

ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Vitex cymosa* BERTERO EX SPRENG. (LAMIACEAE)

Jéssica Ingrid de Moraes SILVA¹

Cecília Veronica NUNEZ²

¹Bolsista PAIC/FAPEAM-INPA; ²Orientadora COTI/INPA

INTRODUÇÃO

A família Lamiaceae Martinov possui 46 gêneros e 518 espécies no Brasil, onde é nativa e possui representantes em todas as suas regiões (Harley 2015). Dentre essa família, destaca-se a espécie *Vitex cymosa* Bertero ex Spreng, sendo conhecido popularmente como tarumeiro, tarumã-do-alagado, tarumã-do-igapó, e jaramantaia. Ocorre na região Amazônica e no Brasil Central até São Paulo e Mato Grosso do Sul em matas ciliares. É uma planta decídua, pois na época de sua floração (de setembro a novembro) fica totalmente despida de sua folhagem. (Almeida 1998; Corrêa 1984; Lorenzi 2002). Santos e colaboradores (2000) isolaram do extrato etanólico das cascas do caule de *V. cymosa* coletadas em Barra da Corda (MA) o esteroide 20-hidroxicdisona e 26-hidroxipinasterona, e do extrato diclorometânico das folhas foi isolado o iridoide não glicosídico tarumal, do extrato butanólicodas folhas os iridoide não glicosídicos viteóide II e agnusídeo, coletadas em Corumbá (MS) (Santos *et al.* 2001). Foram isolados do extrato etanólico dos frutos de *V. cymosa*, coletados em Campo Grande, MS a substância ácido-3,5-di-cafeoilquínico (Leitão *et al.* 2008), e dos extratos das folhas os flavonoides canferol, 3'-*O*-metil-luteolina, luteolina, pachipodol, apigenina, orientina, iso-orientina, vitexina, iso-vitexina, 2''-*O*-cafeoil-orientina, 2''-*O*-*p*-hidroxibenzoil-orientina dos extratos das folhas coletados em Corumbá (MS) (Leitão *et al.* 2011). Os extratos hexânico e metanólico das flores e frutos *V. cymosa* apresentaram atividade inseticida contra *Sitophilus zeamais* (pela via de ingestão) com mortalidade 12 e 17%, respectivamente (dados não publicados, realizado pelo grupo de pesquisa), Não foram encontrados registros de estudos químicos de espécimes coletados na região Norte. Com isso, este estudo visou realizar o fracionamento do extrato metanólico das flores e frutos de *V. cymosa*, a fim de isolar as substâncias presentes. Os extratos foram testados quanto ao potencial antibacteriano sobre *Staphylococcus aureus* e toxicidade sobre *Artemia salina*.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta do material vegetal e preparo dos extratos

O material vegetal de *V. cymosa* (galhos, folhas, flores e frutos) foi coletado na Ilha da Marchantaria, às margens do lago do Catalão (AM), em junho de 2009. Os galhos, folhas, flores e frutos de *V. cymosa* foram secos em estufa a 50 °C por aproximadamente 2 dias e posteriormente triturados em moinho de facas para o preparo dos extratos.

Após a trituração do material vegetal, devido à pouca quantidade de flores e frutos, os mesmos foram reunidos para a preparação dos extratos. Foram preparados os extratos com solventes de polaridade crescente (hexano e metanol), usando ultrassom por 20 min em cada extração. Para a concentração dos extratos foi utilizado o rota-evaporador sob pressão reduzida, em temperatura <50 °C.

Ensaio de toxicidade frente Artemia salina Leach

Segundo metodologia preconizada por Meyer (1982), foi utilizado como meio de crescimento uma solução salina (3,8%), e para a eclosão das larvas, foram utilizados 10 mg de cistos de *Artemia salina*. As condições de crescimento utilizadas para a eclosão dos cistos foram de: temperatura de 25 a 28 °C, e iluminação em lâmpada

fluorescente, durante 48 horas. Após o período de eclosão, as larvas foram transferidas para placas de 24 poços e distribuídas 10 larvas de *A. salina* para cada poço. Em cada placa, foram realizados os controles do meio salino e do solvente, ambos em triplicata. Os ensaios com as amostras também foram realizados em triplicata.

Os extratos foram adicionados aos poços do ensaio na concentração inicial de 1000 µg/mL. As placas com as larvas de *A. salina* foram mantidas por 24 horas sob iluminação de lâmpada fluorescente. Após esse período, avaliou-se o número de larvas sobreviventes.

Ensaio antibacteriano sobre Staphylococcus aureus

O ensaio antibacteriano sobre *Staphylococcus aureus* foi realizado por meio da determinação da concentração inibitória mínima (CIM), em meio líquido, através da técnica de microdiluição. Para isto, foram feitas diluições sucessivas dos extratos (1000 µg/mL até 15,62 µg/mL) em tubos de ensaio, e em seguida, 95 µL de cada diluição foi colocado em cada poço da placa de 96 poços. Foi inoculado o micro-organismo-teste (5 µL), preparado pela escala de (McFarland 0,5) diluído 10 vezes. As placas foram incubadas a 37 °C por 18 a 24 horas. Após esse período, foram inoculados 40 µL de revelador (cloreto de 2,3,5-tri-fenil-tetrazólio) numa concentração de 2 mg/mL em cada poço, e estes incubados novamente por 30 minutos. O ensaio foi realizado em triplicata. Foram utilizados como controles: negativo (solvente utilizado para solubilizar o extrato + micro-organismo); positivo com antibiótico (oxitetraciclina) e esterilidade do caldo (um poço contendo apenas o caldo). A placa foi analisada em leitor de ELISA.

Fracionamento e isolamento (fluxograma 1)

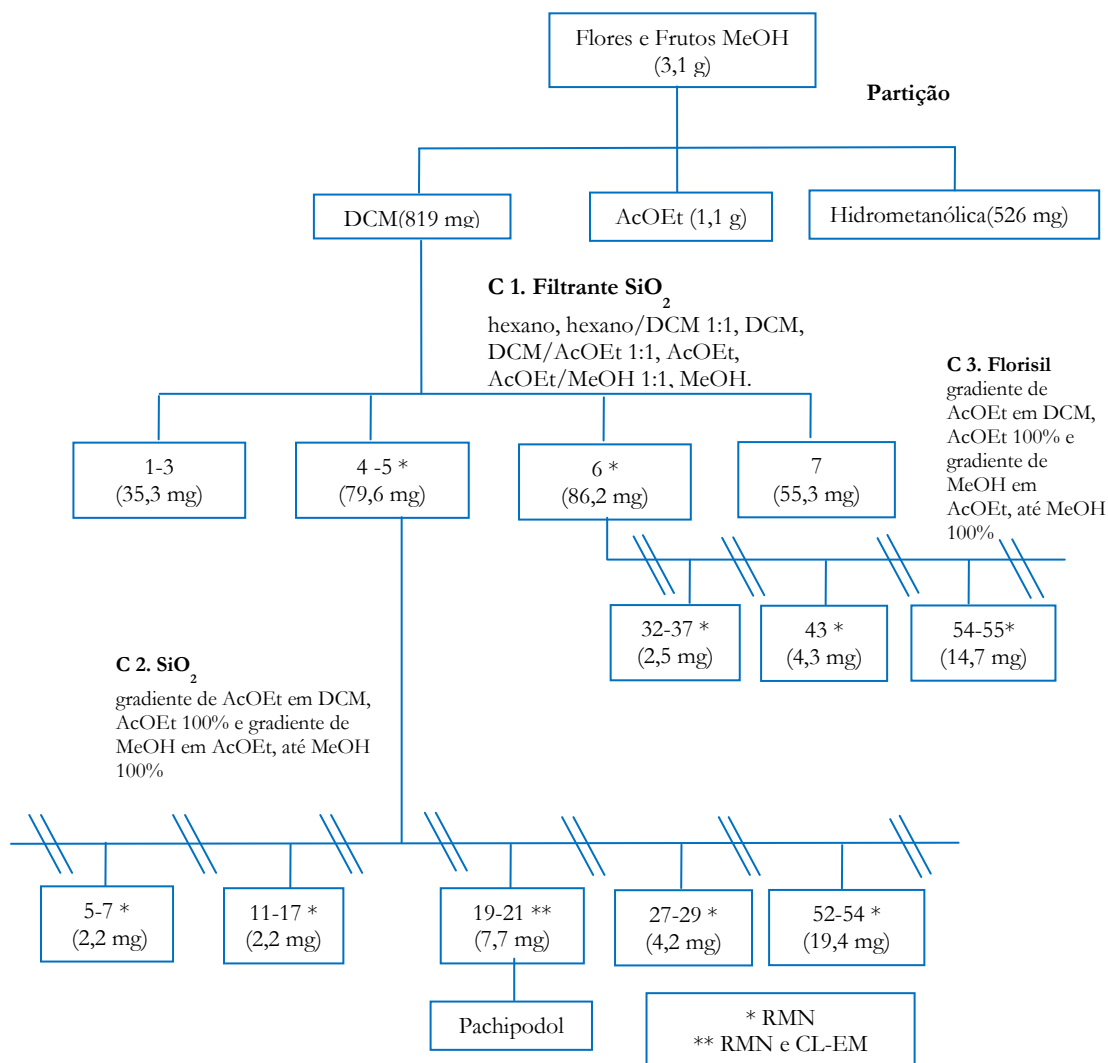
Para o fracionamento, foi realizada uma extração líquido-líquido com o extrato metanólico (MeOH) das folhas, onde foram solubilizadas 8 g do extrato bruto em 140 mL de solução de MeOH/H₂O na proporção 1:1, essa mistura foi colocada em um funil de separação juntamente com 140 mL de Diclorometano (DCM), o funil foi levemente agitado, e após a separação foi retirada a fase DCM, esse procedimento foi realizado quatro vezes e depois foi repetido com o solvente acetato de etila (AcOEt). As três fases obtidas (DCM, AcOEt e MeOH/H₂O,) foram concentradas em rotaevaporador. Também foi realizada uma extração líquido-líquido com o extrato MeOH de flores e frutos (3 g), onde foi seguido o mesmo procedimento da extração acima citada, porém utilizando 100 mL de cada solvente extrator.

Com a fase DCM do extrato MeOH de flores e frutos foi realizada uma coluna filtrante, denominada Coluna 1, onde foram utilizados 224 mg da amostra e 140 g de sílica, e foram utilizados os sistemas de eluição: hexano, hexano/DCM 1:1, DCM, DCM/AcOEt 1:1, AcOEt, AcOEt/MeOH 1:1, MeOH.

As frações obtidas foram denominadas 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 respectivamente, as frações de 1 a 3 e 4 a 5 foram reunidas por se demonstrarem semelhantes pela análise em CCDC. As frações 4-5 e 6 foram analisadas por Ressonância Magnética Nuclear de ¹H (RMN) de 60 MHz. Com a fração reunida 4-5 foi realizada uma coluna cromatográfica aberta com sílica, denominada Coluna 2, onde foi utilizado 80 mg de amostra e 80 g de sílica, usando gradiente de AcOEt em DCM, AcOEt 100% e gradiente de MeOH em AcOEt, até MeOH 100%. Foram obtidas 69 frações, estas foram analisadas por CCDC e reunidas de acordo com a similaridade. As frações reunidas 5-7, 11-17, 19-21, 27-29 e 52-54 foram analisadas por RMN, as frações 19-21 e 52-54 também foram analisadas por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (CL-MS) de alta resolução com ionização por electrospray (ESI), utilizando o modo positivo e negativo e RMN de ¹H e de ¹³C de 300 MHz.

A fração 11-17 foi submetida a uma cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) com 8 mg de amostra, sendo o sistema de eluição hexano/DCM 1:1. Foram visualizadas 5 bandas na luz ultravioleta 254 nm, estas foram coletadas e denominadas S1 (origem), S2, S3, S4, S5.

A fração 6, obtida da coluna filtrante, foi submetida a uma cromatografia em coluna aberta usando florisil (7 g) (coluna 3) como fase estacionária e 86 mg de amostra, usando gradiente de AcOEt em DCM, AcOEt 100% e gradiente de MeOH em AcOEt, até MeOH 100%, foram obtidas 71 frações. Estas foram analisadas por CCDC e reunidas de acordo com a similaridade. As frações 32-37, 43 e 54-55 foram analisadas por RMN.



Fluxograma 1. Fracionamento e isolamento.

Os extratos, fases e frações obtidas foram analisadas por Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC), cujas placas foram reveladas com diversos reagentes tais como: $Ce(SO_4)_2$ e anisalaldeído sulfúrico para detecção de terpenos, $FeCl_3$ para detecção de substâncias aromáticas, $AlCl_3$ para confirmar a presença de flavonoides.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O ensaio demonstrou que os extratos de *V. cymosa* não apresentam toxicidade sobre *Artemia salina*, pois para um extrato ser considerado como citotóxico deve apresentar uma mortalidade maior que 50% das larvas, na concentração de 1000 µg/mL (Meyer *et al.* 1982). O extrato metanólico dos galhos apresentou uma taxa de mortalidade de 37% das larvas de *A. salina*, sendo o maior valor observado entre os extratos testados.

Os extratos hexânico e metanólico das folhas mostraram uma elevada atividade antibacteriana, pois tiveram absorvâncias próximas do controle positivo (oxitetraciclina) na concentração de 1 mg/mL, seguido do extrato metanólico dos galhos (nas concentrações de 2 e 1 mg/mL) e o hexânico das flores e frutos (na concentração de 1 mg/mL). Fonseca e colaboradores (2006) descreveram que o óleo essencial dos frutos de *V. cymosa* apresentou atividade antimicrobiana com halo de inibição de 10 mm contra *S. aureus* pelo método de difusão em ágar. Santos (2015) descreveu para o extrato hidroalcoólico dos frutos e sementes de *V. cymosa* atividade contra *S. aureus*, por meio de concentração inibitória mínima (CIM) e microbicida mínima (CMM).

Foram observados também indícios de substâncias aromáticas, pois quando as CCDC foram analisadas com FeCl₃ apresentaram manchas com coloração preta; também indícios de flavonoides, pois foi possível observar fluorescência nas CCDC, que foi intensificada com a utilização de AlCl₃, sob a luz ultravioleta 365 nm.

A análise dos espectros bidimensionais HSQC, HMBC e COSY e as constantes de acoplamento identificadas no espectro de RMN de ¹H, permitiram realizar a identificação do flavonoide pachipodol como o constituinte majoritário da fração.

O flavonoide pachipodol já foi isolado das folhas de *Vitex cymosa* por Leitão e colaboradores (2011) e o primeiro isolamento desse flavonoide foi realizado pelo estudo químico de *Miliusa balansae* Fin. & Gagn. (Annonaceae) (Huong *et al.* 2005). Com base nesse trabalho é que foi realizada a comparação dos dados de RMN de ¹H e ¹³C.

Os dados da espectrometria de massas da fração 4-5.19-21, da fase DCM do extrato MeOH de flores e frutos, indicou a massa molecular de 344 *m/z*, condizente com a fórmula molecular C₁₈H₁₆O₇, para o constituinte majoritário. O que está de acordo com a estrutura proposta.

CONCLUSÃO

Foi possível isolar do extrato metanólico de flores e frutos de *Vitex cymosa* o flavonoide pachipodol, anteriormente isolado das folhas de *V. cymosa* (Leitão *et al.* 2011). O ensaio de toxicidade frente *A. salina* demonstrou que os extratos de *V. cymosa* não apresentam toxicidade, pois não se obteve a sua CL₅₀ em nenhuma das concentrações testadas. Os extratos de *V. cymosa* apresentaram boa atividade antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* nas concentrações de 0,5, 1 e 2 mg/mL. Esse foi o primeiro estudo fitoquímico e antibacteriano com espécimes coletados na região norte, contribuindo para o conhecimento científico da espécie.

REFERÊNCIAS

- Almeida, S.P. 1988. *Cerrado: aproveitamento alimentar*. Planaltina: EMBRAPA Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados, Brasília. 188 p.
- Corrêa, M.P. 1984. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Rio de Janeiro: IBDF, v.4.
- Fonseca, E.N.; Figer, A.; Furtado, D.T.; Lopes, D.; Alviano, D. S.; Alviano, C. S.; Leitão, S.G. 2006. Análise química e atividade antimicrobiana do óleo essencial dos frutos de *Vitex cymosa* Betero. *Revista brasileira de plantas medicinais*, 8(4): 87-91.
- Harley, R.; França, F.; Santos, E.P.; Santos, J.S.; Pastore, J.F. 2015. *Lamiaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://www.floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB142>). Acesso em: 06 Jan. 2015.

- Huong, D.T.; Luong, D.V.; Thao, T.T.P.; Sung, T.V. 2005. A new flavone and cytotoxic activity of flavonoid constituents isolated from *Milusa balansae* (Annonaceae). *Pharmazie*, 60: 627–629.
- Leitão, S.G.; Fonseca, E.N.; Santos, T.C.; França, F.; Monache, F.D. 2008. Caffeoylquinic acid derivatives from two Brazilian *Vitex* species. *Biochemical Systematics and Ecology*, 36: 312-315.
- Leitão, S.G.; Santos, T.C.; Monache, F.D.; Matheus, M.E.; Fernandes, P.D.; Marinho, B.G. 2011. Phytochemical profile and analgesic evaluation of *Vitex cymosa* leafextracts. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 21(5).
- Lorenzi, H. 2002. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 2.ed. Nova Odessa: *Plantarum*, 2.
- Meyer, B.N.; Ferrigni, N.R.; Putnan, J.E.; Jacobsen, L.B.; Nichols, D.E. Mcl. Aughlin, J. 1982. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Journal of Medical Plant Research*, 45(1): 31-34.
- Santos, F.B. 2015. *Atividade antimicrobiana dos extratos hidroalcoólicos dos frutos do cerrado Genipa americana L., Dipteryx alata Vog. e Vitex cymosa Bert.* Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul. 12p.
- Santos, T.C.; Schripsema, J.; Monache, T.C.; Leitão, S.G. 2001. Iridoids from *Vitex cymosa*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 12(6).
- Santos, T.C.; Monache, T.C.; Leitão, S.G. 2000. Ecdysteroids from two Brazilian *Vitex* species. *Fitoterapia*, 72: 215-220.