


Determinação *in vitro* da atividade antioxidante de *Vitex megapotamica* através do ensaio de ação sequestradora do radical livre DPPH

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.6791225200612>

Giovanny Ricardo Hartmann

Grupo de Pesquisa em Produtos Naturais e Bioatividades – GPPNBio,
Centro Universitário Univel - Cascavel, Paraná, Brasil.
<http://lattes.cnpq.br/9042063540773659>

Lucas Vinicius de Melo

Grupo de Pesquisa em Produtos Naturais e Bioatividades – GPPNBio,
Centro Universitário Univel - Cascavel, Paraná, Brasil.
<http://lattes.cnpq.br/2231267292028262>

Tiago Tizziani

Grupo de Pesquisa em Produtos Naturais e Bioatividades – GPPNBio,
Centro Universitário Univel - Cascavel, Paraná, Brasil.
<https://orcid.org/0000-0002-2651-0557>

RESUMO : As plantas medicinais representam uma importante fonte de compostos bioativos com potencial terapêutico, especialmente através de metabólitos secundários que modulam processos associados ao estresse oxidativo. Nesse contexto, a espécie *Vitex megapotamica*, usualmente conhecida como Tarumã, pertencente à família Lamiaceae e amplamente utilizada na medicina tradicional, destaca-se por sua composição rica em compostos fenólicos e flavonoides, reconhecidos por suas propriedades antioxidantes. O presente estudo teve como objetivo avaliar *in vitro* a atividade antioxidante do extrato bruto hidroalcoólico e das frações hexânica, diclorometânica, n-butanólica e aquosa das folhas de *V. megapotamica*, por meio do ensaio de sequestro do radical livre DPPH•. A triagem foi realizada na concentração de 200 µg mL⁻¹, seguida da determinação da concentração efetiva capaz de reduzir 50% do radical (EC₅₀) para as amostras com atividade superior a 50%. Os resultados demonstraram elevada capacidade antioxidante para o extrato bruto hidroalcoólico (87,5%) e para as frações hexânica (89,8%), diclorometânica (89,1%)

e aquosa (86,8%), enquanto a fração n-butanólica apresentou atividade inferior (19,2%). As frações hexânica e diclorometânica destacaram-se por apresentarem EC_{50} inferior a $20 \mu\text{g mL}^{-1}$, indicando elevada capacidade antioxidante mesmo em baixas concentrações, enquanto o extrato bruto apresentou EC_{50} de $31,7 \mu\text{g mL}^{-1}$. Esses resultados evidenciam que os compostos bioativos antioxidantes de *V. megapotamica* encontram-se distribuídos em frações de diferentes polaridades, sugerindo a presença de moléculas tanto lipofílicas quanto hidrofílicas com alta capacidade sequestradora de radicais livres. Dessa forma, a espécie *V. megapotamica* constitui uma promissora fonte de agentes antioxidantes, com potencial aplicação farmacêutica e biotecnológica.

PALAVRAS-CHAVE: *Vitex megapotamica*; DPPH; produtos naturais; radicais livres; estresse oxidativo; flavonoides.

In vitro determination of the antioxidant activity of *Vitex megapotamica* through the DPPH free radical scavenging assay.

ABSTRACT: Medicinal plants represent an important source of bioactive compounds with therapeutic potential, especially through secondary metabolites that modulate processes associated with oxidative stress. In this context, the species *Vitex megapotamica*, commonly known as Tarumã, belonging to the family Lamiaceae and widely used in traditional medicine, stands out due to its composition rich in phenolic compounds and flavonoids, which are recognized for their antioxidant properties. The present study aimed to evaluate in vitro the antioxidant activity of the crude hydroalcoholic extract and the hexane, dichloromethane, n-butanol, and aqueous fractions of *V. megapotamica* leaves using the DPPH• free radical scavenging assay. The screening was performed at a concentration of $200 \mu\text{g mL}^{-1}$, followed by the determination of the effective concentration required to reduce 50% of the radical (EC_{50}) for samples exhibiting antioxidant activity above 50%. The results demonstrated high antioxidant capacity for the crude hydroalcoholic extract (87.5%) and for the hexane (89.8%), dichloromethane (89.1%), and aqueous (86.8%) fractions, whereas the n-butanol fraction showed lower activity (19.2%). The hexane and dichloromethane fractions stood out by presenting EC_{50} values below $20 \mu\text{g mL}^{-1}$, indicating high antioxidant efficiency even at low concentrations, while the crude extract exhibited an EC_{50} of $31.7 \mu\text{g mL}^{-1}$. These findings demonstrate that the antioxidant bioactive compounds of *V. megapotamica* are distributed among fractions of different polarities, suggesting the presence of both lipophilic and hydrophilic molecules with high free radical scavenging capacity. Thus, *V.*

megapotamica constitutes a promising source of antioxidant agents with potential pharmaceutical and biotechnological applications.

KEYWORDS: *Vitex megapotamica*; DPPH; natural products; free radicals; oxidative stress; flavonoids.

INTRODUÇÃO

As plantas medicinais têm desempenhado papel central na história da humanidade, constituindo um dos mais antigos recursos terapêuticos empregados na prevenção e tratamento de doenças. O conhecimento tradicional acumulado por diferentes povos ao longo dos séculos sustentou o uso de preparados vegetais destinados à promoção da saúde e ao manejo de sintomas e enfermidades (Rates, 2001). Com o desenvolvimento da ciência moderna, essas práticas foram integradas e expandidas por meio da farmacognosia, etnofarmacologia, química de produtos naturais, química medicinal e demais áreas que se dedicam ao estudo dos produtos naturais bioativos, provenientes de plantas, fungos, organismos marinhos e animais, investigando suas características quimiotaxonômicas, físico-químicas, bioquímicas e farmacológicas, bem como suas formas de aplicação terapêutica (Dutra; Crivelli; Fritzen, 2016).

Entre as espécies vegetais de relevância etnofarmacológica, encontra-se *Vitex megapotamica* (Spreng.) Moldenke (IPNI, 2025), usualmente conhecida como Tarumã e pertencente à família Lamiaceae, destaca-se tanto por sua ampla distribuição na América do Sul quanto por sua diversidade fitoquímica. A planta ocorre no Sul do Brasil, além de regiões da Argentina, Paraguai e Uruguai, apresentando características morfológicas marcantes, como flores azuladas e frutos oleaginosos semelhantes a azeitonas, o que explica alguns de seus nomes populares (Brum et al., 2012; Brum et al., 2013). Tradicionalmente, *V. megapotamica* é utilizada como agente anti-inflamatório, diurético, hipocolesterolemia e hipoglicemiantes, reforçando seu potencial terapêutico em diferentes contextos clínicos (Brandt et al., 2009).

A composição fitoquímica da espécie é rica em metabólitos secundários, especialmente compostos fenólicos e flavonoides, amplamente reconhecidos por sua capacidade antioxidante (Brum et al., 2013). Além desses, já foram identificados taninos, catequinas, flavonóis, flavanonas, xantonas, esteroides, triterpenoides e diversos outros constituintes associados a propriedades farmacológicas relevantes (Brum et al., 2012). No reino vegetal, esses metabólitos desempenham funções adaptativas essenciais, mas em organismos humanos apresentam potencial para modular processos inflamatórios, oxidativos e neurodegenerativos (Dos Santos; Farias Rodrigues, 2017).

Entre esses grupos, os flavonoides têm recebido destaque por sua estrutura química característica, composta por anéis aromáticos com duplas ligações conjugadas, que permite a neutralização eficiente de radicais livres e a estabilização de espécies reativas envolvidas no estresse oxidativo (Dewick, 2009; Machado et al., 2008). Ao atuarem como antioxidantes, esses compostos são capazes de inibir a peroxidação lipídica, proteger macromoléculas biológicas e contribuir para a integridade celular, apresentando implicações relevantes para a prevenção de doenças crônicas e neurodegenerativas (Nones, 2010).

Os radicais livres, definidos como moléculas ou átomos contendo elétrons desemparelhados, são altamente reativos e capazes de desencadear danos significativos em proteínas, lipídios e DNA quando presentes em excesso (Lima; Bezerra, 2012). Embora sejam produzidos naturalmente por processos metabólicos, desequilíbrios entre sua geração e os mecanismos de defesa antioxidante podem resultar em estresse oxidativo exacerbado, condição associada ao desenvolvimento de diversas patologias. Entre as espécies envolvidas estão as espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e enxofre, que podem existir tanto na forma radicalar quanto não radicalar, mas que, em elevadas concentrações, promovem respostas deletérias às células e tecidos (Martelli; Nunes, 2014).

Nesse cenário, a busca por compostos naturais capazes de modular o estresse oxidativo tem se intensificado, destacando os flavonoides como importantes agentes neutralizadores de radicais como superóxido, hidroxila e hidroperóxido (Lima; Bezerra, 2012). Sua eficácia está relacionada não apenas à estrutura química, mas também à capacidade de realizar quelatação de metais e de atuar diretamente na captura e estabilização dessas espécies reativas.

Nesse sentido, a espécie *Vitex megapotamica* destaca-se como uma espécie promissora para o desenvolvimento de produtos naturais com potencial antioxidante, dada sua variabilidade estrutural, constituintes químicos e dados reportados na literatura que respaldam as propriedades farmacológicas de seus metabólitos.

METODOLOGIA

Coleta do material vegetal

As folhas de *Vitex megapotamica* foram coletadas no primeiro semestre de 2024 pelos integrantes do Grupo de Pesquisa em Produtos Naturais e Bioatividades (GPPNBio) da Univel. O material vegetal passou por triagem e foram realizadas exsiccatas para a identificação botânica da espécie.

A porção remanescente do material vegetal foi submetida à secagem à temperatura ambiente, permitindo a posterior trituração e obtenção do material necessário para os procedimentos de extração.

Obtenção do extrato bruto e fracionamento

Após a secagem completa, o material vegetal foi triturado, resultando em 986 g de pó de folhas. Esse material foi submetido à maceração exaustiva com solução hidroalcoólica (etanol absoluto e água destilada, 70% v/v) em recipiente fechado. Durante um período total de três semanas, a maceração foi conduzida com renovação periódica do solvente a cada sete dias. A cada troca de solvente, realizou-se filtração simples, e as soluções obtidas foram reunidas para posterior concentração em evaporador rotatório.

Ao término do processo, o solvente foi removido em rotaevaporador, sob pressão reduzida a 50 °C, resultando em 82 g de extrato bruto hidroalcoólico, correspondendo a um rendimento de 8,4% em relação ao material vegetal seco utilizado.

Particionamento do extrato de *Vitex megapotamica*

Para o fracionamento, o extrato bruto foi ressuspensionado em água destilada, etapa necessária para permitir a separação das frações por diferenças de polaridade. Assim, 32,736 g do extrato bruto foram solubilizados em 300 mL de água, constituindo a fase aquosa inicial.

O particionamento foi realizado por extração líquido-líquido em funil de separação, utilizando solventes de polaridade crescente: hexano, diclorometano e n-butanol. Para cada solvente, adicionaram-se 100 mL da solução aquosa do extrato e 100 mL do solvente correspondente, realizando-se sucessivas extrações até esgotamento da fase orgânica. As fases foram separadas, filtradas e concentradas novamente em rotaevaporador para remoção dos respectivos solventes.

As frações obtidas, hexânica, diclorometânica, butanólica e aquosa, foram então armazenadas em frascos âmbar e mantidas sob refrigeração até a realização dos ensaios biológicos.

Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH

A atividade antioxidante foi determinada por meio do ensaio de sequestro do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), baseado no método descrito por Moresco et al. (2012), com adaptações para leitura em espectrofotômetro UV/Vis Bioplus.

A mistura reacional foi preparada contendo 60 µL da solução do extrato vegetal ou fração (1000 µg mL⁻¹), 100 µL da solução etanólica de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) a 0,004% e 140 µL de etanol, totalizando 300 µL por ensaio. Para o controle da amostra (Abs_branco), foram utilizados 240 µL de etanol e 60 µL da solução do extrato ou fração, sem adição de DPPH. Para o controle positivo (Abs_controle), foram preparados 100 µL da solução de DPPH (0,004%) e 200 µL de etanol. As misturas foram incubadas a 25 °C, em ausência de luz por 30 minutos, e posteriormente submetidas à leitura de absorbância em espectrofotômetro UV-Vis (Bioplus) utilizando o comprimento de onda de 517 nm, correspondente ao máximo de absorção do radical DPPH. Todas as amostras, controles e brancos foram analisados em triplicata.

A atividade antioxidante (%) foi calculada de acordo com a equação:

$$AA (\%) = \left(1 - \frac{Abs_{amostra} - Abs_{branco}}{Abs_{controle}} \right) \times 100$$

Fonte: Moresco, HH., et al. (2012).

Abs_{amostra}: corresponde à absorbância da mistura contendo a amostra vegetal e o radical DPPH.

Abs_{branco}: corresponde à absorbância da amostra vegetal na ausência de DPPH (branco).

Abs_{controle}: corresponde à absorbância da solução de DPPH preparada em etanol, sem adição da amostra (controle).

As amostras que apresentaram atividade antioxidante superior a 50% foram submetidas ao cálculo da concentração efetiva capaz de reduzir o DPPH em 50% (EC₅₀). Para esse cálculo, o ensaio descrito anteriormente foi repetido utilizando-se diferentes concentrações do extrato ou de suas frações (variando de 2,5 a 200 µg mL⁻¹).

Foram realizados três experimentos independentes, cada um conduzido em triplicata, para as amostras selecionadas. A partir dos valores de atividade antioxidante obtidos, construíram-se curvas analíticas e aplicaram-se equações para o cálculo da EC₅₀. Os resultados foram expressos em µg mL⁻¹.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

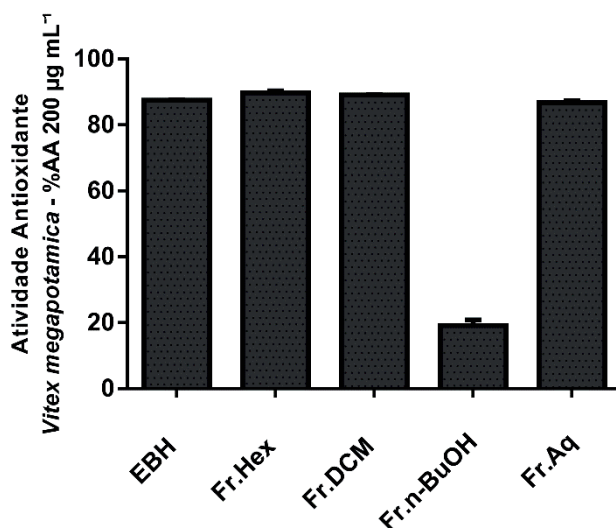
Na triagem de atividade antioxidante pelo método de captura do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), realizada na concentração de 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, observou-se que majoritariamente as amostras de *Vitex megapotamica* apresentaram elevada capacidade antioxidante, com exceção da fração solúvel em n-butanol. A percentagem média de atividade antioxidante (%AA), foi calculada em triplicata:

Amostra	%AA a 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (média \pm DP)	EC ₅₀ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Extrato bruto hidroalcoólico	87,5 \pm 0,1	31,7
Fração hexânica	89,8 \pm 0,6	< 20
Fração diclorometânica	89,1 \pm 0,2	< 20
Fração n-butanólica	19,2 \pm 1,7	ND
Fração aquosa	86,8 \pm 0,6	ND

*Os valores de %AA representam a média \pm desvio padrão (DP) de três determinações independentes. EC₅₀: concentração necessária para sequestrar 50% do radical DPPH. ND: não determinado.

Tabela 1 - Atividade antioxidante (%AA) de *Vitex megapotamica* através do ensaio de ação sequestradora do radical livre DPPH.

Os melhores resultados de captura do radical livre DPPH• na concentração de triagem foram observados para as frações hexânica e diclorometânica, que exibiram atividade próxima de 90%, seguidas de valores também elevados para o extrato bruto e a fração aquosa, enquanto a fração n-butanólica apresentou atividade inferior. Com base nesses resultados, foram selecionadas as amostras com atividade acima de 50% para a determinação da EC₅₀, utilizando as diferentes concentrações testadas (20–240 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Para a fração diclorometânica, a atividade antioxidante aumentou de 53,2% a 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para 64,8% a 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 89,2% a 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 92,2% a 120 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Desta forma, na menor concentração avaliada (20 $\mu\text{g mL}^{-1}$), a fração diclorometânica ultrapassou o limiar de 50% de atividade, indicando uma EC₅₀ inferior a 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$.



*Os valores de %AA representam a média \pm desvio padrão (DP) de três determinações independentes na concentração de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$. EBH: extrato bruto hidroalcoólico; Fr.Hex: fração hexânica; Fr.DCM: fração diclorometânica; Fr.n-BuOH: fração n-butanólica; Fr.Aq: fração aquosa.

Figura 1 - Atividade antioxidante (%AA) de *Vitex megapotamica* na concentração de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$

O extrato bruto hidroalcoólico apresentou atividade de 48,6% a $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ e 72,9% a $60 \mu\text{g mL}^{-1}$, com leve aumento de atividade antioxidante de 74,1% e 74,7% nas concentrações de 120 e $240 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Os valores obtidos foram plotados na forma de % de decréscimo da absorbância de DPPH em função da concentração da solução teste, onde determinou-se a concentração necessária para diminuir a concentração do DPPH em 50% (concentração efetiva 50% - EC_{50}). A EC_{50} obtida foi de $31,7 \mu\text{g mL}^{-1}$, indicando o potencial antioxidante de *V. magapotamica* no extrato bruto, embora inferior às frações mais ativas. A fração hexânica destacou-se por apresentar atividade elevada em todas as concentrações avaliadas: 87,2% a $20 \mu\text{g mL}^{-1}$, 87,9% a $30 \mu\text{g mL}^{-1}$, 89,3% a $60 \mu\text{g mL}^{-1}$, 88,2% a $120 \mu\text{g mL}^{-1}$ e 82,4% a $240 \mu\text{g mL}^{-1}$. Considerando que já em $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ a atividade foi superior a 80%, a EC_{50} desta fração é também inferior a $20 \mu\text{g mL}^{-1}$, sugerindo elevada ação antioxidante.

CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que a espécie *Vitex megapotamica* apresenta atividade antioxidante *in vitro*, confirmando seu potencial como fonte natural de compostos bioativos capazes de atuar no sequestro de radicais livres. Entre os extratos avaliados, as frações hexânica e diclorometânica destacaram-se por exibirem os maiores valores de atividade antioxidante, próximos de 90% na triagem e apresentando EC_{50} inferior a $20 \mu\text{g mL}^{-1}$, o que evidencia elevada capacidade antioxidante. O extrato bruto hidroalcoólico e a fração aquosa também apresentaram atividade significativa, reforçando a presença de metabólitos com importante capacidade redutora, como fenóis e flavonoides, comumente associados à neutralização de espécies reativas de oxigênio (ROS).

A distribuição da atividade entre as frações sugere que os antioxidantes presentes na espécie abrangem compostos de distintas polaridades, incluindo tanto moléculas hidrofílicas quanto lipofílicas. Esses resultados corroboram com a literatura reportando *V. megapotamica* como uma planta rica em flavonoides C-glicosilados e outros metabólitos secundários com reconhecida atividade biológica.

Desta forma, os resultados obtidos reforçam o potencial de *Vitex megapotamica* como uma planta medicinal promissora no desenvolvimento de agentes antioxidantes naturais, com potencial aplicação farmacêutica, nutracêutica e biotecnológica. Considerando a relação direta entre estresse oxidativo, neuroinflamação e doenças neurodegenerativas, a atividade antioxidante robusta observada neste estudo sustenta futuras investigações voltadas à compreensão dos mecanismos envolvidos em modelos *in vivo*.

REFERÊNCIAS

Brandt AP, et al. Avaliação *in vivo* do efeito hipocolesterolêmico e toxicológico preliminar do extrato bruto hidroalcoólico e decocção de *Vitex megapotamica* (Spreng) Moldenke (V. montevidensis Cham.). *Rev Bras Farmacogn*. 19:388–93, 2009. Doi: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2009000300009>

Brum, Thiele Faccim de. Metabólitos secundários, composição química e atividade antioxidante do óleo essencial e das folhas de *Vitex megapotamica* (Sprengel) Moldenke. (Dissertação de Mestrado), Universidade Federal de Santa Maria UFSM, 2012. <http://repositorio.ufsm.br/handle/1/6006>

De Brum, T.F.; Zadra, M.; Piana, M.; Boligon, A.A.; Fröhlich, J.K. et al. HPLC Analysis of Phenolics Compounds and Antioxidant Capacity of Leaves of *Vitex megapotamica* (Sprengel) Moldenke. *Molecules*. 18, 8342–8357, 2013. Doi: <https://doi.org/10.3390/molecules18078342>

De Brum, T. F. et al. Composition and antioxidant capacity of the essential oil of leaves of *Vitex megapotamica* (Sprengel) Moldenke', *Natural Product Research*, 27(8), pp. 767–770, 2013. Doi: <https://doi.org/10.1080/14786419.2012.696258>

Dewick PM. *Medicinal Natural Products*. 3rd ed. Chichester: Wiley; 2009. Doi: <http://dx.doi.org/10.1002/9780470742761>

Dos Santos DS, Farias Rodrigues MM. Atividades farmacológicas dos flavonoides: um estudo de revisão. *Estação Científica*. 7(3):29–35, 2017. Doi: <http://dx.doi.org/10.18468/estcien.2017v7n3.p29-35>

Dutra RL, Crivelli SRM, Fritzen M. *Farmacognosia I*. 1ed. SESES. Rio de Janeiro, 2016.

IPNI - International Plant Names Index. The Royal Botanic Gardens, Kew, Harvard University Herbaria & Libraries and Australian National Botanic Gardens: *Vitex megapotamica* (Spreng.) Moldenke, *Amer. J. Bot.* 38: 327 (1951). Acesso em dezembro de 2025. <https://www.ipni.org/n/265977-2>

Lima FO, Bezerra AS. Flavonoides e radicais livres. *Disciplinarum Scientia*. Ciências Naturais e Tecnológicas, Santa Maria, v. 13, n. 1, p. 111-124, 2012. <https://periodicos.ufn.edu.br/index.php/disciplinarumNT/article/view/1298>

Machado H, et al. Flavonoides e seu potencial terapêutico. *Bol Cent Biol Reprod*. Juiz de Fora, v.27, p.33-39, 2008. <https://periodicos.ufjf.br/index.php/boletimcbr/article/view/17024>

Martelli F, Nunes FMF. Radicais livres: em busca do equilíbrio. *Ciênc Cult*. 66(3):54–7, 2024. Doi: <http://dx.doi.org/10.21800/S0009-67252014000300017>

Moresco, HH, Queiroz, GS, Pizzolatti, MG, & Brighente, I. Chemical constituents and evaluation of the toxic and antioxidant activities of *Averrhoa carambola* leaves. *Rev Bras Farmacog.*, 22:319-324, 2012. Doi: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000217>

Nones J, Nones C. Flavonóides no cérebro: Afinal, o que eles fazem por lá? *Pubvet*. 4(29) 2010. <https://ojs.pubvet.com.br/index.php/revista/article/view/2500>

Rates SMK. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmacognosia. *Rev Bras Farmacogn*. 11:57–69, 2001. Doi: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2001000200001>