

## Avaliação do potencial antioxidante e compostos fenólicos de *Vitex megapotamica* (Spreng.) Moldenke.

## Evaluation of antioxidant potencial and phenolic compounds of *Vitex magapotamica* (Spreng.) Moldenke.

### RESUMO

A *Vitex megapotamica*, tem as folhas usadas na medicina popular em infusões como diuréticos e depurativo do sangue, hipertensão arterial, anti-inflamatória e expectorante. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antioxidante de extratos de *V. megapotamica*. As suas folhas foram coletadas no município de Vera Cruz do Oeste (PR). Para as análises foram preparados extratos em diferentes solventes (água, solução hidroalcoólica 70 % (p/v), acetona, acetato de etila, etanol e hexano). A quantificação dos compostos fenólicos totais (FT) foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu, já a avaliação da atividade antioxidante do extrato foi realizada pelos métodos de captura do radical livre DPPH em TEAC. Além disso, foi realizado análise por HPLC, como também o teste antimicrobiano do mesmo, utilizando *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Para FT os valores encontrados foram 128,0; 18,0; 0,5; 4,9; 1,0 e 0,1 mg.g<sup>-1</sup> e para o DPPH os valores obtidos foram 27400,0; 2260,0; 5077,0; 5093,3; 5110,0; 4293,3µg TEAC g<sup>-1</sup> para os extratos, respectivamente. Já no teste antimicrobiano o resultado obtido foi positivo na concentração 10 mg.mL<sup>-1</sup> de extrato para a *S. aureus*. Assim os dados obtidos mostraram elevados níveis de compostos fenólicos e atividade antioxidante, possibilitando diversas aplicações industriais.

**PALAVRAS-CHAVE:** Compostos bioativos. Extratos vegetais. Anti-inflamatório. Planta Medicinal.

### ABSTRACT

*Vitex megapotamica*, has the leaves used in folk medicine for infusions such as diuretics and purifying blood, high blood pressure, anti-inflammatory and expectorant. Thus, the objective of this work was to evaluate the antioxidant potential of *V. megapotamica* extracts. Its leaves were collected in Vera Cruz do Oeste (PR). For the analyzes extracts were prepared in different solvents (water, 70% (w / v) hydroalcoholic solution, acetone, ethyl acetate, ethanol and hexane). The total phenolic compounds (FT) quantification was performed by the Folin-Ciocalteu method, while the antioxidant activity of the extract was evaluated by the DPPH free radical capture methods in TEAC. In addition, HPLC analysis and antimicrobial testing were performed using *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. For FT the values found were 128.0; 18.0; 0.5; 4.9; 1.0 and 0.1 mg g<sup>-1</sup> and for DPPH the values obtained were 27400.0; 2260.0; 5077.0; 5093.3; 5110.0; 4293.3µg TEAC g<sup>-1</sup> for the extracts, respectively. In the antimicrobial test, the obtained result was positive in the concentration 10 mg / mL extract for *S. aureus*. Thus the data obtained showed high levels of phenolic compounds and antioxidant activity, enabling several industrial applications.

**KEYWORDS:** Bioactive compounds. Plant extracts. Anti-inflammatory. Medicinalplant.

**Lorelay da Silva Oliveira**  
[lorelaysilvaoliveira@gmail.com](mailto:lorelaysilvaoliveira@gmail.com)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil

**Ricardo Fiori Zara**  
[ricardozara@utfpr.edu.br](mailto:ricardozara@utfpr.edu.br)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil

**Tatiana Shioji Tiunan**  
[tatianatiunan@utfpr.edu.br](mailto:tatianatiunan@utfpr.edu.br)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil

**Euclides Lara Cardozo**  
[euclideslcrj@gmail.com](mailto:euclideslcrj@gmail.com)  
Empresa SUSTENTEC, Pato Bragado, Paraná, Brasil

**Cristiane Loiva Reichert**  
[cris\\_loiva@yahoo.com.br](mailto:cris_loiva@yahoo.com.br)  
Empresa SUSTENTEC, Pato Bragado, Paraná, Brasil

**Recebido:** 19 ago. 2019.

**Aprovado:** 01 out. 2019.

**Direito autoral:** Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



## INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade o homem vem buscando na flora, em sua ampla biodiversidade, a cura de diversas patologias. As primeiras civilizações as usavam instintivamente, através de infusões e decocções, pois não haviam informações suficientes para identificar os mecanismos de ação e realizar extrações complexas de compostos, comprovando cientificamente a qualidade das mesmas (CALIXTO; SIQUEIRA JUNIOR, 2008).

Uma das plantas que vem sendo estudada é a *Vitex magapotamica* (Spreng.) Moldenke, também conhecida como *Vitex taruma*, *V. montevidensis* e *V. bignonioides*. Essa planta é pertencente a família Lamiaceae (ex-Verbenaceae) e popularmente conhecida como tarumã, tarumã-preto, sombra de touro, azeitona brava, cinco folhas e azeitona do mato (ALICE, 1995). Essa espécie tem ocorrência confirmada no nordeste, centro-oeste, sudeste e nas florestas do sul do Brasil, como também no Paraguai, nordeste da Argentina e no Uruguai (Vitex, 2016).

A *Vitex magapotamica* (Spreng.) Moldenke se apresenta como uma árvore caducifólia, que varia de 3 a 10 metros de altura, que possui tronco tortuoso e ramificado (CARDOSO, 2004). As suas folhas são utilizadas na medicina popular, em infusões, como diuréticos, depurativo do sangue, tratamento de hemorroidas, tratamento de hipertensão arterial, anti-inflamatório e expectorante. As prospecções fitoquímicas realizadas nas folhas da *V. megapotamica* mostraram resultados positivos para presença de fenóis, taninos, flavonóis, xantonas, heterosídeos antociânicos, heterosídeos cardioativos, flavanonas e cumarinas (BRUM et al., 2011).

Dessa forma, o objetivo desta pesquisa foi avaliar o potencial antioxidante de extratos de *Vitex megapotamica*, obtidas no município de Vera Cruz do Oeste no Paraná, extraídos com diferentes solventes, além de avaliar o teor de compostos fenólicos totais e de flavonoides presente em suas folhas.

## METODOLOGIA

As folhas de *V. megapotamica* foram coletadas no município de Vera Cruz do Oeste no Paraná, passou por processos de identificações e então suas folhas foram secadas a temperatura ambiente por 30 dias, triturados e moído de facas e armazenados em embalagem protegidos da luz e umidade. Para o preparo do extrato bruto foram utilizados seis solventes com polaridades diferentes (água, álcool 70%, acetona, etanol 99, acetato de etila e hexano) a fim de se determinar qual apresentaria melhor extração de compostos com atividade antioxidante e maior extração de compostos fenólicos. Para isso, pesou-se 1 g de extrato seco e diluiu-se em 10 mL de solvente, essas soluções foram agitadas por 1 hora e filtradas a vácuo separadamente. Os filtrados foram transferidos para o rotaevaporador, e após todo o processo de evaporação teve o seu volume completado com 20 mL de etanol 70% para solventes orgânicos, e 20 mL de água no extrato aquoso.

As amostras obtidas passaram por testes de DPPH, método que utiliza o princípio da captura do radical livre 2,2-difenil-1-picrihidrazila. Para isso, preparouse os padrões de Trolox ((6-hydroxy-2,5,7-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) pesando 25 mg de padrão Trolox e diluindo esse em balão volumétrico de 50 mL com etanol (concentração final da solução estoque de 500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Essa solução

foi diluída em cinco concentrações, sendo elas 25, 125, 250, 375 e 500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Posteriormente pipetou-se 30  $\mu\text{L}$  de cada concentração de padrão para tubos de ensaio, adicionando-se 2,0 mL de solução de DPPH (0,06  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) mantendo as soluções em ao abrigo da luz por 60 minutos. Pipetou-se 0,5 mL do extrato em um tubo de ensaio, com 2,0 mL da solução de DPPH, deixando as amostras em repouso por 60 minutos ao abrigo da luz. Paralelamente, um preparo do branco seguiu igualmente ao das amostras, mas com a ausência de extrato. A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 517 nm e os resultados do DPPH foram expressos em  $\mu\text{g}$  de atividade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC)/ g de extrato.

As amostras também passaram por análises de fenólicos totais, realizados pelo método de Folin Ciocalteu. Para isso, preparou-se uma solução estoque de ácido gálico, foi pesado 20 mg de padrão de ácido gálico e diluído em balão volumétrico de 100,0 mL com água destilada resultando em uma solução com concentração de 200  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Essa solução foi diluída para obter as concentrações de 5,0/7,5/10,0/14,0/17,0/20,0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . A partir das soluções coletou-se uma alíquota de 2,0 mL e transferiu para tubos de ensaio protegidos da luz. Em seguida foram adicionados 2,5 mL do reagente Folin Ciocalteu, e a mistura permaneceu em repouso de 3 a 8 minutos. Logo após, foi adicionado 2,0 mL de carbonato de sódio 4% e os tubos foram deixados em repouso por 1 hora, ao abrigo da luz. As amostras e o branco foram preparados seguindo as mesmas quantidades e ordem dos reagentes, mudando apenas os 2,0 mL iniciais, no branco adiciona-se álcool 70% e na amostra adicionou-se os diferentes extratos obtidos. Mediu-se a absorbância em espectrofotômetro a 760 nm e os resultados obtidos foram expressos em equivalente de ácido gálico (mg EAG por 100,0 g de extrato).

Com os resultados obtidos selecionou-se o melhor solvente para extração dos componentes presentes na planta, este extrato foi liofilizado. O material liofilizado foi analisado em HPLC, para a verificação da presença de compostos de interesse (vitexina e isotexina). Para isso, preparou-se uma solução com concentração de 1,42  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  com água mili-Q, dissolveu-se em ultrassom por 40 min e a solução foi filtrada (filtro Millex com 0,45 micras e 13 mm, feito de PTFE), para então ser injetada em HPLC Thermo Fisher Ultimate 3000 LC system equipado com coluna Zorbax Eclipse XDB-C18 4,6X250 mm e 5  $\mu\text{m}$ , e detector de UV-Vis. As condições cromatográficas estão descritas na Tabela 1. A identificação dos compostos de interesse (vitexina e isotexina) foi realizado por comparação dos tempos de retenção e espectros de UV-Vis, para isso foi utilizado uma mistura dos padrões e analisados nas mesmas condições que os extratos. Foram acompanhados em quatro comprimentos de onda diferentes, sendo eles 254, 360, 280 e 220 nm.

Tabela 1 – Método utilizado na análise do HPLC

Tempo de corrida (min)	Gradiente de água acidificada com ácido fosfórico 0,1% (%)	Gradiente de metanol (%)	Fluxo da fase móvel (mL/min)	Temperatura (°C)
0	95	5	1	30
60	5	95	1	30
75	5	95	1	30
80	95	5	1	30
90	95	5	1	30

Fonte: Autoria própria (2019).

Por fim, com o material liofilizado realizou-se o teste antimicrobiano com duas espécies diferentes de bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25922 pelo método dos poços por microplacas. O teste foi realizado em triplicata adicionando 100 µL de meio Mueller Hinton, 100 µL extrato aquoso com a concentração de 10 mg.L<sup>-1</sup> e 10 µL de microrganismo padronizado com a escala de mcfarland e diluído a uma concentração de 10<sup>4</sup> unidades. Na mesma microplaca realizou o teste controle com um antibiótico (ampicilina) a uma concentração de 1 mg.mL<sup>-1</sup> seguindo os mesmos procedimento anteriores, trocando apenas o extrato pela diluição do antibiótico.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

### DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E FENÓLICOS TOTAIS

Os valores obtidos nas análises de DPPH e fenólicos totais nos diferentes solventes estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 – Atividade antioxidante e fenólicos totais de extratos preparados em diversos solventes *Vitex megapotamica*

	Água	Álcool 70%	Acetona	Etanol 99 PA	Acetato de etila	Hexano
DPPH (µg TEAC/ g)	27400,0	2260,0	5077,0	5093,3	5110,0	4293,3
Fenólicos totais (mg de EAG/ g)	128,0	18,0	0,50	4,9	1,0	0,1

Fonte: Autoria própria (2019).

Através dos dados obtidos pode-se notar que o extrato da *Vitex megapotamica* possui um elevado nível de antioxidantes e fenólicos totais, como afirma Mores (2018), podendo essa característica ser mais explorada na indústria farmacêutica e de alimentos. Além disso, o comparativo dos extratos obtidos com diferentes solventes mostra que o extrato aquoso é o qual possui maior atividade antioxidante e maior quantidade de fenólicos totais.

### DETERMINAÇÃO DO PERFIL CROMATOGRÁFICO DA *VITEX MEGAPOTAMICA*

Com o perfil cromatográfico obtido na análise do HPLC comparado com o cromatograma dos padrões analisados não foi possível afirmar a presença de isovitexina e vitexina na forma livre no extrato aquoso da planta. Isso pode ter ocorrido devido ao fato desses compostos estarem na forma glicosiladas, como por exemplo, 2-O- $\beta$ -D-glicopiranosil vitexina. Dessa forma, para obtenção de resultados que confirmem as suspeitas no cromatograma faz-se necessário desenvolvimento de metodologia analítica específica para estes compostos, como a hidrólise das substâncias, ou ainda para a confirmação dos compostos a adição de padrões na amostra para confirmação dos compostos presentes.

### DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

O teste antimicrobiano realizado mostrou que o extrato de *Vitex megapotamica* possui atividade inibitória na concentração de 10 mg.mL<sup>-1</sup>. O teste de confirmação e identificação em placa de petri afirmou que o extrato apenas inibiu o crescimento do microrganismo e não eliminou o mesmo.

### CONCLUSÕES

Os extratos de *Vitex megapotamica* apresentaram melhores resultados de atividade antioxidante (DPPH) quando utilizado água como solvente, o que sugere que os compostos responsáveis por essa atividade do extrato apresentam uma elevada polaridade. Além disso, apresentou boa quantidade de fenólicos totais e ainda ação antimicrobiana para *Staphylococcus aureus*, despertando interesse para novos testes na área e fornecendo características atraentes ao ramo industrial. Estudos mais aprofundados dos compostos presentes nesta planta devem ser realizados.

### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Laboratório Multiusuário Central Analítica (LABCA) pelo suporte. Ao Dr. Euclides Lara Cardozo Junior SUSTENTEC – Produtores associados para desenvolvimento de tecnologias sustentáveis, por fornecer o extrato da planta para as análises. E a Universidade Tecnológica Federal do Paraná, câmpus Toledo, pelo espaço laboratorial e materiais cedido às pesquisas.

### REFERÊNCIAS

ALICE, C. B.; SIQUEIRA, N. C. S.; MENTZ, L. A.; BRASIL e SILVA, G. A. A.; JOSÉ, K. F. D. **Plantas Medicinais de Uso Popular Atlas Farmacognóstico**. Canoas, Ed. ULBRA, 1995. 208 p.

BRUM, T. F.; ZADRA, M.; FROEDER, A. L. F.; BOLIGON, A. A.; FROHLICH, J. K.; ATHAYDE, M. L. Análise fitoquímica preliminar das folhas de *Vitex megapotamica*

(Spreng.) Moldenke. Saúde, Santa Maria, **Ahead of Print**, v. 37, n. 2, p. 57-62, 2011.

CALIXTO, J. B.; SIQUEIRA JUNIOR, J. M. Desenvolvimento de Medicamentos no Brasil: Desafios. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 78, p. 98-106, 2008.

CARDOSO, F. **Árvores de Curitiba**. Editora do Autor, Curitiba, Brasil, 2004.

MORES, S. Avaliação da atividade antioxidante de extratos de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e tarumã (*Vitex megapotamica*). Dissertação (Graduação em Engenharia de Alimentos). Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2018.

*Vitex* in **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <https://reflora.ibri.gov.br/reflora/floradobrasil/FB142>. Acesso em 5 ago. 2019.