



FORMULÁRIO PARA RELATÓRIO FINAL

1. Identificação do Projeto

Título do Projeto PIBIC/PAIC

Análise da influência da radiação gama na composição das partes aéreas de *Vitex agnus castus*

Orientador

Geone Maia Corrêa

Aluno

Anderson Gonçalves de Oliveira Costa

2. Informações de Acesso ao Documento

2.1 Este documento é confidencial?

SIM

NÃO

2.2 Este trabalho ocasionará registro de patente?

SIM

NÃO

2.3 Este trabalho pode ser liberado para reprodução?

SIM

NÃO

**2.4 Em caso de liberação parcial, quais dados podem ser liberados?
Especifique.**



3. Introdução

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

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

A descoberta de produtos naturais biologicamente ativos está ligada intimamente à comunidade científica mundial. Um aspecto importante no uso dos extratos vegetais que contém metabólitos secundários é sua ação frente a vários microrganismos patogênicos. O controle de qualidade desses extratos é indispensável para avaliar se os produtos permanecem inalterados durante seu prazo de validade, prevenindo efeitos indesejáveis a sociedade. Dessa forma, alguns métodos químicos são adotados para esterilizar e reduzir a contagem microbiana. Entretanto, ao contrário dos métodos químicos, o processo de esterilização por irradiação gama, até uma determinada dosagem, não deixa nenhum resíduo tóxico que possa causar dano à saúde. Porém, de acordo com a legislação brasileira, a utilização de métodos para eliminar contaminantes deve ser estudada quanto a possibilidade de alterações da matéria prima. Isso se deve ao fato de que substâncias químicas e/ou biológicas presentes nos vegetais também poder ser afetadas, causando diminuição nos seus teores (SANTOS, 2008).

Dessa forma, além de se avaliar quimicamente o óleo essencial e o extrato das folhas de *Vitex agnus castus* L., submetidos a radiação gama, este projeto tem como objetivo verificar a toxicidade destas amostras frente ao microcrustáceo *Artemia salina*.

JUSTIFICATIVA



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

RELATÓRIO FINAL PIBIC/PAIC 2015-2016



UFAM

Torna-se importante estabelecer as condições experimentais para a radioesterilização de produtos fitoterápicos. No Brasil, a radioesterilização está prevista na legislação, mas é pouco difundida (ANVISA, 2001). Uma das razões é a resistência do consumidor devida à desinformação principalmente sobre a segurança do processo, qualidade nutricional do produto irradiado e métodos confiáveis de detecção que possam ser empregados como padrão (BRUHN, 1998; LEAL, 2004). A exigência da legislação e do mercado consumidor pela correta rotulagem de produtos radioesterilizados tem estimulado o estudo de métodos de identificação desses produtos para evitar a re-irradiação, controlar a dose absorvida, verificar o cumprimento dos níveis mínimos de exigência microbiológica, além de contribuir para o maior controle e ampliação do mercado internacional (BOGL, 1989; SCHREIBER *et al*, 1993).

Em 1983, a comissão do *Codex Alimentarius* aprovou a radioesterilização de alimentos a doses abaixo de 10 kGy, o que vem sendo obedecida em 37 países. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprovou em 2001 radioesterilização de alimentos a doses não estipuladas (ANVISA, 2001), desde que sejam suficientes para alcançar a finalidade pretendida e não comprometer a integridade do produto. Em 2004, a ANVISA exigiu o registro de controle de qualidade de medicamentos fitoterápicos, incluindo a pesquisa de eventuais alterações estruturais da matéria-prima (droga vegetal) (ANVISA, 2004).

A Companhia Brasileira de Esterilização atende aos maiores produtores de fitoterápicos instalados no país, mas que preferem não divulgar ao público que estão empregando essa técnica por temerem possíveis rejeições pelos consumidores (GIURLANDI, 2001). O Instituto de Defesa do Consumidor alerta sobre novos estudos que relatam produtos radiolíticos nocivos ao ser humano, formados a partir de reações tanto de lipídeos com oxigênio molecular quanto de decaimento causado pelos efeitos diretos e indiretos da radiação (SCHREIBER *et al*, 1993). Nesse sentido, a avaliação da composição química de extratos, frações e constituintes isolados de *Vitex agnus castus* submetidos a diferentes energias de irradiação fazem-se necessários ao desenvolvimento de fitoterápicos esterilizados e isentos de agentes contaminantes.

A descoberta de produtos naturais biologicamente ativos está ligada intimamente à comunidade científica mundial. Vários trabalhos na literatura reportam potenciais terapêuticos para as plantas na forma *in natura*, de extratos ou de produtos naturais (SOUZA *et al*, 2004). As etapas e requerimentos para descoberta, desenvolvimento e comercialização de produtos naturais estão descritas amplamente na literatura (BAYTOP, 1984). Historicamente, os produtos naturais são



considerados como a principal fonte de princípios ativos, sendo que mais de 90% das classes terapêuticas disponíveis atualmente no mercado são derivadas de protótipos naturais (BAYTOP, 1984), justificando a importância dos trabalhos com plantas.

Desta forma, a avaliação da composição química das folhas e do óleo essencial de *Vitex agnus castus* aliados a avaliações farmacológicas poderão contribuir para o desenvolvimento de novos fitoterápicos ou, por outro lado, determinar constituintes químicos tóxicos e que apresentem efeitos indesejáveis à saúde da população.

4. Objetivos

4.1 Objetivo geral

Avaliar o perfil químico do extrato bruto, frações e do óleo essencial de *Vitex agnus* submetidos a processos de radioesterelização.

4.2. Objetivos específicos

- ✓ Obter os constituintes químicos voláteis de *Vitex agnus castus* por hidrodestilação;
- ✓ Obter extrato bruto e frações das folhas da espécie estudada;
- ✓ Verificar o potencial citotóxico do óleo essencial e do extrato bruto das folhas do material estudado.
- ✓ Comparar por meio de cromatografia de camada fina o perfil químico dos extratos e frações radiados e não radiados.

5. METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

Coleta do Vegetal

A coleta do material vegetal (folhas, ramos e flores) de *Vitex agnus castus* L. (alecrim do note) foi feita na região urbana de Itacoatiara, no mês de março de 2015.

Extração dos óleos essenciais

O óleo essencial de *Vitex agnus castus* L. foi obtido por hidrodestilação das folhas, ramos e flores frescas, em aparelho de Clevenger durante seis horas de extração. Em seguida, o óleo obtido foi centrifugado por 10 minutos a 3500 rpm para separação e retirada da água. Manteve-se o óleo



obtido de *Vitex agnus castus* L. em frasco âmbar tampado sob refrigeração para análises químicas posteriores.

Análise em CG-EM

O óleo extraído foi submetido à análise em CG-EM em equipamento SHIMADZU acoplado a espectrômetro de massas SHIMADZU QP2010. Para cromatografia dos componentes foi empregada coluna DB-5MS, com 30 m x 0,25mm, espessura do filme interno de 0,25µm. A identificação dos constituintes foi feita por interpretação de seus respectivos espectros de massas e índice de retenção linear (Índice de Kovat's), além de comparação com dados da literatura. Essa análise foi realizada em parceria com a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP.

Teste de citotoxicidade em *Artemia salina*

Para o teste de citotoxicidade seguiu-se a metodologia descrita por Meyer et al (1982), onde os cistos de *A. salina* foram incubados em solução salina (10 mg de cistos/100 mL de solução). Após 24 h sob iluminação artificial a 28 °C, os náuplios de *A. salina* (primeiro estágio larval) foram transferidos para outro aquário contendo solução salina e mantidos em nova incubação por mais 24 h sob iluminação artificial a 28 °C, obtendo-se apenas metanáuplios de *Artemia salina* denominados de cultura pura.

O óleo essencial obtido no mês de março foi diluído em DMSO nas concentrações de: 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 e 32 µg/mL. Em seguida, as amostras previamente diluídas foram adicionadas em alíquotas de 5,0 mL de solução salina (solução 37% de sal marinho) e, posteriormente, a solução fora acrescida de 10 larvas de *A. salina* por tubo de ensaio. Os testes foram realizados em quintuplicata. As culturas de *A. salina* foram incubadas a 28 °C. Após 24 h os microcrustáceos imóveis ou depositados no fundo do tubo de ensaio serão considerados como mortos.

Os números de sobreviventes e de mortos foram determinados em porcentagens de mortos e, posteriormente, esses valores foram tratados através de análise estatística pelo programa de Probitos Analysis) para determinar DL₅₀ (FINNEY, 1971).

Preparação do Extrato

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

Preparo e fracionamento do extrato



Foram transferidos aproximadamente 590 gramas do material seco e triturado para um balão de 12 L seguido de adição de 2,5 L de etanol (70%), posteriormente fez-se a extração por um período de 24 horas. A mistura foi aquecida, após esfriar, a fase alcóolica foi filtrada para um erlenmeyer. Este processo foi repetido até que se tivesse extraído o máximo possível das substâncias. Para retirada do solvente, o material extraído foi concentrado em evaporador rotatório. Ao final do processo de retirada do solvente, dividiu-se o extrato em duas porções. Uma porção (600 mL) para obtenção do extrato bruto seco e outra para fracionamento através da técnica de partição líquido-líquido com solventes em ordem crescente de polaridade, tais como: Hexano (VT-01), diclorometano (VT-02), acetato de etila (VT-03) e butanol (VT-04). Ao final cada fração foi concentrada e enviada para serem irradiadas.

Irradiação

A irradiação das amostras foram realizadas no Laboratório de Irradiação Gama (Comissão Nacional de Energia Nuclear do CDTN em Belo Horizonte-MG), sob orientação do Dr. Márcio Tadeu Teixeira. A irradiação foi realizada em aparelho de Gama – Cell com fonte de ^{60}Co a doses variáveis de 1, 5, 10 e 20 kGy.

Prospecção fitoquímica

Caracterização de constituintes fenólicos

Para preparo da solução estoque pesou-se aproximadamente 30mg do extrato bruto seco e das frações acetato de etila, butanol e hidroalcóolica. Em seguida cada fração foi extraída com diclorometano para retirada de clorofila. A fração diclorometano foi filtrada e armazenada para testes posteriores. Ao material não solúvel foram adicionados 30 mL de metanol (70%), em seguida o material obtido foi transferido para um balão volumétrico de 100 mL. O volume foi completado com metanol (70%) com ajuste de pH das solução estoque para 4. Alíquotas de cada fração obtida, foram separadas em seis tubos de ensaio contendo 5 mL para realizar os seguintes testes:

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

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

Teste para leucoantocianidinas, catequinas e flavonas: aos tubos 5 e 6 foram feitos ajustes de pH. O tubo cinco a pH 3 e o tubo seis a pH11. Com auxílio de um bico de Bunsen aqueceu-se,



cuidadosamente, cada tubo por aproximadamente 3 minutos. Observou-se qualquer mudança na coloração, por comparação aos tubos correspondentes utilizados no teste anterior (MATTOS,2001).

Caracterização de terpenos

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

Teste para saponinas

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

Teste confirmatório para saponinas

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

Avaliação em placas cromatográficas

Para realização de ensaio em placas cromatográficas primeiramente foi preparado as soluções estoque das amostras submetidas em diferentes doses de radiação e não irradiadas, solubilizando 10 mg do extrato bruto seco (VT) e das frações em Hexano (VT01), em Clorofórmio (VT02), em Acetato (VT03), em Butanol (VT04) e Hidroalcolica (VT05)) em 1 mL de solventes compatíveis para as diluições das amostras. As placas utilizadas possuem uma corrida cromatográfica de 4,5 cm. Para eluição das substâncias foram utilizados os seguintes gradientes: Acetato de etila, Ácido fórmico, Ácido acético e água na proporção (10:1,1:1,1:2,6), e Hexano:Acetato de etila nas proporções (9:1) para amostras apolares e (7:3) para amostras com maior polaridade. Os reveladores utilizados foram NP/PEG e Valinina.

Teste de Atividade contra o *Trypanosoma cruzi*

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



No ensaio com formas tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi* provenientes de cultura de tecido, cerca de 4.000 células L929 por poço foram semeadas em placas de 96 poços, seguindo incubação durante a noite em estufa, a 37 °C, para a adesão da célula à superfície. Após incubação, a infecção foi feita com 10 tripomastigotas provenientes de cultura de tecidos/célula, durante 2 h. Após esse período, o meio contendo os parasitas extracelulares foram substituído por meio novo e a placa novamente incubada a 37 °C durante 48 h. As amostras diluídas nas concentrações de **20 e 10 µg/ mL** foram incubadas, e após incubação a 37 °C por 96 h foi adicionado o substrato CPRG aos poços. A placa foi novamente incubada a 37 °C e a leitura realizada após 16-20 h em espectrofotômetro utilizando-se um filtro de 570 nm. Simultaneamente, os seguintes controles foram utilizados: células não infectadas, células infectadas não tratadas, benzonidazol a 1 µg/mL (controle positivo) e DMSO diluído em meio a uma concentração final de 1% (controle negativo). Os resultados foram expressos por porcentagem de redução da absorbância dos poços experimentais em comparação com a absorbância dos poços contendo células infectadas não tratadas. Este ensaio foi realizado em parceria com o Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ-MG.

6. Resultados e Discussões

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

O óleo essencial obtido apresenta-se com uma cor amarelo claro, e um odor característico da espécie. Para o mês de março de 2015, obteve-se rendimento de 0,155%. Conforme descrito por Gobbo - Neto & Lopes (2007) a época em que uma droga é coletada é um dos fatores de maior importância, visto que a quantidade e, às vezes, até mesmo a natureza dos constituintes ativos não é constante durante o ano.

Após análise do óleo essencial obtido de *Vitex agnus castus* foi observado que o mesmo apresentou o 1,8-Cineol como constituinte majoritário. Outros compostos foram detectados nas análises, porém somente alguns encontraram-se em concentrações maiores, como mostra a (Tabela 1). A identificação dos constituintes foi feita através da interpretação de seus respectivos espectros e calculando-se o índice de retenção linear (índice de Kovat's) (Tabela 1), comparando-os com a literatura.

Componentes identificados no mês de março 2015/ Área (%)	Área (%)	IR _{cal}	IR _{tab}
---	-------------	-------------------	-------------------

1,8- Cineol	42.11	1044	1031 ^A
Biciclo[3.1.1]hept-2-eno, 2,6,6-trimetil	1.38	947	NI
Sabineno	5.88	987	969 ^A
beta.-Mirceno	2.04	1003	991 ^B
gama.-Terpineno	2.18	1070	1062 ^C
3-Ciclohexen-1-ol, 4-metil-1-(1-metiletil	8.24	1191	NI
3-Ciclohexeno-1-metanol, .alfa.,.alfa.,4	5.33	1205	NI
<alfa> Terpinil acetato	6.76	1357	1346 ^A
trans-Cariofileno	3.66	1432	1419 ^B
1,6,10-Dodecatrieno, 7,11-dimetil-3-metileno	5.46	1466	NI
Biciclo,germacreno	3.14	1507	1487 ^D
.tau -Cadinol	1.60	1651	NI

A= ADAMS 2007;

B= TORRES *et al* 2008;

C= TELASCREA *et al* 2008;

D= COSTA *et al* 2008;

NI= Não Identificado

Teste de citotoxicidade em *A. salina*

Meyer e colaboradores avaliando extratos vegetais determinaram que extratos com valores da CL₅₀ menores que 1000 µg/mL no ensaio de citotoxicidade com larvas de *A. salina* eram considerados tóxicos. Dolabela (1997) avaliando CL₅₀ em larvas de *A. salina* de extratos brutos e substâncias puras propôs que substâncias cuja DL₅₀ estiverem na faixa de 80 µg/mL < DL₅₀ > 250 µg/mL podem apresentar atividade tripanomicida, por outro lado, substâncias com toxicidade DL₅₀ < 145 µg/mL podem apresentar atividade anti-tumoral.

Após tratar os valores em programa Probitos Analysis determinou-se que a DL₅₀ para o óleo essencial obtido é de 11,14 µg/mL. Dessa forma, considerando as afirmações acima descritas, o óleo essencial obtido é considerado tóxico para *A. salina* e, possivelmente poderá ter correlação para atividade antitumoral. É descrito na literatura que o composto majoritário do óleo essencial de *Vitex*



agnus castus é o terpeno 1,8-Cineol e que este seja, possivelmente, o principal responsável pela atividade citotóxica, não descartando o efeito de outros constituintes presentes.

Rendimento de extrato bruto seco e frações

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

Prospecção fitoquímica para constituintes fenólicos

Para os testes de constituintes fenólicos, no extrato bruto seco e nas frações submetidas aos testes fitoquímicos, observou-se, no tubo número 1, uma mudança de coloração e formação de precipitado e nos tubos 3, 4 e 6 notou-se uma mudança de coloração. Segundo MATTOS (2001), tais resultados são indicativos da presença das classes de taninos condensados, flavonas, flavonóis e xantonas, respectivamente. Para os demais tubos observou-se um resultado negativo para as classes analisadas. No entanto, o resultado não implica necessariamente que não há presença dessas classes de metabólitos secundários, sendo possível que a quantidade dos mesmos esteja em baixa concentração não sendo o suficiente para serem detectadas.

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

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

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



Caracterização de terpenos

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

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

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

Teste para saponinas

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

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

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

Análise em placas cromatográficas



Para as placas em que se utilizaram vanilina como revelador, ao aquecê-las por aproximadamente 5 minutos, observou-se nas frações VT-01 e VT-02 manchas com colorações que variaram entre rosa escuro a avermelhado e roxo. Tais colorações são indicativos das classes de esteroides/triterpenoides e iridoides, respectivamente (BARRETO, 2004). Porém, não foi observado mudança no perfil químico nas amostras irradiadas como mostram as Figuras (1) e (2), em anexo.

Utilizando-se NP/PEG como revelador, observou-se a mesma em câmara Ultravioleta a 365 nm (Figura 5). Manchas de fluorescência alaranjada, amarela ou verde foram usadas como critério da evidência da presença de flavonoides (BARRETO, 2004). No entanto, não foi perceptível mudança quanto ao perfil químico das amostras irradiadas em diferentes doses de radiação quando comparadas as amostras não irradiadas, como mostram as Figuras (3) e (4), em anexo.

Teste para atividade contra *Trypanosoma cruzi*

Das amostras analisadas em atividade tripanocida para formas tripomastigotas de *T. cruzi*, o extrato bruto e as frações hidroalcóolica e butanólica mostraram-se inativas. No entanto, as frações em hexano e em diclorometano apresentaram sobre o parasita IC₅₀ de 17,4 e 22,2 µg/L, respectivamente, e sobre as células IC₅₀ de <40 e <80 µg/L. Como padrão tem-se o benzonidazol que sobre o parasita apresenta IC₅₀ de 1 µg/L, e sobre a célula IC₅₀ de 625 µg/L, o tornando bastante seletivo. O resultado apresentado nos permite dizer que, possivelmente, as frações em hexano e em diclorometano são pouco seletivas, uma vez que os mesmos conseguem atingir tanto as células quanto os parasitas em concentrações próximas.

Analisando a atividade tripanocida para formas tripomastigotas de *T. cruzi* de terpenos isolados, Lima (2014) constatou que esta classe de compostos apresenta uma capacidade inibitória satisfatória frente ao parasita. Isto, possivelmente, explica a atividade identificada para os extratos em hexano e em diclorometano analisados, uma vez que através do ensaio de Lieberman-Buchard obteve-se um resultado sugestivo para a classe de terpenos.



UFAM

Agradecimentos

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

7. Bibliografia Citada

- ADAMS, R.P. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. Allured Publishing Corporation. (2007).
- ANVISA. Resolução N° 21, de 26 de janeiro de 2001.
- ANVISA. Resolução RDC N° 48, de 16 de março de 2004.
- BARRETO, L.C.L.S. **Estudo farmacognóstico e determinação da atividade biológica de *Vitex gardneriana shauer* (Verbenaceae)**. 2004. 114f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Departamento de Ciências Farmacêuticas/Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2004.
- BARRETO, L.C.L.S. et al, 2007. Atividade moluscicida de extratos de aucubina de *Vitex gardneriana shauer* (Verbenaceae) em embriões de *biomphalaria glabrata*. **Lat. Am. J. Pharm.** v. 26, 339:43.
- BAYTOP, T. 1984. *Therapy with Medicinal Plants in Turkey (Past and Present)*. **Istanbul, Publications of Istanbul University**. No: 373-3255. 1984.
- BÖGL, K.W. 1989. **Appl. Radiat. Isot.** 40, 1203. 1989
- BRUHN, C.M. et al. 1998. **Radiat. Phys. Chem.** 52, 29. 1998
- BRUM, T. F. et al. 2011. Análise fitoquímica preliminar das folhas de *Vitex megapotamica* (Sprengel) Moldenke. **Ahead of print.** v. 37, n.2, p. 57-62.
- Buckner, F. S. et al, 1996. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase. **Antimicrob Agents Chemother** 40: 2592-2597.



UFAM

- CHEN, S.-N. *et al.* 2011. Phytoconstituents from *Vitex agnus castus* fruits. **Fitoterapia**. Elsevier. Vol. 82, p. 528-533.
- COSTA, V. C. O. *et al.* 2008. Composição química e modulação da resistência bacteriana a drogas do óleo essencial das folhas de *Rollinia leptopetala* R. E. Fries. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Brazilian Journal of pharmacognosy.
- DAS, Swarnamoni; KANODIA, Lalit. 2013. Effect of ethanolic extract of leaves of *Vitex negundo* L. on acetic acid induced colitis in albino rats. **Asian Journal of pharmaceutical and Clinical Research**. v. 6.
- Dolabela, M.F. 1997. Triagem “in vitro” para atividade antitumoral e antitrypanossoma cruzi de extratos vegetais, produtos naturais e substâncias sintéticas. Belo Horizonte: ICB-UFMG, 130p. (Dissertação de mestrado em ciências biológicas-Farmacologia).
- FINNEY, D.J. 1971. Probits analysis, 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 77p.
- GIURLANDI, S. 2001. **Brasil Nuclear**. 8, 2246. 2001.
- GOBBO – NETO, L; LOPES, N. P., 2007. Plantas Medicinais: Fatores de Influência no Conteúdo de Metabólitos Secundários. **Química Nova**, Vol.30.
- LEAL, A. S.; RODRIGUES, I.; SCHOR, H. H. R. 2004. **Quim. Nova**.27, 488. 2004
- LIMA, G. S. **Estudo da atividade tripanossomicida e leishmanicida de extrato, frações e terpenos de *Croton cajucara* Benth.** 2014. 76f. Tese (Doutorado em Patobiologia Animal)- Programa de Pós-Graduação em Ciência, Tecnologia, e Inovação em Agropecuária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.
- MACIEL, M.A.M. *et al* 2002. Plantas Medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova** 25: 429-438.
- MAIA, A.C.C.M. *et al* 2001. *Vitex agnus castus* L: Um Estudo Etnobotânico e Etnofarmacológico, **Revista Virtual de Iniciação Acadêmica da UFPA**. Paraná, Vol. 1, nº 2, p. 1-15.
- MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil**. 2. ed. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2001. 346p.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

RELATÓRIO FINAL PIBIC/PAIC 2015-2016



UFAM

- MEYER, B.N. et al 1982. Brine Shrimp: a convenient general bioassay for activity plant constituents. *Planta Med* 45: 31-34.
- OLIVEIRA, R.B. et al. 2006. Arylfurans as potential *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase inhibitors. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 101: 169-173, 2006.
- Resolução RDC-nº 21, de 26 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico para Irradiação de Alimentos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, DF. Diário Oficial da União, 29 de janeiro de 2001.
- ROCHA, W. S. et al. 2011. Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do cerrado. **Rev. Bras. Fruct.** São Paulo. Vol. 33, nº 4, p. 1215-1221.
- SANTOS, G.H.F. Influência da radiação gama em extratos vegetais ricos em taninos. 2008. 93f. Dissertação (Mestrado em Ciências)- Centro de Tecnologia e Geociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2008.
- SCHENKEL, E.P. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento** .3 ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS/Ed. UFSC, 2001. cap.27, p.597-619.
- SCHREIBER, G. A. et al. 1993. **Int. J. Radiat. Biol.** 63, 105. 1993.
- SCHREIBER, G. A. et al. 1993. **Int. J. Radiat. Biol.** 63, 105. 1993.
- SOUZA, A.Q.L. et al 2004. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. *Acta Amazônica*, 2: 185 – 195.
- TELASCREA, M. et al. 2008. Essential oils from leaves of *Cryptocarya* spp from the atlantic rain forest. **Química Nova**, Vol. 31, nº 3, 503-507.
- TORRES, R. N. S. 2008. Constituintes voláteis de própolis piauiense. **Química Nova**, Vol. 31, nº 3, 479-485, 2008.

