

Óleo essencial de *Vitex agnus castus* L (Verbenaceae): composição química, avaliação citotóxica, genotóxica e atividade antibacteriana.

Essential Oil From *Vitex agnus castus* L (Verbenaceae): Chemical Composition, Cytotoxic, Genotoxic And Antibacterial Activity.

Eilika Feitosa Vasconcelos^{1*}, Sean Telles Pereira¹, Maria das Graças Freire de Medeiros¹, Ana Amélia Carvalho Melo Cavalcante¹, Antônia Maria das Graças Lopes Citó¹, Regina Celia Bressan Queiroz Figueiredo¹, José Arimatéia Dantas Lopes¹

¹ Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, Piauí, Brasil

*Autor correspondente

Endereço: Universidade Federal do Piauí, Campus Universitário Petrônio Portella, Bloco do Curso de Farmácia.

CEP: 64049-550 – Teresina, Piauí, Brasil

E-mail: eafvasconcelos@hotmail.com

RESUMO

(a) Objetivos: O objetivo deste estudo foi avaliar a composição química, atividade citotóxica, genotóxica e atividade antibacteriana do óleo essencial da *Vitex agnus castus* L. Cultivada no Piauí. (b) Material e Métodos: As amostras dos óleos essenciais das folhas foram obtidas por hidrodestilação e identificadas por CG-MS. Os estudos de citotoxicidade e genotoxicidade foram avaliados frente ao biomarcador *Allium sepa* e células de macrófagos, a atividade antibacteriana usando o método de difusão em discos. (c) Resultados: Vinte e três componentes foram identificados por GC-MS. O óleo essencial apresentou atividade inibidora moderada contra ambas às bactérias gram-positivas e gram-negativas e mostrou efeitos tóxicos, citotóxicos e genotóxicos, em concentrações de 50 e 25 µg.mL⁻¹, sugerindo que outros estudos dos efeitos genotóxicos devem ser realizados assim como estudos de dose-resposta para a identificação de possíveis doses não genotóxicas. (d) Conclusões: A composição do óleo essencial de *Vitex agnus castus* L cultivada no Nordeste Brasileiro apresenta um quimiotipo diferente da cultivada na Europa.

Palavras-chave: VITEX AGNUS CASTUS L.; ÓLEO ESSENCIAL; CITOTOXICIDADE; GENOTOXICIDADE; ANTIBACTERIANA.

ABSTRACT

(a) Objectives: The aim of this study was to evaluate the chemical composition, cytotoxicity, genotoxicity and antibacterial activity of essential oil of *Vitex agnus castus* L. Cultivated in Piauí. (b) Material and Methods: Samples of essential oils from the leaves was obtained by hydrodistillation and identified by GC-MS. The studies of cytotoxicity and genotoxicity biomarker against *Allium sepa* and macrophage cells, antibacterial activity using the disc diffusion method were evaluated. (c) Results: Twenty-three components were identified by GC-MS. The essential oil showed moderate inhibitory activity against both gram-positive and gram-negative bacteria and showed toxic, cytotoxic and genotoxic effects at concentrations of 50 and 25 µg.mL⁻¹, suggesting that other studies of genotoxic effects should be performed so as dose-response studies to identify potential non-genotoxic doses. (d) Conclusions: The essential oil composition of *Vitex agnus castus* L cultivated in Northeast Brazil presents a different chemotype of cultivated in Europe.

Keywords: VITEX AGNUS CASTUS L.; ESSENTIAL OIL; CYTOTOXICITY; GENOTOXICITY; ANTIBACTERIAL.

INTRODUÇÃO

O *Vitex* gênero (Verbenaceae) compreende cerca de 270 espécies conhecidas, a maioria nativa da região mediterrânea, no entanto essas espécies são bem adaptadas a outras regiões de clima semelhante. No Brasil há registros de ocorrência do gênero *Vitex* do Amazonas ao Rio Grande do Sul, e as espécies *Vitex*, *Vitex trifolia*, *Vitex odorata* Hub e *Vitex agnus castus* L. São mais frequentemente citadas (Hernández et al, 1999.; Hebbalkar et al., 1992). A *Vitex agnus castus* L. (VAC), cresce naturalmente no Oriente Médio e Sul da Europa (Upton, 2001), seus frutos são utilizados na medicina popular para o tratamento de vários distúrbios ginecológicos. Tradicionalmente, o extrato dos frutos VAC tem sido utilizada no tratamento de muitas doenças do sexo feminino, incluindo amenorreia, dismenorreia, distúrbio pré-menstrual, insuficiência do corpo lúteo, hiperprolactinemia, infertilidade, acne, menopausa e lactação interrompida (Prilepskaya et al., 2006; Wuttke et al., 2003; Schellenberg, 2001; Berger et al., 2000; Halaska et al., 1999; Odentha, 1998; Lauritzen et al., 1997; Milewicz et al., 1993). Na Grécia, VAC tem sido utilizada para tratamento de problemas menstruais. Além disso, tem sido utilizada para tratar dor, inchaço, inflamação, dores de cabeça, reumatismo, e disfunção sexual (Upton, 2001).

Os óleos essenciais de espécies da família Verbenaceae produziram excelentes actividades antibacterianas e antifúngicas relacionadas com a presença de alguns componentes químicos, tais como 1,8-cineol, α -terpineol, α -pineno e β -pineno e outros (Salgueiro et al., 2008). Alguns estudos relataram o uso de óleo essencial de VAC em terapias complementares no tratamento dos sintomas da menopausa (Schnaubelt, 2005; Lucks, 2003). Há relatos sobre a composição química do óleo essencial de VAC, mas não há comparação entre dentro da mesma espécie, especialmente com a natural da região do Mediterrâneo e da Ásia Central, de onde se originou, com variedade adaptada à região do Nordeste do Brasil.

Os óleos essenciais são compostos naturais, voláteis e complexos formados a partir do metabolismo secundário de plantas que são amplamente usados na medicina popular, em alimentos, em perfumaria e na obtenção de medicamentos. Eles têm um número de substâncias, em concentrações diferentes, em que existe uma predominância de dois ou três. Em sua maioria, os componentes majoritários determinam

as propriedades biológicas do óleo, e são os compostos activos mais importantes. As propriedades dos óleos têm sido atribuídas à presença de uma mistura de constituintes característicos em que os tipos mais abundantes de compostos químicos são terpenóides especificamente monoterpenos e sesquiterpenos (Bakkali et al, 2008;. Calsamiglia et al, 2007;. Scheelz Z et al, 2001). Como tal, as composições de óleos essenciais destilados a partir de diferentes populações de plantas refletem a resposta do metabolismo secundário para as condições ambientais específicas, tais como solo, clima e altitude, especialmente, com as diferenças resultantes na composição dos produtos de reação e de luz fotossintética (Schnaubelt, 2002).

Em todo o mundo, muitas espécies de plantas medicinais são utilizadas para tratamento de doenças. No entanto, a maior parte deles não foi profundamente estudada, bem como a presença de substâncias citotóxicas ou mutagénica na sua composição ou resultantes do seu metabolismo pode ser prejudicial para os seres humanos (Panigrahi & Rao, 1982). Os efeitos mutagénicos causada por substâncias resultam em alterações cromossômicas que são detectáveis durante o ciclo celular de uma espécie por meio da análise citogenética. O sistema de teste *Allium cepa* é amplamente utilizado para avaliar o potencial genotóxico de infusões (chás) de plantas medicinais, através da análise do ciclo celular. O conhecimento do potencial genotóxico destas espécies através do teste de *Allium cepa* serve como um aviso e bioindicador de segurança para a população que utiliza chás medicinais como única alternativa para o tratamento da doença de seu povo (Fachinetto et al., 2007; Gadano et al., 2002).

O objetivo deste estudo foi caracterizar o óleo essencial produzido a partir de folhas de VAC no Nordeste do Brasil e avaliar a sua genotoxicidade, citotoxicidade e toxicidade aguda e atividade antibacteriana.

MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material Vegetal

As folhas de VAC foram coletadas no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal do Piauí – Teresina-PI. A espécie foi identificada e registrada no Herbário Graziela Barroso da Universidade federal do Piauí sob o número 18885.

2.2. Extração e Análise Química

As folhas da planta fresca foram submetidas ao processo de hidrodestilação na proporção de 1:15 material vegetal:água (m/m), durante 3 horas. O rendimento do óleo essencial foi expresso em percentagem (%) volume/massa, ou seja, volume (mL) de óleo essencial por massa (g) de material vegetal. Foi utilizado um cromatógrafo gasoso marca Shimadzu modelo GC-17A, acoplado a um espectrômetro de massas GCMS QP5050A equipado com coluna capilar de sílica fundida J & W Scientific DB-5 (50 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura do filme). As condições de operação foram às seguintes: injetor a 220 °C, interface a 240 °C e coluna programada para operar a 60 °C, com elevação de temperatura na taxa de 3 °C min⁻¹, até 240 °C. Utilizou-se hélio como gás de arraste, mantido ao fluxo constante de 1,0 mL min⁻¹. A aquisição dos espectros de massas foi feita na faixa de 40 a 350 daltons pelo método de ionização por impacto de elétrons, com energia de ionização de 70 eV e fonte de íons a 200 °C. Os constituintes voláteis foram, na sua maioria, tentativamente identificados por comparação dos espectros de massas obtidos com os registros da biblioteca computacional Wiley229 e pela determinação experimental dos índices de Kováts, aplicando-se uma série homóloga de n-alcanos nas mesmas condições usadas para a injeção dos óleos essenciais. Os valores assim obtidos foram, então, comparados com os índices de Kováts disponíveis na literatura (ADMS, 2007). A identificação definitiva de alguns constituintes voláteis foi realizada pela coinjeção de padrões químicos com os óleos essenciais. Somente as identificações baseadas nos dados de espectrometria de massas associada à coinjeção dos óleos com compostos padrões foram consideradas definitivas.

2.3. Atividade Antibacteriana

A atividade antibacteriana foi demonstrado utilizando uma modificação do método originalmente descrito por Bauer et al, 1966, que é amplamente usado para testes de susceptibilidade antimicrobiana. Como os microrganismos de teste, a bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* bactérias (ATCC 25923) e *S. aureus* (MRSA), e as bactérias gram-negativas de *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27653) foram utilizados. A vancomicina antibiótico padrão (30 µg: disco) foi utilizado como referência ou controle positivo. Todos os testes foram feitos pela colocação de um disco de papel de filtro estéril (6 mm de diâmetro) impregnados com 10

µL de amostras de óleo na superfície de Agar Mueller Hinton, anteriormente inoculada com 250 µL em 20 mL de (MHA) meio líquido em 10 cm em placas de Petri estéreis. As placas foram incubadas a 37 °C durante 24 horas para observar a formação da zona de inibição em torno do disco. Uma zona de inibição com diâmetro inferior a 5 mm corresponde a uma falta de actividade. Padrão de DMSO (dimetilsulfóxido) foi utilizado como um controle negativo.

2.4. Ensaio de Citotoxicidade em Macrófagos

Macrófagos peritoneais de ratos Balb/c foram plaqueadas a 5 x 10⁴ (células/poço) em lamelas na placa de 96 poços com meio RPMI suplementado com 10% de PBS inativado e incubou-se durante 2 horas a 37 °C em CO₂ a 5%. As células não aderentes foram, em seguida, removidas, e os macrófagos aderentes foram lavados duas vezes com PBS e cultivadas durante 48 h em meio RPMI, na ausência ou na presença de diferentes concentrações de óleo essencial da VAC (250 a 15,6 µg.mL⁻¹). As células tratadas e não tratadas foram lavadas e incubadas em meio de cultura fresco contendo 5 mg.mL⁻¹ de 3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazólio (MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), por mais 3 horas a 37 °C, em condições idênticas. Após o tempo de incubação, as células foram solubilizadas em DMSO (100 µL/poço) e os precipitados formados derivados de redução de MTT foi determinada espectrofotometricamente a 540 nm. A concentração citotóxica (CC50) foi determinada por análise de regressão utilizando o SPSS 8.0 for Windows.

2.5. Ensaio *Allium cepa*

Para a análise dos efeitos tóxicos, citotóxicos e genotóxicos do óleo essencial no sistema *Allium cepa*, foi utilizado o protocolo Adams (1995) modificado por Bacich e Segall (1997). Foram preparados os grupos de teste de óleo essencial nas concentrações: 6,25; 12,5; 25 e 50 µg.mL⁻¹, utilizou-se a água potável como um controle negativo (CN) e a solução de sulfato de cobre como um controle para 0,0006 mg.mL⁻¹ positivo (CP). Pequenos bulbos de cebola comum (*A. cepa* L.), da mesma variedade e de tamanho uniforme foram escolhidos para as experiências. Os bulbos foram obtidos de um mesmo agricultor, que não utiliza pesticida. Para cada amostra (concentração) utilizou-se três tubos. Depois de 72 h de exposição, os ápices das raízes foram medidos e cortados e em seguida colocados em solução Carnoy 3:1 (3 partes de etanol para 1

ácido acético) por 24 horas, em seguida, as raízes foram acondicionadas em frasco com etanol 70%. Para preparação da lâmina, as raízes foram lavadas três vezes em água destilada durante cinco minutos cada lavagem, em seguida, colocadas em uma solução de ácido clorídrico a 1 mol.L⁻¹ durante 11 minutos e, em seguida, passou por mais de uma lavagem com água destilada, antes de serem colocadas no reativo de Schiff por mais duas horas. Após este tempo, as raízes foram lavadas com água e, em seguida, cortado para o vértice da raiz e adicionou carmim acético a 2%, e, em seguida, as células foram observadas com um microscópio de luz (100X).

2.6. Análise Estatística

O programa Prisma versão Graphpad 5.0.nonparametric ANOVA (Dunnett e Tukey) foi utilizado para a comparação de médias de diferentes parâmetros, com níveis de significância, *P <0,05 e ***P <0,001, para a análise dos dados do comprimento raiz, são dados como a média ± SD. O índice mitótico e da frequência de células aberrantes (%) foi calculada como o número de células em divisão por 5000 observadas e com base na proporção de células aberrantes marcada em cada uma das concentrações, respectivamente. O programa SPSS 8.0 para Windows software foi usado para determinada pela análise de regressão do CC50.

2.7. Padrões Éticos

Todos os experimentos que envolvem o uso de animais experimentais foram realizados de acordo com os padrões éticos da Fundação Oswaldo Cruz e foram aprovados pelo comitê de ética (CEUA – FIOCRUZ L-0001/08).

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

A extração do material vegetal (folhas) por hidrodestilação resultou em um óleo essencial amarelo, com um rendimento de 0,7 % (m/v). Vinte e três componentes foram identificados a partir deste óleo (Tabela 1: Composição química (%) dos constituintes voláteis do óleo a partir de folhas de *Vitex agnus castus* L. (Verbenaceae)), que corresponde a 94,64 % do óleo, constituído de uma mistura complexa de sesquiterpenos e monoterpénóides, sendo os monoterpénóides 1,8-cineol constituinte majoritário, seguido pelo β-felandreno e cis-ocimeno e o sesquiterpeno β-farnesene. A composição do óleo essencial cultivado no Nordeste Brasileiro da VAC é de um quimiotipo diferente do cultivado na Europa, esta

diferença, provavelmente, pode estar associada a fatores edfoclimático que influencia a composição do óleo essencial da planta (Galletti et al., 1996; Senatore et al., 1996). Estudos anteriores demonstraram que a atividade antimicrobiana de óleos essenciais varia muito entre as diferentes espécies de plantas, (Santos et al., 2004; Burt, 2004), mas geralmente óleos essenciais têm sido ativos, principalmente contra bactérias gram-positivas, estes resultados podem estar diretamente relacionado a estrutura da parede celular, em que a presença da membrana externa de bactérias gram-negativas funciona como barreira a certos tipos de antibióticos, (Tortora, 2003). A Tabela 2: Avaliação microbiológica das folhas de *Vitex agnus castus* L. mostra que nos resultados iniciais, o óleo essencial de VAC foi ativo frente as bactérias gram-positivas e gram-negativas. Alguns autores sugerem que os componentes de óleos essenciais também podem agir sobre as proteínas celulares nas membranas citoplasmáticas, incluindo a ATPase, através da sua acumulação na bicamada lipídica e a destruição da interação lipídeoproteína. Possivelmente também pode ocorrer uma interação direta de compostos lipofílicos com porções hidrofóbicas de proteínas (Sikkema et al., 1995). Dada a grande variedade de composições químicas dos óleos essenciais seu mecanismo de acção pode envolver vários alvos na célula bacteriana (Burt, 2004). A actividade antimicrobiana dos óleos essenciais de VAC foi atribuído à capacidade do seu constituinte (em particular os monoterpenos) para incorporar preferencialmente dentro da estrutura da membrana, que perde então a sua elevada impermeabilidade para protóns e ions maiores, bem como outras funções enzimáticas vitais (Bakkali et al, 2008;. Franco et al, 2005).

A concentração citotóxica 50% (CC50), após 48 horas de incubação de o óleo essencial de VAC em células de mamíferos (macrófagos) foi de 617,9 mg.mL⁻¹. Os óleos essenciais de diferentes espécies têm mostrado actividade citotóxica para uma grande variedade de organismos, incluindo bactérias, fungos e parasitas. Apesar de o óleo essencial de VAC demonstrou ser activo contra algumas bactérias, que apresentou menor toxicidade em mamíferos macrófagos quando comparado com outros óleos essenciais das espécies da mesma família (Bakkali, et al., 2008, Medeiros et al., 2011).

É de grande importância à realização de estudos de toxicidade antes de disseminar o uso de ervas com efeitos medicinais, incluindo a

avaliação de genotoxicidade deve ser feito para evitar riscos adicionais à saúde humana. E para avaliar o risco para a saúde de vida causada por estes compostos são analisados biomarcadores - qualquer resposta biológica correspondente a uma exposição, efeito ou susceptibilidade dos indivíduos para produtos químicos e / ou estressores ambientais (VAN DER OOST et al, 2003.). No caso deste estudo, foi utilizado o sistema de teste de *Allium cepa* para a avaliação de biomarcadores: frequência de micronúcleos (MN) e aberrações cromossômicas (CA), além disso, avaliaram-se também como parâmetros a análise do crescimento das raízes (CR) e o índice mitótico (MI). Foi então possível identificar os efeitos tóxicos, citotóxicos e genotóxicos de óleo essencial de VAC. Com o teste A. *Cepa* vários parâmetros são avaliados, como o CR, MI, MN e CA. Este sistema de teste é adequado para estudar os efeitos de toxicidade e citotoxicidade, porque as suas raízes estão em contato direto com a substância de teste, permitindo que a avaliação de diferentes concentrações (Vitentini et al. De 2001, Bagatini et al., 2007). Para analisar a toxicidade, foi avaliada a influência do óleo essencial de VAC no crescimento da raiz, o parâmetro sugere que as doses tóxicas no caso estavam em concentrações mais elevadas, como mostrado na Figura 1: Efeito do óleo essencial de VAC no crescimento de meristemas radiculares de *Allium cepa*. A média e o desvio padrão de 5.000 células por tratamento. ANOVA - significativo "teste de comparações múltiplas de Tukey" em relação ao CN em *** $p < 0,05$. CN = controle negativo; CP = controle positivo.

A redução do índice mitótico para menos de 50% do controle negativo causou efeitos letais em organismos de teste, enquanto que um decréscimo inferior a 22%, normalmente têm efeitos subletais, e quando o índice mitótico apresentou valores mais elevados do que os encontrados em controles negativos, significa que houve indução no processo de divisão celular, esta indução pode causar a proliferação descontrolada de células e resultam na formação de neoplasia (Smak-Kincl, 1996). Através destes parâmetros, as concentrações de 12,5; 25 e 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de óleo essencial VCA provou ser citotóxico (Figura 2: Efeito do óleo essencial VAC no índice mitótico em meristemas radiculares de *Allium cepa*. A média e o desvio padrão de 5.000 células por tratamento. ANOVA - significativo "teste de comparações múltiplas de Tukey" em relação ao CN em *** $p < 0,05$. CN = controle negativo; CP = controle positivo.), a inibição do índice mitótico, mas não havia células binucleadas, bem como

não ocorreu diminuição na divisão de células de indução. Relacionando o parâmetro macroscópico na figura 1 (toxicidade) e o parâmetro microscópico figura 2 (citotoxicidade), as três concentrações mais elevadas foram considerados tóxicos e citotóxicos, este resultado pode ser explicado pelo fato de que a primeira é a inibição da divisão celular expresso pela inibição do crescimento radicular (BARBERIO et al., 2009). As concentrações mais elevadas de óleo essencial de VAC induziram aberrações cromossômicas nas células do meristema de *Allium cepa* como observado nas figuras 3 e 4 (Figura 3: Efeito do óleo essencial de VAC no índice aberrações cromossômicas em meristemas radiculares de *Allium cepa*. A média e o desvio padrão de 5.000 células por tratamento. ANOVA - significativo "teste de comparações múltiplas de Tukey" em relação ao CN em *** $p < 0,05$. CN = controle negativo; CP = controle positivo e Figura 4: Fotomicrografias (100X) de aberrações cromossômicas observadas em células meristemáticas expostas ao óleo essencial VCA. a) Telófase com pontes b) Anáfase com pontes e perda de cromossomos c) Fragmentos).

O óleo essencial de VAC obtido no Nordeste Brasileiro é quimiotipicamente diferente do óleo obtido na Europa. O óleo obtido das folhas de VAC apresentou efeitos tóxicos, citotóxica e genotóxica nas concentrações de 50 e 25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, usando como biomarcador o sistema *Allium cepa* por conseguinte, foi menos tóxicos frente a células de mamíferos, indicando que deve reforçar o estudo dos efeitos citotóxicos e genotóxicos em diferentes concentrações em organismos superiores e devem ser realizados estudos de dose-resposta para a identificação de possíveis doses não genotóxicas.

CONCLUSÕES:

O óleo essencial de VAC obtido no Nordeste Brasileiro é quimiotipicamente diferente do óleo obtido na Europa. O óleo obtido das folhas de VAC apresentou efeitos tóxicos, citotóxica e genotóxica nas concentrações de 50 e 25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, usando como biomarcador o sistema *Allium cepa* por conseguinte, foi menos tóxicos frente a células de mamíferos, indicando que deve reforçar o estudo dos efeitos citotóxicos e genotóxicos em diferentes concentrações em organismos superiores e devem ser realizados estudos de dose-resposta para a identificação de possíveis doses não genotóxicas.

Tabela 1: Composição química (%) dos constituintes voláteis do óleo a partir de folhas de *Vitex agnus castus* L. (Verbenaceae).

Constituintes	Ri* (exp)	Quantidade relativa (%)
β-Pinene	974	1.28
Myrcene	988	1.62
α-Terpinene	1014	0.28
p-Cymene	1020	0.58
β-Phellandrene	1025	20.57
1,8-Cineole	1026	22.29
cis-Ocimene	1032	10.15
trans-Ocimene	1044	0.24
γ-Terpinene	1059	0.67
linalol	1097	1.26
trans-Sabinene hydrate	1098	0.51
α-Terpineol	1186	0.49
Thymol	1289	0.37
α-Terpinyl acetate	1346	8.26
trans-Caryophyllene	1375	4.10
β - Caryophyllene	1417	0.31
β-Farnesene	1440	10.2
α-Humulene	1452	2.58
Bicyclogermacrene	1500	3.86
Caryophyllene oxide	1582	0.39
δ-Cadinol	1652	1.01
Iso methy β-ionone	1724	3.20
Undetermined		5.43

*Ri_{exp}= Índice de retenção experimental.

Tabela 2: Avaliação Microbiológica do óleo essencial das folhas de *Vitex agnus castus* L.

Espécies de Bactérias	Diâmetro da zona de inibição (mm ± SD)	
	Óleo da VAC	Vancomicina
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	9.0 ± 0,5**	12.0 ± 1.0
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	(-)	12.0 ± 0.09
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	12.0 ± 1.0**	14.0 ± 0.07
<i>Pseudomonas</i>	14.0 ±	12.0 ± 1.0

aeruginosa (ATCC 27653) 1.0**

** Significativamente diferente do controle ($p < 0,05$). (-): Nenhuma zona de inibição.

Figura 1: Efeito do óleo essencial de VAC no crescimento de meristemas radiculares de *Allium cepa*. A média e o desvio padrão de 5.000 células por tratamento. ANOVA - significativo "teste de comparações múltiplas de Tukey" em relação ao CN em *** $p < 0,05$. CN = controle negativo; CP = controle positivo.

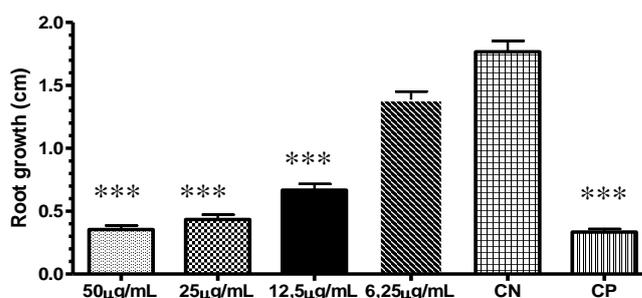


Figura 2: Efeito do óleo essencial VAC no índice mitótico em meristemas radiculares de *Allium cepa*. A média e o desvio padrão de 5.000 células por tratamento. ANOVA - significativo "teste de comparações múltiplas de Tukey" em relação ao CN em *** $p < 0,05$. CN = controle negativo; CP = controle positivo.

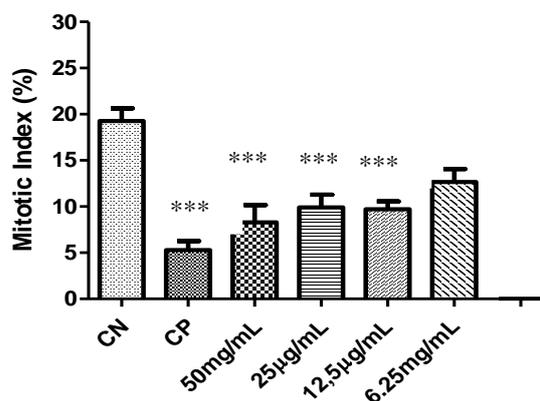


Figura 3: Efeito do óleo essencial de VAC no índice aberrações cromossômicas em meristemas radiculares de *Allium cepa*. A média eo desvio padrão de 5.000 células por tratamento. ANOVA - significativo "teste de comparações múltiplas de Tukey" em relação ao CN em *** $p < 0,05$. CN = controle negativo; CP = controle positivo.

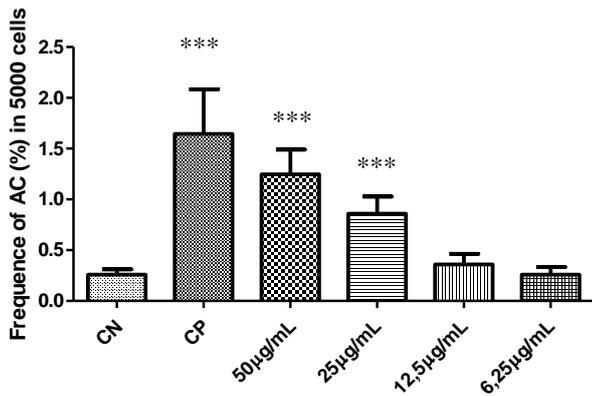


Figura 4: Fotomicrografias (100X) de aberrações cromossômicas observadas em células meristemáticas expostas ao óleo essencial VCA. a) Telófase com pontes b) Anáfase com pontes e perda de cromossomos c) Fragmentos.



AGRADECIMENTOS:

CNPq, UFPI, RENORBIO e FIOCRUZ.

REFERÊNCIAS:

Adams, R.P. 2007. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**. 14th ed. Illinois: Allured Publishing corporation: Carol Stream.

Adams, W.J. 1995. Aquatic toxicology testing methods. In: Hoffman DJ, Rather BA, Burton GAJ. **Handbook of ecotoxicology**. Flórida: Lewis.

Babich, H., Segall, M.A., Fox, K.D. 1997. The allium test – a simple, eukaryote genotoxicity assay. **The amer Biol Teacher**, v.59, p. 580-583.

Bagatini, M.D., Silva, A.C.F., Tedesco, S.B., 2007. Uso do sistema de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, p. 444-447.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Waomar, M. 2008. Biological effects of essential oils – A

review. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p.446-475.

Barbério, A., Barros, L., Voltolini, J.C., Mello, M.L.S. 2009. Evaluation of the cytotoxic and genotoxic potential of water from River Paraíba do Sul, in Brazil, with the *Allium cepa* L. test. **Brazilian journal of biology and technology**. v. 69, p. 837-842.

Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C., Turk, M, 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standard single disc method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 36, p. 493-496.

Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223-253.

Fachinetto, J.M., Bagatini, M.D., Durigon, J., Silva, A.C.F., Tedesco, S.B. 2007. Efeito anti-proliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 49-54.

Gadano, A., Gurni, A., López, P., Ferraro, G., Carballo, M. 2002. In vitro genotoxic evaluation of the medicinal plant *Chenopodium ambrosioides* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, p. 11-16.

Galletti, G.C. and Russo, M.T. 1996. Essential oil composition of leaves and berries of *Vitex agnus-castus* L. from Calabria, Southern Italy. **Mass Spectrometry**. v. 10, p. 1345-1350.

Halaska, M., Beles, P., Gorkow, C., Sieder, C. 1999. Treatment of cyclical mastalgia with a solution containing a *Vitex agnus-castus* extract: results of a placebo-controlled double-blind study. **The Breast**. v. 8, p. 175-181.

Hebbalkar, D.S., Hebbalka, G.D., Sharma, R.N., Joshi, V.S., Bhat, V.S. Mosquito repellent activity of oils from *Vitex negundo* Linn. Leaves. **Indian Journal of Medical Research**, v. 95, p. 37-44.

Hernández, M.M., Heraso, C., Villarreal, M.L., Arispuro, I.V., Aranda, E. 1999. Biological activities of crude plant extracts from *Vitex trifolia* L. (Verbenaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 67, p. 37-44.

Jary, H., Spengler, B., Wuttke, W., Chritoffel, V. 2006. In vitro assays for bioactivity-guided isolation of endocrine active compounds in *Vitex agnus-*

castus. **Maturitas** v. 55, p. 26-36.

Lauritzen, C., Reuter, H.D., Repges, R., Bohnert, K.J., Schmidt, U. 2004. Treatment of premenstrual tension syndrome with *Vitex agnus-castus* - controlled for treatment of hyperprolactinemia and mastalgia. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 85, p. 292-293.

Lucks, B.C. 2003a. *Vitex agnus castus* essential oil and menopausal balance: a research update. **International Journal Aromat.** v. 13, p.169-172.

Manteiga, R., Park, D.L., Ali, S.S. 1997. Risks associated with consumption of herbal teas. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 150, p. 1-30.

Medeiros, M.D., Silva, A.C., Citó, A.M., Borges, A.R., Lima, S.G., Lopes, J.A., Figueiredo, R.C. 2011. In vitro antileishmanial activity and cytotoxicity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. *Parasitol Int. Article in Press*.

Milewicz, A., Gejdel, E., Sworen, H., Sienkiewicz, K., Jedrzejak, J. 1993. *Vitex agnus castus* extract in the treatment of luteal phase defects due to latent hyperprolactinemia. Results of a randomized placebo-controlled double-blind study. **Drug Research**. v. 43, p.752-756.

Odentha, K.P. 1998. *Vitex agnus castus* L., - Traditional Drug and Actual Indications. **Phytotherapy Research**, v. 12, p. 160-161.

Prilepskaya, V.N., Ledina, A.V., Tagiyeva, A.V., Revazona, F.S. 2006. *Vitex agnus castus*: Successful treatment of moderate to severe premenstrual syndrome. **Maturitas**, v. 55, p. 55-63.

Santos, F.J.B., Lopes, J.A.D., Citó, A.M.G.L. 2004. Composition and biological activity of essential oils from *Lippia organoides* H.B.K. **J Journal of Essential Oil Research**, v. 16, p. 504-506.

Schellenberg, R. 2001. Treatment for the premenstrual syndrome with *agnus castus* fruit extract: prospective, randomized, placebo controlled study. **British Medical Journal**, v. 322, p. 134-137.

Schelz, Z., Hohmann, J., Molnar, J. 2010. Recent advances in research of antimicrobial effects of essential oils plant derived compounds on bacteria. In: Chattopadhyay D, editor. **Ethnomedicine: A Source of Complementary Therapeutics**: Kerala, India: Research Signpost,

v. 1, p. 281-304.

Schnaubelt, K. 2005. Essential oil therapy according to traditional Chinese medical concepts. **International journal of artificial organs**. v. 15, p. 98-105.

Senatore, F., Porta, G.D., Reverchon, E. 1996. Constituents o *Vitex agnus-castus* L essential oil. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 11, p. 179-182.

Sikkema, J., De Bont, J.A.M., Poolman, B. 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiology Review**, v. 59, p. 201-222

Smaka-Kincl, V. 1996. The evaluation of waste and ground water quality using the *Allium* test procedure. **Mutation Research**, v. 368, p. 171-179.

Upton, R. 2001. Chaste Tree Fruit, *Vitex agnus-castus*: Standards of Analysis, Quality Control, and Therapeutics. **American Herbal Pharmacopoeia**, Santa Cruz, CA.

Van Der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, p. 57-149.

Vicentini, V.E.P., Camparoto, M.L., Teixeira, R.O., Mantova, M.S.M. 2001. *Averrhoa carambola* L., *Syzygiumcumini* (L.) Skeels and *Cissussicyoides* L.: medicinal herbal tea effects on vegetal and test systems. **Acta Scientiarum**, v. 23, p. 593-598.

Wuttke, W., Jarry, H., Christoffel, V., Spengler, B., Wuttke, D.S. 2003. Chaste tree (*Vitex agnus castus*) - pharmacology and clinical indications. **Phytomedicine**, v. 10, p. 348-357.