

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**METABÓLITOS SECUNDÁRIOS, COMPOSIÇÃO
QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÓLEO
ESSENCIAL E DAS FOLHAS DE *Vitex megapotamica*
(SPRENGEL) MOLDENKE**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Thiele Faccim de Brum

**Santa Maria, RS, Brasil
2012**

**METABÓLITOS SECUNDÁRIOS, COMPOSIÇÃO
QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÓLEO
ESSENCIAL E DAS FOLHAS DE *Vitex megapotamica*
(SPRENGEL) MOLDENKE**

Thiele Faccim de Brum

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Margareth Linde Athayde

**Santa Maria, RS, Brasil
2012**

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**METABÓLITOS SECUNDÁRIOS, COMPOSIÇÃO QUÍMICA E
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL E DAS FOLHAS
DE *Vitex megapotamica* (SPRENGEL) MOLDENKE**

elaborada por
Thiele Faccim de Brum

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA:

Margareth Linde Athayde, Dr^a.
(Presidente/Orientador)

Paula Augusti, Dr^a. (UNIPAMPA)

Liliane de Freitas Bauermann, Dr^a. (UFSM)

Santa Maria, 19 de março de 2012.

*Dedico este trabalho
a minha orientadora, Margareth,
pela confiança,
e aos meus pais, Ciro e Marilêuza
pela incansável dedicação, incentivo e compreensão.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar meu caminho e me dar forças para seguir sempre em frente e por me fazer acreditar que tudo é possível.

A minha orientadora Dr^a. Margareth Linde Athayde, pelo apoio concedido nos momentos mais difíceis, pela motivação, amizade e confiança na orientação deste trabalho e, em especial, pela sabedoria compartilhada de maneira incondicional.

À Universidade Federal de Santa Maria, pela oportunidade de receber o grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade e subsídios necessários para que pudesse executar meus experimentos, em especial ao funcionário Paulo Ricardo pela sua amizade e atenção incondicional.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pelos ensinamentos, apoio, disponibilidade e atenção e incentivo, em especial a professora Dr^a. Liliane de Freitas Bauermann.

À CAPES pela bolsa concedida.

À professora Dr^a Thais Scotti do Canto-Dorow, responsável pela identificação do material vegetal.

Meu muito obrigado, com muito carinho, aos meus colegas do laboratório de Fitoquímica pela amizade, companheirismo, ensinamentos, reflexões e por sempre estarem ao meu lado em todos os momentos, aconselhando, incentivando e, inclusive na contribuição a este trabalho.

Às professoras Dr^a. Paula Augusti e Dr^a. Liliane de Freitas Bauermann, que aceitaram compor a comissão examinadora, contribuindo para a conclusão deste trabalho.

Agradeço aos meus pais, Ciro e Marilêuza, pelo exemplo de luta, sabedoria, dedicação, pelo importante apoio e incentivo em todas as minhas escolhas e por terem dado condições materiais e morais para que eu pudesse alcançar meus objetivos.

Aos meus irmãos Ígor e Thaís, que sempre estiveram ao meu lado e são exemplos de coragem, batalha e determinação.

A minha amiga e colega Danieli pela amizade, atenção, companheirismo e que além do apoio, colaborou na formatação final deste trabalho.

A todos que, de alguma maneira, com seu apoio, tempo e atenção, transmitindo energia e confiança sem os quais a jornada seria mais difícil.

“A natureza é o único livro que oferece o conteúdo valioso em todas as suas folhas”.

Johann Goethe

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

METABÓLITOS SECUNDÁRIOS, COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL E DAS FOLHAS DE *Vitex megapotamica* (SPRENGEL) MOLDENKE

AUTORA: THIELE FACCIM DE BRUM

ORIENTADORA: MARGARETH LINDE ATHAYDE

Data e Local da Defesa: 19 de março de 2012, Santa Maria.

A família Verbenaceae consiste de aproximadamente 2600 espécies, sendo que o gênero *Vitex* apresenta 250 espécies. *Vitex megapotamica* distribui-se no nordeste da Argentina, no leste do Paraguai, no Uruguai e comumente encontrada no sul do Brasil. O presente trabalho teve como objetivo realizar um estudo fitoquímico, a constituição química e a atividade antioxidante do óleo essencial e dos extratos das folhas de *V. megapotamica*. As folhas da planta foram coletadas no município de Santa Maria, RS, Brasil, em dezembro de 2010. O material está depositado no herbário do Departamento de Biologia da UFSM catalogado sob o número de registro SMBD 13.071. O material macerado com etanol (70%) e filtrado, após uma parte do extrato etanólico foi reservada e a outra evaporada em evaporador rotatório para remoção do etanol (extrato aquoso). Este foi particionado em ampolas de separação, utilizando solventes de polaridade crescente: diclorometano, acetato de etila e butanol, sendo que o extrato bruto foi obtido pela secura do extrato aquoso. O estudo fitoquímico revelou a presença de heterosídeos antociânicos, fenóis, taninos, catequinas, flavonóis, flavanonas, flavanonóis, xantonas, esteroides, triterpenoides, heterosídeos cardioativos, fenóis com posição orto e meta livres, cumarinas, e ácidos orgânicos. O extrato bruto e as frações foram investigados quanto à capacidade antioxidante através do método do DPPH, TBARS e carbonilação de proteínas, o teor de compostos fenólicos (flavonoides, polifenóis e taninos) foi determinado, e foi realizada a identificação e quantificação de ácidos fenólicos por CLAE. Os teores de compostos fenólicos foram maiores na fração acetato de etila, sendo de $522,4 \pm 1,12$ mg/g para polifenóis e $220,48 \pm 0,30$ mg/g para flavonoides, esta fração foi a única que apresentou taninos condensados, embora em pequena quantidade. Os ensaios com DPPH revelaram alta capacidade seqüestradora de radicais livres, apresentando IC_{50} que variaram de $14,17 \pm 0,76$ µg/ml a $37,63 \pm 0,98$ µg/ml. As frações e o extrato bruto inibiram a produção de TBARS, com IC_{50} que variou de $16,36 \pm 5,09$ µg/ml a $72,72 \pm 7,22$ µg/ml, sendo que a fração acetato de etila foi a que apresentou o melhor resultado. Os extratos foram eficazes na inibição da carbonilação de proteínas em concentrações de 50, 100 e 200 mg/ml, por possuírem maior quantidade de compostos fenólicos. A análise por CLAE revelou a presença de ácido clorogênico e rosmarínico, sendo o segundo encontrado em maior quantidade. Através da extração do óleo essencial das folhas, foi possível obter a composição química e a capacidade antioxidante pelo método do DPPH. Os componentes majoritários obtidos foram BHT (34,17%), fitol (12,66%), α -cariofileno (11,84%), δ -elemeno (10,65%), β -cariofileno (7,82%), γ -elemeno (4,24%) e germacreno D (2,82%). O óleo mostrou inibição percentual de 35,62% e 75,25% em concentrações de 76 e 101,6 mg/ml, respectivamente. Provavelmente, a atividade antioxidante relatada se deve ao componente majoritário BHT. Através deste estudo, foi possível identificar a composição química do óleo essencial bem como reconhecer os principais grupos de substâncias presentes nos extratos das folhas de *V. megapotamica* os quais obtiveram uma boa atividade antioxidante.

Palavras-chave: Verbenaceae. Óleos essenciais. Compostos fenólicos. Capacidade antioxidante. CLAE.

ABSTRACT

Master's Degree Dissertation
Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences
Federal University of Santa Maria

SECONDARY METABOLITES, CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF THE ESSENTIAL OIL AND OF THE LEAVES OF VITEX MEGAPOTAMICA (SPRENGEL) MOLDENKE

AUTHOR: THIELE FACCIM DE BRUM

ADVISER: MARGARETH LINDE ATHAYDE

Day and Place of the Defense: March 19th, 2012, Santa Maria.

The Verbenaceae family consists of about 2600 species, of which the genera *Vitex* has 250 species. *Vitex megapotamica* is distributed in northeastern Argentina, eastern Paraguay, in Uruguay and commonly found in southern Brazil. The present work aims to perform a phytochemical study, the chemical composition and antioxidant activity of essential oil and extracts of leaves of *V. megapotamica*. Leaves of *V. megapotamica* were collected in Santa Maria, RS, Brazil, in december of 2010. A dried voucher specimen is preserved in the herbarium of the Department of Biology at Federal University of Santa Maria by register number SMBD 13071. The material was macerated in ethanol (70%) and filtered, after a part of the ethanol extract was reserved and the other evaporated in rotary evaporator to remove ethanol (aqueous extract). This was partitioned in ampoules of separation using increasingly polar solvents: dichloromethane, ethyl acetate and butanol, and the crude extract was obtained by drying the aqueous extract. The phytochemical study revealed the presence of anthocyanins, phenols, tannins, catechins, flavonols, flavanones, flavanonóis, xanthonés, triterpenoids, steroids, cardioactive glycosides, phenols with ortho and meta position free, coumarins and organic acids. The crude extract and fractions were investigated for antioxidant activity by the method of DPPH, TBARS and protein carbonyls, the content of phenolic compounds (flavonoids, polyphenols and tannins) was determined, and was performed to identification and quantification of phenolic acids by HPLC. The phenolics compounds were higher in the ethyl acetate fraction, being 522.4 ± 12.1 mg/g for polyphenols and 220.48 ± 0.30 mg/g for flavonoids, only this fraction showed condensed tannins, though in small quantity. The assays with DPPH revealed high radical scavenging capacity, showed IC_{50} ranged from 14.17 ± 0.76 μ g/ml to 37.63 ± 0.98 μ g/ml. The crude extract and fractions inhibited the TBARS production, with IC_{50} ranging from 16.36 ± 5.09 μ g/ml to 72.72 ± 7.22 μ g/ml, where as ethyl acetate fraction was showed the best result. The extracts were effective in inhibiting protein carbonyls at concentrations of 50, 100 and 200 mg/ml, therefore have a higher amount of phenolic compounds. HPLC analysis revealed the presence of chlorogenic and rosmarinic acids and the second in the greatest quantity. Through the extracting the essential oil of the leaves, it was obtained the chemical composition and antioxidant capacity by DPPH method. The main components in the oil were BHT (34.17%), phytol (12.66%), α -caryophyllene (11.84%), δ -elemene (10.65%), β -caryophyllene (7.82%), γ -elemene (4.24%) and germacrene D (2.82%). The oil showed percentage inhibition of 35.62% and 75.25% at concentrations of 76 and 101.6 mg/ml, respectively. Probably, the antioxidant activity reported is due to the major component of BHT. Through this study it was possible identify the chemical composition of essential oil, as well as know the major groups of substances present in extracts from leaves of *V. megapotamica* who obtained a good antioxidant activity.

Key words: Verbenaceae. Essential oil. Phenolics. Antioxidant capacity. HPLC.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ramo com frutos de <i>Vitex megapotamica</i> (tarumã).....	20
Figura 2 – <i>Vitex megapotamica</i> : aspecto geral da planta.....	21
Figura 3 – Etapas da lipoperoxidação lipídica.....	28

MANUSCRITO 2

Figure 1 - Effect of different concentrations of crude extract, dichlorometane, ethyl acetate and butanolic fractions from the laves of <i>V. megapotamica</i> on Fe(II) (10 μ M)-induced TBARS production in brain homogenates. Dates are expressed as means \pm S.E.M., (n=3). Significant differences are indicated by * $p \leq 0.05$ when compared with FeSO ₄ group.....	61
Figure 2 - The effect of crude extract, dichlorometane, ethyl acetate and butanolic fractions of <i>V. megapotamica</i> on protein carbonyl groups production in plasma. Dates are expressed as means \pm S.E.M. (n=3) to a, b, c, d = different from control ($p < 0.001$).....	63
Figure 3 - High performance liquid chromatography phenolics profile of crude extract (A), dichloromethane (B), ethyl acetate (C) and butanolic fractions (D) of <i>Vitex megapotamica</i> leaves. Peaks: 1 - chlorogenic acid and 2 - rosmarinic acid. The chromatogram is representative of the length of 327nm.....	65

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela 1 – Prospecção fitoquímica das folhas de <i>V. megapotamica</i> em dois solventes (aquoso e etanólico); Forte: +++, Médio: ++, Fraco: +, Ausente: O, Não feito: -.....	36
---	----

MANUSCRITO 1

Table 1 – Chemical compositions of the leaves essential oil of <i>Vitex megapotamica</i>	49
--	----

MANUSCRITO 2

Table 1 - Total phenolic content, total flavonoids, condensed tannins and antioxidant activity (IC ₅₀ /DPPH) for crude extract and fraction of <i>V. megapotamica</i>	60
Table 2 - Lipid peroxidation (IC ₅₀ /TBARS) for crude extract and fractions of <i>V. megapotamica</i>	62
Table 3 - HPLC/DAD of quantified polyphenols in crude and fractions of <i>V. megapotamica</i>	64

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Abs – absorvância
AcOEt – acetato de etila
ACG – ácido clorogênico
AR – ácido rosmarínico
BuOH – butanol
BHT - Butylated hydroxytoluene
CG-EM – cromatografia gasosa acoplada a espectro de massas
CG – cromatografia gasosa
MS – espectrômetro de massas
CH₂Cl₂ – diclorometano
CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência
DPPH – 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
DNPH - 2,4-dinitrophenylhydrazine
EB – extrato bruto
ERO – espécie reativa de oxigênio
L - lipídio
LH – ácido graxo poliinsaturado
MDA - malondialdeído
MS – espectrômetro de massas
min. - minuto
mg/g – miligramas por grama
NIST – (do inglês) “National Institute of Standards and Technology”
TBARS – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
tR – tempo de retenção
UV – ultravioleta
µl – microlitros
µg/ml – micrograma por mililitro

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 – Manuscrito submetido ao periódico: Natural Product Research..... 102

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo geral	18
2.1 Objetivos específicos	18
3 REVISÃO DA LITERATURA	19
3.1 Descrição da planta	19
3.1.1 Família Verbenaceae	19
3.1.2 Espécie <i>Vitex megapotamica</i>	19
3.1.3 Compostos isolados de <i>Vitex megapotamica</i>	21
3.1.4 Estudos biológicos descritos para <i>Vitex megapotamica</i>	22
3.2 Metabólitos secundários	23
3.2.1 Definição	23
3.2.2 Importância e funcionalidade.....	23
3.3 Óleos essenciais	24
3.4 Antioxidante	26
3.4.1 Espécies reativas de oxigênio	26
3.4.1.1 Peroxidação lipídica	27
3.4.1.2 Carbonilação de proteínas	29
3.4.2 Defesa antioxidante.....	30
4 RESULTADOS	32
ARTIGO 1 – ANÁLISE FITOQUÍMICA PRELIMINAR DAS FOLHAS DEVITEX MEGAPOTAMICA (SPRENGEL) MOLDENKE	32
Resumo	33
Abstract.....	33
Introdução.....	34
Materiais e métodos.....	34
Resultados e discussão	35
Conclusão.....	37
Referências bibliográficas	37
MANUSCRITO 1 – COMPOSITION AND ANTIOXIDANT CAPACITY OF THE ESSENTIAL OIL OF LEAVES OF VITES MEGAPOTAMICA (SPRENGEL) MOLDENKE	39
Abstract.....	40
Introdução.....	40
Resultados e discussão	41
Referências bibliográficas	43
Material suplementar	46
Abstract.....	46
Materiais e métodos.....	46
Referências bibliográficas	48
MANUSCRITO 2 – HPLC ANALYSIS OF PHENOLICS COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF LEAVES OF VITEX MEGAPOTAMICA (SPRENGEL) MOLDENKE	50
Abstract.....	51
Introdução.....	52

Materiais e métodos	53
Resultados e discussão	57
Conclusão	65
Referências bibliográficas	66
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	70
6 CONCLUSÃO.....	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
ANEXO	102

1 INTRODUÇÃO

Sem o recurso da ciência, o homem primitivo observava, admirava e apreciava a diversidade do mundo das plantas, as quais forneciam alimentos, remédios, roupa e abrigo. Em frente às doenças que acometiam os povos antigos, eles recorriam às plantas, pois não havia muitas alternativas para a cura das enfermidades (CUNHA, 2005). Ainda hoje, o conhecimento sobre plantas medicinais simboliza, muitas vezes, o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos (MACIEL et al., 2002).

Com certeza, inúmeras espécies vegetais foram incorporadas à medicina tradicional, única e exclusivamente, pelo acaso, caracterizado pelo uso empírico de espécies vegetais, seguido de avaliação, mesmo que rústica e grosseira, dos sinais e sintomas que apareciam após seu consumo, até selecionar pela qualidade de respostas se determinada espécie seria útil ou não. O método usado é o mesmo, o da tentativa e erro, ainda muito comum e útil na pesquisa, que serve para mostrar a forte ligação entre o conhecimento popular e o científico (STASI, 1996). A partir desse conhecimento popular, acerca do uso das plantas medicinais, que serviu de embasamento para os estudos clínicos, farmacológicos e químicos das plantas, originaram-se os primeiros fármacos utilizados pelo homem, como atropina, artemísia, colchicina, digoxina, efedrina, morfina, pilocarpina, quinina, reserpina, taxol, vincristina e vinblastina (GILANI; ATTA-UR-RAHMAN 2005).

Nos últimos anos, tem-se verificado um grande avanço científico, envolvendo os estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais que visam obter novos compostos com propriedades terapêuticas (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

Segundo Miguel e Miguel (1999), os produtos naturais podem ser tão eficientes quanto os produzidos pela síntese química, contudo a transformação de uma matéria-prima vegetal em um medicamento deve visar à preservação da integridade química e farmacológica do vegetal, garantindo a constância de sua ação biológica e a sua segurança de utilização, além de valorizar seu potencial terapêutico. Para garantir esses objetivos, a produção de fitoterápicos requer, necessariamente, estudos prévios relativos a aspectos botânicos, agrônômicos,

fitoquímicos, farmacológicos, toxicológicos, de desenvolvimento de metodologias analíticas e tecnológicas.

Tendo em vista que a maior parte da população mundial é ocupada pelos países menos desenvolvidos economicamente, os quais encontram dificuldades em oferecer atendimento à saúde, frente ao aumento populacional e diante da escassez de recursos e necessidade aumentada de medicamentos que se tornam mais dispendiosos, destaca-se a importância da Fitoterapia (WIJESEKERA, 1986). O estímulo ao uso destes fitoterápicos tem como objetivo: prevenir, curar ou minimizar os sintomas das doenças, com um custo mais acessível à população e aos serviços de saúde, comparativamente àqueles obtidos por síntese química, que são, em geral, mais caros, devido às patentes tecnológicas envolvidas (TOLEDO et al., 2003).

Um fator relevante é a quantidade de plantas existente no planeta, sendo que a maioria é desconhecida sob o ponto de vista científico, onde entre 250-500 mil espécies, somente cerca de 5% têm sido estudadas fitoquimicamente e uma porcentagem ainda menor é avaliada sob aspectos biológicos (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998). O Brasil é o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 a 550.000, sendo que apenas 8% das espécies vegetais da flora brasileira foram estudadas em busca de compostos bioativos e 1.100 espécies vegetais foram avaliadas em suas propriedades medicinais (DIAS, 1996).

Entre as inúmeras espécies vegetais de interesse medicinal, encontra-se a *Vitex megapotamica* (Sprengel) Moldenke, usualmente conhecida como tarumã e cujas sinonímias são *Vitex montevidensis* Cham. e *Bignonia megapotamica* Sprengel, que pertence à família Verbenaceae a qual compreende cerca de 100 gêneros distribuídos nas regiões tropicais de todo o mundo (JOLY, 2002). O gênero *Vitex* L., com aproximadamente 300 espécies distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais de ambos os hemisférios, tem poucos representantes nas regiões temperadas da Ásia e da Europa. Algumas delas com valor comercial por serem madeiráveis. *Vitex polygama* Chamisso é muito semelhante à *Vitex megapotamica*, diferenciando-se por ter folhas hirsutas (CARVALHO, 2006).

Na medicina popular, a infusão das folhas desta planta é utilizada no tratamento das hemorróidas e como depurativa do sangue (hipocolesterolêmica) (LONGHI, 1995). São também atribuídas propriedades anti-afrodisíacas e

antilúéticas (LOPEZ et al., 1987). No Rio Grande do Sul, as folhas são comercializadas por ervateiros como diuréticas, “depurativas” e indicadas em afecções cutâneas (ALICE et al., 1995). Segundo Toursarkissian, 1980, as cascas e os frutos são referidos como emenagogos e diuréticos, além de expectorantes (CORREA, 1984). O fruto também é utilizado contra dores reumáticas (SALVADOR; OLIVEIRA, 1989). Usam-se a casca e as folhas no combate ao ácido úrico, hipertensão arterial, colesterol, inflamação do útero, da bexiga e da próstata (FRANCO; FONTANA, 1997).

Diante da diversidade de indicações terapêuticas, com base somente no uso popular e da escassez de estudos que comprovem tais efeitos, motivou-se a realização deste trabalho para que haja uma maior compreensão acerca de seus constituintes químicos e avaliação da capacidade antioxidante do óleo essencial e dos extratos das folhas de *V. megapotamica*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Realizar um estudo fitoquímico e avaliar a constituição química e a atividade antioxidante do óleo essencial e dos extratos das folhas de *Vitex megapotamica*.

2.2 Objetivos específicos

- Pesquisar metabólitos secundários presentes na planta através de screening fitoquímico preliminar;
- Extrair óleo essencial das folhas;
- Identificar os constituintes químicos do óleo essencial por CG-EM;
- Determinar a capacidade antioxidante pelo método do DPPH no extrato bruto, frações e óleo essencial;
- Identificar compostos fenólicos no extrato bruto e frações;
- Avaliar o efeito protetor do extrato bruto e frações contra a peroxidação lipídica, através do método do TBARS;
- Avaliar o efeito do extrato bruto e frações contra a oxidação protéica, através da quantificação de grupos carbonil em proteínas;
- Identificar compostos fenólicos no extrato bruto e frações por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e quantificá-los (quando presentes).

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Descrição da planta

3.1.1 Família Verbenaceae

A maioria das espécies pertencentes à família Verbenaceae são subarbustos ou arbustos, escandentes pelos galhos ou volúveis; não tem gavinhas. Há ervas e até árvores de grande porte. Geralmente apresentam folhas opostas, simples, inteiras, serradas ou partidas, sem estípulas, às vezes verticiladas e, no gênero *Vitex*, compostas digitadas (SCHULTZ, 1985).

A família Verbenaceae consiste de aproximadamente 100 gêneros e 2600 espécies; de distribuição pantropical, apenas um número limitado de espécies ocorrem em regiões temperadas. Os maiores gêneros são *Clerodendrum* (400 espécies), *Verbena* (250 espécies), *Vitex* (250 espécies), *Lippia* (200 espécies), *Premna* (200 espécies) e *Lantana* (150 espécies) (CRONQUIST, 1981). Nesta família, uma das melhores fontes de ecdisteroides é *Vitex*, um gênero de arbustos e árvores pequenas encontradas em regiões tropicais e subtropicais (CORREA, 1984).

3.1.2 Espécie *Vitex megapotamica*

O nome genérico *Vitex* vem do latim *viere*, “juntar, tecer” (cestos). O epíteto específico *megapotamica* vem do grego *mégas* (grande) e *potamós* (rio), em referência ao estado do Rio Grande do Sul. Em tupi-guarani, é conhecida como *taumã*, que significa “fantasia, agouro” (LONGHI, 1995). *Vitex megapotamica* (Figura 1) distribui-se no nordeste da Argentina, no leste do Paraguai, no Uruguai e comumente encontrada no sul do Brasil (ALICE et al., 1995). É conhecida por inúmeros nomes na medicina popular, tais como tarumã, azeitona-do-mato,

tapinhoan, tarumã-preta, tarumã-de-montevidéu, tarumã-do-mato, tarumã-azeitona, azeitona-brava, azeitona-da-terra, tarumã-romã e sombra-de-touro, dentre outros. A árvore (Figura 2) é ornamental, recomendada em paisagismo e em arborização urbana (LORENZI, 1992). Suas flores azuis, pequenas, tornam a árvore conspícua e seus frutos são oleaginosos, comestíveis, com aspecto de pequenas azeitonas, o que justifica alguns de seus nomes populares (SCHULTZ, 1985).



Figura 1 – Ramo com frutos de *Vitex megapotamica* (tarumã) (COSMO et al., 2009)

A espécie *V. megapotamica* tem crescimento lento, com incremento médio de $1,70 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$, que pode atingir grande porte, com até 25 m de altura e 120 cm de diâmetro. Serve como vetor de polinização, essencialmente abelhas, destacando-se a abelha-européia ou africanizada (*Apis mellifera*) e diversos insetos pequenos (CARVALHO, 2006). Inflorescências grandes, em forma de panículas, com vistosas flores azuladas ou arroxeadas e zigomorfas (LONGHI, 1995). A época da floração, no Rio Grande do Sul, ocorre de setembro a novembro (BACKES; NARDINO, 1998) e seus frutos em forma de bagas, redondos, verdes quando imaturos; e roxo-escuros ou pretos quando maduros (LONGHI, 1995), os quais amadurecem de dezembro a fevereiro, no Rio Grande do Sul (LOPES et al., 1996).

É uma das espécies recomendadas em planos de recuperação de matas ciliares degradadas, dado seu caráter higrófilo (BARDDAL, 2006; CURCIO et al., 2007). É bastante procurada devido à sua resistência mecânica e durabilidade elevada quando exposta ao ambiente externo e em contato com o solo, motivo pelo qual se recomenda a espécie para mourões (suportando o contato com o solo por longo tempo), cepos, obras externas, internas e hidráulicas, esteios, postes, carroçarias, mobílias, fundações, bengalas, tonéis de cachaça e dormentes de primeira qualidade (CARVALHO, 2006). O tarumã é indicado para plantio em áreas com o solo permanentemente encharcado (TORRES et al., 1992), locais úmidos, às vezes na margem de cursos d'água. Suporta encharcamento e inundação (DURIGAN; NOGUEIRA, 1990).

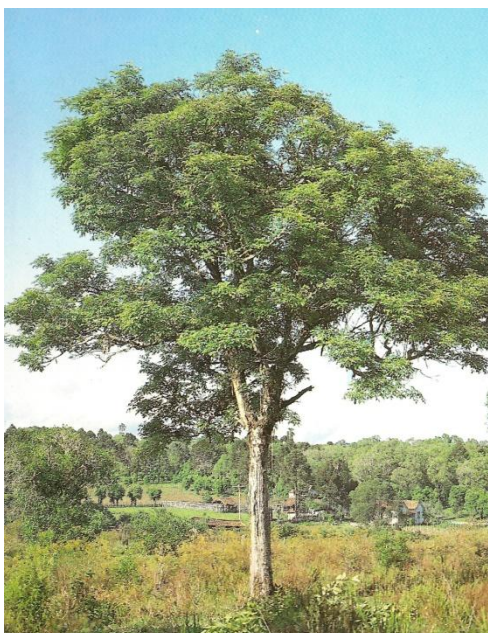


Figura 2 – *Vitex megapotamica*: aspecto geral da planta (LORENZI, 1992)

3.1.3 Compostos isolados de *Vitex megapotamica*

Existem poucos estudos químicos e farmacológicos para a espécie *V. megapotamica*. Até o presente momento, apenas Rimpler (1969), isolou

pterosteron, polypodin B, esteróides ecdysonatíges (viticosteron E) e em outro estudo realizado em 1972, pelo mesmo autor, o isolamento de phytoecdysones e iridóides (RIMPLER, 1972). Iridóides e icdisteróides são utilizados como marcadores quimiotaxonômicos para a identificação taxonômica, usando características morfológicas das plantas pertencentes a família Verbenaceae (RIMPLER; SAUERBIER, 1986).

3.1.4 Estudos biológicos descritos para *Vitex megapotamica*

Zanatta e colaboradores (2007) testaram o efeito agudo do extrato bruto e frações das folhas de *Vitex megapotamica* na diabetes induzida com aloxano em ratos normais. As doses administradas foram de 400 e 800 mg/kg para o extrato bruto e frações. Este estudo mostra que a espécie em estudo possui ação hipoglicêmica, capaz de melhorar o estado diabético, sendo a fração acetato de etila a que melhor apresentou esse efeito. O Principal mecanismo pelo qual a *V. megapotamica* provoca sua ação hipoglicêmica, provavelmente, se deve pelo estímulo do consumo de glicose periférica uma vez que não tem efeito sobre a curva de tolerância a glicose.

Ainda, Brandt e colaboradores (2009) realizaram um estudo fitoquímico preliminar do extrato bruto e decocção de *Vitex megapotamica* que revela a presença de taninos, glicosídeos flavonônicos, polifenóis, alcalóides, óleos essenciais e saponinas. Estes autores realizaram, neste estudo, o efeito da decocção das cascas e do extrato bruto das folhas do tarumã sobre o perfil lipídico *in vivo* e uma avaliação bioquímica toxicológica preliminar. Observaram que o extrato bruto e a decocção possuem efeito hipolipidêmico pela redução dos níveis séricos de colesterol e triacilgliceróis e que não houve lesão cardíaca, hepática ou renal nas avaliações toxicológicas preliminares ensaiadas.

3.2 Metabólitos secundários

3.2.1 Definição

O metabolismo é um conjunto de reações químicas que continuamente estão ocorrendo em cada célula, sendo que a presença de certas enzimas é que direcionam essas reações. Os compostos químicos formados, degradados ou simplesmente transformados é que são os metabólitos (SANTOS et al., 2010).

Metabólitos secundários são compostos químicos distintos dos intermediários e dos produtos do metabolismo primário. Eles variam de acordo com a espécie vegetal e a família e alguns são restritos à determinada família, gênero ou espécie, possibilitando o emprego como marcador taxonômico (BENETT; WALLSGROVE, 1994). Outro aspecto relevante que pode interferir na produção de metabólitos secundários, é a influência dos fatores ambientais, como clima, tipo de solo e época de coleta da planta. Geralmente, os efeitos medicinais e/ou tóxicos das plantas estão relacionados aos metabólitos secundários, os quais possuem como função adaptar o vegetal ao meio e representam a principal classe de substâncias vegetais de interesse farmacológico (VANHAELEN et al., 1991). As principais classes de compostos derivados do metabolismo secundário das plantas são: taninos, flavonóides, alcalóides, cumarinas, antraquinonas, óleos essenciais e saponinas (SIMÕES et al., 2010).

3.2.2 Importância e funcionalidade

Os metabólitos secundários foram considerados, durante muito tempo, como produtos de excreção do vegetal. Atualmente, já foram reconhecidas diversas funções desses metabólitos como, por exemplo, defesa contra herbívoros e microorganismos, proteção contra os raios UV, a atração de polinizadores ou animais dispersores de sementes (WINK, 1990).

O aparecimento de metabólitos biologicamente ativos na natureza é determinado por necessidades ecológicas e possibilidades biossintéticas, sendo que a co-evolução de plantas, insetos, microorganismos e mamíferos conduz a síntese de metabólitos com funções de defesa ou atração, principalmente. Através dessa interação dos metabólitos secundários é que estes apresentam atividades biológicas interessantes. A elevada diversidade desses metabólitos vegetais tem despertado o interesse de pesquisadores de diversas áreas da ciência, como a farmacêutica, alimentar, agrônômica, perfumaria, entre outras, que veem neles uma fonte promissora de novas moléculas (RHODES, 1994).

Quando não se dispõe de estudos químicos sobre a espécie de interesse, a análise fitoquímica preliminar pode indicar os grupos de metabólitos secundários relevantes na mesma para detectar as classes de compostos presentes na parte da planta usada na medicina popular e na própria preparação tradicional a fim de guiar outros estudos, tais como isolamento, atividades biológicas, tóxicas, farmacológicas entre outras (SIMÕES et al., 2010).

Segundo Farias (2010), a caracterização dos principais grupos de substâncias vegetais de interesse tem sido conseguida pela realização de reações químicas que resultem no desenvolvimento de coloração e/ou precipitado característico. As reações químicas permitem verificar a presença de substâncias, por exemplo, flavonóides, alcalóides, esteróides, entre outros, sendo métodos simples, de rápida execução e baixo custo. Elas são geralmente inespecíficas, ocorrendo através de grupos funcionais ou estruturas comuns a várias substâncias.

3.3 Óleos essenciais

Os óleos essenciais, também chamados de óleos voláteis, óleos etéreos ou essências, são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas (SIMÕES et al., 2010), podendo conter normalmente até 100 compostos, sendo que um, dois ou algumas vezes, três destes, dominam em termo de porcentagem (TISSERAND, 1996). Quimicamente, constituem-se misturas de substâncias divididas em dois grupos principais: derivados terpenóides e/ou derivados fenilpropanóides, sendo que os primeiros preponderam. Os terpenos e

seus derivados de baixo peso molecular aparecem nas plantas como constituintes principais dos óleos essenciais. Os compostos terpênicos mais frequentes nos óleos essenciais são os monoterpenos (cerca de 90% dos óleos voláteis) e os sesquiterpenos (STEINEGGER; HANSEL, 1992).

Os óleos podem estar estocados em certos órgãos, tais como: flores, folhas, cascas do caule, madeira, raízes, rizomas, frutos ou sementes e sua composição pode variar conforme a localização, como por exemplo, o óleo das cascas de *Cinnamomum zeylanicum* (canela) é rico em aldeído cinâmico, enquanto que os das folhas e das raízes desse mesmo vegetal são ricos em eugenol e cânfora, respectivamente. É importante ressaltar que o óleo, além de apresentar composição química, características físico-químicas e odores bem diferentes de distintas partes da mesma planta também pode variar significativamente no mesmo órgão de uma mesma espécie vegetal, de acordo com a época de coleta, condições climáticas e de solo (SIMÕES; SPITZER, 2010).

Além de serem responsáveis pelo odor agradável e característico de muitos vegetais, os óleos apresentam funções biológicas variadas, tais como inibição do crescimento de outras espécies (alelopatia), proteção contra predadores e atração de polinizadores, etc (INOUE, 2003; SIMÕES; SPITZER, 2010). Devido a essas características e também, por apresentarem ações biológicas e propriedades organolépticas variadas, é que os óleos essenciais são importantes matérias-primas industriais, utilizadas na manufatura de produtos nos setores da perfumaria, cosmética, farmacêutica, higiene e limpeza, alimentícia e bebidas (PAULI, 2001).

Muitos óleos voláteis são utilizados em função de suas propriedades terapêuticas e para a aromatização de formas farmacêuticas destinadas a uso oral. Os óleos apresentam propriedades farmacológicas bem estabelecidas, como ação inseticida e acaricida (JAENSON et al., 2005), antifúngica (KORDALI et al., 2005), antileishmaniose (ROSA et al., 2003), antimicrobiana (PONCE et al., 2003), antioxidante (MARIN et al., 2008), entre outras.

Várias espécies de *Vitex* já foram estudadas quanto à composição do óleo essencial, *Vitex agnus-castus* (EKUNDAYO et al., 1990), *Vitex negundo* (MALLAVARAPU et al., 1994), *Vitex diversifolia* (NEBIÉ et al., 2005), *Vitex trifolia* (SUKSAMRARN et al., 1991), no entanto, *Vitex megapotamica* ainda não tem a sua composição conhecida.

3.4 Antioxidante

3.4.1 Espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo

Nos últimos anos, uma quantidade substancial de evidências tem indicado o papel chave dos radicais livres e outros oxidantes como grandes responsáveis pelo envelhecimento e pelas doenças degenerativas associadas ao envelhecimento, como câncer, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune e disfunções cerebrais (ATOUI et al., 2005).

A terminologia espécies reativas de oxigênio (EROs) inclui as espécies radicalares e as não radicalares que, embora não possuam elétrons desemparelhados, são reativas em decorrência de sua instabilidade (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Os radicais livres são compostos que possuem na estrutura química um ou mais elétrons desemparelhados, sendo desta forma muito instáveis, altamente reativos, e de meia vida curta. A geração destes radicais livres pode ser endógena (fosforilação oxidativa) ou exógena (radiação, fumo, substâncias tóxicas, como solventes, herbicidas e drogas) (SANTOS, 2006). A geração celular das EROs não radicalares, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e radicalares, como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical peroxil (ROO^{\cdot}) e radical hidroxila ($^{\cdot}OH$), estão inseparavelmente ligados ao envolvimento de O_2 nas reações metabólicas de redução/oxidação (oxidação de substratos orgânicos durante a respiração, suporte de reações imunes e de defesas), bem como ativação de O_2 por fatores exógenos (BELOZERSKAYA; GESSLER, 2007).

O estresse oxidativo é uma condição celular ou fisiológica de elevada concentração de ERO que causa danos moleculares às estruturas celulares ao reagir com lipídeos, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos, com conseqüente alteração funcional e prejuízo das funções vitais em diversos tecidos ou órgãos (HALLIWELL, 1992; GYAMFI et al., 1999; AL-MAMARY et al., 2002). No entanto, o efeito deletério do estresse oxidativo varia consideravelmente de um ser vivo para o outro, de acordo com a idade, o estado fisiológico e a dieta. (HARMAN, 1992). O estresse oxidativo pode resultar tanto de um aumento na produção de EROs quanto

da redução da capacidade antioxidante celular total (HALLIWELL, 1992; MEAGHER, FITZGERALD, 2000; PENG et al., 2000).

Em condições fisiológicas normais as EROs podem desempenhar importante papel fisiológico na regulação da resposta imunológica participando do processo fagocítico de defesa contra infecções e atuando como fatores de transcrição na sinalização intracelular, induzindo a apoptose (HALLIWEL, 1994; BIESALSKI, 2002). Contudo, o aumento na sua produção e/ou a redução na sua eliminação gera um desequilíbrio fisiológico, caracterizando o estresse oxidativo.

3.4.1.1 Peroxidação lipídica

A membrana plasmática é basicamente formada por uma dupla camada lipídica no qual se encontram proteínas integrais e periféricas associadas. As EROs podem prejudicar a função das membranas pela oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados presentes nos lipídios e indiretamente pela inibição da síntese dos lipídios, dessaturação de ácidos graxos ou ativação das lipases, processo esse denominado peroxidação lipídica que serve de marcador do estresse oxidativo (GOETZ et al., 2008). Tanto na membrana plasmática quanto nas membranas subcelulares das organelas que contêm altas quantidades de ácidos graxos poliinsaturados a formação de radicais intermediários resulta na peroxidação de ácidos graxos (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

A lipoperoxidação pode ser dividida em três etapas: (a) iniciação, (b) propagação e (c) terminação (CERQUEIRA et al., 2007). Estas etapas são apresentadas na Figura 3, onde o lipídio é representado por (L).

A reação inicia-se com o sequestro do hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado (LH) da membrana celular pelo OH^\bullet ou pelo LO^\bullet , levando à formação do radical lipídico (L^\bullet). Na primeira reação de propagação, o L^\bullet reage rapidamente com o O_2 resultando na formação do radical peroxil (LOO^\bullet), que por sua vez sequestra novo hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado, formando novamente o L^\bullet na segunda equação de propagação. O término da peroxidação lipídica ocorre quando os radicais (L^\bullet e LOO^\bullet) produzidos nas etapas anteriores propagam-se até a estabilização (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

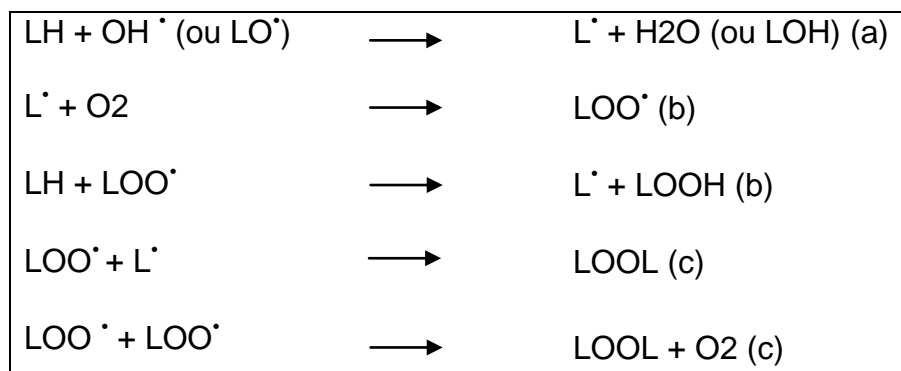


Figura 3 – Etapas da lipoperoxidação lipídica (FERREIRA; MATSUBARA, 1997)

Todas estas reações oxidativas causam modificações nas propriedades físicas e químicas das membranas, alterando sua fluidez e permeabilidade, tanto da membrana plasmática quanto das membranas que delimitam as organelas com risco de ruptura que levam à morte celular. (VASCONCELOS et al., 2007). As reações envolvendo os vários intermediários entre si levam a produção de novos produtos como, por exemplo, o malondialdeído (MDA) que reage com o grupo amina de purinas. Por este motivo, um modo de se averiguar a presença de peroxidação lipídica é através da técnica espectrofotométrica do ácido tiobarbitúrico (TBARS) (LYKKESFELDT 2007; CATALGOL et al., 2007; JIA et al., 2007; MICALLEFT et al., 2007). A técnica consiste na reação do ácido tiobarbitúrico com o MDA formado em meio ácido que indica o grau de peroxidação lipídica.

Por outro lado, assim como na formação de RLs e espécies reativas, a peroxidação lipídica pode ser um processo fisiológico nem sempre prejudicial, pois participa da resposta inflamatória liberando ácido araquidônico e, subsequentemente, prostaglandinas e distintos endoperóxidos (JAMIESON, 1989). Entretanto, a excessiva liberação destes produtos durante os danos oxidativos pode causar edema celular, modificações na permeabilidade celular, quimiotaxia e danos teciduais (BLAKE et al., 1987), implicando, por exemplo, na patogênese da aterosclerose (VAGIMIGLI et al., 2003).

3.4.1.2 Carbonilação de proteínas

O dano às proteínas por radicais livres também merece destaque, pois ele induz mudanças físicas da molécula do tipo fragmentação, agregação e susceptibilidade à digestão proteolítica, resultando na formação de derivados carbonil e o dano oxidativo é refletido pelo aumento dos níveis de proteína carbonil (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

As proteínas possuem muitos sítios reativos e estas podem ser modificadas por indução de EROs, cátions metálicos (Fe^{2+} , Cu^{+}), endobióticos (GSH), irradiação, peróxidos lipídicos, oxidoredutases, fármacos, entre outros (VASCONCELOS et al., 2007).

O primeiro evento que ocorre durante o estresse oxidativo em proteínas é a formação de um radical centrado no carbono por extração de H^{\bullet} do carbono α em uma ligação peptídica. Em seguida, ocorre fragmentação das cadeias e oxidação de quase todos os tipos de aminoácidos (principalmente os aromáticos), com produção frequente de compostos carbonilados, particularmente a partir de resíduos de prolina, arginina e lisina (DALLE-DONE et al., 2003; VASCONCELOS et al., 2007). Além disso, os grupos carbonila podem ser introduzidos em proteínas via reação com aldeídos derivados da peroxidação lipídica (MDA) ou gerados a partir da reação de redução de açúcar (glicose) ou produtos de sua oxidação com resíduos de lisina (reações de glicação e de glicoxidação formando carboximetil-lisina) (VASCONCELOS et al., 2007, ELLIS 2007).

O dano causado por aldeídos pode levar à perda da função de proteínas e enzimas, danificar lipídios, e ainda levar à formação de adutos no DNA. Alguns aldeídos podem diminuir os níveis intracelulares de glutathiona por meio do aumento do desequilíbrio oxidante na célula. Estas perturbações moleculares podem culminar com a morte celular (ELLIS, 2007).

A carbonilação de proteínas resultantes do processo oxidativo podem ser degradada ou recuperada resultando em não aparecimento de patologias ou, em casos mais acentuados, conduzir à morte celular resultando em processos patológicos, como por exemplo, diabetes, catarata, sepse e câncer (DALLE-DONNE et al., 2003; NYSTROM, 2005).

3.4.2 Defesa antioxidante

Os organismos aeróbicos são protegidos contra as EROs por um complexo sistema antioxidante endógeno (por exemplo, superóxido dismutase, glutathione redutase e glutathione peroxidase). Além desse sistema de defesa, produtos naturais com atividade antioxidante são importantes para atenuar o dano oxidativo, desta maneira complementando estas defesas (KANTER, 1998). Quando há limitação na disponibilidade de antioxidantes podem ocorrer lesões oxidativas de caráter cumulativo e estes podem estabilizar ou desativar os radicais livres antes que ataquem os alvos biológicos nas células (ATOUI et al., 2005). Neste contexto, há um interesse crescente pelos efeitos antioxidantes de produtos naturais e do seu papel na saúde e na doença.

De acordo com Mensor e colaboradores (2001), as substâncias antioxidantes presentes nos vegetais neutralizam a ação dos radicais livres. Esta atividade está relacionada com compostos capazes de proteger um sistema biológico contra reações potencialmente nocivas que causam excessiva oxidação, impedindo que radicais livres danifiquem células e tecidos. O consumo diário destas substâncias pode fortalecer o sistema imunológico, além de reduzir o risco de uma série de doenças como o desenvolvimento de câncer através da ação prolongada dos radicais livres no organismo, os quais são combinados pelos antioxidantes (MENSOR et al., 2001; ROGINSKY; LISSI, 2005).

Apesar do uso terapêutico das plantas ser tão antigo quanto à própria espécie humana, o conhecimento das propriedades antioxidantes é relativamente recente, apresentando um enorme crescimento da investigação científica nas duas últimas décadas, envolvendo desde o efeito dos extratos brutos, de frações ou de componentes isolados e/ou modificados (FILHO; SILVA; BOVERIS, 2001). Atualmente, as substâncias com potencial antioxidante têm sido requeridas pelas indústrias de alimentos, cosméticos e medicamentos, estimulando assim, a investigação da atividade antioxidante de vegetais.

Os primeiros estudos com polifenóis relacionavam a sua fundamental importância na dieta devido aos seus efeitos nutricionais, como por exemplo, à diminuição na absorção e digestibilidade de alimentos devido à capacidade destes constituintes químicos se ligarem e precipitarem minerais e macromoléculas tais

como proteínas e carboidratos (YANG et al., 2001). Contudo, o interesse principal tem recaído, pois dentre as diversas classes de substâncias antioxidantes de ocorrência natural, as substâncias com núcleo fenólico, como tocoferol, flavonóides e ácidos fenólicos, têm recebido muita atenção nos últimos anos, sobretudo por inibirem a peroxidação lipídica e a lipooxigenase *in vitro* (HASLAM, 1996; SOARES, 2002). Os compostos fenólicos dentre esses, os flavonoides, triterpenos, taninos são excelentes antioxidantes. Muitos flavonoides como a quercetina, luteonilina e catequinas, são melhores antioxidantes que a vitamina C, vitamina E e β -caroteno em uma mesma concentração molar (GAO et al., 1999).

De acordo com a habilidade destas substâncias em prevenir doenças conhecidamente associadas ao estresse oxidativo, tais como cardiopatias, processos inflamatórios, alguns tipos de câncer podem estar vinculadas às propriedades antioxidantes dos polifenóis reportadas (MAURÍCIO, 2006). A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias (HASLAM, 1996; SOARES, 2002; CHUN et al., 2005).

4 RESULTADOS

A dissertação, no seu todo, foi elaborada com introdução, revisão da literatura, considerações finais (na qual estão inseridas as principais conclusões de toda a pesquisa) e as referências bibliográficas correspondentes a estes itens as quais constam no final deste trabalho.

Os resultados obtidos neste trabalho apresentam-se na forma de artigo científico e manuscritos que estão formatados de acordo com as normas dos periódicos aos quais estão publicados, submetidos ou por submissão e apresentam-se distribuídos em introdução, metodologia, discussão, conclusão e referências bibliográficas específicas.

ARTIGO 1 - Publicado na Revista Saúde (Santa Maria)

Análise fitoquímica preliminar das folhas de *Vitex megapotamica* (SPRENGEL) Moldenke

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* (Sprengel) Moldenke. Revista Saúde (Santa Maria), vol. 37, n.2, 2011.

**Análise fitoquímica preliminar das folhas de *Vitex Megapotamica* (Sprengel)
Moldenke**

Thiele Faccim de Brum*, Marina Zadra, Amanda Luana Forbrig
Froeder**, Aline Augusti Boligon*, Janaina Kieling Frohlich*,
Margareth Linde Athayde***

RESUMO: A espécie *Vitex megapotamica* (Sprengel) Moldenke, usualmente conhecida como tarumã, pertence à família Verbenaceae a qual compreende cerca de 100 gêneros distribuídos nas regiões tropicais de todo o mundo. Esta espécie tem sido usada na medicina tradicional principalmente para hemorróidas, depurativa do sangue, hipertensão arterial, anti-inflamatória, dentre outras. O presente trabalho teve por objetivo a realização da triagem farmacognóstica de extratos das folhas de *Vitex megapotamica*. Os resultados da análise fitoquímica indicaram a presença de heterosídeos antociânicos, fenóis e taninos, catequinas, flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas, esteroides e triterpenoides (esteroides livres), heterosídeos cardioativos, fenóis com posição orto e meta livres, fenóis com a posição para livre, cumarinas, ácidos orgânicos e fenóis.

Descritores: *Vitex megapotamica*; Tarumã; Folhas; Estudo fitoquímico.

**Phytochemical preliminary analysis leaves of *Vitex Megapotamica*
(Sprengel) Moldenke**

ABSTRACT: The species *Vitex megapotamica* (Sprengel) Moldenke, usually known as tarumã, belongs to the Verbenaceae family which comprises about 100 genera distributed in tropical regions around the world. This species has been mainly used in traditional medicine for hemorrhoids, purifying the blood, hypertension, anti-inflammatory, and others. The aim of this study was to carry out a pharmacognostic screening of extracts of *V. megapotamica* leaves. The results of phytochemical analysis indicated the presence of anthocyanins, phenols and tannins, catechins, flavonols, flavanones, and flavanonóis xanthonones, triterpenoids and steroids (steroid free), cardioactive glycosides, phenols with ortho and meta position free phenol with the position free, coumarins, organic acids and phenols.

Descriptors: *Vitex megapotamica*; Tarumã; Leaves; Phytochemical study.

* Mestranda em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

** Graduanda no Curso de Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

Introdução

Nos últimos anos, tem-se verificado um grande avanço científico, envolvendo os estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais que visam obter novos compostos com propriedades terapêuticas.¹

Estes produtos naturais podem ser tão eficientes quanto os produzidos pela síntese química, contudo a transformação de uma matéria-prima vegetal em um medicamento deve visar à preservação da integridade química e farmacológica do vegetal, garantindo a constância de sua ação biológica e a sua segurança de utilização, além de valorizar seu potencial terapêutico. Para garantir esses objetivos, a produção de fitoterápicos requer, necessariamente, estudos prévios relativos a aspectos botânicos, agrônômicos, fitoquímicos, farmacológicos, toxicológicos, de desenvolvimento de metodologias analíticas e tecnológicas.²

Entre as inúmeras espécies vegetais de interesse medicinal, encontra-se a *Vitex megapotamica* (Sprengel) Moldenke, usualmente conhecida como tarumã, pertence à família Verbenaceae a qual compreende cerca de 100 gêneros distribuídos nas regiões tropicais de todo o mundo.³ *V. megapotamica* distribui-se no nordeste da Argentina, no leste do Paraguai, no Uruguai e comumente encontrada no sul do Brasil. Na medicina popular, a infusão das folhas desta planta é utilizada no tratamento das hemorróidas, depurativa do sangue (hipocolesterolêmica), diuréticas, afecções cutâneas, expectorante, hipertensão arterial, anti-inflamatória, dentre outras propriedades terapêuticas.⁴⁻⁷ Para a espécie em estudo foi relatado o isolamento de esteróides e iridóides.^{8,9} Em 2007, foi relatada a atividade hipoglicemiante das folhas de *V. megapotamica*.¹⁰ e em 2009, foi demonstrado a ação do extrato bruto hidroalcolólico e decoção das cascas sobre efeito hipolipidêmico e redução dos níveis séricos de colesterol e triacilglicerol.¹¹ Estes mesmos autores realizaram um estudo fitoquímico preliminar do extrato bruto das folhas de *V. megapotamica* que revela a presença de taninos, glicosídeos flavonônicos, polifenóis, alcalóides, óleos essenciais e saponinas. Sendo assim, devido à escassez de estudos que comprovem tais efeitos, este estudo teve como objetivo realizar uma análise farmacognóstica dos extratos de *V. megapotamica* em diferentes solventes. Além disso, complementar outros estudos através de uma pesquisa preliminar das substâncias presentes nos extratos a fim de verificar a possível presença de grupos químicos oriundos do metabolismo secundário desta espécie.

Materiais e métodos

Material botânico

As folhas e os galhos de *V. megapotamica* foram coletados em dezembro de 2010, no município de Santa Maria, no estado do Rio Grande do Sul. O material testemunho está depositado no herbário do Departamento de Biologia da UFSM catalogado sob o número de registro SMBD 13.071.

Preparação dos extratos

As folhas foram secas à temperatura ambiente e posteriormente trituradas em moinho de facas. A seguir, o material (1272,68 g de pó das folhas) foi submetido à maceração com etanol (70%) a temperatura ambiente por sete dias com agitação diária. Uma parte do extrato etanólico foi reservada e a outra parte foi filtrada e evaporada para remoção do etanol obtendo-se o extrato aquoso remanescente.

Análise fitoquímica

O extrato aquoso e o extrato etanólico foram submetidos a uma série de reações de caracterização, para o extrato aquoso realizou-se as seguintes reações: heterosídeos antociânicos (cores diferentes pela variação do pH), heterosídeos cianogênicos (reação de ácido sulfúrico e papel micro-sódico), amino-grupos (nebulização com ninhidrina) e ácidos voláteis (variação do pH após fervura); para o extrato hidroalcolólico foram: fenóis e taninos (reação com cloreto férrico), antonianinas, antocianidinas e flavonoides (presença de coloração em pH 3, 8, 5 e 11), leucoantocianidinas, catequinas e flavonas (coloração da amostra alcalinizada e acidificada após aquecimento), flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas (reação com magnésio granulado com ácido clorídrico), esteroides e triterpenoides (extração com clorofórmio, anidrido acético e ácido sulfúrico), catequinas (reação com ácido clorídrico e aquecimento), resinas (formação de precipitado através da extração de resíduo sólido com etanol), heterosídeos cardioativos (teste de Kedde e Liebermann-Buchard), fenóis com posição orto e meta livres (reativo de Liebermann), fenóis com a posição para livre (reativo de Millon), cumarinas (extração com éter e câmara de luz ultravioleta), ácidos orgânicos (extração com éter e determinação do pH) e fenóis (reação de precipitação com cloreto férrico), segundo metodologias descritas em publicações especializadas.^{12,13}

Resultados e discussão

A realização da prospecção fitoquímica das folhas de *V. megapotamica* (Tarumã) revelou resultados positivos para a presença de heterosídeos antociânicos, fenóis e taninos, catequinas, flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas, esteroides e triterpenoides (esteróides livres), heterosídeos cardioativos, fenóis com posição orto e meta livres, fenóis com a posição para livre, cumarinas, ácidos orgânicos e fenóis. Foram observados testes negativos para heterosídeos cianogênicos, amino-grupos, ácidos voláteis, antonianinas, antocianidinas e flavonoides, leucoantocianidinas e flavonas e resinas (Tabela 1). Os resultados negativos não implicam necessariamente na sua ausência, sendo possível que a quantidade dos mesmos esteja pequena para ser detectada.

Tabela 1 – Prospecção fitoquímica das folhas de *V. megapotamica* em dois solventes (aquoso e etanólico); Forte: +++, Médio: ++, Fraco: +, Ausente: O, Não feito: -

Testes	Aquoso	Hidroalcóolico
Heterosídeos antocianícos	+++	-
Heterosídeos cianogênicos	O	-
Amino-grupos	O	-
Ácidos voláteis	O	-
Fenóis e taninos	-	+++
Antonianinas, antocianidinas e flavonoides	-	O
Leucoantocianidinas, catequinas e flavonas	-	++ para catequinas
Flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas	-	++
Esteroides e triterpenóides	-	++ esteróides livres
Catequinas	-	++
Resinas	-	O
Heterosídeos cardioativos	-	++
Fenóis com posição orto e meta livres	-	++
Fenóis com a posição para livre	-	+++
Cumarinas	-	+++
Ácidos orgânicos	-	++
Fenóis	-	+++

Os resultados indicam a presença de metabólitos secundários que podem estar relacionados à sua ação no tratamento de diversas patologias. Tendo em vista o resgate da biodiversidade brasileira e identificação das potencialidades das plantas e sua possível ação medicinal, alguns metabólitos secundários são apontados neste estudo como ponto de partida para este enfoque. Conforme a relação dos metabólitos secundários com suas possíveis atividades biológicas descritas por Simões e colaboradores (2010), compostos fenólicos atuam na inibição da peroxidação lipídica e a lipoxigenase, a presença destes pode

estar relacionados ao uso do tarumã como antiinflamatório e hipolipidêmico, taninos são empregados na medicina tradicional no tratamento de hipertensão arterial, reumatismo, feridas, antioxidante, anti-hemorrágico, cicatrizante, antiulcerogênico e anti-inflamatório em geral. Os heterosídeos cardioativos podem estar relacionados ao uso do tarumã como hipotensor citado na medicina popular. Triterpenos e esteroides atuam como anti-inflamatórios e hormonais, as cumarinas como anticoagulante, relaxante vascular, hipolipidêmica e hipotensora. Leucoantocianidinas, flavonas, flavanonas, antocianos, flavonóis conferem propriedades anti-inflamatórias, antivirais, antimicrobiana, antioxidante entre outras.¹⁴ A presença de esteroides e compostos fenólicos encontrados justificam a ação hipolipidêmica já citada para esta espécie.¹¹

Conclusão

A prospecção fitoquímica permitiu a detecção das principais classes de metabólitos secundários desta espécie, possibilitando correlacionar as suas possíveis atividades, com as descritas na literatura. Dessa forma, os farmacógenos encontrados neste estudo acenam para várias possibilidades terapêuticas o que servirá de apoio para direcionar os estudos a fim de se aprofundar ainda mais o conhecimento sobre essa espécie, uma vez que os dados sobre a planta ainda são escassos.

Agradecimentos

À Bióloga Prof^a. Dr^a. Thais Scotti do Canto-Dorow, Departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Maria, por proporcionar a identificação de *Vitex megapotamica* (SPRENGEL) MOLDENKE.

Referências bibliográficas

1. Cechinel Filho V, Yunes RA. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. Quim. Nova 1998; 21(1): p. 99-105.
2. Miguel MD, Miguel GO. Desenvolvimento de fitoterápicos. São Paulo: Robe, 1999.
3. Joly AB. Introdução à taxonomia vegetal. 13ª ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2002; p. 579-589.
4. Longhi RA. Árvores e arvoretas do Sul. Porto Alegre: Ed. L&PM, 1995; p. 151-152.
5. Alice CB, Mentz L, Siqueira NCS, Silva GAAB, Jose KF. Plantas medicinais de uso popular: atlas farmacognóstico. 1ª ed. Canoas: Ed. da Ulbra, 1995; p. 185-187.
6. Correa MP. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: IBDF, 1984.
7. Franco IJ, Fontana VL. Ervas e plantas: a medicina dos simples. Erechim: Imprimax, 1997, p. 177.

8. Rimpler H. Pterosteron, polypodin B and neues ecdysonartige steroids (viticosteron E) aus *Vitex megapotamica*. *Tetrahedron Letters*, 1969; 5 (10): p. 329-333.
9. Rimpler H. Phytoecdysones and iridoids from *Vitex megapotamica*. *Archiv der Pharmazie* 1972; 10 (305): p. 746-751.
10. Zanatta L, Sousa E, Cazarolli LH, Junior AC, Pizzolatti MG, Szpoganicz B, Silva FRMB. Effect of crude extract and fractions from *Vitex megapotamica* leaves on hyperglycemia in alloxan-diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 2007, n. 109, p. 151-155.
11. Brandt AP, Oliveira LFS, Fernandes FB, Alba J. Avaliação in vivo do efeito hipocolesterolêmico e toxicológico preliminar do extrato bruto hidroalcoólico e decoção da *Vitex megapotamica* (Spreng) Moldenke (*V. montevidensis* Cham.). *Rev. Bras. Farmacogn.* 2009; 19(2A): p. 388-393.
12. Moreira EA. Contribuição para o estudo fitoquímico de *Lobelia hassleri* A. ZAHLB e *Lobelia stellfeldii* R. Braga. *Companulaceae. Tribuna Farmacêutica* 1979; 47 (1): 13-39.
13. Matos FJA. Introdução à fitoquímica experimental. 3ª ed. Fortaleza: Editora da UFC; 2009.
14. Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora UFSC; 2010.

Thiele Faccim de Brum

Endereço para correspondência: Rua Silva Jardim, 1854, apto 82. — CEP: 97010-490, Santa Maria, RS, Brasil.

E-mail: thi_chaim@yahoo.com.br

Recebido em 30 de maio de 2011.

Aprovado em 13 de setembro de 2011.

MANUSCRITO 1 - Submetido à Revista Natural Product Research

Composition and antioxidant capacity of the essential oil of leaves of *Vitex megapotamica* (Sprengel) Moldenke

Thiele Faccim de Brum, Aline Augusti Boligon, Janaína Kieling Frohlich, Thiago Guilherme Schwanz, Marina Zadra, Mariana Piana, Amanda Luana Forbrig Froeder, Margareth Linde Athayde

Composition and antioxidant capacity of the essential oil of leaves of *Vitex megapotamica* (Sprengel) Moldenke

Thiele Faccim de Brum^a, Aline Augusti Boligon^a, Janaína Kieling Frohlich^a, Thiago Guilherme Schwanz^b, Marina Zadra^a, Mariana Piana^a, Amanda Luana Forbrig Froeder^a, Margareth Linde Athayde^{a*}

^aPhytochemical Research Laboratory, Department of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, Build 26, room 1115, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil;

^bCenter for Analysis and Organic Research (NAPO), Department of Chemistry, Federal University of Santa Maria, Build 15, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil.

*Correspondence: Tel: + (55) 32208950 Fax: +55 (55) 32208248

E-mail address: marga@ccs.ufsm.br (Margareth Linde Athayde)

Postal address: Department of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, Build 26, room 1115, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

Abstract

This study is designed to examine the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Vitex megapotamica*. GC-MS analysis was resulted in the detection of twenty-seven components, consisting 92.36% of the oil. The main components in the oil were butylated hydroxytoluene (34.17%), phytol (12.66%), α -caryophyllene (11.84%), δ -elemene (10.65%), β -caryophyllene (7.82%), γ -elemene (4.24%) and germacrene D (2.82%). The antioxidant activity of the oil was evaluated in terms of their free radical-scavenging activity against 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). The oil showed percentage inhibition of 35.62% and 75.25% at concentrations of 76 and 101.6 mg/ml, respectively. To the best of our knowledge, this is the first study of the composition and antioxidant activity of essential oil of the species *V. megapotamica*.

Keywords: *Vitex megapotamica*, essential oil, butylated hydroxytoluene, antioxidant capacity

1 Introduction

The Verbenaceae family consists of *ca.* 100 genera and 2600 species; of pantropical distribution, only a limited number of species occur in temperate regions. (Cronquist, 1981). The genus *Vitex* approximately includes 270 known species of trees and shrubs within tropical and sub-tropical regions, although few species may be found in temperate zones (McMillan, 1976). *Vitex megapotamica* is distributed in northeastern Argentina, eastern Paraguay, in Uruguay and commonly found in southern Brazil. In folk medicine, the infusion of the leaves of this plant is used as a diuretic, hypocholesterolemic, skin disorders and treatment of hemorrhoids; the use of the bark and leaves include also the fight against uric acid, high blood pressure, inflammation of the uterus, bladder and prostate (Alice et al, 1995).

The essential oils of some species of *Vitex* genus has being studied. The chemical composition of the essential oil of *Vitex agnus-castus* by GC and GC–MS analysis was resulted in the detection of 27 components, being the major components 1,8-cineole, sabinene , α -pinene, α -terpinyl acetate and (Z)- β -farnesene (Sarikurkcu et al, 2009). Limonene (74.2%) was found as a major component of the essential oil obtained from the leaves of *Vitex diversifolia* Bak.(Nébié et al, 2005).

Previous studies of *V. megapotamica* have reported the isolation of pterosteron, polypodin B, phytoecdysones and ecdysonatiges steroids and iridoids (Rimpler, 1969, 1972). Zanatta et al., (2007) demonstrated that *V. megapotamica* has an anti-hyperglycemic action, is able to ameliorate the diabetic state and, probably, is a source of hypoglycemic compounds whereas Brandt et al., (2009) demonstrated the hypolipidemic effect and reduction of serum cholesterol and triacylglycerol. In the same study, a preliminary phytochemical analysis revealed the presence of essential oils, flavanones glycosides, polyphenols, among other classes of secondary metabolites. However, there are no reports in the literature concerning the composition chemical of the essential oil. The present study report the chemical composition and antioxidant capacity of the essential oil from leaves of *V. megapotamica*, accessed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis and 1,1-diphenil-2-picrylhydrazil (DPPH) method.

2. Results and discussion

The leaves, under hydrodistillation, gave an white coloured oil with a yield of 1.75%; the identified constituents, with their relative percentages and retention indices are listed in Table S1. GC-MS showed the presence of 27 compounds, representing 92.36% of the total oil composition.

Butylated hydroxytoluene (BHT, 34.17%) was the most abundant component in *V. megapotamica* oil; also known as 2,6-bis (1.1-dimethylethyl-4-methylphenol), it have been widely used for many years as antioxidants to preserve and maintain the freshness, nutritive value, flavor and color of foods, and animal feed products (JECFA, 1996). BHT was also identified and quantified in the composition of essential oil of other species, such as *Zygophyllum album* L., *Solanum pseudocapsicum*, and also, in the leaves extracts of halophyte plant *Mesembryanthemum crystallinum* (Tigrine-Kordjani et al, 2006; Aliero et al, 2006; Bouftira et al, 2007; Bouftira et al, 2010).

In the group of secondary plant metabolites, antioxidant phenolics are commonly found in various fruits, vegetables and herbs and they have been shown to provide a defense against oxidative stress from oxidizing agents and free radicals (Matkowski, 2006). In plants, the synthesis of antioxidant secondary metabolites that absorb at 300-400 nm is significantly increased by UV radiation providing therefore a high level of protection from harmful oxidants generated thermally or by light (Larson, 1988). Bouftira et al (2007) and Bouftira et al (2010) found that the concentration of this phenol is depended on the plant growth stage and the flowering stage, period of a greatest exposure to solar radiation, is that which has the highest BHT concentration. Reactive oxygen species (ROS) are overproduced in plants under stress, including drought and desiccation, salt stress, chilling, heat shock, heavy metals, ultraviolet radiation, air pollutants, such as ozone and SO₂, mechanical stress, nutrient deprivation, pathogen attack and high light stress (Allen, 1995). To mitigate oxidative damage initiated by reactive oxygen species, plants have developed a complex antioxidative. This may explain the amount of BHT in oil composition of *V. megapotamica* because it was collected in summer and possibly undergone to exogenous interferences mentioned above. Conversely, the presence of BHT in *V. megapotamica* indicated that the essential oil could have interesting antioxidative properties.

Phytol (12.66%), is a usual constituent of the essential oils, being present in plants as *Leea indica*, *Cardaria draba*, and *Salvia splendens*, (Srinivasan et al, 2009; Radonic, 2011; Mathew & Thoppil, 2011).

The β -caryophyllene (7.82%) is an important component of the oil, since it has proven biological activities, such as antiedema, antiinflammatory, antitumor, antibacterial and spasmolytic, some of these activities has been given to its oxide-derived (Shimizu, 1990). It is a constituent of many essential oils, especially the oil of *Vitex agnus-castus* and *Feronia elephantum* (Pande et al, 2010; Sarikurkcu et al, 2009). Tzakou & Loukis (2009), working with the species *Achillea umbellata* described the presence of β -caryophyllene, germacrene D, α -copaene, α -cadinol in the in the oil of the aerial parts, these compounds are present in *V. megapotamica* too.

It is well known that antioxidant can seize the free radical chain of oxidation and form stable free radicals, which would not initiated or propagate further oxidation, and DPPH has been used extensively as free radical to evaluate reducing substances. DPPH solutions show a strong absorption band at 518 nm appearing as a deep violet colour. In the presence of an active radical scavenger, the absorption vanishes and the resulting decolourization is stoichiometric at a selected range with respect to the degree of reduction. The remaining

DPPH, measured after a certain time, corresponds inversely to the radical-scavenging activity of the antioxidant, i.e., the degree of decolouration indicates the free radical-scavenging efficiency of the fractions (Kulisic et al, 2004).

The anti-scavenging ability of the essential oil applied on silica gel TLC plates was determined using quercetin as a reference. One sample yellow spot could be observed immediately after spraying DPPH reagent on the TLC plate, suggesting interesting antioxidant activity for this oil. Therefore, the radical scavenging of the *V. megapotamica* oil was estimated by DPPH, using ascorbic acid as a reference. The oil was active at 76.0 and 101.6 mg/ml concentrations, representing 35.62% and 75.25% of inhibition, respectively, when compared with ascorbic acid, a well documented antioxidant.

To the best of our knowledge, this is the first study of the composition and antioxidant activity of essential oil of the species *V. megapotamica*. Considering the results presented here, further studies can be performed with the oil of this species in order to relate the chemical constituents found with particular biological property.

Acknowledgements

The authors would like to thank the professors from NAPO (Center for Analysis and Organic Research at Federal University of Santa Maria) for providing the CG/MS chromatograms and spectra and A. F. Morel (Department of Chemistry at Federal University of Santa Maria) for the assessment of the *n*-alkane series. The authors thank the financial support of CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)/Brazil.

References

- Alice, C.B., et al. (1995). *Plantas medicinais de uso popular: atlas farmacognóstico*. 1. ed. Canoas: Ed. da Ulbra, p. 185-187
- Aliero, A.A., Grierson, D.S. & Afolayan, A.J. (2006). Chemical composition of the essential oil from *Solanum pseudocapsicum*. *Pakistan Journal Biological Sciences*, 9, 1175-1177.
- Allen, R.D. (1995). Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant Physiology*, 107, 1049-1054.
- Bouftira, I., Abdelly, C., & Sfar, S. (2007). Identification of a naturally occurring 2,6-bis (1,1-dimethylethyl)-4- methylphenol from purple leaves of the halophyte plant *Mesembryanthemum crystallinum*. *African Journal of Biotechnology*, 6,1136–1139.

- Bouftira, I., Imen, M., & Souad, S. (2010). Dosage of 2,6-Bis (1.1-dimethylethyl)-4-methylphenol (BHT) in the plant extract *Mesembryanthemum crystallinum*. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, article ID 142486, 5 pages.
- Brandt, A. P., Oliveira de, L. F. S., Fernandes, F. B. & Alba, J. (2009). Avaliação in vivo do efeito hipocolesterolêmico e toxicológico preliminar do extrato bruto hidroalcoólico e decocção da *Vitex megapotamica* (Spreng) Moldenke (*V. montevidensis* Cham.). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19, 388-393.
- Hurford, N., Law, R.J., Payne, A.P. & Fileman, T.W. (1989). Concentration of chemicals in the north sea arising from discharging from chemical tankers. *Oil Chem Pollut*, 5, 391-410.
- JECFA, (1996) Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants in food. WHO Food Additives Series, No 35. *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*, Geneva, 3–86.
- Kulusic, T., Radonic, A., Katanilic, V., Milos, M. (2004). Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chem.*, 85, 633-640.
- Larson, R.A. (1988). The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*, 27, 969.
- Matkowski, A. (2006). Plant phenolic metabolites as antioxidants and antimutagens. In: Blume, Y., Smertenko, P., Durzan, D.J. (Eds.), *NATO Life Science Monographs*, IOS Press, Amsterdam, 376, 129–148.
- Mathew, J. & Thoppil, J.E. (2011). Chemical composition and mosquito larvicidal activities of *Salvia* essential oils. *Pharmaceutical biology*, 49, 456-463.
- McMillan, X. (1976). A Concise Dictionary of Plants Cultivated in the United States and Canada. In: Bayley, L.H. (Ed.). *Hortorium*. Cornell University, New York, 1161-1162.
- Nébié, R.H.Ch., Yaméogo, R.T., Bélanger, A. & Sib, F.S. (2005). Chemical composition of essential oils of *Vitex diversifolia* Bak. from Burkina Faso. *Journal of Essential Oil Research*, 17, 276-277
- Pande, C., Tewari, G., Singh, S., & Padalia, R.C. (2010). Chemical composition of the essential oil of *Feronia elephantum* Correa. *Natural Product Research*, 24, 1807-1810.
- Radonic, A., Blazevic, I., Mastelic, J., Zekic, M., Skocibusic, M., & Maravic, A. (2011). Phytochemical Analysis and Antimicrobial Activity of *Cardaria draba* (L.) DESV. Volatiles. *Chemistry & Biodiversity*, 8, 1170-1181.
- Rimpler, H. (1969). Pterosteron, polypodin B and neues ecdysonartiges steroids (viticosteron E) aus *Vitex megapotamica*. *Tetrahedron Letters*, 5, 329-333.

- Rimpler, H. (1972). Phytoecdysones and iridoids from *Vitex megapotamica*. *Archiv der Pharmazie*, 10, 746-751.
- Sarikurkcu, C., Arisoy, K., Tepe, B., Cakir, A. & Abali G. (2009). Studies on the antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of *Vitex agnus- castus* L. fruits from Turkey. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 2479-2483.
- Shimizu, M. (1990). Quantity estimation of some contaminants in commonly used medicinal plants. *Chem Pharm Bull*, 38, 2283-2287.
- Srinivasan, G. V., Sharanappa, P., Leela, N. K., Sadashiva, C. T. & Vijayan, K. K. (2009). Chemical composition and antimicrobial of the oil *Leea indica* (Burm. f.) Merr. Flowers. *Natural Product Radiance*, 8, 488-493.
- Tigrine-Kordjani, N., Meklati, B.Y., Chemat, F. (2006). Analysis by gas chromatography-mass spectrometry of the essential oil of *Zygophyllum album* L., an aromatic and medicinal plant growing in Algeria. *The International Journal of Aromatherapy*, 16, 187–191.
- Tzakou, O. & Loukis, A. (2009) Chemical composition of the essential oil of *Achillea umbellate* growing I Greece. *Natural Product Research*, 23, 264-270.
- Zanatta, L., Sousa, E., Cazarolli, L. H., Junior, A. C., Pizzolatti, M. G., Szpoganicz, B. & Silva, F.R.M.B. (2007). Effect of crude extract and fractions from *Vitex megapotamica* leaves on hyperglycemia in alloxan-diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 109, p. 151-155.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Composition and antioxidant capacity of the essential oil of leaves of *Vitex megapotamica* (Sprengel) Moldenke

Thiele Faccim de Brum^a, Aline Augusti Boligon^a, Janaína Kieling Frohlich^a, Thiago Guilherme Schwanz^b, Marina Zadra^a, Mariana Piana^a, Amanda Luana Forbrig Froeder^a e Margareth Linde Athayde^{a*}

^aPhytochemical Research Laboratory, Department of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, Build 26, room 1115, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil;

^bCenter for Analysis and Organic Research (NAPO), Department of Chemistry, Federal University of Santa Maria, Build 15, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil.

*Correspondence: Tel: + (55) 32208950 Fax: +55 (55) 32208248

E-mail address: marga@ccs.ufsm.br (Margareth Linde Athayde)

Postal address: Department of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, Build 26, room 1115, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

Abstract

This study is designed to examine the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Vitex megapotamica*. GC-MS analysis was resulted in the detection of twenty-seven components, consisting 92.36% of the oil. The main components in the oil were butylated hydroxytoluene (34.17%), phytol (12.66%), α -caryophyllene (11.84%), δ -elemene (10.65%), β -caryophyllene (7.82%), γ -elemene (4.24%) and germacrene D (2.82%). The antioxidant activity of the oil was evaluated in terms of their freeradical-scavenging activity against 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). The oil showed percentage inhibition of 35.62% and 75.25% at concentrations of 76 and 101.6 mg/ml, respectively. To the best of our knowledge, this is the first study of the composition and antioxidant activity of essential oil of the species *V. megapotamica*.

Keywords: *Vitex megapotamica*, essential oil, butylated hydroxytoluene, antioxidant capacity

Experimental

Plant Material

The leaves of *Vitex megapotamica* were collected in Santa Maria, State of Rio Grande do Sul, Brazil, in March of 2011. A exsiccate was archived as voucher specimen in the herbarium of Department of Biology at Federal University of Santa Maria by register number SMDB 13071, for future reference.

Extraction of the essential oil

The essential oil was obtained from the fresh leaves (88,22g), was subjected to hydro-distillation process in a Clevenger apparatus for 4 hours. The oil was separated from water with ethyl ether that was evaporated at room temperature. The yielding of oils was calculated on the basis on the fresh weight of the plant materials. The oil samples obtained was stored at 4-6 °C until it was submitted to GC-MS analysis.

Analysis of the essential oil

The oil was analysed by using a Agilent Technologies Gas Chromatograph model 6890N interfaced with a mass spectrometer model 5975B inert XL CI/EI MSD Agilent Technologies. The separation of the compounds was realized with a DB-5MS (J&W Scientific) fused silica capillary column (30 m X 0.25 mm i.d. X film thickness 0,25 µm). The injector temperature remained 280 °C, the injection volume was 1.0 µL with split ratio 13.3:1. Helium was used as carrier gas with constant flux to 1.3 mL min⁻¹. The oven temperature was programmed from 50 °C to 300 °C at 5 °C min⁻¹ to analysed the oil. Mass spectra was taken in the EI mode scan at 70 eV.

Identification of components

The identification of constituents was performed on the basis of retention index (RI), determined with reference to the homologous series of n-alkanes, C₉ – C₂₆, C₂₈ and C₃₀, under identical experimental conditions, MS library search (NIST) and by comparing with the MS literature data (Adams, 1995). The relative amounts of individual components were calculated based on the GC peak area without using correction factors.

Preliminary evaluation of the antioxidant activity against DPPH radical

Ten microlitres of the essential oil were applied to TLC plates (silica gel 60 GF₂₅₄) and sprayed with a 0.15% 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) solution in MeOH and left at room temperature for 30 minutes. Active compounds appear as yellow spots against a purple background (Cavin, et al., 1998; Marin, et al., 2008). Quercetin was used as positive control.

Radical scavenging capacity – DPPH assay

The antioxidant activity of the essential oil was evaluated by monitoring their ability in quenching the stable free radical DPPH, according to a slightly modified method previously described by Choi et al. (2002). Spectrophotometric analysis was used to measure the free radical-scavenging capacity (RSC). Four different ethanol dilutions of oil at 101.6,

76.0, 25.3 and 8.4 mg/mL were mixed with 1.0 mL of DPPH 0.3 mM in ethanol solution. After 30 min, absorption was measured at 518 nm, where the radical DPPH shows maximum absorption. A solution of DPPH (1 mL; 0.3 mM) in ethanol (2.5 mL) was used as a negative control and ascorbic acid in the same concentrations used for the essential oil provided the positive control. Ethanol was used to calibrate the spectrophotometer. The test was performed in triplicate and the calculation of the antioxidant activity followed the equation:

$$\% \text{ inhibition} = 100 - \frac{[(\text{Abs. sample} - \text{Abs. blank}) \times 100]}{\text{Abs. control}}$$

where Abs_{sample} is absorbance of the sample; Abs_{blank} is absorbance of blank without adding the DPPH; Abs_{control} is absorbance the solution of ethanol in DPPH. The percentage of inhibition was calculated and a graphic of percentage of inhibition versus concentration was constructed. Experiments were carried out in triplicate. Correlation coefficients were optimized (Tsimogiannis and Oreopoulou, 2006).

References

- Adams, R.P. (1995). *Identification of essential oil components by Gas Chromatography/Mass spectroscopy*. Allured Publishing Corporation: Illinois USA, p. 456.
- Cavin, A., Potterat, O., Wolfender, J., Hostettmann, K., & Dyatmyko, W. (1998). Use of On-flow LC/¹H NMR for the Study of an Antioxidant Fraction from *Orophea enneandra* and Isolation of a Polyacetylene, Lignans, and a Tocopherol Derivative. *Journal of natural products*, 61, 1497-1501.
- Choi, C.W., Kim, S.C., Hwang, S.S., Choi, B.K., Ahn, H.J., Lee, M.Y., Park, S.H., Kim, S.K. (2002). Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Sci.* 63, 1161–1168.
- Marin, R., Apel, M.A., Limberger, R.P., Raseira, M.C.B., Pereira, J.F.M., Zuanazzi, J.A.S., & Henriques, A.T. (2008). Volatile components and antioxidant activity from some Myrtaceous fruits cultivated in Southern Brazil. *Lat. Am. J. Pharm.*, 27, 172-177.
- Tsimogiannis, D.I., Oreopoulou, V., (2006). The contribution of flavonoids C-ring on the DPPH free radical scavenger efficiency. A kinetic approach for the 30,40-hydroxy substituted members. *Food Sci. Emerging Technol.* 7, 140–146.

Table S1- Chemical compositions of the leaves essential oil of *Vitex megapotamica*.

RI (min)	Compound	Percent composition	KI ^a	KI ^b
15.643	<i>trans</i> -2-decenal	0.03	1261	1261
17.564	γ-elemene	4.24	1331	1339
18.741	α -copaene	1.59	1376	1376
18.952	β -bourbunene	0.16	1384	1384
19.088	β -elemene	1.16	1389	1391
19.551	α -gurjunene	0.07	1407	1409
19.907	β-caryophyllene	7.82	1421	1418
20.143	β -cubebene	0.21	1430	1390
20.071	γ -gurjunene	0.03	1427	1473
20.364	aromadendrene	0.28	1439	1439
20.546	seychellene	0.08	1446	1460
20.686	β -gurjunene	0.08	1452	1432
20.834	α-caryophyllene	11.84	1458	1454
20.913	alloaromadendrene	0.60	1461	1461
21.272	β -chamigrene	0.60	1475	1475
21.439	germacrene D	2.82	1482	1480
21.655	<i>cis</i> - β -guaiene	0.32	1490	1490
21.820	δ-elemene	10.65	1497	1339
22.009	butylated hidroxytoluene	34.17	1542	1512
22.343	α -cadinene	0.69	1519	1538
23.310	<i>trans</i> -nerolidol	0.05	1560	1564
23.758	spathulenol	1.28	1578	1576
23.968	globulol	0.73	1587	1583
24.177	viridiflorol	0.51	1596	1590
25.264	α -muurolol	0.60	1643	1645
25.560	α -cadinol	0.25	1657	1653
34.842	phytol	12.66	2113	2221
Total identified		92.36		

Relative proportions of the essential oil constituents were expressed as percentages obtained by peak-area normalization. Rt = Retention time according their order on MS. ^aKovat's indices experimental (base don homologous series of *n*-alkane C₇-C₃₀). ^bKovat's indices literature (Adams, 1995).

MANUSCRITO 2 – Para submissão à Revista Brasileira de Farmacognosia**HPLC analysis of phenolics compounds and antioxidant activities of leaves of *Vitex megapotamica* (Sprengel) Moldenke**

Thiele F. de Brum, Marina Zadra, Mariana Piana, Aline A. Boligon, Janaína K. Frohlich, Robson B. Freitas, Amanda L. F. Froeder, Michel M. Machado, Romaiana P. Pereira, Sílvio T. Stefanello, João B. T. Rocha, Margareth L. Athayde

HPLC analysis of phenolics compounds and antioxidant capacities of leaves of *Vitex megapotamica* (Sprengel) Moldenke

Thiele F. de Brum¹, Marina Zadra¹, Mariana Piana¹, Aline A. Boligon¹, Janaína K. Frohlich¹,
Robson B. Freitas¹, Amanda L. F. Froeder¹, Michel M. Machado¹, Romaiana P. Pereira²,
Sílvio T. Stefanello², João B. T. Rocha², Margareth L. Athayde^{1*}

¹Phytochemical Research Laboratory, Department of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, Build 26, room 1115, RS, 97105-900, Brazil.

²³Toxicological Biochemistry Research Laboratory, Department of Chemistry, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil.

* Correspondence: Tel: + (55) 32208950 Fax: + 55 (55) 32208248

E-mail address: margareth@smail.ufsm.br (Margareth Linde Athayde)

Postal address: Department of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, Build 26, room 1115, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

ABSTRACT

Antioxidant activities of fractions and crude extract from the leaves of *Vitex megapotamica* were determined in this study. Compounds identified by HPLC/DAD analysis of the crude extract and fractions from leaves of *V. megapotamica* revealed two compounds phenolics (chlorogenic and rosmarinic acids). Oxidative stress parameters were determined, cerebral lipid peroxidation was induced by Fe(II) and protein carbonyl with 2,4-dinitrophenylhydrazine. Radical-scavenging activity was determined by DPPH method. Total phenolics were measured using Folin-Ciocalteu, total flavonoids using aluminium chloride and tannins condensed by method vanillin. IC₅₀ (DPPH) ranged from 14.17 ± 0.76 to 37.63 ± 0.98 µg/ml. Ethyl acetate fraction might contain the strongest lipid peroxidation inhibitory compounds with IC₅₀ from 16.36 ± 5.09 µg/ml, also was the one with the highest content of polyphenols (522.4 ± 1.12 mg/g), flavonoides (220.48 ± 0.30 mg/g) and condensed tannin (3.86 ± 0.53 mg/g). Higher dosages of the extracts were more effective in reducing levels of plasma proteins carbonyl. Results obtained indicated that *V. megapotamica* exhibits good potential to prevent disease caused by the overproduction of free radicals and also it might be used as a potential source of natural antioxidant agents.

Keywords: DPPH, HPLC, phenolics, TBARS, *Vitex megapotamica*

1 Introduction

Numerous crude extracts and pure natural compounds from plants were reported to have antioxidant and radical-scavenging activities and intensive research has been carried out either to characterize the antioxidant properties of extracts and/or to isolate and identify the compounds responsible for those activities seeking the development of natural antioxidant formulations in the areas of food, medicine and cosmetics (Miliauskas et al., 2004, Barla et al., 2007; Boligon et al., 2009; Kintzios et al., 2010).

Phenolic compounds are known to be responsible for the free radical scavenging and antioxidant activities of plants; they possess many biological effects, of which are mainly attributed to their antioxidant activities in scavenging free radicals, inhibition of peroxidation and chelating transition metals (Bahman et al., 2007). Free radicals are reactive oxygen species (ROS), which include hydrogen peroxide, hydroxyl radical, nitric oxide, peroxy nitrite, singlet oxygen, peroxy radical, and superoxide anion (Halliwell, 2001). An over-production of these reactive species will result in oxidative stress brought about by the imbalance of the bodily antioxidant defense system and free radical formation. Oxidative stress has been shown to be one of the mechanisms that correlated with oxidative damages caused by the free radicals leading to chronic diseases like cancer, coronary heart diseases, diabetes, neurodegenerative diseases, and even aging (Mayne, 2003). Different therapeutic strategies have been proposed for the prevention and treatment of ROS-mediated diseases, with special emphasis on antioxidant therapy, that can delay or inhibit the oxidation of lipids or other molecules by inhibiting the initiation or propagation of oxidative chain reactions.

Vitex megapotamica (Sprengel) Moldenke belongs to the Verbenaceae family and is popularly known as “tarumã”. Is distributed in northeastern Argentina, eastern Paraguay, in Uruguay and commonly found in southern Brazil. In traditional medicine, the infusion of the leaves of this plant is used as a diuretic and hypocholesterolemic, as anti-inflammatory, in

cases of rheumatism, treatment of hemorrhoids and skin disorders, among other (Alice et al., 1995; Joly, 2002). Older studies of *V. megapotamica* have reported the isolation of pterosteron, polypodin B, phytoecdysones and ecdysonatiges steroids and iridoids (Rimpler, 1969, 1972). Recently, Zanatta et al., (2007) demonstrated that *V. megapotamica* has an anti-hyperglycemic action, is able to ameliorate the diabetic state being probably, a source of hypoglycemic compounds whereas Brandt et al., (2009) demonstrated an hypolipidemic effect with reduction of serum cholesterol and triacylglycerol. Therefore, this study aimed to identify phenolic compounds by high performance fractions.

2. Methods

2.1. Chemicals, apparatus and general procedures

All chemicals were of analytical grade. Solvents for the extractions, dichloromethane, ethyl acetate, ethanol and n-butanol were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Rutin, catechin, gallic, ascorbic, chlorogenic, and rosmarinic acids, 2,2-diphenyl,1-picrylhydrazyl (DPPH), dimethylsulfoxide (DMSO), tris-HCl, thiobarbituric acid, and sodium dodecyl *sulfate* (SDS) were acquired from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Folin-Ciocalteu and Iron Sulfide (FeSO_4) were acquired from Merck (Darmstadt, Germany). High performance liquid chromatography (HPLC-DAD) was performed with the HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan), Prominence Auto-Sampler (SIL-20A), equipped with Shimadzu LC-20AT reciprocating pumps connected to the degasser DGU-20A5 with integrator CBM-20A, UV-VIS detector DAD SPD-M20A and software LC Solution 1.22 SP1.

2.2. Animals

Male Wistar rats (3.0–3.5 months of age and weighing 270–320 g) were maintained groups of 3–4 rats per cage. They had continuous access to food and water in a room with controlled temperature ($22 \pm 3^\circ\text{C}$) and on a 12-h light/dark cycle with lights on at 7:00 a.m. The animals were maintained and used in accordance to the guidelines of the Brazilian

Association for Laboratory Animal Science (COBEA) (project number 23081.005770/2009-38).

2.3. Plant collection and extractions

Leaves of *V. megapotamica* were collected in Santa Maria (Rio Grande do Sul State of Brazil) in December of 2010. A dried voucher specimen is preserved in the herbarium of the Department of Biology at Federal University of Santa Maria by register number SMBD 13071.

Plant material was dried at room temperature and powdered in a knife mill. The leaves (1272.68 g) were macerated at room temperature with ethanol 70% for a week with daily shake-up; the solvent has been renovated several times. After filtration, the hydroalcoholic extract was evaporated under reduced pressure at temperature below 40°C, in order to obtain the aqueous extract; part of this aqueous extract was evaporated to dryness to furnish a crude extract. The remaining aqueous extract was partitioned with solvents of increasing polarity: dichloromethane, ethyl acetate and n-butanol. Finally, the fractions obtained were concentrated to dryness in a rotary evaporator and their yields were determined.

2.4. Determination of total phenolics

Total phenolic contents were measured using Folin–Ciocalteu method, slightly modified as described by Boligon et al., (2009). Gallic acid was used as standard to construct a calibration curve in the range of 0.005 to 0.030 mg/mL. Samples were read in triplicate at 730 nm in a spectrophotometer. Total phenolic content was expressed in milligrams equivalents of gallic acid (GAE) per gram of each fraction.

2.5. Determination of total flavonoids

Total flavonoid were determined according to a slightly modified colorimetric method described by Woisky & Salatino, (1998). Samples were prepared at a concentration of 1.0 mg/mL in methanol. Briefly, 0.5 mL of each sample was added to 0.5 mL of AlCl_3 (2%, w/v)

and 2.5 mL of methanol. The absorbances were measured at 420 nm against the blank. Rutin was used to construct the calibration curve and the test was performed in triplicate. The flavonoid content was established in milligrams equivalents of rutin per gram of each fraction.

2.6. Determination of condensed tannins

Condensed tannins were determined by the vanillin method according Morrison et al., (1995). Samples were prepared at a concentration of 25.0 mg/mL in methanol. To 0.1 mL of each sample were added 0.9 mL of methanol, 2.5 mL of solution A (8.0 mL concentrated HCl in 100.0 mL methanol) and 2.5 mL of solution B (1.0 g vanillin in 100.0 mL methanol). The absorbances were read at 500 nm against the blank of each sample. Catechin was used to make the calibration curve and the test was performed in triplicate. The condensed tannins content was expressed in milligram equivalents of catechin per gram of each fraction.

2.7. Radical-scavenging activity – DPPH assay

The antioxidant activity of the fractions and the crude extracts was evaluated by monitoring its ability in quenching the stable free radical DPPH, according to a slightly modified method previously described by Choi et al., (2002). The DPPH quenching ability was expressed as IC₅₀ (the extract concentration required to inhibit 50% of the DPPH in the assay medium). Six different ethanol dilutions of each sample at 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62, and 7.81 µg/mL were tested. A solution of DPPH (1mL; 0.3mM) in ethanol (2.5 mL) was used as a negative control and ascorbic acid in the same concentrations used for the samples provided the positive control. The absorption was measured at 518 nm and ethanol was used to calibrate the spectrophotometer. The test was performed in triplicate and the antioxidant activity was calculated by the equation:

$$\% \text{ inhibition} = 100 - \frac{[(\text{Abs}_{\text{sample}} - \text{Abs}_{\text{blank}}) \times 100]}{\text{Abs}_{\text{control}}}$$

2.8. In vitro Fe (II)-induced lipid peroxidation in rat brain

Rats were killed and the encephalic tissue was rapidly dissected and placed on ice. Tissues were immediately homogenized in cold 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 (1/10, w/v). The homogenate was centrifuged for 10 min at 4,000 x g to yield a pellet that was discarded and a low-speed supernatant (S1) that was used for the TBARS assay. An aliquot of 100µL of S1 was incubated for 1 h at 37°C with freshly prepared FeSO₄ (10 µM), in the presence of different extracts fractions of *V. megapotamica*. Then, TBARS production was determined as described by Ohkawa et al., (1979).

2.9. Protein carbonyl groups

Were collected plasma the rats and the determination of total protein in plasma was conducted using the commercial kit Labtest® as recommended by the manufacturer. Plasma samples were diluted and after, put in refrigerator for 2 h. Plasma were obtained from peripheral blood allowed to clot at room temperature for 2 h, separated by centrifugation at 200 x g for 15 min in centrifuge, and stored at -80°C until used. The plasma content of protein carbonyl groups was evaluated with use of the Levine, (1990) method; briefly, 100 µl of plasma was incubated with 100 µl of a 20 mM 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) solution for 60 min. Then the proteins were precipitated from the solution with the use of 20% trichloroacetate; the protein pellet was washed three times with ethanol and ethyl acetate and resuspended in 1 ml of 6 M guanidine at 37°C for 15 min. The carbonyl content was determined by reaction with DNPH and the absorbances were read at 366 nm (molar absorption coefficient, 22.000 M⁻¹/cm) (Morabito, 2004).

2.10. HPLC-DAD qualitative and quantitative analysis of polyphenols

High performance liquid chromatography was performed with Prominence Auto-Sampler (SIL-20A) equipped with Shimadzu LC-20AT (Shimadzu, Kyoto, Japan) reciprocating pumps connected to a DGU-20A5 degasser and CBM-20A integrator. UV-VIS

detector DAD SPD-M20A and Software LC solution 1.22 SP1 were used. Reverse phase chromatography analyses were carried out with a Phenomenex C-18 column (4.6 mm x 250 mm) packed with 5 μ m diameter particles, volume injection was 40 μ L and the gradient elution was conducted according to the Evaristo & Leitão, (2001) method with minor modifications. Mobile phase consists of water containing 2.0% acetic acid (solvent A) and methanol (solvent B). The UV absorption spectrums of the standards as well as the samples were recorded in the range of 230-400 nm. Stock solutions of standards were prepared in methanol in the range of 0.0025-0.045 mg/mL. Samples and standards solutions as well as the mobile phase were degassed and filtered through 0.45 μ m membrane filter (Millipore). Chromatographic operations were carried out at ambient temperature and in triplicate.

2.11. Statistical analysis

Data from the TBARS and protein carbonyl assay were analyzed statistically by oneway analysis of variance (ANOVA), followed by Duncan's multiple range tests when appropriated using the statistical software SPSS 10.0 for Windows. Graphics were constructed using the Slide Write 4.032 Bit Edition program. To DPPH, total phenolics, flavonoids, and tannins assays were analyzed statistically by oneway analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey test using the statistical package SAS (2001). Statistical p values were calculated to quantify levels of significance for each treatment type. A significant p value ($p < 0.05$, $p < 0.01$, or $p < 0.001$ when appropriate) means that there exists significant difference between the two sets of data being analyzed.

3 Results and discussion

3.1 Phenolic contents, total flavonoids, condensed taninns and free radical-scavenging activities

The results obtained for polyphenols, flavonoids and tannins are interpolated in the analytical curve ($Y = 15.635x + 0.0194$, $r = 0.9671$, $y = 4.2561 x + 0.0052$, $r = 0.9999$, $y =$

0.0015 x + 0.0005, $r = 0.9936$), respectively, showing no deviation from linearity ($p = 0.05$), as determined by the (ANOVA). Total phenolic (TP), total flavonoids (TF), condensed tannins (CT) and DPPH (IC_{50}) are given in Table 1. Values followed by different letters in each column differ significantly at $P < 0.05$ according to the Tukey test. Ethyl acetate fraction was the one with the highest content of polyphenols and flavonoids in this study (522.4 mg/g of GAE equivalents and 220.48 mg/g of rutin equivalents, respectively). High contents of polyphenols and flavonoids in the ethyl acetate fractions were also reported by Boligon et al., (2012) working with *Scutia buxifolia* leaves (322.69 mg/g of GAE equivalents and 145.72 mg/g of rutin equivalents, respectively), Janovik et al., (2011), studying *Cariniana domestica* leaves (510.00 to 214.32 mg/g; and 39.92 to 15.26 mg/g for phenolics and flavonoids), and Schubert et al., (2007), working with *Ilex paraguariensis* leaves and fruits whose phenolic contents ranged from 86.82 to 199.91 mg/g. Studies of qualitative composition of plant extracts revealed the presence of high concentrations of phenolics in the extracts obtained using polar solvents. Various phytochemical components, especially polyphenols are known to be responsible for the free radical scavenging and antioxidant activities of plants. (Lee et al., 2003; Atoui et al., 2005).

The most common methods to determine antioxidant activity in a practical, rapid and sensitive are those that involve a radical chromophore, simulating the reactive oxygen species, and the free radical DPPH, of purple coloration that absorbs 515 nm, one of the most widely used for in vitro evaluation of plant extracts and fractions (Arnao et al., 2000). By the action of an antioxidant or a radical species, the DPPH is reduced to form diphenyl-hydrazine picril (yellow), with a consequent decrease of the absorption (Brand-Williams et al., 1995; Sánchez-Moreno et al., 1998). In fact, the best results of IC_{50} were obtained of the fractions ethyl acetate and butanolic, what could be explained on the basis of the similarity between compounds with high antioxidant activity extracted by these organic solvents. Several studies

have demonstrated that butanolic and ethyl acetate fractions are good sources of antioxidant compounds (Schubert et al., 2007; Tseng et al., 1997; Turkmen et al., 2006; Tung et al., 2009). Through the antioxidant capacity measured by DPPH was found that there was no significant difference in ethyl acetate and butanolic fractions, which showed the best results. The ethyl acetate fraction showed a relatively high value of polyphenols, almost twice the butanolic fraction, and however, showed the same antioxidant capacity. Similar behavior was observed for the crude extract which had the second highest content of polyphenols and flavonoids, although, the antioxidant activity was lower than these fractions. Several authors have described the strong correlation between antioxidant activity (DPPH method) and phenolic compounds (Mustafa et al., 2010; Surveswaran et al., 2007; Sousa et al., 2007). It was possible to see that this relationship was well established with *V. megapotamica*. This fact can be explained by several factors, in their midst the presence of several active compounds present in the plant that may trend towards different antioxidant abilities, but also synergistic effects of different compounds, experimental conditions and mechanisms of antioxidant reactions method used may affect this association (Jayaprakasha & Patil, 2007). In addition, the structure of the phenolic groups and possible changes in hydroxyl, by glycosylation as an example, cause a decrease in antioxidant activity, due to the reduction in the number of hydroxyls and the steric hindrance that sugar gives, difficulting the connection to the free radical (Cho et al., 2003). There are also compounds that react strongly with the DPPH, and others that have a mechanism for slower reaction (Tsimogiannis & Oreopoulos, 2006). In a way, the highest values of polyphenols and flavonoids in the ethyl acetate fraction relate to the good results of inhibition of DPPH radical. The dichloromethane fraction had the lowest polyphenol and flavonoids content and antioxidant activity also lower than all other fractions and ascorbic acid. This fact was expected due to the low polarity of the solvent.

The results for the content of condensed tannins in this study were not satisfactory, because only the ethyl acetate fraction obtained a small amount of these compounds. In a preliminary phytochemical analysis performed by Brum et al, (2011), revealed the presence of tannins in hydroalcoholic extract by reaction with ferric chloride. Some authors attribute to several factors that may be related to the low tannin content and the absence of solvent extractors used in this study, such as seasonality and the influence of collection site, effect of air pollution and the effect of nutrient restriction soil (Simón et al., 1999; Hatano et al., 1986; Salminen et al., 2001; Pansera et al., 2003; Furlan et al., 1999). It also can interfere with the solvent extractor and experimental methodology, because according to the method depends on the reaction of vanillin with vanillin tannins to form colored complexes. The success of this test depends on the type of solvent used, the concentration and nature of the acid, the reaction time, temperature and concentration of vanillin.

Table1. Total phenolic content, total flavonoids, condensed tannins and antioxidant activity (IC₅₀/DPPH) for crude extract and fraction of *V. megapotamica*

Extract/fraction	TP^a ± S.E.^d (mg/g)	TF^b ± S.E.^d (mg/g)	T^c ± S.E.^d (mg/g)	IC₅₀ ± S.E.^d (µg/mL)
Crude extract	309.1b ± 0.88	198.09b ± 0.33	-	20.44b ± 0.37
Dichloromethane	113.1d ± 1.30	148.44c ± 0.55	-	37.63a ± 0.34
Ethyl acetate	522.4a ± 1.12	220.48a ± 0.30	3.86 ± 0.53	16.21c ± 0.38
n-butanolic	216.8c ± 0.42	151.02c ± 0.46	-	14.17c ± 0.21
Ascorbic acid	-	-	-	14.86c ± 0.28

^a TP = total phenolics expressed as gallic acid equivalents (mg/g fraction ± S.E.)

^b TF = total flavonoids expressed as rutin equivalents (mg/g fraction ± S.E.)

^c T = condensed tannins expressed as catechin equivalents (mg/g fraction ± S.E.)

^d S.E.= Standard error

3.2 Lipid peroxidation

Lipid peroxidation was an oxidative deterioration process of polyunsaturated fatty acids which was damaged by radical. The MDA, however, is one of the most widely used biomarkers for being one of the secondary products of lipid peroxidation well known (Su et al., 2009; Esterbauer et al., 1991). The results demonstrated the effect of *V. megapotamica* at

different fractions on TBARS production in brain, induced by Fe(II), since the brain tissue is vulnerable to free radical damage in view of the fact of its high consumption of oxygen and relatively low concentration of antioxidant enzymes and free radicals scavengers. The ethanol was utilized in both fractions tested as the dilution vehicle and not demonstrated interference at the obtained results. The *V. megapotamica* fractions reducing the TBARS production considerably and this occurring parallel with the increase of concentrations tested. All the fractions of *V. megapotamica* decreased the MDA production at basal levels however the crude extract, ethyl acetate and butanolic fractions demonstrate this effect at lower concentrations when compared with the dichloromethane fraction. In this essay, the IC₅₀ was in the following order: dichloromethane > butanolic > crude extract > ethyl acetate (figure 1 and table 2). These results suggested that the ethyl acetate fractions might contain the strongest lipid peroxidate inhibitory compounds, because is the fraction that has a 50% inhibition in the production of TBARS in a lower concentration. The inhibition of lipid peroxidation showed a positive relation with the total phenols.

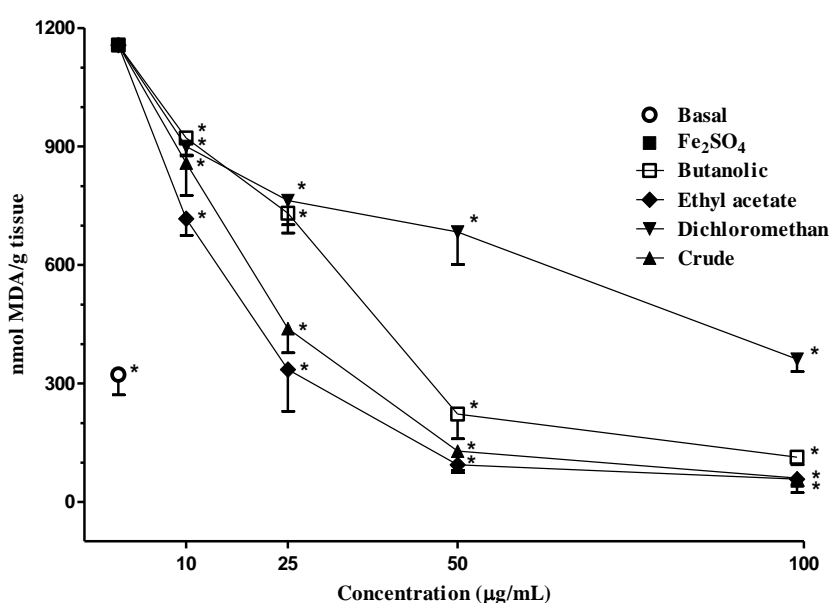


Figure 1. Effect of different concentrations of crude extract, dichlorometane, ethyl acetate and butanolic fractions from the laves of *V. megapotamica* on Fe(II) (10 µM)-induced TBARS production in brain homogenates. Dates are expressed as means ± S.E.M., (n=3). Significant differences are indicated by * $p \leq 0.05$ when compared with FeSO₄ group.

Table 2. Lipid peroxidation (IC₅₀/TBARS) for crude extract and fractions of *V. megapotamica*

Crude extract/fractions	IC₅₀ (mean ± S.E.M.)
Crude extract	20.22 ± 4.27
Dichloromethane	72.72 ± 7.22
Ethyl acetate	16.36 ± 5.09
n-butanolic	32.78 ± 3.06

S.E.M: standard error of the mean.

Free Fe(II) can induce neurotoxicity and its levels are increased in some degenerative diseases (Bostanci & Bagirici, 2008). Several authors have focused in the use of natural therapeutic antioxidant compounds that can afford protection in a variety of *in vitro* and *in vivo* models of human pathologies, including neurotoxicity models (Bastianetto & Quirion, 2002; Patel et al., 2007; Pereira et al., 2009).

3.3 Protein carbonyl

The action of reactive oxygen species on proteins has been widely demonstrated to increase the formation of carbonyl groups (Dalle-Donne, 2003). Moreover, carbonyl stress may be due to the damaging effect of various monodicarbonyls (such as MDA and HNE) and of hypochlorous acid (whose production is catalysed by myeloperoxidase in neutrophils) on proteins. However, in contrast to lipid peroxidation, protein oxidation does not have the features of chain reactions. Also the level of carbonyl groups in circulating proteins is considered a useful marker of oxidative stress, which may have some advantages in comparison with the measurement of other parameters; in fact, these oxidation products are formed relatively early and are more stable (Morabito, 2004).

High levels of protein carbonyl groups (PCG) have been observed in several diseases, such as Alzheimer's disease, rheumatoid arthritis, diabetes, sepsis, chronic renal failure, and in some malignancies. The analysis by ANOVA revealed a significant decrease PCG levels in plasma which was incubated the different extracts at concentrations of 50, 100 and 200 mg/ml. The concentration of the 25 mg/ml for all extracts was not able to reduced the PCG levels

when compared to your control. This results showed a dose-dependent effect (figure 2). This way we conclude that higher doses are more efficient than lower doses (25 mg/ml) since higher doses are richer in phenolic compounds.

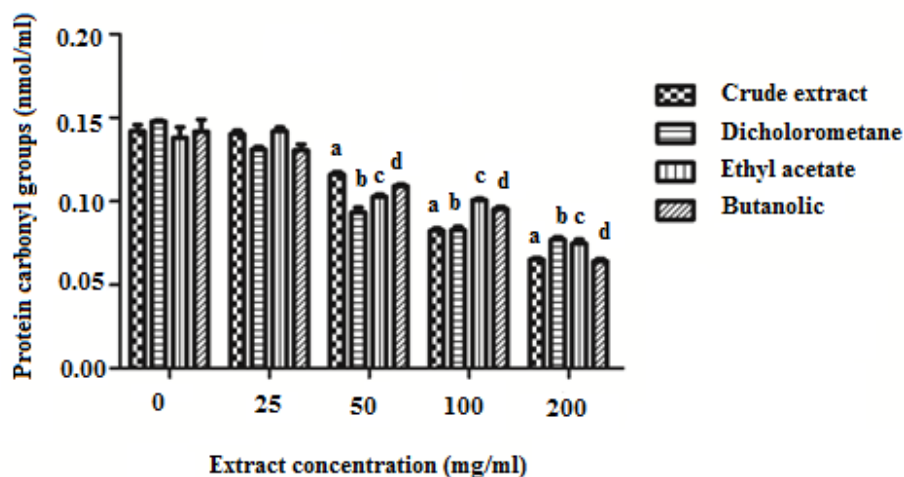


Figure 2 – The effect of crude extract, dichlorometane, ethyl acetate and butanolic fractions of *V. megapotamica* on protein carbonyl groups production in plasma. Dates are expressed as means \pm S.E.M. (n=3) to a, b, c, d = different from control ($p < 0.001$).

In the study by Bahramikia et al, (2009), we investigated the antioxidant activity of four plant species *Teucrium polium*, *Cyperus rotundus*, *Anethum graveolens* and *Nasturtium officinale* using a model pro-oxidant model pro-oxidant (Fe(II)/ascorbate) in homogenates rat liver. The plant extracts showed inhibitory effects against the formation of protein carbonyl, lipid peroxidation and reactive oxygen species. The authors atribuíaram these protective effects of extract of each plant due to its polyphenol content. Since the *T. polium* has a higher polyphenol content and had the highest antioxidant activity against oxidation of proteins. In another study with different fractions of *T. Polium* different methods were used to evaluate the antioxidant capacity in vitro. The results indicated that the ethyl acetate fraction has the highest antioxidant activity in inhibiting the formation of protein carbonyls (Ardestani & Yazdanparast, 2007).

3.4 HPLC-DAD qualitative and quantitative analysis of polyphenols

The crude extract and fractions from *V. megapotamica* were investigated for the presence of the following polyphenolic compounds: chlorogenic and rosmarinic acids. Identification of the compounds was done by comparison of their retention's time and UV absorption spectrum with those of the standards. The results obtained for this HPLC screening (see figure 2 and table 3) indicates that ethyl acetate is the fraction which englobes the larger number of phenolic compounds.

Table 3. HPLC/DAD of quantified polyphenols in crude and fractions of *V. megapotamica*

Extract/Fraction	mg/g of dried extract or fraction ^a	
	CLA	RA
Crude extract	0.87±0.01	-
Dichloromethane	0.74±0.06	-
Ethyl acetate	-	54.11±0.30
n-Butanol	1.23±0.05	-

^a Results are expressed as mean (n=3) ± standart deviation
CLA = chlorogenic acid and RA= rosmarinic acid

The presence of both rosmarinic acid in high quantities can be closely related to the lowest values of IC₅₀ obtained for ethyl acetate fraction in DPPH and TBARS assays. Rosmarinic acid is known antioxidant, anti-inflammatory, antibacterial and anti-HIV properties (Petersen & Simmonds, 2003). In a study by Sahin et al., (2011), rosmarinic acid was the most abundant phenolic compound determined in all *Prunella* L. samples, and that the amount of this compound ranged from 1.19±0.01 to 38.28±0.68 mg/g dried plant for *P. vulgaris* L., from 0.84±0.01 to 39.19±0.48 mg/g dried plant for *P. laciniata* (L.) L., from 0.70±0.01 to 36.45±0.04 mg/g dried plant for *P. grandiflora* L. and from 0.24±0.01 to 18.95±0.14 for *P. orientalis* Bornm. In this study, the content of rosmarinic acid in the leaves of *V. megapotamica* was found in highest concentration in the EtOAc fraction (54.11 ± 0.30 mg/ml), and that in the other fractions and EB was not possible to quantify the AR, was only identified. The chlorogenic acid is one of the compounds found in most plant species (Hynes

and O’Coinceanainn, 2004). Variety of studies have demonstrated the beneficial effect of chlorogenic acid on different pathophysiological effects, and its antioxidant action more relevant.

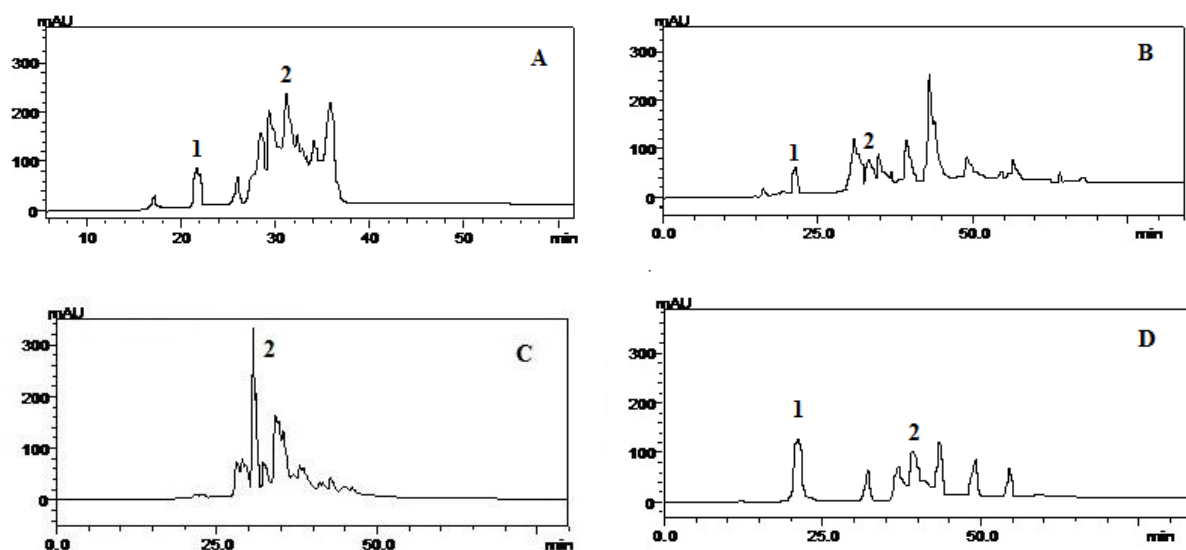


Figure 3 - High performance liquid chromatography phenolics profile of crude extract (A), dichloromethane (B), ethyl acetate (C) and butanolic fractions (D) of *Vitex megapotamica* leaves. Peaks: 1 - chlorogenic acid and 2 - rosmarinic acid. The chromatogram is representative of the length of 327nm.

Conclusion

The fractions and crude extract of *V. megapotamica* tested here have effective antioxidant capacity, being the ethyl acetate fraction the one with the strongest lipid inhibitory activity and the highest contents of phenolic compounds, flavonoids and tannins. HPLC/DAD analysis performed with *V. megapotamica* revealed the presence two compounds phenolics: chlorogenic and rosmarinic acids, and that the ethyl acetate is the fraction which englobes the larger number of phenolic compounds. Higher dosages of the extracts were more effective in reducing levels of plasma proteins carbonyl.

Considering that natural substances can be responsible for the protective effect against the risk of many disease processes, the results described in this paper suggest that *V. megapotamica* has important antioxidant activity, which may be related to its popular uses,

serving as a stimulus for further study to assess the antioxidant activity of compounds isolated from the leaves of this species.

Acknowledgements

The authors would like to thank Dr^a. Thais Scotti do Canto-Dorow (Botanical Department of Federal University of Santa Maria) for providing the identification of *V. megapotamica*. The authors thank the financial support of CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)/Brazil.

References

- Alice CB et al. 1995. *Plantas medicinais de uso popular: atlas farmacognóstico*. 1. Ed. Canoas: Ed. da Ulbra, p. 185-187.
- Ardestani A, Yazdanparast R 2007. Inhibitory effects of ethyl acetate extract of *Teucrium polium* on *in vitro* protein glycooxidation. *Food Chem Toxicol* 45(12): 2402–2411.
- Arnao MB, Cano A, Acosta M 2000. A method to measure antioxidant activity in organic media: application to lipophilic vitamins. *Redox Rep* 5: 365-370.
- Atoui AK, Mansouri A, Boskou G and Kefalas P 2005. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chem* 89: 27-36.
- Bahman N, Mohammed K, Hamidreza I 2007. In vitro free radical scavenging activity of five salvia species. Pak. *Pharm Sci* 20(4):291- 294.
- Bahramikia S, Ardestani A, Yazdanparast R 2009. Protective effects of four Iranian medicinal plants against free radical-mediated protein oxidation. *Food Chem* 115(1): 37–42.
- Barla A, Öztürk M, Kültür S, Öksüz S 2007. Screening of antioxidant activity of three Euphorbia species from Turkey. *Fitoterapia* 78: 423-425.
- Bastianetto S, Quirion S, 2002. Natural extracts as possible protective agents of brain aging. *Neurobiol. Aging* 23: 891–897.
- Boligon AA, Brum TF, Frohlich JK, Froeder ALF, Athayde ML 2012. HPLC/DAD profile and determination of total phenolics, flavonoids, tannins and alkaloids contents of *Scutia buxifolia* Reissek stem bark. *Res J Phytochem*, DOI: 10.3923/rjphyto.
- Boligon AA, Pereira RP, Feltrin AC, Machado MM, Janovik V, Rocha JBT, Athayde ML, 2009. Antioxidant activities os flavonol derivatives from the leaves and stem bark of *Scutia buxifolia* Reiss. *Bioresource Technol* 100: 6592-6598.
- Bostanci MO, Bagirici F, 2008. Neuroprotective effect of aminoguanidine on iron induced neurotoxicity. *Brain Res. Bull.* 76, 57–62.

Brandt AP, Oliveira de LFS, Fernandes FB, Alba J, 2009. Avaliação in vivo do efeito hipocolesterolêmico e toxicológico preliminar do extrato bruto hidroalcoólico e decocção da *Vitex megapotamica* (Spreng) Moldenke (*V. montevidensis* Cham.). *Rev Bras Farmacogn* 19: 388-393.

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C, 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm.-Wiss. Technol* 28: 25-30.

Brum TF, Zadra M, Froeder ALF, Boligon AA, Frohlich JK, Athayde ML, 2011. Análise fitoquímica preliminar das folhas de *Vitex megapotamica* (Sprengel) Moldenke. *Revista Saúde (Santa Maria)*, 37:(2)p. 101-106.

Cho EJ, Yokozava T, Rhyu DY, Kim SC, Shibahara N, Park JC, 2003. Study on the inhibitory effects of Korean medicinal plants and their main compounds on the DPPH radical. *Phytomedicine* 10: 544-551.

Choi CW, Kim SC, Hwang SS, Choi BK, Ahn HJ, Lee MY, Park SH, Kim SK, 2002. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Sci* 63:1161–1168.

Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R 2003. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta* 329: 23- 38.

Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H, 1991. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 11:81–128.

Evaristo IM, Leitão MC, 2001. Identificação e Quantificação por DAD-HPLC, da Fração Fenólica Contida em Folhas de *Quercus suber* L. *Silva Lusitana* 9:(2), 135-141.

Furlan CM, Domingos M, Salatino A, 1999. Leaf contents of nitrogen and phenolic compounds and their bearing with the herbivore damage to *Tibouchina pulchra* Cogn. (Melastomataceae), under the influence of air pollutants from industries of Cubatão, São Paulo. *Rev. Bras. Bot.* 22: 317-323.

Halliwell B, 2001. Vitamin C and genomic stability. *Mutat Res* 45:(1–2), 29–35.

Hatano T, Kira R, Yoshizaki M, Okuda T, 1986 . Seasonal changes in the tannins of *Liquidambar formosana* reflecting their biogenesis. *Phytochemistry* 25: 2787-2789.

Hynes, M.J.; O’Coinceanainn, M. The kinetics and mechanisms of reactions of iron (II) with caffeic acid, chlorogenic acid, sinapic acid, ferulic acid and naringin. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2004, v. 98, p. 1457-1464.

Janovik V, Boligon AA, Bandeira RV, Athayde ML, 2011. HPLC/DAD analysis, determination of total phenolics and flavonoid contents and antioxidant activity from the leaves of *Cariniana domestica* (Mart) Miers. *Res J Phytochem* 5: 209-215.

Jayaprakasha GK, Patil BS. 2007. *In vitro* evaluation of the antioxidant activities in fruit extracts from citron and blood orange. *Food Chem* 101(1):410–8.

Joly AB 2002. Introdução à taxonomia vegetal. 13 ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, p. 579-589.

Kintzios, S., Papageorgiou, K., Yiakoumettis, I., Baricevic, D. Kusar, A. 2010. Evaluation of the antioxidants activities of four Slovene medicinal plant species by traditional and novel biosensory assays. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 53: 773–776.

Lee KW, Kim YJ, Lee HJ and Lee CY 2003. Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *J. Agric. Food Chem* 51: 7292-7295.

Mayne ST. 2003. Antioxidant nutrition and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiological research. *J Nutr* 133:933–40.

Miliauskas G, Venskutonis PR, Van Beek TA 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plants. *Food Chem* 85: 231-237.

Morabito F, Cristiani M, Saija A, Stelitano C, Callea V, Tomaino A, Minciullo PL, Gangemi S, 2004. Lipid peroxidation and protein oxidation in patients affected by Hodgkin's lymphoma, *Mediators Inflamm* 13: 381-383.

Morrisson et al. 1995. Determination of lignin and tannin contents of Cowpea Seed Coats. *Annals of Botany*, ed. 76, p. 287-290.

Mustafa RA, Hamid AA, Mohamed S, Bakar FA, 2010. Total Phenolic Compounds, Flavonoids, and Radical Scavenging Activity of 21 Selected Tropical Plants. *Journal of food science*, 75(1): 28-30.

Ohkawa H, Ohishi H, Yagi K, 1979. Assay for lipid peroxide in animal tissues thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95: 351–358.

Pansera MR, Santos ACA, Paese K, Wasum R, Rossato M, Rota LD, Pauletti GF, Serafini LA 2003. *Rev Bras Farmacogn* 13: 17.

Patel R, Garg R, Erand S, Maru GB, 2007. Chemopreventive herbal anti-oxidant: current status and future perspectives. *J. Clin Biochem Nutr* 40: 82–91.

Pereira RP, Fachinetto R, Prestes AL, Puntel RL, Silva GNS, Heinzmann BM, Boschetti TK, Athayde ML, Burger ME, Morel AF, Morsch VM, Rocha JBT, 2009. Antioxidant Effects of Different Extracts from *Melissa officinalis*, *Matricaria recutita* and *Cymbopogon citratus*. *Neurochem Res* 34, 973–983.

Petersen M, Simmonds MSJ, 2003. Rosmarinic acid. *Phytochemistry* 62: 121–125.

Rimpler, H. 1969. Pterosteron, polypodin B and neues ecdysonartige steroids (viticosteron E) aus *Vitex megapotamica*. *Tetrahedron Letters* 5(10): 329-333.

Rimpler, H. 1972. Phytoecdysones and iridoids from *Vitex megapotamica*. *Archiv der Pharmazie* 10(305): 746-751.

Sahin, S.; Demir, C.; Malyer, H. Determination of phenolic compounds in *Prunella L.* by liquid chromatography-diode array detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. (2011), 55, 1227–1230.

Salminen J, Ossipov V, Haukioja E, Pihlaja K, 2001. Seasonal variation in the content of hydrolysable tannins in leaves of *Betula pubescens*. *Phytochemistry* 57:15-22.

Sánchez-Moreno C, Larrauri JA, Saura-Calixto F, 1998.. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J. Sci. Food Agric* 76: 270-276.

Schubert A, Pereira DF, Zanin FF, Alves SH, Beck RCR, Athayde ML, 2007. Comparison of antioxidant activities and total polyphenolic and methylxanthine contents between the unripe fruit and leaves of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. *Pharmazie* 62: 876–880.

Simón BF, Cadahia E, Conde E, 1999. Evolution of phenolic compounds of spanish oak wood during natural seasoning. First results. *J Agric Food Chem* 47: 1687-1694.

Sousa CMM, Silva HR, Vieira-Jr GM, Ayres MC, Costa CLS, Araújo DS, Cavalcate LCD, Barros EDS, Araújo PBM, Brandão MS, Chaves MH 2007. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Quim. Nova*, 30(2): 351-255.

Su XY, Wang ZY, Liu JR 2009. *In vitro* and *in vivo* antioxidant activity of *Pinus koraiensis* seed extract containing phenolic compounds. *Food Chem* 117: 681-686.

Surveswaran S, Cai YZ, Corke H, Sun M. 2007. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. *Food Chem* 102(3):938–53.

Tseng TH, Kao ES, Chu CY, Chou FP, Lin HW, Wang CJ, 1997. Protective effects of dried flower extracts of *Hibiscus sabdariffa L.* against oxidative stress in rat primary hepatocytes. *Food Chem Toxicol* 35: 1159–1164.

Tsimogiannis DI, Oreopoulou V, 2006. The contribution of flavonoids C-ring on the DPPH free radical scavenger efficiency. A kinetic approach for the 30,40-hydroxy substituted members. *Food Sci. Emerging Technol* 7: 140–146.

Tung YT, Wu JH, Huang CY, Kuo YH, Chang ST, 2009. Antioxidant activities and phytochemical characteristics of extracts from *Acacia confuse* bark. *Bioresour Technol* 100: 509–514.

Turkmen N, Sari F, Velioglu YS, 2006. Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin–Ciocalteu methods. *Food Chem* 99: 835–841.

Woisky RG, Salatino A, 1998. Analysis of própolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *J Apic Res* 37: 99-105.

Zanatta L, Sousa E, Cazarolli LH, Junior AC, Pizzolatti MG, Szpoganics B, Silva FRMB, 2007. Effect of crude extract and fractions from *Vitex megapotamica* leaves on hyperglycemia in alloxan-diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 109:151-155.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A exploração de plantas nativas na medicina popular é largamente difundida no Brasil por ser um país dotado de uma diversidade genética de espécies vegetais que são fortemente exploradas pelas culturas de diversos lugares do mundo, na busca de plantas para a cura de muitas enfermidades. As informações obtidas da medicina popular têm muito a contribuir com os pesquisadores, indústrias farmacêuticas, biólogos, agricultores e a sociedade como um todo, para o aumento do arsenal de práticas terapêuticas e para o desenvolvimento de novos fármacos com propriedades químicas, farmacológicas e toxicológicas conhecidas, como também, proteger nossa biodiversidade. A perda da biodiversidade e o acelerado processo de mudança cultural acrescentam um senso de urgência em garantir o registro desse saber, inclusive para uso científico. Através deste conhecimento, evitam-se falsificações ou substituições por outras plantas como também, proporciona-se o aumento da credibilidade dos pacientes e médicos no estímulo ao uso de medicamentos fitoterápicos. Estes têm sido utilizados para o tratamento de muitas patologias, por ser um produto com um custo mais acessível à população e aos serviços de saúde.

Quando se pretende trabalhar com plantas, o primeiro passo a ser realizado é a identificação da espécie e por seguinte, uma pesquisa fitoquímica preliminar, para conhecer os principais grupos de metabólitos secundários presentes nelas. No presente trabalho, este processo foi realizado no extrato hidroalcoólico e aquoso das folhas de *V. megapotamica*, submetendo-se a uma série de reações de caracterização que revelaram a presença de heterosídeos antociânicos, fenóis e taninos, catequinas, flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas, esteroides e triterpenoides (esteróides livres), heterosídeos cardioativos, fenóis com posição orto e meta livres, fenóis com a posição para livre, cumarinas, ácidos orgânicos e fenóis. As classes de princípios ativos encontradas neste estudo acenam para várias possibilidades terapêuticas e os dados obtidos na literatura servem de apoio para direcionar os estudos a fim de aprofundar ainda mais o conhecimento sobre essa espécie.

Dentre os metabólitos secundários encontrado nesta análise fitoquímica, vários grupos de substâncias apresentam propriedades farmacológicas comprovadas, como por exemplo, os taninos apresentam propriedades bactericida e fungicida (SCALBERT, 1991; CHUNG et al., 1998), antiviral (OKUDA et al., 1993), inibição da peroxidação lipídica e sequestradora de radicais livres (HAGERMAN et al., 1998; MOURE et al., 2001), cumarinas têm apresentado ação anticoagulante, imunossupressora, relaxante vascular, hipolipidêmica e hipotensora (HOULT; PAYÁ, 1996), sendo que cumarinas contendo grupos di-hidroxilados em posição orto, são poderosos inibidores da peroxidação lipídica, além de eliminarem o ânion radical superóxido e quelarem íons ferro, o que os conferem propriedades antioxidantes (MARTÍN-ARAGÓN et al., 1996). As xantonas possuem ação inibitória da enzima monoamino-oxidase (MAO), atividade relacionada com o tratamento de estados depressivos (USDIN, 1984; FOWLER; ROSS, 1984). Vários estudos têm demonstrado às xantonas propriedades potenciais para o tratamento de câncer (LIN et al., 1996), como também antimicrobiana (LINUMA et al., 1996; DHARMARATNE et al., 1999), antifúngica (RATH et al., 1996; ROCHA et al., 1994; PINTO et al., 1994), antioxidante (MAHABUSARAKAM et al., 2000; YOSHIHAWA et al., 1994) entre outras. Flavanonas possuem ação antitumoral (SIMÕES et al., 2010), flavonóis possuem atividade antiviral (HUDSON, 1990), antitumoral (SIMÕES et al., 2010 p. 604) e no tratamento da insuficiência vascular (SIMÕES et al., 2010), catequinas possuem atividade antioxidante (MOREL et al., 1993). Diante da diversidade de ações biológicas destas classes de metabólitos secundários, constatou-se que a maioria apresenta características antioxidantes, o que motivou o estudo desta atividade nas folhas de *V. megapotamica*. As plantas vêm destacando-se pelas suas potenciais ações antioxidantes e por isso tem sido utilizadas para o tratamento de diversas patologias, inclusive, no tratamento do câncer, doenças neurodegenerativas, aterosclerose, entre outras.

Em um estudo fitoquímico preliminar de *V. megapotamica* realizado por Brandt et al., (2009), constatou-se a presença de óleos essenciais. Por este fato e a ausência de dados na literatura a respeito da composição química do óleo, motivou-se a realização da extração do óleo essencial. Através da análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas obtiveram-se as quebras das moléculas de cada um dos constituintes do óleo essencial. Através destes dados e da comparação com base no índice de retenção (RI) experimental com o da

literatura (ADAMS, 1995) e com o banco de dados espectrais (NIST) identificou-se os componentes do óleo.

Foram identificados vinte e sete componentes, consistindo 92,36% do total do óleo. O constituinte majoritário foi o hidroxitolueno butilado (BHT) (34,17%), seguido por fitol (12,66%), α -cariofileno (11,84%), δ -elemeno (10,65%), β -cariofileno (7,82%), γ -elemeno (4,24%) e germacreno D (2,82%).

Além disso, a atividade antioxidante do óleo foi avaliada em termos da sua capacidade em sequestrar radical livre (DPPH). O óleo mostrou inibição percentual de 35,62% e 75,25% em concentrações de 76 e 101,6mg/ml, respectivamente. Provavelmente, a atividade antioxidante relatada se deve ao componente majoritário BHT. O BHT, é um composto orgânico lipofílico, utilizado como um aditivo alimentar antioxidante, bem como em cosméticos e produtos farmacêuticos. Foi identificado e quantificado também na composição do óleo essencial de outras espécies, tais como *Zygophyllum album* L., *Solanum pseudocapsicum*, e também, nos extratos de folhas de planta *Mesembryanthemum crystallinum* (TIGRINE-KORDJANI et al., 2006; ALIERO et al., 2006; BOUFTIRA et al., 2007; BOUFTIRA et al., 2010).

Os metabólitos secundários representam uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante, como por exemplo, os constituintes dos óleos essenciais que são biossintetizados em tricomas glandulares principalmente de folhas e cálices florais e dependem, além dos fatores genéticos, também dos fisiológicos e ambientais (FREITAS et al., 2004; LAWRENCE, 1992; KUTCHAN, 2001). Segundo Freitas et al. (2004), a quantidade dos constituintes presentes nas plantas varia consideravelmente em função de fatores externos, incluindo temperatura, irrigação, incidência solar, nutrientes do solo, horário de coleta, idade da planta, entre outros. Aliado a isso, a síntese de metabólitos secundários antioxidantes que absorvem em 300-400 nm é significativamente aumentada por radiação UV (GOTTLIEB et al., 1996) fornecendo, portanto, um alto nível de proteção contra oxidantes prejudiciais gerados termicamente ou pela luz (LARSON, 1988). Estes fatores estimulam as plantas a desenvolverem proteção a estes agentes externos, através da produção de compostos que possuam efeito antioxidante, tais como polifenóis, flavonóides, bem como a produção de BHT (IROVETZ et al., 2006; JAYAPRAKASHA et al., 2006). Diante disso, acredita-se que estes fatores podem explicar a quantidade de BHT na composição do óleo de *V. megapotamica*, pois as folhas, para extração do óleo, foram coletadas no verão e,

possivelmente, submetido a interferências exógenas mencionadas anteriormente. A presença de BHT em *V. megapotamica* indica que o óleo essencial pode ter interessantes propriedades antioxidantes.

A atividade antioxidante dos óleos voláteis tem sido bastante estudada, assim como os extratos das plantas, que vêm apresentando um enorme crescimento científico na investigação de propriedades antioxidantes, nas duas últimas décadas, envolvendo desde o efeito dos extratos brutos, de frações ou de componentes isolados e/ou modificados. As espécies vegetais produzem uma variedade de antioxidantes, mediante os danos moleculares provenientes de espécies reativas de oxigênio (ERO), sendo que os compostos fenólicos representam a maior classe de antioxidantes originados por elas. Dentro desse grupo de compostos fenólicos com atividade antioxidante, encontram-se principalmente, os flavonóides, taninos, catequinas, proantocianidinas e alguns ácidos polifenólicos (ZUANAZZI; MONTANHA, 2010; ACKER et al., 1996). A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras, dada à sua estrutura química. Estas características desempenham um papel importante no sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de inibição, como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura dessas substâncias (HASLAN, 1996; SOARES, 2002; CHUN et al., 2005). Existem estudos que demonstram que os flavonoides exibem uma série de ações bioquímicas e farmacológicas, tais como anticarcinogênico, antiviral, antimicrobiano, antitrombótico, anti-inflamatória e atividades antimutagênica (TURKOGLU et al., 2007).

Os antioxidantes têm também uma vasta gama de atividades biológicas e farmacológicas e oferecem um grande benefício para saúde. Durante o estresse oxidativo estas substâncias são importantes na prevenção da lesão celular e no desenvolvimento de certos cânceres e doenças neurodegenerativas (NEWMAN et al., 2000).

No momento atual, existe uma variedade de métodos para se determinar a capacidade antioxidante de ativos presentes em alimentos, fluidos biológicos, vegetais, entre outros. A maioria dos métodos de determinação da atividade antioxidante *in vitro*, tem como reagente um radical livre, o qual é capturado ou neutralizado pelos compostos antioxidantes, inibindo a formação de produtos de

oxidação. Um dos métodos mais conhecidos determinar a atividade antioxidante de extratos e substâncias isoladas é o método do DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil). A solução etanólica do DPPH apresenta coloração roxa e absorve fortemente em 518nm (ROGINSKY; LISSI, 2005).

Por ação de um antioxidante, o DPPH é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, apresentando coloração amarela, reação essa monitorada pelo decréscimo da absorbância. A partir dos resultados obtidos, determina-se a porcentagem de atividade antioxidante que corresponde à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante (BRAND-WILLIAMS et al., 1995). A capacidade antioxidante de *V. megapotamica* foi avaliada por esse método, conforme metodologia descrita por Choi et al. (2002). As frações BuOH e AcOEt foram as que obtiveram os melhores resultados, com IC₅₀ de 14,17 ± 0,76 e 16,21 ± 0,40 µg/mL, respectivamente (IC₅₀ = concentração necessária para inibir o radical DPPH em 50%). As frações CH₂Cl₂ e EB apresentaram as menores atividades 37,63 ± 0,98 e 20,44 ± 1,23 µg/mL, respectivamente. Como foi mencionada anteriormente, a atividade antioxidante se deve principalmente pela presença de alguns metabólitos secundários presentes nas espécies vegetais, tais como compostos fenólicos, flavonóides, taninos entre outros, os quais foram determinados, neste estudo, visando estabelecer uma correlação com o potencial antioxidante encontrado para esta espécie.

O doseamento de polifenóis foi realizado para o EB e as frações, empregando-se o reagente Folin-Ciocalteu, seguindo a metodologia descrita por Chandra e Mejia (2004) e para o teor de flavonóides utilizou-se a metodologia descrita por Woisky e Salatino (1998) que utiliza cloreto de alumínio. A fração AcOEt apresentou o maior teor de polifenóis (522,4 ± 1,12 mg/g) e flavonoides (220,48 ± 0,30 mg/g) neste estudo, seguido do EB 309,1 ± 0,88 mg/g, 198,09 ± 0,33 mg/g, BuOH 216,8 ± 0,42 mg/g e 151,02 ± 0,46 mg/g, CH₂Cl₂ 113,1 ± 1,30 mg/ml e 148,44 ± 0,55 mg/ml, respectivamente, considerando as concentrações expressas como miligrama de equivalentes de ácido gálico para polifenóis e miligrama de equivalentes de rutina para flavonoides. Este resultado era esperado, pois segundo Canadanovic et al, (2008), estudos de composição qualitativa de extratos de plantas revelam a presença de altas concentrações de compostos fenólicos nos extratos obtidos, utilizando solventes polares.

Através da capacidade antioxidante avaliada pelo DPPH verificou-se que não houve diferença significativa nas frações AcOEt e BuOH, as quais apresentaram os melhores resultados neste estudo. Aliado a isso, verificou-se que a fração AcOEt foi a que apresentou a maior concentração de polifenóis e flavonóides. Vários autores relatam a existência de uma correlação positiva entre compostos fenólicos e o potencial antioxidante, usando ensaios similares (ALONSO et al., 2002; SHYAMALA et al., 2005; CHANDRA; MEJIA, 2004; TUNG et al., 2007; MUSTAFA et al., 2010; SURVESWARAN et al., 2007; SOUSA et al., 2007). Foi possível perceber que esta relação ficou bem estabelecida com *V. megapotamica*. A fração AcOEt apresentou um valor relativamente alto de polifenóis, quase duas vezes maior que a fração BuOH e no entanto, demonstraram a mesma capacidade antioxidante. Este fato pode ser explicado através de diversos fatores, entre eles, a presença de diferentes compostos ativos na planta que podem tendenciar a capacidade antioxidante, mas também os efeitos sinérgicos de diferentes compostos, as condições experimentais e o mecanismo do método antioxidante utilizado em que as reações podem afetar esta associação (JAYAPRAKASHA; PATIL, 2007). Como exemplo disso, a presença de outros compostos que interferem com o reagente Folin-Ciocalteu e/ou a de outros não fenólicos com efeitos antioxidantes. Há também compostos que reagem fortemente com o DPPH, e outros que têm um mecanismo de reação mais lenta (TSIMOGIANNIS; OREOPOULOS, 2006). Além disso, a estrutura dos grupos fenólicos e possíveis alterações nas hidroxilas, como por exemplo, por glicosilação, provocam um decréscimo da atividade antioxidante, devido à redução no número de hidroxilas e ao impedimento estérico que o açúcar proporciona, dificultando a ligação a radicais livres (CHO et al., 2003). Geralmente, a atividade antioxidante dos flavonóides depende do padrão de estrutura e de substituição de grupos hidroxila. De certa forma, os maiores valores de polifenóis e flavonoides na fração acetato de etila se relacionam com os bons resultados de inibição do radical DPPH.

Os resultados são semelhantes a estudos realizados com outras espécies vegetais, utilizando as mesmas condições de ensaio, como por exemplo, constatou-se que o IC₅₀ das frações acetato de etila e butanólica das folhas de *Ilex paraguayensis* foram 13,26 e 27,22 µg/mL, respectivamente (SCHUBERT et al., 2007). Em estudo realizado por Li et al., (2009) verificou-se que as frações de *Lysimachia foenum-graecum* com melhor atividade antioxidante foram acetato de etila seguida da butanólica, o mesmo ocorreu com duas espécies de *Amaranthus*,

em que a melhor atividade antioxidante encontrada foi na fração acetato de etila (NSIMBA et al., 2008). A *Acacia podalyriifolia* também obteve maior teor de compostos fenólicos na fração AcOEt (338,5 mg/g), sendo que esta fração foi a que obteve a maior ação antioxidante ($IC_{50} = 3,22 \mu\text{g/mL}$) (ANDRADE et al., 2007).

Em estudo realizado por Mensor et al., (2001), com duas espécies de *Vitex*, *V. cymosa* e *V. polygama*, os quais avaliaram em cinco tipos de extratos: etanólico, hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol, em diferentes partes da planta, quanto ao potencial antioxidante pelo método do DPPH. A fração acetato de etila foi a que obteve maior capacidade antioxidante tanto para as folhas quanto para as raízes de *V. cymosa* que obtiveram o mesmo valor ($IC_{50} = 34.12 \pm 1.48 \mu\text{g/mL}$), para a *V. polygama* não foi diferente, a fração acetato de etila também foi a que obteve os melhores resultados tanto para as folhas ($IC_{50} = 13,37 \pm 0,06 \mu\text{g/mL}$), raízes ($IC_{50} = 13,21 \pm 0,57 \mu\text{g/mL}$) e frutos ($IC_{50} = 35,23 \pm 2,29 \mu\text{g/mL}$). Já no estudo com *V. megapotamica*, foram encontrados resultados melhores de inibição do radical livre. Segundo Molgaard e Ravn, (1988), as espécies pertencentes a família Verbenaceae provavelmente possuem atividade antioxidante devido a flavonóis e também a fenilpropanóides glicosídeos, tais como verbascoside, que tem sido detectado em um grande número de espécies desta família. Substâncias como verbascoside e flavonóides já foram estudadas quanto à capacidade antioxidante e demonstraram serem bastante ativas (XIONG et al., 1996; GORDON, 1996; RAPTA et al., 1995; YOKOZAWA et al., 1997). Por fim, fica claro que a capacidade antioxidante é marcadamente influenciada pela polaridade dos solventes extratores.

O método utilizado para a obtenção do teor de taninos foi o da vanilina descrito por Morrison et al., (1995). Os resultados para o teor de taninos condensados neste estudo não foram satisfatórios, porque apenas a fração acetato de etila obteve uma pequena quantidade destes compostos. Na análise fitoquímica realizada em nosso estudo, observou-se a presença de taninos, porém, como as reações não são bem específicas, devido as grupos funcionais ou estruturas comuns a várias substâncias, pode estar ocorrendo uma possível interferência. Outros fatores que podem interferir no resultado são os solventes utilizados neste estudo, sazonalidade, influência da coleta, fatores exógenos (SIMÓN et al., 1999; HATANO et al., 1986; SALMINEN et al., 2001; PANSERA et al., 2003; FURLAN et al., 1999) e também a metodologia utilizada para o doseamento, pois o método depende da reação dos taninos com a vanilina para formar complexos coloridos que podem

sofrer interferência do solvente utilizado, tempo de reação, temperatura, concentração da vanilina, natureza do ácido entre outros (SCHOFIELD et al., 2001).

Como forma de complementar o estudo *in vitro* do DPPH realizado para determinar a capacidade antioxidante de *V. megapotamica*, os extratos das folhas também foram avaliadas quanto à inibição da peroxidação lipídica pelo método do TBARS, uma vez que os compostos fenólicos têm recebido atenção especial nos últimos anos, sobretudo por inibirem a peroxidação lipídica. O sistema nervoso central é praticamente vulnerável à peroxidação lipídica, devido ao seu alto conteúdo lipídico, incluindo ácidos graxos poliinsaturados, alvos principais das espécies reativas de oxigênio (GRUNDMAN, 2000). O Fe (II), um pró-oxidante conhecido, é o metal de transição mais abundante no corpo humano, é essencial para transporte de oxigênio e diversas reações redox (HYNES; O'COINCEANAINN, 2004). Este metal pode induzir a neurotoxicidade, via estimulação da reação de Fenton, que são importantes geradoras de radicais livres endógenos, e seus níveis podem estar aumentados em algumas doenças degenerativas (BOSTANCI; BAGIRICI, 2008). Os compostos fenólicos são capazes de formar complexos com Fe (III) e estão associados com uma diminuição da absorção de ferro no organismo (LAYRISSE et al., 2000). O cérebro é particularmente suscetível a danos causados por radicais livres por causa do seu alto consumo de oxigênio e sua baixa concentração de enzimas antioxidantes e removedoras de radicais livres. Neste contexto, o potencial antioxidante do extrato bruto e das frações das folhas foram testadas frente o Fe (II), utilizando o tecido encefálico de ratos para o ensaio do TBARS. As frações reduziram consideravelmente a produção de TBARS, seguindo a seguinte ordem de inibição: AcOEt > EB > BuOH > CH₂Cl₂. A fração AcOEt foi a que apresentou o melhor resultado, inibindo 50% na produção de TBARS em uma concentração mais baixa (IC₅₀ = 16.36 ± 5.09 µg/ml). Os bons resultados da inibição da peroxidação lipídica mostraram uma relação positiva com o teor de fenóis encontrado nas folhas de *V. megapotamica*.

Modificações protéicas podem não ocasionar perda de função ou alterações estruturais, nesse caso, as proteínas com ação antioxidante sofrem oxidação reversível (LEVINE et al., 2000; DALLE-DONNE et al., 2005a; DALLE-DONNE et al., 2005b). Em contrapartida, modificações irreversíveis de proteínas podem levar a danos estruturais com inativação e perdas funcionais das mesmas. Tal modificação protéica irreversível e não enzimática é denominada a carbonilação (STADTMAN;

BARLETT 1991; STADTMAN; LEVINE, 2003) e isso ocorre devido à indução de ERO, produzindo derivados carbonilados altamente reativos, ou indiretamente através do ataque de produtos secundários do estresse oxidativo. As proteínas carboniladas resultantes do processo oxidativo podem ser degradadas ou recuperadas, o que resulta em não aparecimento de doenças ou, em casos mais acentuados, conduzir à morte celular originando processos patológicos (DALLADONNE et al., 2006).

Elevados níveis de grupos de proteína carbonil têm sido observadas em várias doenças, tais como a doença de Alzheimer, artrite reumatóide, diabetes, septicemia, insuficiência renal crônica, e em alguns tumores malignos (MORABITO et al., 2004).

O ensaio de carbonilação de proteínas tem sido utilizado em estudos experimentais e amostras clínicas (STADTMAN, 1990; STADTMAN; OLIVER, 1991; QUINLAN et al., 1994; GLADSTONE; LEVINE, 1994; REZNICK et al., 1992) através de ensaio convencional colorimétrico que mede a ligação da dinitrofenilhidrazina (DNPH) (LAPPIN; CLARK, 1951; LEVINE et al., 1990; LEVINE et al., 1994; REZNICK; PACKER et al., 1994). Os níveis de proteína carbonilada no plasma foram utilizados como um parâmetro de estresse oxidativo neste estudo, através de método previamente descrito por Levine et al, (1990) com algumas modificações. Houve uma diminuição significativa nas proteínas carboniladas no plasma, o qual foi incubado com diferentes extratos, em concentrações de 50, 100 e 200 mg/ml. A concentração de 25 mg/ml não foi capaz de reduzir os níveis de proteínas carboniladas para todos os extratos testados quando comparados com os seus respectivos controles. Os resultados mostraram um efeito dose-dependente. Desta forma, concluímos que doses elevadas são mais eficientes do que as doses mais baixas (25 mg/ml), porque eles são mais ricos em compostos fenólicos.

Os bons resultados encontrados para a capacidade antioxidante motivou a realização de um perfil cromatográfico por CLAE, com a finalidade de identificar e quantificar os possíveis compostos fenólicos que possam ser responsáveis por essa atividade. Esta análise foi feita através de metodologia descrita por Evaristo e Leitão, (2001) utilizando o gradiente de eluição e foram investigadas a presença de dois ácidos fenólicos: clorogênico (ACG) e rosmarínico (AR). A identificação dos compostos foi realizada por comparação dos tempos de retenção e dos espectros de absorção com aqueles dos padrões.

Neste estudo, com exceção da fração acetato de etila, todas as outras frações obtiveram as duas substâncias testadas. O AR foi encontrado em maior concentração na fração AcOEt ($54,11 \pm 0,30$ mg/ml), sendo que nas demais frações e no EB, não foi possível quantificar o AR, apenas foi identificado.

Em comparação com o AR, o ACG foi encontrado em quantidades bem menores, sendo que a maior concentração obtida foi na fração BuOH ($1,23 \pm 0,05$ mg/g), seguida do EB ($0,87 \pm 0,01$ mg/ml) e CH_2Cl_2 ($0,74 \pm 0,06$ mg/ml).

A presença de AR em quantidades elevadas pode estar estreitamente relacionada com os menores valores de IC_{50} obtidos para a fração AcOEt em ensaios DPPH e TBARS. O AR é conhecido pelas suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatória, anti-bacteriano e anti-HIV (PETERSEN; SIMMONDS, 2003). O AR, assim como muitos antioxidantes naturais têm sido identificados como agentes sequestradores de espécies radicalares (CAO et al., 2005).

Em um estudo realizado por Sahin et al., (2011), o AR foi o composto fenólico mais abundante determinado em todas as amostras *Prunella* L., e que a quantidade deste composto variou de $1,19 \pm 0,01$ para $38,28 \pm 0,68$ mg/g de planta seca em *P. vulgaris* L., de $0,84 \pm 0,01$ para $39,19 \pm 0,48$ mg/g planta seca em *P. laciniata* (L.) L., de $0,70 \pm 0,01$ para $36,45 \pm 0,04$ mg/g planta seca em *P. grandiflora* L., de $0,24 \pm 0,01$ para $18,95 \pm 0,14$ em *P. orientalis* Bornm.

Segundo Velioglu et al, (1998), o AR identificado por CLAE, foi o ácido fenólico mais abundante encontrado em *Thymus vulgaris*, *Mentha piperita*, *Melissa officinalis* e *Rosmarinus officinalis*.

O ACG, embora encontrado em menor concentração nos extratos de *V. megapotamica*, é um dos compostos encontrados na maioria das espécies de plantas (HYNES; O'COINCEANAINN, 2004). Segundo Cechinel Filho e Yunes, (1998), mesmo que as plantas produzam centenas de metabólitos secundários, apenas os compostos presentes em maior concentração são geralmente estudados pela fitoquímica. No entanto, a análise de substâncias ativas é muito complexa e longa, já que geralmente os compostos presentes em menor proporção na espécie vegetal são os que apresentam melhores efeitos biológicos.

Uma diversidade de estudos tem mostrado que o ACG possui efeitos benéficos sobre diferentes quadros fisiopatológicos, sendo a sua ação antioxidante a mais relevante. Segundo Moran et al., (1997) o ACG pode impedir as reações do tipo Fenton, através de quelação com o íon ferro. Um outro estudo demonstra a

atividade antioxidante do ACG ao proteger proteínas do ataque de radicais livres (KISS et al., 1989). Várias patologias envolvem a formação de ERO, neste sentido, pode-se supor que os efeitos antioxidantes do ACG podem proteger o organismo de diferentes doenças, como por exemplo, efeito hipotensor mostrado em estudos experimentais em modelos com animais e humanos (WATANABE et al., 2006; BONITA et al., 2007; CHEN et al., 2009), estudos experimentais em ratos e humanos têm demonstrado a ação do ACG como anti-diabético (KARTHIKESAN et al., 2010a, 2010b; PARI et al., 2010), tem sido constatado o efeito do ACG na prevenção do desenvolvimento do câncer de cólon humano e inibição da proliferação das células tumorais de diferentes linhagens (GRANADO-SERRANO et al., 2007), o ACG também tem apresentado efeito anti-inflamatório em vários estudos in vivo (KRAKAUER, 2002; SANTOS et al., 2006; OLMOS et al., 2007; ZHANG et al., 2010; MARRASSINI et al., 2010).

Como podemos observar a fração AcOEt foi a que obteve os melhores resultados neste estudo, sendo esta promissora para ensaios com atividades biológicas, priorizando o isolamento de substâncias para guiar estudos biodirecionados.

6 CONCLUSÃO

- Os resultados da análise fitoquímica preliminar indicaram a presença de heterosídeos antociânicos, fenóis e taninos, catequinas, flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas, esteroides e triterpenoides, heterosídeos cardioativos, fenóis com posição orto e meta livres, fenóis com a posição para livre, cumarinas, ácidos orgânicos e fenóis.
- A análise por CG-MS resultou na identificação de 27 componentes, representando 92,36% dos constituintes do óleo essencial de *V. megapotamica*. Os componentes principais do óleo foram hidroxitolueno butilado, fitol, α -cariofileno, δ -elemeno, β -cariofileno, γ -elemeno e germacreno D.
- O óleo apresentou capacidade antioxidante pelos dois métodos utilizados neste estudo, tanto por aplicação do óleo em placas de sílica gel e pulverizadas com DPPH como obteve bom percentual de inibição através da capacidade sequestradora de radicais livres (DPPH).
- A fração acetato de etila apresentou o maior teor de polifenóis, flavonoides e foi a única fração que obteve taninos condensados, embora em pequena quantidade.
- No ensaio realizado pelo método do DPPH as frações butanólica e acetato de etila apresentaram a melhor capacidade sequestradora de radicais livres.
- As frações e o extrato bruto inibiram a peroxidação lipídica pelo ensaio TBARS, sendo que a fração acetato de etila foi a que apresentou o melhor resultado.
- Os extratos diminuíram significativamente a carbonilação de proteínas em concentrações mais elevadas que se deve a presença de compostos fenólicos.
- A análise por CLAE das frações e do extrato bruto revelou a presença de ácido clorogênico e rosmarínico, sendo o segundo encontrado em maior quantidade.

Diante das constatações obtidas neste estudo foi possível reconhecer as principais classes de metabólitos secundários presentes nas folhas de *Vitex*

megapotamica, acenando para várias possibilidades terapêuticas bem como identificar pela primeira vez a composição química do óleo essencial e avaliar a capacidade antioxidante deste que foi atribuída ao seu constituinte majoritário (BHT). Além disso, foi possível verificar uma boa atividade antioxidante dos extratos obtidos das folhas desta espécie, conforme os métodos utilizados neste estudo, o que nos permite inferir que esta atividade pode estar relacionada com sua utilização na medicina popular, servindo como um estímulo para mais estudos a fim de avaliar a capacidade antioxidante dos compostos isolados tanto do óleo como das folhas de *V. megapotamica*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKER, S. A. et al. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoides. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 3, p. 331-342, 1996.

ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by Gas Chromatography/Mass spectroscopy**. 4. ed. USA: Allured Publishing Corporation: Illinois, 1995. p. 456, 1995.

ALICE, C. B. et al. **Plantas medicinais de uso popular**: atlas farmacognóstico. 1. Ed. Canoas: Ed. da Ulbra, p. 185-187, 1995.

ALIERO, A.A., GRIERSON, D.S.; AFOLAYAN, A. J. Chemical composition of the essential oil from *Solanum pseudocapsicum*. **Pakistan Journal Biological Sciences**, v. 9, p. 1175-1177, 2006.

AL-MAMARY, M; AL-MEERI, A; AL-HABORI, M. Antioxidant activities and total phenolics of different types of Honey. **Nutrition Research**, v. 22, p. 1041-1047, sept. 2002.

ALONSO, A. M. et al. Determination of antioxidant power of red and white wines by a new electrochemical method and its correlation with polyphenolic content. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 50, p. 3112-3115, apr. 2002.

ANDRADE, C. A. et al. Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. Ex G. Don, Leguminosae-mimosoideae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 2, p. 231-235, Abr./Jun. 2007.

ATOUI, A. K. et al. Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chemistry**, v. 89, p. 27, jan. 2005.

BACKES, A.; NARDINO, M. **Árvores, arbustos e algumas lianas nativas no Rio Grande do Sul**. São Leopoldo: Ed. UNISINOS, 1998. p. 202.

BARDDAL, M. L. **A influência da saturação hídrica na distribuição de oito espécies arbóreas da floresta ombrófila mista aluvial do rio Iguaçu, Paraná**,

Brasil. 2006. 130 f. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias)- Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

BELOZERSKAYA, T.; GESSLER, N. Reactive oxygen species and the strategy of antioxidant defense in fungi: A review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, [S.l.], v. 43, n. 5, p. 506-515, nov. 2007.

BENETT, R. N.; WALSGROVE, R. M. Secondary metabolites in plant defense mechanisms. **New Phytologist**, v.127, p. 617-633, aug.1994.

BIESALSKI, H. K. Free radical theory of aging. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 5, n.1, p. 5-10, 2002.

BLAKE, D. R.; RALLEN, R. E.; LUNEC, J. Free radicals in biological systems-a review oriented to inflammatory processes. *British Medicinal Bulletin*, v. 43, n. 2, p. 371-385, 1987.

BONITA, J. S. et al. Coffee and cardiovascular disease: *In vitro*, cellular, animal and human studies. **Pharmacological Research**, Scraton, v. 55, p. 187-198, mar. 2007.

BOSTANCI, M. O.; BAGIRICI, F. Neuroprotective effect of aminoguanidine on iron induced neurotoxicity. **Brain Research Bulletin**, v. 76, p. 57-62, may. 2008.

BOUFTIRA, I.; ABDELLY, C.; SFAR, S. Identification of a naturally occurring 2,6-bis (1.1-dimethylethyl)-4- methylphenol from purple leaves of the halophyte plant *Mesembryanthemum crystallinum*. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 1136–1139, mar. 2007.

BOUFTIRA, I., IMEN, M.; SOUAD, S. Dosage of 2,6-Bis (1.1-dimethylethyl)-4-methylphenol (BHT) in the plant extract *Mesembryanthemum crystallinum*. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, p. 5, dec. 2010.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, London, v. 28, n. 1, p. 25-30, june.1995.

BRANDT, A. P. et al. Avaliação in vivo do efeito hipocolesterolêmico e toxicológico preliminar do extrato bruto hidroalcoólico e decocção da *Vitex megapotamica* (Spreng) Moldenke (*V. montevidensis* Cham.). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 19, p. 388-393, abr./jun. 2009.

CANADANOVIC, B.J., CETKOVIC, G., DILAS, S., et al. Radical scavenging, antibacterial, and antiproliferative activities of *Melissa officinalis* L. extracts. **Journal of Medicinal Food**, v. 11, p. 133-143, mar. 2008.

CAO, H. et al. DFT study on the antioxidant activity of rosmarinic acid. **Journal of Molecular Structure**, v. 719, p. 177-183, apr. 2005.

CARVALHO, P.E.R. **Espécies Arbóreas Brasileiras**.1. Ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2006, p. 527-532.

CATALGOL, B. K.; OZDEN, S.; ALPERTUNGA, B. Effects of trichlorfon on malondialdehyde and antioxidant system in human erythrocytes. **Toxicology in Vitro**, v. 21, p. 1538-1544, june. 2007.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n.1, p. 99-105, jan. 1998.

CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controversias e perspectivas. **Química Nova**, v.30, p.441-449, jan. 2007.

CHANDRA, S.; DE MEJIA, E.G. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to Mate (*Ilex paraguayensis*) and Green (*Camellia sinensis*) Teas. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 52, p. 3583-3589, may. 2004.

CHEN, Z. et al. Antihypertensive Nutraceuticals and Functional Foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Hong Kong, v. 57, p. 4485-4499, may. 2009.

CHO, E. J. et al. Study on the inhibitory effects of Korean medicinal plants and their main compounds on the DPPH radical. **Phytomedicine**, v. 10, p. 544-551, nov. 2003.

CHOI, C.W. et al. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoid by assay-guided comparison. **Plant Science**, v. 163, p. 1161-1168, oct. 2002.

CHUN, S. S. et al. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 809-816, feb. 2005.

CHUNG, K. T.; LU, Z.; CHOU, M. W. Mechanism of inhibition of tannic acid and related compounds on the growth of intestinal bacteria. **Food and Chemical Toxicology**, v. 36, p. 1053-1060, June 1998.

CORREA, M. Pio. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: IBDF, 1984. v. 6.

COSMO, N. L. et al. Morfologia do fruto, da semente e morfo-anatomia da plântula de *Vitex megapota mica* (Spreng.) Moldenke (Lamiaceae). **Acta Botânica Brasileira**. v. 23, n. 2, p. 389-397. Jan. 2009.

CRONQUIST, A. **An Integrated System of Classification of Flowering Plants**. 2. Ed. New York: Columbia University Press, 1981. v. 34.

CUNHA, A. P. **Farmacognosia e Fitoquímica**. 2. ed. Berna/Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2005. p. 38-58.

CURCIO, G. R. et al. Recomendação de espécies arbóreas nativas, por tipo de solo, para recuperação ambiental das margens da represa do rio Iraí, Pinhais. **Floresta**, Curitiba, v. 37, n. 1, Jan./Abr. 2007.

DALLE-DONNE, I. et al. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clinica Chimica Acta**, v. 329, p. 23-28, Mar. 2003.

DALLE-DONNE, J. et al. S-glutathionylation in human platelets by a thiol-disulfide exchange-independent mechanism. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 38, p. 1501-1510, June 2005a.

DALLE-DONNE, J. et al. Proteins as biological markers of oxidative/nitrosative stress in diseases. The contribution of redox-proteomics. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 24, p. 55-99, 2005b.

DALLE-DONNE, J. et al. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 10, n. 2, p. 389-406, 2006.

DHARMARATNE, H. R. W.; WIJWSINGHE, W. M. N. M.; THEVANASEM, V. Antimicrobial activity of xanthenes from *Calophyllum* species, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Journal Ethnopharmacology**, v. 66, p. 339-342, 1999.

DIAS, B.F.S. A implementação da convenção sobre diversidade biológica no Brasil: desafios e oportunidades. Campinas, p. 10, 1996.

DURIGANG, G.; NOGUEIRA, J. C. B. Recomposição de matas ciliares. **Scientia Forestalis**, São Paulo: Instituto Florestal, p. 14, 1990.

EKUNDAYO, O. et al. The chemical composition and antimicrobial activity of the leaf oil of *Vitex agnus-castus* L. **Journal Essential Oil Research**, v. 2, n. 3, p. 115-119, 1990.

ELLIS, E. M. Reactive carbonyls and oxidative stress: potential for therapeutical intervention. **Pharmacology and therapeutics**, v.115, p.13-24, july. 2007.

EVARISTO I.M.; LEITÃO M.C. Identificação e Quantificação por DAD-HPLC, da Fração Fenólica Contida em Folhas de *Quercus suber* L. **Silva Lusitana**, v. 9, n. 2, p. 135-141, 2001.

FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C. M. O. et al, (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. UFRGS, 2010, p. 263-288.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas e sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, p. 61-68, mar. 1997.

FILHO, D. W.; SILVA, E. L. da; BOVERIS, A. Flavonóides antioxidantes de plantas medicinais e alimentos: importância e perspectivas terapêuticas. In: YUNES, R. A; CALIXTO, J. B. **Plantas Medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001. p. 318-334.

FOWLER, C. J.; ROSS, S. B. Intra and extraneuronal monoamine oxidase. **Blood Vessels**, v. 21, p. 126-131, 1984.

FRANCO, I. J.; FONTANA, V. L. **Ervas e plantas: a medicina dos simples**. Erechim: Imprimax, 1997, p. 177.

FREITAS, M.S.; SOUZA, K.C.B.; RESENDE, U.P. Produção e qualidade de óleos essenciais de *Mentha arvensis* em resposta à inoculação de fungos micorrízicos arbusculares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, p. 887-894, 2004.

FURLAN, C. M.; DOMINGOS, M.; SALATINO, A. Leaf contents of nitrogen and phenolic compounds and their bearing with the herbivore damage to *Tibouchina pulchra* Cogn. (Melastomataceae), under the influence of air pollutants from industries of Cubatão, São Paulo. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 22, p. 317-323, 1999.

GAO, Z.; HUANG, K.; YANG, X.; XU, H. Free radical scavenging and antioxidant activities of flavonoids extracted from the radix of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1472, p. 643-650, 1999.

GILANI, A. H.; ATTA-UR-RAHMAN. Trends in Ethnopharmacology. **Journal Ethnopharmacology**, v. 100, p. 43-49, aug. 2005.

GLADSTONE, I. M. J.; LEVINE, R. L. Oxidation of proteins in neonatal lungs. **Pediatrics**, v. 93, p. 764-768, 1994.

GOETZ, M. E., LUCH, A. Reactive species: a cell damaging route assisting to chemical carcinogens. **Cancer Letters**, v. 266, p. 73-83, July. 2008.

GORDON, M. H. Dietary antioxidants in disease prevention. **Natural Product Reports**, v. 13, p. 265-273, 1996.

GRANADO-SERRANO, A. B. et al. Molecular mechanisms of (-)-epicatechin and chlorogenic acid on the regulation of the apoptotic and survival/proliferation pathways in a human hepatoma cell line. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 5, p. 2020-2027, 2007.

GRUNDMAN, M. Vitamin E and Alzheimer disease: the basics additional clinical trials. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, n. 2, p. 630S-636S, 2000.

GYAMFI, M. A., YONAMINE, M., ANIYA, Y. Free-radical scavenging action of medicinal herbs from Ghana *Thonningia sanguinea* on experimentally-induced liver injuries. **General Pharmacology: The Vascular System**, v. 32, p. 661-667, June. 1999.

GOTTLIEB, O.; KAPLAN, M.; BORIN, M.; **Biodiversidade: Um Enfoque Químico-Biológico**. 1. ed. Rio de Janeiro: Ed. UFRJ, 1996.

HAGERMAN, A. E. et al. High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 46, p. 1887-1892, 1998.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 3. ed. Oxford: Clarendon Press, 1999. (Oxford science publications).

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. **Journal of Neurochemistry**, v. 59, p. 1609-1623, nov. 1992.

HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants, and human diseases: curiosity, cause or consequence? **The Lancet**, v. 344, p. 721-724, 1994.

HARMAN, D. Free radical theory of aging. **Mutation Research**, v. 275, p. 257-266, sept. 1992.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: Possible modes of action. **Journal Natural Product**, v. 59, p. 205-215, 1996.

HATANO T. et al. Seasonal changes in the tannins of *Liquidambar formosana* reflecting their biogenesis. **Phytochemistry**, v. 25, p. 2787-2789, 1986.

HOULT, J. R. S.; PAYÁ, M. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. **General Pharmacology**, v. 27, p. 713-722, 1996.

HUDSON, J. B. Antiviral compounds from plants. Florida: CRC, 1990, 200p.

HYNES, M.J.; O'COINCEANAINN, M. The kinetics and mechanisms of reactions of iron (II) with caffeic acid, chlorogenic acid, sinapic acid, ferulic acid and naringin. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 98, p. 1457-1464, 2004.

INOUE, S. Laboratory evaluation of gaseous essential oils. **The International Journal of Aromatherapy**, v. 13, n. 4, p. 173-184, sept. 2003.

IROVETZ, L. et al. Chemical composition and antioxidant properties of clove leaf essential oil. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 54, p. 6303-6307, 2006.

JAENSON, T. G. T.; PALSSON, K.; BORG-KARLSON, A. K. Evaluation of extracts and oils of tick-repellent plants from Sweden. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 19, p. 345-352, dec. 2005.

JAMIESON, D. Oxygen toxicity and reactive oxygen metabolites in mammals. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 7, n. 1, p. 87-108, 1989.

JAYAPRAKASHA, G.K. et al. Phenolic constituents in the fruits of *Cinnamomum zeylanicum* and their antioxidant activity. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 54, p. 1672–1679, 2006.

JAYAPRAKASHA, G. K., PATIL BS. *In vitro* evaluation of the antioxidant activities in fruit extracts from citron and blood orange. **Food Chemistry**, v. 101, n. 1, p. 410–418, 2007.

JIA, Z.; MISRA, H. P. Reactive oxygen species in *in vitro* pesticide-induced neuronal cell (SH-SY5Y) cytotoxicity: role of NFκB and caspase-3. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 42, p. 288-298, jan. 2007.

JOLY, Aylton Brandão. **Introdução à taxonomia vegetal**. 13 Ed. São Paulo: Companhia, Ed. Nacional, p. 579-589, 2002.

KANTER, M. Free radicals, exercise and antioxidant supplementation. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 57, p. 9-13, 1998.

KARTHIKESAN, K.; PARI, L.; MENON, V. P. Antihyperlipidemic effect of chlorogenic acid and tetrahydrocurcumin in rats subjected to diabetogenic agents. **Chemico-Biological Interactions**, v. 188, n. 3, p. 643-650, 2010a.

KARTHIKESAN, K.; PARI, L.; MENON, V. P. Combined treatment of tetrahydrocurcumin and Chlorogenic acid exerts potential antihyperglycemic effect on streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic rats. **General Physiology and Biophysics**, v. 29, n.1, p. 23-30, 2010b.

KISS, T. et al. Complexes of 3,4-dihydroxyphenyl derivatives-X. Cooper (II) complexes of chlorogenic acid and related compounds. **Polyhedron**, v. 8, p. 2345-2349, 1989.

KORDALI, S. et al. Screening of chemical composition and antifungal and antioxidant activities of the essential oils from three Turkish *Artemisia* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1408-1416, feb. 2005.

KRAKAUER, T. The polyphenol Chlorogenic acid inhibits staphylococcal exotoxin-induced inflammatory cytokines and chemokines. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, Maryland, v. 24, n.1, p. 113-119, 2002.

KUTCHAN, T.M. Herbal mixtures in the traditional medicine of Eastern Cuba. **Plant Physiology**, v. 125, p. 58-62, 2001.

LAPPIN, G. R.; CLARK, L. C. Colorimetric method for determination of traces of carbonyl compounds. **Analytical Chemistry**, v. 23, p. 541–542; 1951.

LARSON, R.A. The antioxidants of higher plants. **Phytochemistry**, v. 27, p. 969, 1988.

LAYRISSE, M. et al. Iron Bioavailability in Humans from Breakfasts Enriched with Iron Bis-Glycine Chelate, Phylates and Polyphenols. **Journal of Nutrition**, n. 130, p. 2195-2199, 2000.

LAWRENCE, B. M. Chemical components of Labiatae oils and their exploitation. In: HARLEY, R. M., REYNOLDS, T. (eds.). *Advances in Labiatae science*. Kew: Royal Botanic Gardens, p. 399-436, 1992.

LEVINE, R. L et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 464–478, 1990.

LEVINE, R. L.; MOSKOVITZ, J.; STADTMAN, E. R. Oxidation of methionine in proteins: roles in antioxidant defense and cellular regulation. **IUBMB Life**, v. 50, p. 301-307, 2000.

LEVINE, R. L.; WILLIAMS, J. A.; STADTMAN, E. R.; SHACTER, E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods Enzymology**, v. 233, p. 346–357, 1994.

LI, H.; HAO, Z.; WANG, X.; HUANG, L.; LI, J. Antioxidant activities of extracts and fractions from *Lysimachia foenum-graecum* Hance. **Bioresource Technology**, n. 2, v. 100, p. 970–974, Jan 2009.

LIN, C. N.; LIOU, S. J.; LEE, T. H.; CHUANG, T. C.; WON, S. J. Xanthonic derivatives as potential anti-cancer drugs. **Journal Pharmacology**, v. 48, n. 5, p. 539-544, 1996.

LINUMA, M. et al. Antibacterial activity of xanthonic compounds from Guttiferae plants against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal Pharmacology**, v. 48, n.8, p.861-865, 1996.

LONGHI, Rubens Alberto. **Árvores e arvoretas do Sul**. Porto Alegre: Ed. L&PM, p. 151-152, 1995.

LOPES, B. C.; FERREIRA, M. B. D.; BRANDÃO, M. Sombreamento em pastagens: espécies recomendadas para as diversas regiões do Estado de Minas Gerais. **Daphne**, Belo Horizonte, v. 6, n. 4, p. 7-15, out. 1996.

LOPEZ, J. A. et al. **Arboles comunes del Paraguay**: ñande yyyra mata kuera. Washington: Peace Corps, p. 425, 1987.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa, São Paulo: Ed. Plantarum, p. 344, 1992.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil** – nativas e exóticas. Instituto Plantarum de estudos da flora LTDA. São Paulo, 2002.

LYKKESFELDT, J. Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. **Clinica Chimica Acta**, v. 380, p. 50-58, may. 2007.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR, V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, jan. 2002.

MAHABUSARAKAM, W.; PRODFOOT, J.; TAYLOR, W.; CROFT, K. Inhibition of lipoprotein oxidation by prenylated xanthonic compounds derived from mangostin. **Free Radical Research**, v. 33, p. 643-659, 2000.

MALLAVARAPU, G. R.; RAMESH, S.; KAUL. P. N. et al. Composition of essential oils the leaves of *Vitex negundo*. **Planta Medicinales**, v. 60, p. 583-584, 1994

MARIN, R.; APEL, M. A.; LIMBERGER, R. P. et al. Volatile components and antioxidant activity from some Myrtaceous fruits cultivated in Southern Brazil. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 2, p. 172-177, 2008.

MARRASSINI, C.; ACEVEDO, C.; MIÑO, J.; GORZALCZANY, S. Evaluation of antinoceptive, antiinflammatory activities and phytochemical analysis of aerial parts of *Urtica urens* L. **Phytotherapy Research**, Buenos Aires, n. 12, v. 24, p. 1807–1812, Dec. 2010.

MARTÍN-ARAGÓN, S.; BENEDÍ, J.; VILLAR, A. Oxygen active species-scavenger properties of coumarins. **Phytotherapy Research**, v. 10, p. S75-S78, 1996.

MAURICIO, A. Q. Estudo da atividade antioxidante do ácido caféico e da PIH: um polifenol natural e um quelante sintético. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, UNB, Brasília, 2006.

MEAGHER, E. A.; FITZGERALD, G. A. Indices of lipid peroxidation *in vivo*: Strengths and limitations. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, p. 202-226, june. 2000.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 127-130, mar. 2001.

MICALLEF, M.; LEXIS, L.; LEWADOWSKI, P. Red wine consumption increases antioxidant status and decreases oxidative stress in the circulation of both young and old humans. **Nutrition Journal**, v. 6, p. 1-8, 2007.

MIGUEL, M.D.; MIGUEL, G.O. **Desenvolvimento de fitoterápicos**. São Paulo: Robe, 1999

MOLGAARD, P.; RAVN, H. Evolutionary aspects of caffeoyl ester distribution in dicotyledons. **Phytochemistry**, v. 27, p. 2411-2421, 1988.

MORABITO, F.; CRISTIANI, M.; SAIJA, A.; STELITANO, C.; CALLEA, V.; TOMAINO, A.; Minciullo P.L., Gangemi S. Lipid peroxidation and protein oxidation in patients affected by Hodgkin's lymphoma, **Mediators of Inflammation**, v.13, p. 381-383, 2004.

MORAN, J. F.; KLUCAS, R. V.; GRAYER, R. J.; ABIAN, J.; BECANA, M. Complexes of iron with phenolic compounds from soybean nodules and other legume tissues: prooxidant and antioxidant properties. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 22, n. 5, p. 861-870, 1997.

MOREL, I. et al. Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte cultures. **Biochemical Pharmacology**, v. 45, p. 13-19, 1993.

MORRISON, I.M.; ASIEDU, E.A.; STUCHBURY, T.; POWELL, A. A. Determination of lignin and tannin contents of Cowpea seed coats. **Annals of Botany**. v.76, p. 287-290, 1995.

MOURE, A. et al. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, v. 72, p. 145-171, 2001.

MUSTAFA R.A., HAMID A.A., MOHAMED S., & BAKAR F.A. Total Phenolic Compounds, Flavonoids, and Radical Scavenging Activity of 21 Selected Tropical Plants. **Journal of food science**, n.1, v. 75, p. 28-30, 2010.

NÉBIÉ, R. H. Ch.; YAMÉOGO, R. T.; BÉLANGER, A. et al. Chemical composition of essential oils of *Vitex diversifolia* Bak. From Burkina Faso. **Journal of Essential Oil Research**, v. 17, p. 276-277, 2005.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. The influence of natural products upon drug discovery. **Natural Product Reports**, v. 17, p. 75–285, 2000.

NSIMBA, Y. R.; KIKUZAKI, H.; KONISHI, Y. Antioxidant activity of various extracts and fractions of *Chenopodium quinoa* and *Amaranthus* spp. Seeds. **Food Chemistry**, v. 106, p.760-766, 2008.

NYSTROM, T. Role of oxidativecarbonylation in protein quality control and senescence. **The EMBO Journal**, v. 24, n. 1311-1317, 2005.

OKUDA, T.; YOSHIDA, T.; HATANO, T. Classification of oligomeric hydrolysable tannins and specificity of their occurrence in plants. **Phytochemistry**, v. 32, p. 507-521, 1993.

OLMOS, A.; GINER, R. M.; RECIO, M. C.; RIOS, J. L.; CERDÁ-NICOLÁS, J. M.; MÁÑEZ, S. Effects of plants alkylphenols on cytokine production, tyrosine nitration and inflammatory damage in the efferent phase of contact hypersensitivity. **British Journal of Pharmacology**, Valencia-Espanha, v. 152, p. 366-373, 2007.

PAULI, A. Antimicrobial properties of essential oil constituents. **The International Journal of Aromaterapy**, v. 11, n. 3, p. 126-133, 2001.

PANSERA, M. R. et al. A. Análise de taninos totais em plantas aromáticas e medicinais cultivadas no Nordeste do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13, n. 1, p. 17-22, 2003.

PARI, L.; KARTHIKESAN, K.; MENON, V. P. Comparative and combined effect of Chlorogenic acid and tetrahydrocurcumin on antioxidant disparities in Chemical induced experimental diabetes. **Molecular and Cellular Biochemistry**, n. 1-2, v. 341, p. 109-117, 2010.

PENG, J.; JONES, G. L.; WATSON, K. Stress proteins as biomarkers of oxidative stress: effects of antioxidant supplements. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 28, p. 1598-1606, 2000.

PETERSEN, M.; Simmonds, M.S.J. Rosmarinic acid, **Phytochemistry**, v. 62, p. 121–125, 2003.

PINTO, D. C.; FUZZATI, N.; PARMINO, X. C.; HOSTETTMANN, K. Xanthone and antifungal constituents from *Monnina obtusifolia*. **Phytochemistry**, v. 37, p. 875-878, 1994.

PONCE, A. G., et al. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. **Lebensmittel-Wissenschaft-Technologie**, v. 36, n. 7, p. 679-684, 2003.

QUINLAN, G. J.; EVANS, T. W.; GUTTERIDGE, J. M. Oxidative damage to plasma proteins in adult respiratory distress syndrome. **Free Radical Research**, v. 20, p. 289–298, 1994.

RAPTA, P.; MISIK, V.; STASKO, A.; VRÁBEL, L. Redox intermediates of flavonoides and caffeic acid esters from propolis: an EPR spectroscopy and cyclic voltammetry study. **Free Radicals Biology & Medicine**, 18: 901-908, 1995.

RATH, G.; POTTERAT, O.; MAVI, S.; HOSTETTMANN, K. Xanthones from *Hypericum roeperatum*. **Phytochemistry**, v. 43, p. 513-520, 1996.

REZNICK, A. Z. et al. Modification of plasma proteins by cigarette smoke as measured by protein carbonyl formation. *Biochemical Journal*, v. 286, p. 607–611, 1992.

REZNICK, A. Z.; PACKER, L. Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. **Methods in Enzymology**, v. 233, p. 357–363; 1994.

ROCHA, L. et al. An antifungal gamma-pyrone and xanthenes with monoamine oxidase inhibitory activity from *Hypericum brasiliense*. **Phytochemistry**, v. 36, p. 1381-1385, 1994.

ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, London, v. 92, n.2, p. 235-254, 2005.

RHODES, M. J. C. Physiological roles for secondary metabolites in plants: from progress, many outstanding problems. **Plant Molecular Biology**, v. 24, n. 1, p. 1-20, 1994.

RIMPLER, H. Pterosteron, polypodin B and neues ecdysonartiges steroids (viticosteron E) aus *Vitex megapotamica*. **Tetrahedron Letters**, v. 5, n. 10, p. 329-333, 1969.

RIMPLER, H. Phytoecdysones and iridoids from *Vitex megapotamica*. **Archiv der Pharmazie** v. 10, n. 305, p. 746-751, 1972.

RIMPLER, H.; SAUERBIER, H. Iridoid glucosides as taxonomic markers in the genera *Lantana*, *Lippia*, *Aloysia* and *Phyla*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 14, p. 307-310, 1986.

ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, London, v. 92, n. 2, p. 235-254, 2005.

ROSA, M. S. S.; MENDONÇA-FILHO, R. R.; BIZZO, H. R.; RODRIGUES, I. A.; SOARES, R. M. A.; SOUTO-PADRÓN, T.; ALVIANO, C. S.; LOPES, A. H. C. S. Antileishmanial Activity of a Linalool-Rich Essential Oil from *Cróton cajurana*. **Antimicrobial Agents and chemotherapy**, v. 47, n.6, p. 1895-1901, 2003.

SAHIN, S.; DEMIR, C.; MALYER, H. Determination of phenolic compounds in *Prunella L.* by liquid chromatography-diode array detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 55, p. 1227–1230, 2011.

SALMINEN, J.P. et al. Seasonal variation in the content of hydrolysable tannins in leaves of *Betula pubescens*. **Phytochemistry**, v. 57, p. 15-22, 2001.

SALVADOR, J. L. G.; OLIVEIRA, S. B. **Reflorestamento ciliar de açudes**. São Paulo: CESP, p. 14, 1989.

SANTOS, A. B. dos. **Atividade antioxidante de extratos vegetais da flora brasileira**: estudo com ressonância paramagnética eletrônica (RPE) e teoria da funcionamento da densidade. 2006. Tese (Doutorado em Física Aplicada a Medicina e Biologia)-Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, São Paulo, 2006.

SANTOS, M. D.; ALMEIDA, M. C.; LOPES, N. P.; DE SOUZA, G. E. P. Evaluation of the Anti-inflammatory, Analgesic and Antipyretic Activities of the Natural Polyphenol Chlorogenic Acid. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Ribeirão Preto, v. 29, n. 11, p. 2236-2240, 2006.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 6. Ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. UFRGS/Ed. UFSC, p. 403-434, 2010.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, v. 30, p. 3875-3883, 1991.

SCHOFIELD, P.; PELL, A. N.; MBUGUA, D. M. Analysis of condensed tannins: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 91, p. 21-40, 2001.

SCHUBERT, A. et al. Comparison of antioxidant activities and total polyphenolic and methylxanthine contents between the unripe fruit and leaves of *Ilex paraguayensis* A. St. Hil. **Pharmazie**, v. 62, p. 876-880, 2007.

SCHULTZ, Alarich R. H. **Introdução a botânica sistemática**. 5 Ed., Porto Alegre: Ed. UFRGS, v. 2, p. 280-281, 1985.

SHYAMALA, B. N. et al. Leafy vegetable extracts-antioxidant activity and effect on storage stability of heated Oils. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 6, p. 239-245, 2005.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O. et al, (Org.). **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 6. Ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. UFRGS/Ed. UFSC, p. 467-495, 2010.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. UFRGS/Ed. UFSC, p. 229-615, 2010.

SIMÓN, B. F.; CADAHIA, E.; CONDE, E. Evolution of phenolic compounds of spanish oak wood during natural seasoning. First results. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 1687-1694, 1999.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, p. 15, 71, 2002.

SOUSA, C. M. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-255, 2007.

SURVESWARAN S, CAI YZ, CORKE H, SUN M. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. **Food Chemistry**, v. 102, n. 3, p. 938–53, 2007.

SUKSAMRARN, A.; WERAWATTANAMETIN, K.; BROPHY, J. J. Variation of essential oil constituents in *Vitex trifolia* species. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 6, n. 1, p. 97–99, Mar. 1991.

STADTMAN, E. R. Metal ion catalysed oxidation of proteins: Biochemical mechanism and biological consequences. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 9, p. 315–325, 1990.

STADTMAN, E. R.; OLIVER, C. N. Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p. 2005–2008, 1991.

STADTMAN, E. R.; BERLETT, B. S. Fenton chemistry. Amino acid oxidation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p. 17201-17211, 1991.

STADTMAN, E. R.; LEVINE, R. L. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in protein. **Amino Acids**, v. 25, p. 207-218, 2003.

STASI, L. C. D. **Plantas Medicinais: Arte e Ciência**. São Paulo: Ed. Afiliada, 1996.

STEINEGGER, E.; HANSEL, R. **Pharmakognosie**. 5. ed. Berlin: Springer, 1992.

TIGRINE-KORDJANI, N., MEKLATI, B.Y., CHEMAT, F. Analysis by gas chromatography-mass spectrometry of the essential oil of *Zygophyllum album* L., an aromatic and medicinal plant growing in Algeria. **The International Journal of Aromatherapy**, v. 16, p. 187–191, 2006.

TISSERAND, R. Essential oil safety I. **The International Journal of Aromatherapy**, v. 7, n. 3, p. 28-32, 1996.

TOLEDO, A. C. O. et al. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Revista Lecta Bragança Paulista**, v.21, n. 1/2, p. 7-13, jan./dez. 2003.

TORRES, R. B.; MATTHES, L. A. F.; RODRIGUES, R. R. et al. Espécies florestais nativas para plantio em áreas de brejo. **O Agrônômico**, Campinas, v. 44, n. 1/3, p. 13-16, 1992.

TOURSARKISSIAN, M. **Plantas medicinales de La Argentina**, Buenos Aires: Hemisferio Sur, p.178, 1980.

TSIMOGIANNIS, D. I.; OREOPOULOU, V. The contribution of flavonoids C-ring on the DPPH free radical scavenger efficiency. A kinetic approach for the 30,40-hydroxy substituted members. **Food Science Emerging Technology**, v. 7, p. 140–146, 2006.

TUNG, Y. T. et al. Antioxidant activities of natural phenolic compounds from *Acacia confuse* bark. **Bioresource Technology**. v. 98, p. 1120-1123, 2007.

TURKOGLU, A; DURU, M. E.; MERCAN, N.; KIVRAK, I.; GEZER, K. Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureous* (Bull.) Murrill. **Food Chemistry**, n. 1, v 101, p. 267–73, 2007.

USDIN, E. Monoamine oxidase, basic and clinical frontiers. **Proc. Symp. Hakone Japan, Excerpta Medica**, p. 315-154, 1984.

VAGIMIGLI, M. et al. Entothelial dysfunction in acute and chronic coronary syndromes: evidence for a pathogenetic role of oxidative stress. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 40, p. 255-261, 2003.

VANHAELEN, M.; LEJOLY, J.; HANOCQ, M. et al. **The Medicinal Plant Industry, USA**, p. 59, 1991.

VASCONCELOS, S.M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v.30, p.1323-1338, 2007.

VELIOGLU, Y. S.; MAZZA, G.; GAO, L.; OOMAH, B. D. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 10, v.46, p. 4113-4117, Aug. 1998.

WATANABE, T.; MITSUI, Y.; KUSAURA, T.; OKAWA, W.; KAJIHARA, Y.; SAITO, I. The blood pressure-lowering effect and safety of Chlorogenic acid from green coffee bean extract in essential hypertension. **Clinical and Experimental Hypertension**., Tokyo, v. 28, n. 5, p. 439-449, 2006.

WIJESEKERA, R. O. B. Plant-derived medicines and their role in global health. **The medicinal Plant Industry**.1986.

WINK, M. Physiology of secondary product formation in plantas. In: CHARLWOOD, B. V.; RHODES, M. J. C. **Secondary products from plant tissue culture**. Oxford: Clarendon, p. 403-434, 1990.

WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis of própolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, v. 37, n. 2, p. 99-105, 1998.

XIONG, O.; KADOTA, S.; TANI, T.; NAMBA, T. Antioxidative effects of phenylethanoids from *Cistanche deserticola*, **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 19, p. 1580-1585, 1996.

YANG, C. S. et al. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. **Annu Review Nutrition**, v. 21, p. 381-406, July 2001.

YOKOZAWA, T.; DONG, E.; WU LIU, Z.; SHIMIDZU, M. Antioxidant activity of flavones and flavonols *in vitro*. **Phytotherapy Research**, v. 11, p. 446-449, 1997.

YOSHIHAWA, M. et al. Antioxidant constituents from the fruits hulls of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) originating in Vietnam. **Yakugazu Zasshi**, v. 114, p. 129-133, 1994.

ZANATTA, L. et al. Effect of crude extract and fractions from *Vitex megapotamica* leaves on hyperglycemia in alloxan-diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 109, p. 151-155, 2007.

ZHANG, X. et al. Chlorogenic acid protects mice against lipopolysaccharide-induced acute lung injury. **Injury**, China, v. 41, n. 7, p. 943-949, 2010.

ZUANAZZI, J. A. S; MONTANHA, J. A. Flavonóides. In SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis, 6 ed., Ed. Universidade-UFRGS, Ed. UFSC, 2010, cap. 23, p. 577-614.

Anexo 1 - Artigo submetido ao periódico: Natural Product Research

Natural Product Research



Composition and antioxidant capacity of the essential oil of leaves of *Vitex megapotamica* (Sprengel) Moldenke

Journal:	<i>Natural Product Research</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Short Communication
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Athayde, Margareth; Federal University of Santa Maria, Industrial Pharmacy de Brum, Thiele; Federal University of Santa Maria, Industrial Pharmacy Boliqon, Aline; Federal University of Santa Maria, Industrial Pharmacy Frohlich, Janaína; Federal University of Santa Maria, Industrial Pharmacy; Federal University of Santa Maria, Industrial Pharmacy Schawnz, Thiago; Federal University of Santa Maria, Department of Chemistry Zadra, Marina; Federal University of Santa Maria, Industrial Pharmacy Piana, Mariana; Federal University of Santa Maria, Industrial Pharmacy Froeder, Amanda; Federal University, Industrial Pharmacy; Federal University of Santa Maria, Industrial Pharmacy
Keywords:	<i>Vitex megapotamica</i> , essential oil, butylated hydroxytoluene, antioxidant capacity

SCHOLARONE™
Manuscripts

URL: <http://mc.manuscriptcentral.com/gnpl>