

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Filipe de Castro Faria

ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DE POTENCIAL TÓXICO DA ESPÉCIE
Ageratum fastigiatum (Gardner) RM King & H. Rob (ASTERACEAE)

Diamantina-MG

2019

Filipe de Castro Faria

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DE POTENCIAL TÓXICO DA ESPÉCIE
Ageratum Fastigiatum (GARDNER) RM KING & H. ROB (ASTERACEAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração em Ciências Farmacêuticas para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Cristiane Fernanda Fuzer Graef

Diamantina-MG

2019

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

F224e

Faria, Filipe de Castro

Estudo fitoquímico e avaliação de potencial tóxico da espécie
Ageratum fastigiatum (Gardner) RM King & H. Rob (Asteraceae) /
Filipe de Castro Faria, 2019.
95 p. :il.

Orientadora: Cristiane Fernanda Fuzer Graef

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e
Mucuri, Dimantina, 2019.

1. Plantas medicinais. 2. Artemia salina. 3. Citotoxicidade.
4. Química de produto natural. I. Graef, Cristiane Fernanda Fuzer. II.
Título. III. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

CDD 615.321

Ficha Catalográfica – Serviço de Bibliotecas/UFVJM
Bibliotecária Nádia Santos Barbosa – CRB6/3468.


FILIPPE DE CASTRO FARIA

**Estudo fitoquímico e avaliação de potencial tóxico da espécie
Ageratum fastigiatum (Gardner) RM King & H. Rob (Asteraceae)**

Dissertação apresentada ao
MESTRADO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS, nível de
MESTRADO como parte dos requisitos
para obtenção do título de MESTRE
EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Orientador (a): Prof.^a Dr.^a Cristiane
Fernanda Fuzer Graef

Data da aprovação : 20/03/2019



Prof.Dr.^a CRISTIANE FERNANDA FUZER GRAEL - UFVJM



Prof.Dr. ANTONIO SOUSA SANTOS - UFVJM



Prof.Dr. FERNANDO ARMINI RUELA - UFVJM

DIAMANTINA

Dedico esse trabalho aos meus pais Luciléia e Carlos Elói, meus irmãos, meus avós, avôs, tios, tias, primos, primas e a Lívia vocês sempre serão minha fonte de inspiração.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e por ser o alicerce da minha vida. Aos meus pais Luciléia e Carlos Elói pelo carinho e confiança que depositaram em mim. Ao Tatá pela irmandade e companheirismo de sempre. A minha namorada Lívia pelo amor, paciência e por me fazer apaixonar por ela todos os dias quando estou com ela.

À minha orientadora Cris, que sempre esteve ao meu lado me apoiando, me orientando e me tornando uma pessoa melhor tanto na vida profissional como na vida pessoal.

Agradeço aos meus amigos de laboratório Carina, Flavinha, Osmar e Vinícius pela luta árdua cotidiana e aos meus amigos da melhor e mais bela cidade do mundo, DIAMANTINA.

Aos mestres e técnicos da UFVJM pelo incentivo e ajuda no dia a dia na pesquisa e no laboratório.

Agradeço também à CAPES pela bolsa de estudos e à FAPEMIG pelo financiamento do estudo fitoquímico (CDS-APQ-02459-15).

E por fim agradeço a todos que torceram e me apoiaram nessa etapa importante da minha vida.

*Insanidade é fazer sempre a mesma coisa e
esperar resultados diferentes (Rita Mae Brown)*

RESUMO

A utilização de plantas medicinais regionais pela população tem levado a um aumento dos estudos para analisar o potencial tóxico das plantas. Além disso, o interesse das indústrias e institutos de pesquisa por plantas medicinais também aumentou. A espécie *Ageratum fastigiatum* (Gardner) RM King & H. Rob (Asteraceae) é conhecida popularmente como Matapasto ou Enxota e, ocorre naturalmente na região de Cerrado, inclusive no município de Diamantina (MG), região do Vale do Jequitinhonha e Mucuri. Essa planta é utilizada com anti-inflamatório, analgésico e cicatrizante usado topicamente em preparações alcoólicas ou hidroalcoólicas. Assim se faz necessário a triagem toxicológica da espécie botânica. A planta foi colhida no Campus JK da UFVJM e foram preparados o extrato etanólico bruto das partes aéreas e suas fases hexânica, diclorometânica e hidroalcoólica através de partição líquido-líquido. Foi realizado um *screening* fitoquímico para a identificação das principais classes de metabólitos especiais nas fases. Na fase hexânica foram detectados cumarinas e triterpenos/esteroides; na fase diclorometânica foram detectados cumarinas, triterpenos/esteroides e taninos hidrolisáveis, na fase hidroalcoólica foram detectados alcaloides, cumarinas, saponinas, triterpenos/esteroides e taninos hidrolisáveis. Foi feita a análise das fases hexânica e diclorometânica em CG/EM e foram identificados sesquiterpenos, constituintes graxos, triterpenos, base nitrogenada, monossacarídeo, alcaloide pirrolizidínico (licopsamina), aldeído, cetona, compostos fenólicos. Foi utilizada CLAE/DAD para análise do perfil fitoquímico da fase hidroalcoólica, observando-se a presença de provável de constituintes poliinsaturados. Para a triagem toxicológica do extrato bruto e de suas fases foram empregadas duas metodologias: ensaio de letalidade com o microcrustáceo *Artemia salina* Leach, e o ensaio de viabilidade de células da linhagem L929, proveniente de tecido conjuntivo de camundongo. Os resultados demonstraram certa toxicidade do extrato e das fases, utilizando a artemia a fase hidroalcoólica apresentou maior toxicidade apresentando CL_{50} de 1,333mg/mL e o extrato etanólico bruto obteve CL_{50} de 4,814mg/mL, sendo o menos tóxico. No ensaio com as células L929 a fase diclorometânica foi a mais tóxica, chegando a reduzir 95,48% da viabilidade das células e apresentando CC_{50} de 11,39 μ g/mL e a fase hidroalcoólica foi considerada a menos tóxica apresentando porcentagem de morte celular variando de 55,67 a 19,38, com CC_{50} de 174,2 μ g/mL. O estudo sugere que o extrato etanólico de *A. fastigiatum* possui constituintes que corroboram seu uso na medicina popular como anti-inflamatório e a detecção de toxicidade

pode ser um indicativo para avaliar ação antitumoral do extrato e de substâncias isoladas da planta e para utilizar a planta na medicina popular de forma racional.

Palavras-chave: Plantas medicinais, *Artemia salina*, Citotoxicidade, Química de produto natural

ABSTRACT

The use of regional medicinal plants by the population has led to an increase in studies to analyze the toxic potential of plants. In addition, the interest of industries and research institutes for medicinal plants has also increased. The species *Ageratum fastigiatum* (Gardner) RM King & H. Rob (Asteraceae) is popularly known as Matapasto or Enxota and occurs naturally in the Cerrado region, including in the municipality of Diamantina (MG), Jequitinhonha Valley and Mucuri region. This plant is used with anti-inflammatory, analgesic and healing used topically in alcoholic or hydroalcoholic preparations. Thus, it is necessary the toxicological screening of the botanical species. The plant was harvested at Campus JK of the UFVJM and the crude ethanolic extract of the aerial parts and their hexane, dichloromethane and hydroalcoholic phases were prepared through a liquid-liquid partition. A phytochemical screening was carried out to identify the main classes of special metabolites in the phases. In the hexane phase coumarins and triterpenes / steroids were detected; in the dichloromethane phase, coumarins, triterpenes / steroids and hydrolysable tannins were detected. In the hydroalcoholic phase, alkaloids, coumarins, saponins, triterpenes / steroids and hydrolysable tannins were detected. The hexane and dichloromethane phases were analyzed in GC / MS and sesquiterpenes, fatty constituents, triterpenes, nitrogenous base, monosaccharide, pyrrolizidine alkaloid (licopsamine), aldehyde, ketone and phenolic compounds were identified. It was used CLAE / DAD to analyze the phytochemical profile of the hydroalcoholic phase, observing the presence of probable polyunsaturated constituents. For the toxicological screening of the crude extract and its phases two methodologies were used: lethality test with the microcrack *Artemia salina* Leach, and the viability assay of L929 lineage cells from mouse connective tissue. The results showed a certain toxicity of the extract and the phases, using the artemia the hydroalcoholic phase presented higher toxicity presenting LC50 of 1,333mg / mL and the raw ethanolic extract obtained LC50 of 4.814mg / mL, being the least toxic. In the L929 cell assay the dichloromethane phase was the most toxic, reducing 95.48% of cell viability and presenting CC50 of 11.39 $\mu\text{g} / \text{mL}$ and the hydroalcoholic phase was considered to be less toxic, with a percentage of cell death varying from 55.67 to 19.38, with CC50 of 174.2 $\mu\text{g} / \text{mL}$. The study suggests that the ethanolic extract of *A. fastigiatum* has constituents that corroborate its use in folk medicine as an anti-inflammatory and the detection of toxicity can be an indicative to evaluate antitumor action of the extract and substances isolated from the plant and to use the plant in rational medicine.

Key words: Medicinal plants, *Artemia salina*, Cytotoxicity, Natural product chemistry

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Artemia Salina</i>	19
Figura 2 - Imagens das partes aéreas (folhas e inflorescências) de <i>Ageratum fastigiatum</i>	28
Figura 3 - Cistos e náuplios de <i>Artemia salina</i>	32
Figura 4 - Mapa UFVJM Diamantina.....	34
Figura 5 – Fluxograma de obtenção de extrato etanólico (das partes aéreas de <i>Ageratum fastigiatum</i>) e seu fracionamento por partição líquido-líquido, com obtenção das fases ou frações hexânica, diclorometânica e hidroalcoólica.	36
Figura 6 - Coluna cromatográfica clássica- cromatografia preparativa por adsorção (fase móvel: gradiente de polaridade; fase estacionária: sílica gel 0,050-0,20mm)	37
Figura 7 – Triagem fitoquímica realizada para detecção de classes dos metabólitos secundários em amostra da fase hidralcoólica do extrato etanólico das partes aéreas de <i>Ageratum fastigiatum</i>	39
Figura 8 - Triagem fitoquímica realizada para detecção de classes dos metabólitos secundários em amostra das fases hexânica e diclorometânica obtidas por partição líquido-líquido do extrato etanólico das partes aéreas de <i>Ageratum fastigiatum</i>	40
Figura 9 – Sistema utilizado no processo de eclosão dos cistos de <i>Artêmia salina</i>	43
Figura 10 – Náuplios de <i>Artemia salina</i> em aumento de vinte vezes na lupa	43
Figura 11 - Esquema dos principais resultados obtidos no estudo fitoquímico de <i>Ageratum fastigiatum</i>	48
Figura 12 –Cromatograma obtido em análise por cromatografia gasosa-espectrometria de massas da fase hexânica resultante da partição do extrato etanólico das partes aéreas de <i>Ageratum fastigiatum</i>	51
Figura 13 - Espectro do ácido hexadecanóico obtido a partir de análise da fase hexânica (resultante da partição do extrato etanólico de <i>Ageratum fastigiatum</i> por Cromatografia Gasosa-Espectrometria de massas	54
Figura 14 - Espectro do linolenato de etila obtido a partir de análise da fase hexânica (resultante da partição do extrato etanólico de <i>Ageratum fastigiatum</i> por Cromatografia Gasosa-Espectrometria de massas	55
Figura 15 - Espectro do neofitadieno obtido a partir de análise da fase hexânica (resultante da partição do extrato etanólico de <i>Ageratum fastigiatum</i> por Cromatografia Gasosa-Espectrometria de massas	56

Figura 16 - Cromatograma obtido em análise por cromatografia gasosa-espectrometria de massas da fase diclorometânica resultante da partição do extrato etanólico das partes aéreas de <i>Ageratum fastigiatum</i>	57
Figura 17 – Espectro da acetil-licpsamina obtido a partir de análise da fase diclorometânica (resultante da partição do extrato etanólico de <i>Ageratum fastigiatum</i> por Cromatografia Gasosa-Espectrometria de massas	59
Figura 18 – Fragmentação proposta da acetil-licpasamina.....	59
Figura 19 – Esquema do mecanismo de formação do pirrol reativo (didehidropirrolizidínico) e posteriores modificações nucleofílicas de alcalóides pirrolizidínicos	60
Figura 20 – Espectro do álcool coniferílico obtido a partir de análise da fase diclorometânica (resultante da partição do extrato etanólico de <i>Ageratum fastigiatum</i> por Cromatografia Gasosa-Espectrometria de massas	61
Figura 21 - Cromatograma obtido pela Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector por arranjo de diodos (CLAE-DAD) para a fração hidroalcoólica do extrato etanólico das partes aéreas de <i>Ageratum fastigiatum</i>	62
Figura 22 - Espectro obtido pela Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector por arranjo de diodos (CLAE-DAD) do componente eluído no tempo 7,67 min, presente na fração hidroalcoólica do extrato etanólico das partes aéreas de <i>Ageratum fastigiatum</i>	62
Figura 23 – Avaliação da toxicidade do extrato etanólico das partes aéreas de <i>Ageratum fastigiatum</i> e de suas frações hexânica, diclorometânica e hidroalcoólica sobre viabilidade de larvas de <i>Artemia salina</i>	65
Figura 24 – Gráfico da CL ₅₀ do extrato etanólico das partes aéreas de <i>Ageratum fastigiatum</i> sobre náuplios de <i>Artemia salina</i>	66
Figura 25 – Gráfico da CL ₅₀ da fase diclorometânica do extrato etanólico das partes aéreas de <i>Ageratum fastigiatum</i> sobre náuplios de <i>Artemia salina</i>	66
Figura 26 – Gráfico da CL ₅₀ da fase hexânica do extrato etanólico das partes aéreas de <i>Ageratum fastigiatum</i> sobre náuplios de <i>Artemia salina</i>	67
Figura 27 – Gráfico da CL ₅₀ da fase hidroalcoólica do extrato etanólico das partes aéreas de <i>Ageratum fastigiatum</i> sobre náuplios de <i>Artemia salina</i>	67
Figura 28 - Avaliação da citotoxicidade do extrato etanólico bruto e frações das partes aéreas de <i>Ageratum fastigiatum</i> sobre a linhagem L929.	70

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Taxonomia de <i>Ageratum fastigiatum</i>	28
Quadro 2 – Atividades biológicas relatadas para diferentes extratos de <i>Ageratum Fastigiatum</i>	29
Quadro 3 - Classe dos metabólitos secundários detectados por screening fitoquímico realizado nas fases hexânica, diclorometânica e hidroalcoólica resultantes da partição líquido-líquido do extrato etanólico das partes aéreas de <i>Ageratum fastigiatum</i>	49
Quadro 4 – Proposta de dados qualitativos e quantitativos dos compostos presentes na fase hexânica obtida por partição do extrato etanólico das partes aéreas da <i>Ageratum fastigiatum</i>	51
Quadro 5 – Proposta de dados qualitativos e quantitativos dos compostos presentes na fase diclorometânica obtida por partição do extrato etanólico das partes aéreas da <i>Ageratum fastigiatum</i>	57
Quadro 6 - Resultados dos testes com variação de temperatura da água, aeração, pH, concentração de sal marinho e luminosidade para padronização do bioensaio com <i>Artemia salina</i>	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fase móvel em polaridade crescente utilizada na Cromatografia em Coluna Clássica para fracionamento do extrato etanólico das partes aéreas de <i>Ageratum fatigiatum</i>	37
Tabela 2 – Gradiente de eluição da fase móvel utilizada na análise em CLAE/DAD da fração hidroalcoólica do extrato etanólico das partes aéreas de <i>Ageratum fastigiatum</i>	42
Tabela 3 - Resultados da avaliação da citotoxicidade do extrato etanólico bruto e frações das partes aéreas da espécie vegetal <i>Ageratum fastigiatum</i> sobre células L929	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µm: micrômetro

ANOVA: Análise de variância

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC: *American Type Culture Collection*

CCC Cromatografia em Coluna Clássica

CCD Cromatografia em Camada Delgada

CG Cromatografia Gasosa

CG/EM: Cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas

CL₅₀: Concentração letal média

CLAE/DAD: Cromatografia líquida de alta eficiência com detector por arranjo de diodos

Cm: centímetro

DMSO: Dimetilsulfóxido

EM: Espectrômetro de Massas

eV: *elétron-volt*

GPS: *Global Positioning System*

IC₅₀: Concentração necessária para promover 50% de inibição da viabilidade

IE: Impacto de elétrons

IQ: Ionização química

IRR: índice de retenção relativo

kPa: kilo-pascal

m/z: massa carga

Mac: massa molecular do ácido

min: minuto

mm: milímetro

NCI: *National Cancer Institute*

NCTC: *National Collection of Type Cultures*

NIST: *National Institute of Standards and Technology*

°C: grau Célsius

PNPMF: Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos

RDC: Resolução da Diretoria Colegiada

RMN: Ressonância magnética nuclear

s: segundo

SUS: Sistema Único de Saúde

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral Alfa

UFVJM: Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

UV: Ultravioleta

UV-Vis: Ultravioleta-Visível

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	18
2.	OBJETIVOS	21
2.1	Objetivos específicos.....	21
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
3.1	Produtos naturais e Plantas medicinais.....	22
3.2	Metabolismo vegetal e pesquisa fitoquímica.....	23
3.3	Alguns métodos de identificação de produtos naturais	25
3.3.1	<i>Cromatografia gasosa associada à espectroscopia de massa (CG/EM)</i>	25
3.3.2	<i>Cromatografia Líquida de alta eficiência (CLAE)</i>	25
3.4	Família Asteraceae	26
3.5	Gênero <i>Ageratum</i>	26
3.6	<i>Ageratum fastigiatum</i> (Gardner) RM King & H. Rob.....	27
3.7	Composição química de <i>Ageratum fastigiatum</i>	29
3.8	Atividades biológicas da <i>Ageratum fatigiatum</i>	29
3.9	Bioensaio de detecção de toxicidade utilizando o microcrustáceo <i>Artemia salina</i>	31
3.10	Bioensaio de citotoxicidade.....	33
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
4.1	Coleta e identificação do material botânico	34
4.2	Preparação do extrato etanólico	35
4.3	Fracionamento do extrato etanólico	35
4.4	Processos Cromatográficos.....	36
4.4.1	<i>Cromatografia em coluna clássica (CCC)</i>	36
4.4.2	<i>Cromatografia em camada delgada (CCD)</i>	38
4.5	Triagem das fases resultantes da partição líquido-líquido do extrato etanólico das partes aéreas de <i>Ageratum fastigiatum</i>	38
4.6	Cromatografia gasosa acoplada com espectrômetro de massas (CG/EM)	40

4.7	Cromatografia Líquida de alta eficiência com detector por arranjo de diodos (CLAE/DAD)	41
4.8	Padronização do bioensaio com <i>Artemia salina</i>	42
4.9	Avaliação da toxicidade do extrato etanólico de <i>Ageratum fatigiatum</i> sobre <i>Artemia salina</i>	43
4.10	Avaliação da toxicidade do extrato etanólico de <i>Ageratum fastigiatum</i> sobre Células L929	44
4.10.1	Ensaio para determinação da citotoxicidade do extrato bruto e suas frações	45
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1	ESTUDO FITOQUÍMICO	47
5.1.2	Rendimento do extrato e das fases hexânica, diclorometânica e hidroalcoólica... ..	49
5.1.3	Cromatografia em Coluna Clássica.....	49
5.1.4	Triagem fitoquímica	49
5.1.5	Cromatografia gasosa da fase hexânica.....	51
5.1.6	Cromatografia gasosa da fase diclorometânica	57
5.1.7	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a Detector por arranjo de diodos (CLAE/DAD) do extrato hidroalcoólico.....	61
5.2	ENSAIOS BIOLÓGICOS	63
5.2.1	Padronização do bioensaio com <i>Artemia salina</i>	63
5.2.2	Avaliação da toxicidade utilizando <i>Artemia salina</i>	64
5.2.3	Avaliação da citotoxicidade do extrato etanólico bruto e de suas fases	68
6.	CONCLUSÕES	73
	REFERÊNCIAS.....	74

1. INTRODUÇÃO

O homem tem usado produtos naturais para curar suas doenças desde o início de sua existência. Ao longo do tempo, indígenas, curandeiros e líderes religiosos mantiveram e transmitiram o conhecimento das plantas medicinais e muitas vezes simbolizam a única opção terapêutica para certas comunidades e grupos étnicos (ELISABETSKY & SOUZA, 2004; LÓPEZ, 2006). O conhecimento sobre o uso popular e a eficácia de plantas medicinais contribuem significativamente para a disseminação de suas propriedades terapêuticas. No entanto, seus constituintes químicos às vezes não são conhecidos (LÓPEZ, 2006). Portanto, estudos fitoquímicos e ensaios biológicos com extratos de plantas medicinais devem ser conduzidos, para se ter maior conhecimento sobre esses vegetais, visando a eficácia de tratamentos, o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos e a segurança da população.

Dentre os biomas brasileiros com rica biodiversidade e a presença de plantas medicinais, pode-se destacar o Cerrado, possuindo uma flora estimada em aproximadamente 11 mil espécies, sendo o segundo bioma brasileiro de maior diversidade vegetal (BRASIL, 2015). No Cerrado ocorrem diferentes formações vegetais, tais como, florestais, savânicas, lenhosas e campestres, com várias fitofisionomias denominadas de cerrado, cerradão, mata de galeria, campo sujo, vereda, campo rupestre. (AGUIAR & CAMARGO, 2004).

Diamantina está localizada na região central do estado de Minas Gerais, incorporada no bioma Cerrado, com diferentes fitofisionomias, sendo o campo rupestre um dos mais destacados (VIANA, 2007). A região apresenta uma importante diversidade biológica e farmacológica ainda inexplorada como uma potencial fonte de agentes terapêuticos, portanto estudos fitoquímicos nas plantas da região são necessários.

A família *Asteracea* é uma das maiores famílias de plantas com mais de 1000 gêneros e mais de 20000 espécies e crescem em diferentes habitats. No Brasil, esta família é representada por cerca de 300 gêneros e 2000 espécies (SOUZA & LORENZI, 2008), sendo que, muitas delas, são usadas popularmente no tratamento de diversas patologias (LORENZI & MATOS, 2002). A família tem características marcantes e é facilmente identificada. A grande maioria das plantas da família são herbáceas enquanto árvores e arbustos são comparativamente raros (OKUNADE, 2002).

Dentre as espécies de *Asteraceae*, a espécie *Ageratum fastigiatum* (Gardner) RM King & H. Rob, conhecida por "matapasto" (DEL-VECHIO-VIEIRA *et al.*, 2008) ou "enxota" (GONÇALVES *et al.*, 2011), é encontrada mais comumente em regiões de áreas abertas naturais, em jardins e em região de planalto no município de Diamantina, no estado de Minas

Gerais (Serra do Espinhaço), caminhos do Triângulo Mineiro, Serra da Mantiqueira, entre outros lugares brasileiros (GUIMARÃES et al., 2002; ALMEIDA et al., 2004).

Diamantina, os raizeiros preparam o extrato com folhas e galhos (com ou sem inflorescências) frescos esmagados ou cortados e submetidos à maceração com água por algumas horas. O extrato aquoso, após filtração, é aplicado topicamente para tratar dor e inflamações (GONÇALVES et al., 2007).

Na literatura atual não foram encontrados estudos de toxicidade desta espécie vegetal. Nesse sentido, o ensaio de letalidade com o microcrustáceo *Artemia salina* Leach (Figura 1), é relativamente simples e barato, muito utilizado para indicar potencial tóxico de diversos produtos naturais, pode ser empregado (RIOS, 1995). A *A. salina* é uma espécie de microcrustáceo filtrador, que se alimenta basicamente de bactérias, algas unicelulares, pequenos protozoários e detritos dissolvidos no meio (SOUTO, 2000). É uma espécie de fácil manipulação em laboratório e o ensaio desenvolvido com esse invertebrado é de baixo custo econômico, é rápido e não necessita de técnicas assépticas, além desses artrópodes permanecerem viáveis durante muito tempo no estado seco. (RIOS, 1995).

Figura 1 - *Artemia Salina*



Adaptado de Rios (1995)

No ensaio de letalidade da *A. Salina* observa-se a porcentagem de artêmias mortas no meio contendo água salinizada artificialmente com a amostra que se pretende avaliar (substância, extrato, etc); avaliam-se diferentes concentrações da amostra. A atividade do teste é manifestada pela toxicidade de componentes ativos, frações ou extrato de produtos naturais frente ao organismo marinho *A. salina*. Esse simples organismo pode ser usado como um monitor conveniente para a toxicidade de produtos. (MEYER, 1982 *et al*). Espera-se que, se a

amostra (planta, extrato, substância pura) apresentar um potencial tóxico, com o aumento da sua concentração ocorrerá uma maior morte das artêmias.

Assim como o teste da *A. salina*, a análise de cultura de células é uma ferramenta fundamental na avaliação do potencial toxicológico das plantas de uso medicinal. Neste estudo para testar o potencial tóxico em células foram utilizadas células derivadas de células normais de mamíferos (fibroblastos de camundongo, linhagem L929).

A pesquisa com *A. fastigiatum* se justifica devido aos fatos de: (a) ser uma espécie medicinal que requer mais estudos; (b) haver a necessidade de estudos toxicológicos da planta com organismos pluricelulares e comparar os resultados com aqueles obtidos em estudos citotóxicos; (c) e serem necessários estudos químicos com extratos polares, cuja composição se assemelha a do preparado pelos raizeiros.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral é realizar o estudo fitoquímico e avaliação de toxicidade do extrato etanólico da planta *Ageratum fastigiatum* (Gardner) R. M. King et H. Rob. (Asteraceae).

2.1 Objetivos específicos

- Coletar partes aéreas dessa espécie vegetal para obter o extrato e suas fases hexânica, diclorometânica e hidroalcoólica;
- Realizar estudos fitoquímicos com o extrato e suas fases, a saber: triagem ou *screening*; fracionamento através de partição líquido-líquido, obtendo fases hexânica, diclorometânica e hidroetanólica; análises das fases através de CG/EM (cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas) e CLAE/DAD (cromatografia líquida de alta eficiência com detector por arranjo de diodos); fracionamento;
- Avaliar o potencial tóxico do extrato etanólico e suas fases através de ensaio de citotoxicidade utilizando células L929;
- Padronizar ensaio toxicológico utilizando o microcrustáceo bioindicador *Artemia Salina*;
- Realizar ensaio com *Artemia salina* para avaliar o potencial tóxico do extrato bruto e suas fases;
- Comparar os resultados de citotoxicidade com os de toxicidade *in vitro* sobre um organismo pluricelular.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Produtos naturais e Plantas medicinais

Segundo Calixto 2003, o Brasil tem uma das maiores biodiversidades do mundo, com estimativas de cerca de 20% do número total de espécies do planeta. Com toda extensão do litoral, com a diversidade da sua flora e detentor da maior floresta equatorial e tropical úmida e de outros biomas únicos no planeta, são importantes a valorização e o estudo de produtos naturais no território brasileiro (PINTO et al., 2002). Essa biodiversidade está distribuída em seis grandes biomas predominantes, sendo o Cerrado, a Caatinga, a Floresta Amazônica, os Campos e Florestas Meridionais, a Floresta Atlântica, e o Pantanal (RIBEIRO & WALTER, 1998).

Ao longo de toda história da humanidade as plantas são usadas para combater enfermidades e doenças; essa prática também é conhecida como fitoterapia. As origens dessas práticas terapêuticas vêm desde os primórdios da espécie humana (ALMASSY JÚNIOR, *et al.* 2005).

A fitoterapia consiste na terapêutica fundamentada na utilização de constituintes ativos derivados de plantas conhecidas pelo uso popular. No Brasil, a fitoterapia é herdada historicamente da cultura ameríndia, africana e europeia. No início da colonização, portugueses diante da carência de produtos medicinais (inclusive plantas) trazido da Europa, se viram na necessidade de buscar as plantas medicinais conhecidas da colônia. Povos indígenas e escravos africanos (que trouxeram plantas de seu local de origem), tradicionalmente, detinham conhecimento acerca da utilização de plantas, uma vez que, em suas culturas era comum seu uso em rituais religiosos e para fins terapêuticos. Houve um enriquecimento da fitoterapia no Brasil durante o início do século XX com a chegada de imigrantes orientais que contribuíram com o costume na utilização de plantas medicinais exóticas na cultura brasileira. A mistura desses costumes associados com o uso popular e transmissão do conhecimento entre sucessivas gerações culminou em uma cultura popular sobre plantas medicinais que se mantém presente em diversas comunidades brasileiras (GURIB-FAKIM, 2006; BRASIL, 2006).

Esse conhecimento vem enriquecendo ao longo dos anos, indícios sobre a atividade farmacológica de muitas espécies vegetais, o que vem estimulando pesquisadores e a indústria farmacêutica a realizarem estudos (MACIEL et al., 2002; BALUNAS et al., 2005). Tem sido feitas pesquisas com vistas à descoberta de novos agentes terapêuticos, e para validar as atividades daquelas plantas usadas como medicinais (MATOS, 1997).

O desenvolvimento de tecnologias e pesquisas para explorar o potencial terapêutico das plantas medicinais brasileiras recebeu incentivos governamentais. Destaca-se a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), mediante o decreto nº 5813 de junho de 2006, que estabeleceu as diretrizes para atuação do governo na área de plantas medicinais e de fitoterápicos, com o objetivo de garantir o acesso seguro e uso racional de plantas medicinais e de fitoterápicos à população brasileira (BRASIL, 2006). Em 2008 o governo federal criou o Grupo Interministerial para elaboração do Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos com o objetivo de fortalecer as diretrizes norteadoras do PNPMF e definir medidas, ministérios e gestores visando a valorização e preservação do conhecimento empírico de comunidades tradicionais acerca das plantas medicinais (BRASIL, 2008). Outra iniciativa do Ministério da Saúde foi a promulgação da Portaria MS nº 886/GM/MS, de 20/04/2010 que instituiu, no âmbito do SUS, a “Farmácia Viva”, tendo como objetivo realizar atividades em todas as fases da cadeia produtiva de fitoterápicos, desde o cultivo de plantas medicinais até a dispensação de fórmulas magistrais e oficinais.

Em 2014 a Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), como forma de promover o acesso da população a medicamentos fitoterápicos, por meio da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) Nº 26, de 13 de maio de 2014 atualizou o registro dos medicamentos fitoterápicos e criou o registro de uma nova classe, os chamados produtos tradicionais fitoterápicos cuja segurança e efetividade são fundamentadas no longo histórico do uso tradicional de plantas para fins terapêuticos.

De acordo com Calixto (2003) 25% a 30% dos medicamentos encontrados em drogarias e farmácias foram derivados de compostos químicos isolados a partir de plantas, podendo chegar a 40% se forem considerados também aqueles medicamentos que têm a sua origem em compostos produzidos por microrganismos.

O uso de plantas na medicina popular brasileira é muito difundido, sendo utilizadas inúmeras espécies com diversos fins terapêuticos (VIEIRA & MARTINS, 2000). Por isso é de grande importância preservar e estudar a biodiversidade, pois assim seu potencial químico e biológico poderá ser empregado no desenvolvimento de novos medicamentos.

3.2 Metabolismo vegetal e pesquisa fitoquímica

Segundo Alves (2001), as reações bioquímicas que ocorrem em um organismo são chamadas em conjunto de metabolismo. Este pode ser didaticamente dividido em: metabolismo primário, responsável pela produção de celulose, lignina, proteínas, lipídios, açúcares, ácidos

nuclêicos e outras substâncias que são responsáveis pelas principais funções vitais das plantas; o metabolismo secundário, também conhecido como metabolismo especial, do qual resultam substâncias de baixo peso molecular, às vezes produzidas em pequenas quantidades responsáveis por funções adaptativas e com distribuição restrita entre os táxons vegetais.

Os metabólitos especiais, em sua maioria, são responsáveis pelos efeitos medicinais, ou tóxicos das plantas, além de apresentarem grande importância ecológica, pois atraem potenciais agentes polinizadores ou dispersores de sementes, e estão relacionados com a defesa química do vegetal contra estresse ambiental, atuando em sua sobrevivência, reprodução, dispersão da espécie e preservação (BALADRIN *et al.*, 1985; DI STASI, 1996; SIMÕES *et al.*, 2001).

A concentração e a composição dos metabólitos secundários em plantas são influenciadas por diversos fatores como sazonalidade, ciclo circadiano, altitude, temperatura, índice pluviométrico, radiação UV, composição atmosférica, água, nutrientes do solo, herbivoria e ataque de patógenos (GOBBO-NETO & LOPES, 2007). A genética e o desenvolvimento individual também influenciam no metabolismo (BÜTER, 1998; SUDATTI, 2004).

A pesquisa fitoquímica é ampla e pode apenas indicar a presença ou não de classes de metabólitos especiais em extratos, até isolar e/ou identificar uma gama de compostos que fazem parte do metabolismo secundário das plantas. O isolamento desses compostos é realizado por diversos métodos, como cromatografias, partição e a identificação pode ser feita por métodos espectroscópicos ou espectrométricos, cromatográficos (confrontando com padrões), além de processos hiefenados, como CG/EM, CLAE/RMN, entre outros.

Um dos objetivos da realização de estudos fitoquímicos de plantas medicinais de uso popular ou tradicional é o de fornecer embasamento para estudos de controle de qualidade de fitoterápicos que venham ser produzidos com essas plantas, além de verificar potenciais substâncias nocivas à saúde humana. No controle de qualidade é essencial a quantificação e identificação de marcadores químicos e de substâncias “indesejáveis” (SIMÕES *et al.* 2001).

Estudos químicos são necessários para a identificação da presença de diferentes classes dos metabólitos secundários. Um exemplo é a triagem ou *screening* fitoquímico que normalmente é realizado através de ensaios qualitativos (reações cromogênicas e de precipitação, e análise por cromatografia de camada delgada que indicam a possível presença ou ausência de grupos de metabólitos secundários (COSTA, 2002; SIMÕES *et al.*, 2007).

Os principais grupos de metabólitos especiais pesquisados nesses ensaios são cumarinas, flavonóides, taninos, antocianinas (uma subclasse de flavonoides), antracenosídeos, alcalóides, saponinas, triterpenos e esteroides.

3.3 Alguns métodos de identificação de produtos naturais

Na identificação dos produtos naturais (classes de metabólitos ou a identidade de substâncias em misturas, em extratos), as técnicas “hifenadas” são empregadas com sucesso, sendo muito utilizadas a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM)e, a cromatografia líquida de alta eficiência com detector por arranjo de diodos (CLAE/DAD) PINTO *et al.* 2002). Esses métodos analíticos podem fornecer informações sobre os perfis químicos dos extratos, sem a necessidade do dispendioso trabalho de isolar, purificar substâncias.

3.3.1 Cromatografia gasosa associada à espectroscopia de massa (CG/EM)

Na utilização do CG/EM, os componentes termo resistentes de uma mistura são separados e, por meio de um detector do tipo espectrômetro de massas, esses componentes podem ser identificados. Nessa análise por espectrometria de massas há a necessidade da ionização do analito. Os métodos de ionização mais comuns em CG/EM são a ionização por impacto de elétrons (*electron ionization*) - IE e a ionização química (*chemical ionization*) - IQ (CHIARADIA *et al.*, 2008; CAMPOS *et al.*, 2005). A CG/EM é aplicável em compostos voláteis e termicamente estáveis em temperaturas elevadas durante o processo de separação cromatográfica (CHIARADIA *et al.*, 2008; CAMPOS *et al.*, 2005). A análise dos espectros de massas de cada componente da amostra, a comparação desses espectros obtidos com aqueles espectros reunidos em espectrotecas e a obtenção e a avaliação do índice de retenção de cada componente do analito são ferramentas importantes, que servem para fazer a identificação ou proposição química.

3.3.2 Cromatografia Líquida de alta eficiência (CLAE)

A cromatografia líquida em coluna clássica é uma das técnicas mais utilizadas para separação e isolamento de compostos presentes em produtos ou extratos vegetais. Permitem utilizar diferentes tamanhos de colunas e combinações de fases móveis e estacionárias. Já a

CLAE é uma técnica mais avançada e dispendiosa, pois utiliza solventes com alto grau de pureza e colunas com a fase estacionária constituída por partículas finas, entre 3 a 10 μm , de diferentes formatos e densidades, que oferecem maior resistência ao fluxo da fase móvel. (SIMÕES et al., 2010).

Segundo VECHIA et al (2016) a CLAE é eficiente no isolamento e validação de moléculas provenientes de extratos vegetais, e por isso amplamente utilizada, tanto pelos dados qualitativos quanto pelos dados quantitativos que são obtidos para amostras de polaridades variadas em uma única eluição. Quando a CLAE é associada ao espectrômetro de massas (EM) pode-se chegar a identificar os componentes de extratos vegetais. A CLAE também pode estar associada a análise na região UV-Vis do espectro de radiação eletromagnética. Nesse caso, fornece pouquíssimas informações estruturais sobre moléculas (a menos que se trabalhe simultaneamente com padrões). No entanto, é uma ferramenta que, quando associada a outras, pode auxiliar na identificação estrutural.

3.4 Família Asteraceae

Asteraceae é uma das maiores famílias dentre as Angiospermas, compreendendo aproximadamente 23 mil espécies, pertencentes a 1.535 gêneros, dispostos em 17 tribos (JUDD et al. 2009). É constituída por plantas com características variadas, incluindo geralmente pequenas ervas ou arbustos e raramente árvores (VERDI et al., 2005). Aproximadamente 98% dos gêneros são compostos por plantas de pequeno porte que são encontradas em todos os tipos de habitats, principalmente nas regiões tropicais montanhosas da América do Sul (JOLY, 1967).

As plantas dessa família tem a característica marcante de biossintetizar uma diversidade de metabólitos secundários estruturais, como alcaloides (destacando os alcaloides pirrolizidínicos como por exemplo a licopsamina [que possui características hepatotóxicas] na tribo Eupatorieae e no gênero *Ageratum*), flavonoides, monoterpenos, diterpenos, triterpenos poliacetilenos, terpenoides, sesquiterpenos, lactonas sesquiterpênicas, além de ácidos fenólicos, benzofuranos e cumarinas. (ZDERO; BOHLMANN, 1990; WIEDENFELD & RÖDER (1991); EMERENCIANO et al., 2001, CALABRIA et al., 2009

Segundo Lorenzi & Matos (2002), diversas plantas da família *Asteraceae* são usadas na medicina popular com ação anti-inflamatória, analgésica e antimicrobiana.

3.5 Gênero *Ageratum*

O gênero *Ageratum*, tem o nome derivado das palavras gregas 'a geras', que significam “não envelhece”, referindo-se à longevidade das plantas (OKUNADE, 2002). É composto por aproximadamente 30 espécies com poucos estudos sobre atividade biológica e testes fitoquímicos. (OKUNADE, 2002). Dentre as plantas do gênero que apresentam estudos disponíveis podemos destacar a *Ageratum conyzoides*, *Ageratum corymbosum*, *Ageratum houstonianum*, *Ageratum mexicanum* e a *Ageratum fastigiatum*, com distribuição variada tropical e subtropical na Ásia, África e da América do Sul (BORTHAKUR *et al.*, 1987).

Em estudos realizados com *A. conyzoides*, por exemplo, foram isoladas estruturas do tipo terpenoides, esteroides, cromenos, cromonas, cumarinas, flavonoides polioxigenados e alcaloides pirrolizidínicos (OKUNADE, 2002; IQBAL *et al.*, 2004; AMAL *et al.*, 2010).

As atividades biológicas estudadas nas plantas do gênero foram analgésicas, antimicrobiana, antiinflamatória, antioxidante e gastroproterora (JAGETIA *et al.*, 2003; SHIRWAIKAR *et al.*, 2003; AKINYEMI *et al.*, 2005; MOURA *et al.*, 2005).

3.6 *Ageratum fastigiatum* (Gardner) RM King & H. Rob

Del-Vechio-Vieira e colaboradores (2008), descreveram as características botânicas da espécie:

Ageratum fastigiatum é um subarbusto vernicoso de até 1,5 m de altura, ereto e ramificado desde a base. Os ramos são acastanhados, hispídeos e glandulosos. As folhas são alternas ou fasciculadas, pecioladas; lâmina com 3-9 cm de comprimento e 0,41,5 cm de largura, membranácea, de linear-lanceolada a lanceolada, ápice agudo, margens serradas, base atenuada, glabra ou pubescente e densamente glanduloso pontoada nas duas faces. A inflorescência é constituída de capítulos subsésseis, congestos, reunidos em cimas corimbiformes. Os capítulos possuem de 3,0-3,5 mm de altura; receptáculo cônico e paleáceo; involúcro campanulado com brácteas involucrais dispostas em duas séries sub iguais em comprimento, pubescentes, glandulosas e lanceoladas de ápices agudos. Flores com 20-22 mm; corola lilás com tricomas glandulares nos lacínios; aquênios 5-costados com grande carpódio assimétrico. Pápus ausente. A raiz, em secções transversais na zona de ramificação, apresenta crescimento secundário com numerosas estruturas secretoras semelhantes a canais, que podem estar ou não associadas à endoderme. O caule, em estrutura secundária, apresenta epiderme uniestratificada com cutícula estriada, presença de estômatos, tricomas tectores simples unisseriados e tricomas glandulares capitados pediculados unisseriados.

O Quadro 1 apresenta a taxonomia da espécie (www.tropicos.org; AVELAR-FREITAS, 2013b). A planta, representada na Figura 2 é utilizada na medicina popular devido a propriedades anti-inflamatória, analgésica e antimicrobiana, sendo conhecida como “enxota” ou “mata-pasto” (LORENZI e MATOS, 2002; CARVALHO, 2004; GONÇALVES *et al.*, 2011).

Quadro 1- Taxonomia de *Ageratum fastigiatum*

Táxons	
Reino	Plantae
Divisão	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Subclasse	Asteridae
Superordem	Asteranae
Ordem	Asterales
Família	Asteraceae
Tribo	Eupatorieae
Gênero	<i>Ageratum</i>
Espécie	<i>Ageratum fastigiatum</i>

Fonte: Autor

Figura 2 - Imagens das partes aéreas (folhas e inflorescências) de *Ageratum fastigiatum*



Fonte: Autor

3.7 Composição química de *Ageratum fastigiatum*

Bohlmann e colaboradores (1981;1983) foram os primeiros a isolar componentes químicos de extrato etéreo das partes aéreas e das raízes de *A. fastigiatum* em plantas coletadas no estado de Goiás; os componentes isolados pertencem as classes de metabólitos secundários: cumarinas, sesquiterpenos (incluindo lactonas sesquiterpênicas), diterpenos do tipo caurano e triterpenos. Em 2009, Del-Vechio-Vieira e colaboradores avaliaram os componentes químicos do óleo essencial das partes aéreas de *A. fastigiatum* encontrando germacreno-D, α -humuleno e β -cedreno, como componentes principais; além de α -pineno, δ -cadineno, α -muurolene e β -gurjuneno; nos extratos de raízes os compostos presentes em maior valor percentual foram o β -cariofileno, α -humuleno e óxido de cariofileno,.

Gonçalves e colaboradores (2011) avaliaram o extrato etanólico das folhas e inflorescências de *A. fastigiatum* coletadas em Diamantina (MG) e encontraram triterpenos e esteroides, além da cumarina ayapina; e, no óleo essencial das folhas e inflorescências foram encontrados monoterpênicos como α -pineno e limoneno, e o sesquiterpeno germacreno-D.

Em estudo mais recente de Avelar-Freitas *et al.*, 2013b foram identificados 11 monoterpênicos e 15 sesquiterpenos em óleo essencial das partes aéreas colhidas em Diamantina, os constituintes em maior concentração encontrados foram α -pineno, limoneno, *trans*-cariofileno, α humuleno, óxido de cariofileno, humuleno 1,2-epóxido, 1,6-humuladien-3-ol e α -cadinol.

3.8 Atividades biológicas da *Ageratum fatigiatum*

Diferentes extratos de *A. fastigiatum* vem sendo pesquisados em relação a algumas atividades biológicas. O Quadro 2 relata os estudos mais recentes.

Quadro 2 – Atividades biológicas relatadas para diferentes extratos de *Ageratum Fastigiatum*

Tipo de extrato	Referência	Atividade Biológica Pesquisada
-----------------	------------	-----------------------------------

Extrato metanólico e suas frações hexânicas e diclorometânica	Del-Vechio-Vieira <i>et al</i> 2007	Atividade antimicrobiana frente aos microrganismos <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Staphylococcus typhosa</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Candida albicans</i> .
Óleo essencial das folhas	Del-Vechio-Vieira <i>et al</i> 2009	Atividade antinociceptiva em modelos animais, ao reduzir contorções abdominais induzidas por ácido acético, reduzir o tempo de lambida em pata induzida por formalina e aumentar o tempo de latência em teste de placa aquecida.
Extrato etanólico e acetato de etila das partes aéreas	Avelar-Freitas <i>et al</i> 2013 ^a	Redução da produção de citocinas inflamatórias in vitro em cultura de leucócitos.
Óleo essencial das partes aéreas	Avelar-Freitas 2015	Efeito anti-inflamatório que inibe o mediador inflamatório TNF- α em leucócitos in vitro.
Extrato etanólico das partes aéreas	Avelar-Freitas 2013c	Atividade inseticida contra o triatomíneo <i>Rhodnius nasutus</i> , vetor da Doença de Chagas no nordeste do Brasil. As cumarinas são as prováveis responsáveis pelo efeito inseticida.
Extrato etanólico das partes aéreas	Costa, Lucas de Abreu 2016	Redução da proliferação de linfócitos aliado a redução da

Extrato etanólico das partes aéreas

Oliveira, 2016

produção das citocinas TNF- α em células CD8+ e IL-2 em linfócitos totais e células CD8+

Atividade antitumoral sobre a linhagem tumoral MDA231.

Fonte: Autor

3.9 Bioensaio de detecção de toxicidade utilizando o microcrustáceo *Artemia salina*

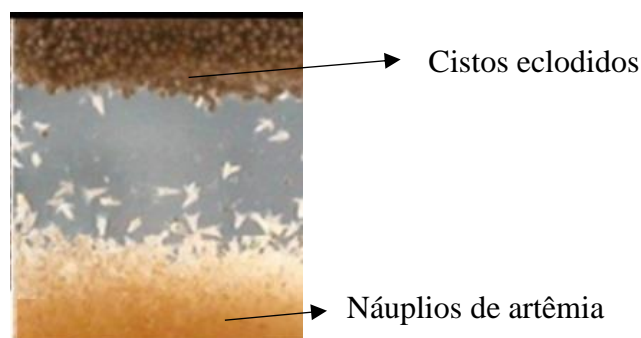
O artrópode de *Artemia salina*, um microcrustáceo de água salgada, é utilizado como organismos-alvo para detectar compostos bioativos (tóxicos) em extratos vegetais e o teste de toxicidade contra esses animais tem mostrado uma boa correlação com a atividade antitumoral (MCLAUGHILIN & ROGERS, 1988). A correlação significativa entre o ensaio da *A. salina* e inibição de crescimento *in vitro* de linhas celulares de tumores sólidos humanos demonstrada pelo *National Cancer Institute* (NCI, EUA) é significativa porque mostra o valor deste bioensaio como uma ferramenta de pré-rastreamento para pesquisa de fármacos antitumorais (ANDERSON *et al.*, 1991).

Desta forma, este bioensaio é uma vantagem na avaliação da bioatividade do produto botânico, conduzindo ao desenvolvimento de novos fármacos com propriedades antitumorais. Por outro lado, a detecção da toxicidade de um extrato de planta medicinal através desse bioensaio pode alertar para que mais estudos sejam realizados com a planta, no intuito de proteger ou orientar a população que faz uso medicinal da planta; por muitas vezes, as pessoas usam plantas para tratar diversas doenças, sem conhecimento do seu potencial tóxico, o que pode ser prejudicial à saúde humana. Da mesma forma, a detecção (ou não) de toxicidade em extratos vegetais poderá orientar pesquisas que tem sido feitas com plantas medicinais no intuito de desenvolver produtos farmacêuticos.

A principal razão pela qual este crustáceo de água salgada é amplamente utilizado para testes de toxicidade de extratos vegetais é devido à disponibilidade comercial de ovos dormentes (cistos), que são colhidas em grandes quantidades em lagos de sal. As larvas (chamadas de náuplios) que nascem a partir dos cistos são utilizadas mundialmente na aquacultura e na aquariologia como alimento vivo para peixes jovens. Os cistos de artêmia permanecem viáveis por muitos anos (MAYROGA *et al.*, 2010). Pode se observar na Figura 3.

O primeiro trabalho no uso do bioensaio com *A. salina* foi publicado em 1956 e, posteriormente, vários estudos foram relatados na literatura utilizando produtos naturais e toxinas, incluindo extratos de plantas (LIEBERMAN, 1999; NUNES *et al.*, 2009, VEERUNAJ, 2012; ARCANJO 2013,). Muitos laboratórios de produtos naturais utilizaram ou utilizam este ensaio em suas rotinas de isolamento, purificação e elucidação estrutural como técnica inicial de triagem biológica, a fim de selecionar e monitorar o estudo fitoquímico de extratos de plantas na busca de substâncias bioativas ou tóxicas (SANTOS PIMENTA, 2003; UANGBAOJE, 2016).O bioensaio com a artêmia é um teste simples, rápido e de baixo custo financeiro, e pode ser realizado em um laboratório de produtos naturais, devido a não apresentar nenhuma necessidade de técnicas assépticas LIEBERMAN, 1999).

Figura 3 - Cistos e náuplios de *Artemia salina*



Fonte: Autor

A importância de um bioensaio é para determinar atividade biológica/ toxicidade de plantas medicinais comumente utilizadas por diferentes pessoas e grupos étnicos e, assim, orientar suas potenciais indicações terapêuticas e perfil de segurança. Os produtos (substâncias, extratos, etc) submetidos a este bioensaio com microcrustáceo, que conduzem à morte metade dos espécimes na concentração de até 1000 mg / mL (CL_{50}), são considerados ativos e, portanto, apresentariam um bom potencial para atividade antitumoral. (MCLAUGHILIN & ROGERS, 1988). Apresentando CL_{50} de até 1000mg/mL, um produto natural também poderia ser considerado tóxico para ser utilizado para fins terapêuticos, necessitando, porém, de estudos toxicológicos complementares para confirmar danos à saúde humana.

Vários estudos tentaram correlacionar a toxicidade de produtos contra *Artemia salina* e seu potencial antifúngico, antiviral e antimicrobiana (MACBAE *et al.*, 1988), tripanocida (AMARANTE 2011), parasiticida (NGUTA *et al.*, 2013). Em vários estudos

pesquisadores utilizaram sistematicamente este bioensaio na avaliação preliminar de extratos de diversas plantas e outros produtos naturais (ARCANJO, 2012; DOS SANTOS, 2017).

3.10 Bioensaio de citotoxicidade

A caracterização de extratos e avaliação de efeitos tóxicos e citotóxicos de compostos de origem vegetal e o entendimento dos benefícios e/ou toxicidade potencial dessas plantas para saúde, são de fundamental importância para reduzir os possíveis riscos desses agentes. (LODISH *et al.*, 1999).

A espécie *A. fastigiatum* já vem sendo estudada por pesquisadores há alguns anos e o seu potencial terapêutico tem sido pesquisado em diversos modelos experimentais. A análise de citotoxicidade é importante pois dá indícios de concentrações seguras para o uso do produto natural em culturas celulares aplicadas para verificar diferentes atividades biológicas. A evidência de citotoxicidade pode indicar que o produto natural pode não ser seguro, como também, paradoxalmente, pode indicar um potencial antitumoral. O produto natural antes de se tornar fármaco com emprego terapêutico deve ser testado em ensaios *in vitro*, *in vivo* e estudos em toxicidade. (GURIB-FAKIM, 2006)

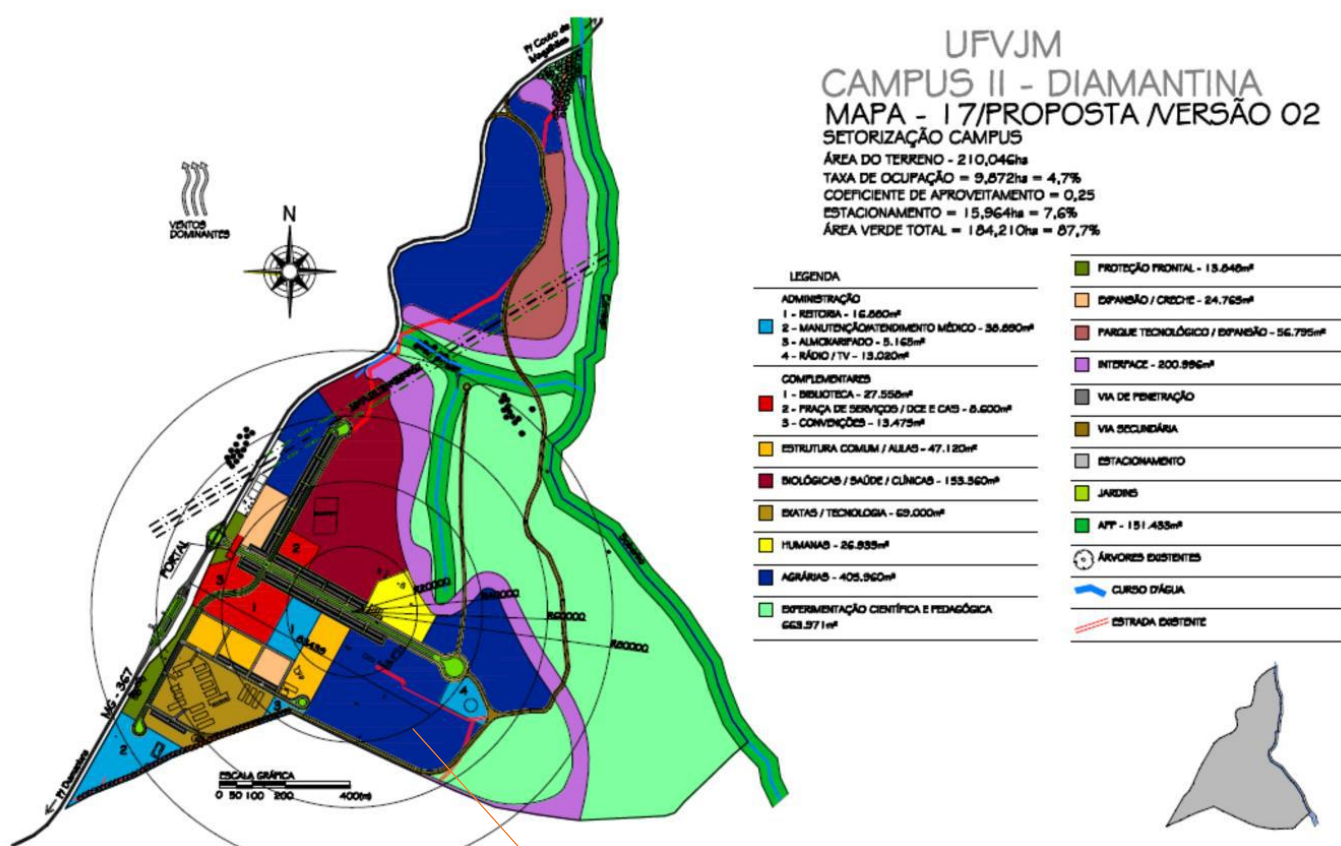
Portanto, o presente estudo pretende verificar o potencial tóxico da planta e, assim, contribuir com estudos futuros e com a segurança da população da região de Diamantina (MG), que faz uso desta planta medicinal.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta e identificação do material botânico

Foram coletadas no dia 19/10/2014 às 09 horas em um dia seco, folhas, flores e caules (partes aéreas) de *Ageratum. fastigiatum*. Tais amostras foram obtidas nas proximidades do apiário, na área pertencente à Faculdade de Ciências Agrárias do Campus JK da UFVJM (Diamantina-MG) (Figura 4). Esta área é constituída por vegetação de campo rupestre e de cerrado, de acordo com o Plano Diretor Físico do Campus JK/UFVJM (UFVJM, 2009). O local da coleta foi marcado com sistema GPS (*Global Positioning System*), apresentando (Latitude: 18° 12,255° Sul e Longitude: 43° 14,243° Oeste).

Figura 4 - Mapa UFVJM Diamantina



Região onde se encontra o Apiário – Departamento de Zootecnia- FCA

A identificação foi feita por comparação com exsicata depositada no Herbário DIAM/UFVJM (Diamantina, MG, Brasil), sob número 1300.

4.2 Preparação do extrato etanólico

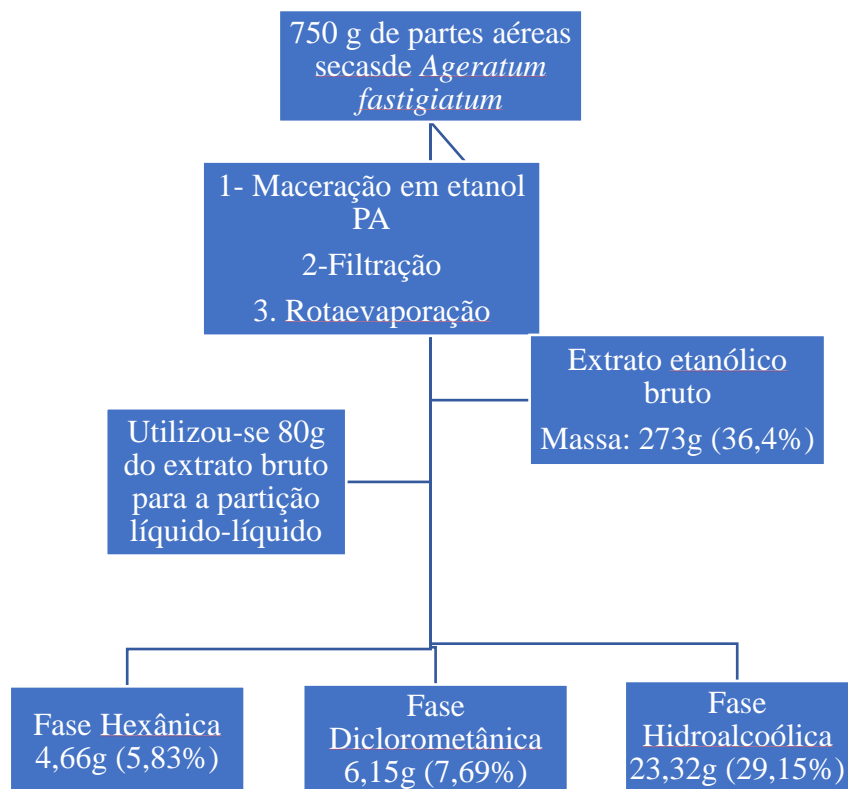
As partes aéreas da planta foram secas em estufa de circulação e renovação de ar (Biopar®), na variação de temperatura 35 a 40°C, até peso constante (2000g). Posteriormente, foram pulverizadas em moinho de facas modelo SL32 (Solab®). O material pulverizado (500,0g) foi submetido a extração por meio de maceração exaustiva em recipientes de vidro âmbar, utilizando-se o etanol PA como solvente extrator, na proporção de 1/10 p/v (pó:solvente). O extrato bruto foi concentrado em evaporador rotativo (Fisatom® 801) a 40-42°C, sob pressão reduzida. Depois foi transferido para frascos de vidro previamente tarados para término da secagem em dessecador, sob vácuo e à temperatura ambiente. O extrato etanólico seco foi armazenado em dessecador, à temperatura ambiente.

4.3 Fracionamento do extrato etanólico

O extrato etanólico bruto (80g) foi ressuspenso em metanol: água 3:1 e fracionados através de partição líquido-líquido utilizando solventes imiscíveis de polaridades diferentes, (hexano e posteriormente diclorometano), obtendo-se as fases (ou frações) hexânica, diclorometânica e hidroalcoólica. As fases hexânica e diclorometânica foram concentradas em evaporador rotatório, transferidas para recipientes de vidro e deixadas em dessecador sob vácuo e a temperatura ambiente. A fase hidroalcoólica foi submetida a processo de rotaevaporação à vácuo (35-40°C), para a retirada do etanol. Posteriormente, liofilizada (liofilizador Liotop® L101) e armazenada em frasco de vidro fechado e previamente tarado a 20°C negativos.

Na Figura 5 a obtenção do extrato e das fases (ou frações) está esquematizada.

Figura 5 – Fluxograma de obtenção de extrato etanólico (das partes aéreas de *Ageratum fastigiatum*) e seu fracionamento por partição líquido-líquido, com obtenção das fases ou frações hexânica, diclorometânica e hidroalcoólica.



Fonte: Autor

4.4 Processos Cromatográficos

4.4.1 Cromatografia em coluna clássica (CCC)

Com 4,0g o extrato etanólico foi realizado a Cromatografia em coluna clássica (Figura 6) utilizando como fase estacionária sílica-gel 60 0,050 – 0,200 mm (Vetec Química Fina Ltda®) com 40cm de altura e 5cm de diâmetro. A fase móvel utilizada foi por gradiente crescente de polaridade, com os solventes hexano, acetato de etila e etanol e misturas dos mesmos conforme a Tabela 1. Foram utilizados 100mL de cada polaridade da fase móvel. Os solventes utilizados foram de grau PA e de diferentes marcas comerciais.

Figura 6 - Coluna cromatográfica clássica- cromatografia preparativa por adsorção (fase móvel: gradiente de polaridade; fase estacionária: sílica gel 0,050-0,20mm)



Fonte: autor

Tabela 1- Fase móvel em polaridade crescente utilizada na Cromatografia em Coluna Clássica para fracionamento do extrato etanólico das partes aéreas de *Ageratum fatigiatum*

SOLVENTES	PROPORÇÃO (%)
Hexano	100
Hexano/ acetato de etila	70:30
Hexano/ acetato de etila	50:50
Hexano/ acetato de etila	40:60
Hexano/ acetato de etila	30:70
Hexano/ acetato de etila	10:90
Acetato de etila	100
Acetato de etila/ etanol	80:20
Acetato de etila/ etanol	70:30
Acetato de etila/ etanol	50:50
Acetato de etila/ etanol	30:70
Acetato de etila/ etanol	10:90
Etanol	100

Fonte: Autor

4.4.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)

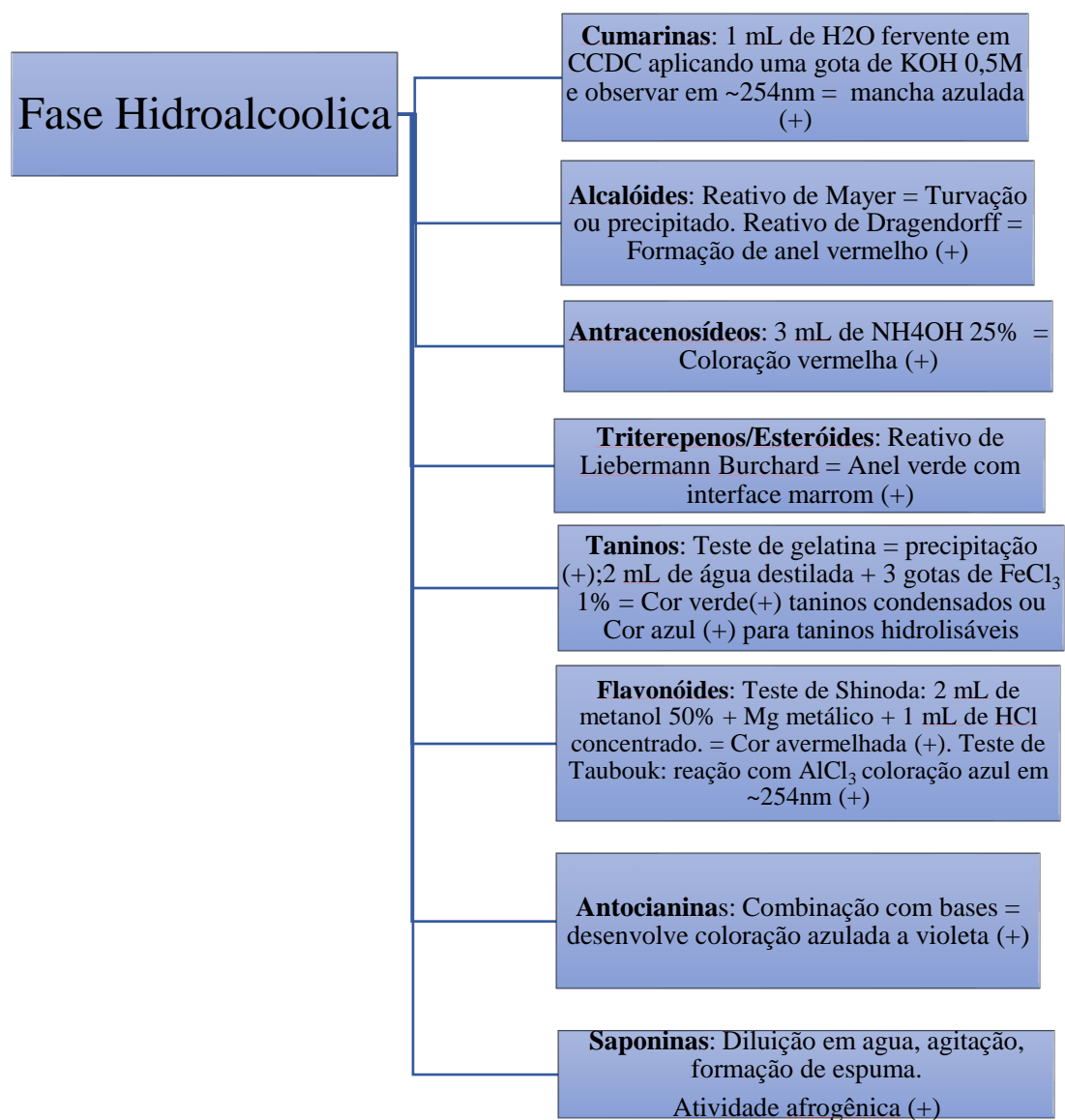
A cromatografia preparativa do extrato etanólico das partes aéreas da planta rendeu 206 frações. Estas foram analisadas por cromatografia em camada delgada em placas de alumínio com Sílica Gel 60 medindo 10 x 20 cm, com espessura de 0,20mm da fase estacionária (Macherey-Nagel®). A fase móvel foi preparada com os solventes hexano, acetato de etila, etanol e misturas dos mesmos, de acordo com as características de polaridade de cada alíquota analisada. Como agentes reveladores foram usadas luz UV ($\lambda = 254$ e 366 nm - lâmpadas Sankyo Denk®), vanilina sulfúrica seguida por aquecimento da cromatoplaça a 100-110 °C. A cromatografia analítica foi empregada para reunir as frações semelhantes em seus perfis químicos.

4.5 Triagem das fases resultantes da partição líquido-líquido do extrato etanólico das partes aéreas de *Ageratum fastigiatum*

Foram pesquisados qualitativamente os principais grupos de metabólitos secundários nos produtos obtidos da planta. A triagem ou *screening* fitoquímico compreendeu reações cromogênicas, de precipitação e análise por CCD. Os testes foram realizados segundo Matos (1997) e Costa (2002).

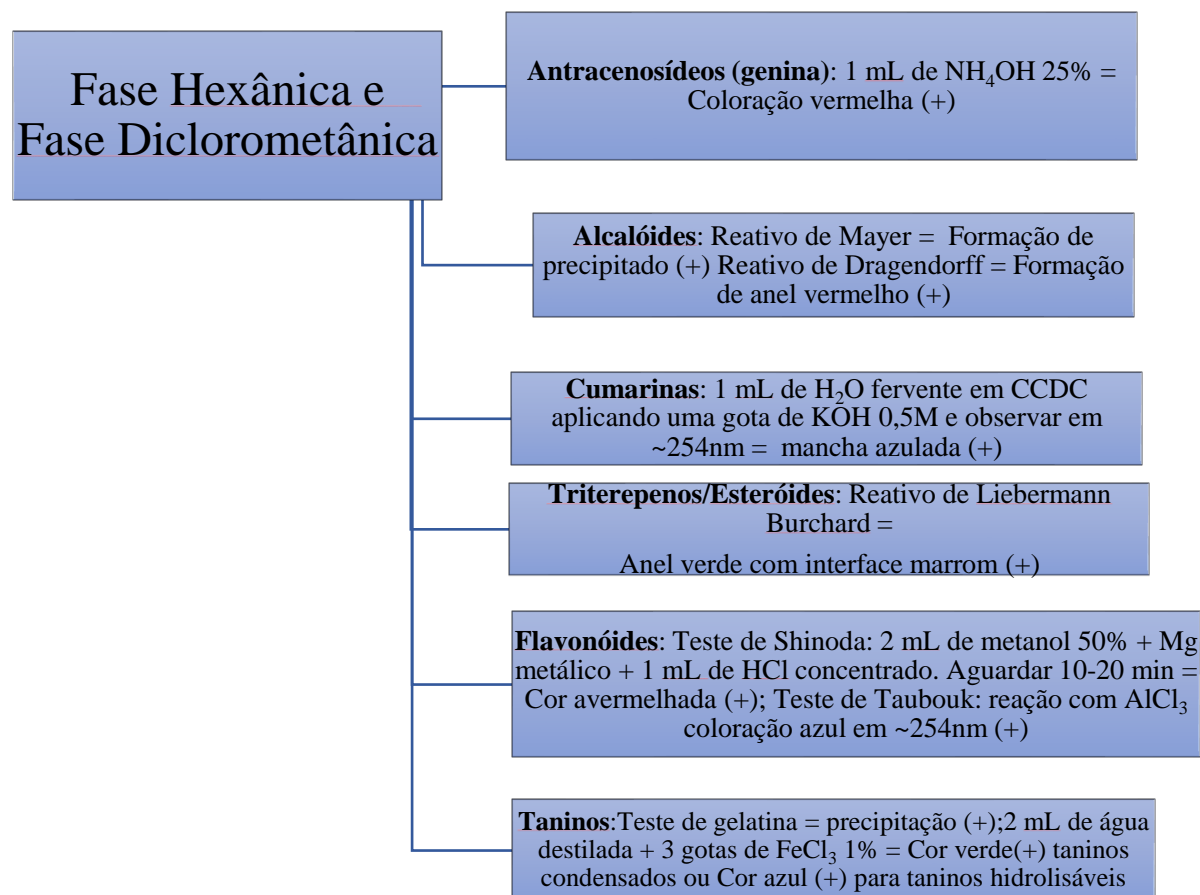
As Figura 7 e Figura 8 resumem os testes realizados na triagem fitoquímica das fases hexânica, diclorometânica e hidrodrolcoólica preparadas a partir do extrato etanólico e o resultado esperado no caso de reação positiva para cada determinada classe de metabólito especial.

Figura 7 – Triagem fitoquímica realizada para detecção de classes dos metabólitos secundários em amostra da fase hidralcoólica do extrato etanólico das partes aéreas de *Ageratum fastigiatum*



Fonte: Autor

Figura 8 - Triagem fitoquímica realizada para detecção de classes dos metabólitos secundários em amostra das fases hexânica e diclorometânica obtidas por partição líquido-líquido do extrato etanólico das partes aéreas de *Ageratum fastigiatum*



Fonte: Autor

4.6 Cromatografia gasosa acoplada com espectrômetro de massas (CG/EM)

As análises cromatográficas das fases hexânica e diclorometânica obtidas a partir do extrato etanólico da planta foram feitas no Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FCFRP/USP). Essas análises foram conduzidas em cromatógrafo Shimadzu® modelo QP2010 equipado com coluna capilar de sílica fundida RTx-5ms (Restek Co. Bellefonte, PA, USA), apresentando 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura do filme).

Cada amostra foi submetida às seguintes condições analíticas: o gás de arraste foi o gás Hélio, com velocidade linear de 43,2cm/s; a pressão empregada foi de 86,7 kPa; a injeção

foi feita no modo split (1:5), com temperatura do injetor a 260°C; a temperatura inicial de análise foi de 60°C, aumentando 4°C/min e permanecendo a 320°C por 25 minutos. O espectrômetro de massas foi operado no modo de ionização eletrônica a 70 eV com varredura de m/z de 35 a 600 Da. A interface foi mantida a 320°C e fonte de íons a 250°C.

A quantificação dos componentes das amostras foi determinada pela área relativa dos picos (%). A proposta de identificação dos constituintes químicos das fases hexânica e diclorometânica do extrato etanólico da planta foi realizada com análises dos dados obtidos através de CG/EM: estudo dos espectros de massas obtidos experimentalmente e comparação com os espectros de espectrotecas NIST11, WILEY7 e FFNSC1.3. Quando necessário, foi calculado o IRR (índice de retenção relativo), de acordo com a equação (1); para tanto foi obtido, nas mesmas condições cromatográficas utilizadas nas análises das fases hexânica e diclorometânica, um cromatograma com série homóloga de hidrocarbonetos alifáticos (C9-C40)

Onde: (1)

- $IRR = 100.n + 100 (t_x - t_a) / (t_{a+1} - t_a)$
- IRR = número do Índice de Retenção Relativa (IRR)
- n = número de átomos de carbono do hidrocarboneto eluído imediatamente antes do composto “x” de interesse
- t_a e t_{a+1} = tempos de retenção dos hidrocarbonetos eluídos imediatamente antes (t_a) e após (t_{a+1}) o composto “x” de interesse, respectivamente.
- t_x = tempo de retenção do composto “x”

4.7 Cromatografia Líquida de alta eficiência com detector por arranjo de diodos (CLAE/DAD)

A fração hidroalcoólica obtida da partição líquido-líquido do extrato etanólico da planta foi analisada em cromatógrafo líquido (modelo LCMS2020 SHIMADZU®) com detector de arranjo de diodos (modelo SPD-M20A SHIMADZU®) alocado no Laboratório de Multiusuários – do Departamento de Farmácia - UFVJM. A análise foi realizada em coluna analítica Supelcosil® TM LC-18 (25 cm x 4,6 mm) com filme de revestimento de 5 μ m de espessura, com sistema de pré-coluna equipado *Amalical Guard Cartridge System* modelo KJO-4282 (Phenomenex®).

O solvente orgânico e o ácido utilizado para compor a fase móvel foram de grau HPLC e a água deionizada foi purificada em um sistema Milli-Q (Millipore Corporation®). Na

tabela 2 foi descrito o gradiente de eluição seguindo as condições analíticas: fluxo de 0,5 mL/min, temperatura ambiente, detecção UV-Vis 200~600nm e o volume injetado foi de 20µL.

Tabela 2 – Gradiente de eluição da fase móvel utilizada na análise em CLAE/DAD da fração hidroalcoólica do extrato etanólico das partes aéreas de *Ageratum fastigiatum*

Tempo (min)	Fase móvel A (%)	Fase móvel B (%)
0	90	10
40,0	0	100
45,0	90	10

Fase Móvel A: água Milli-Q com 1% de ácido acético glacial

Fase Móvel B: acetonitrila

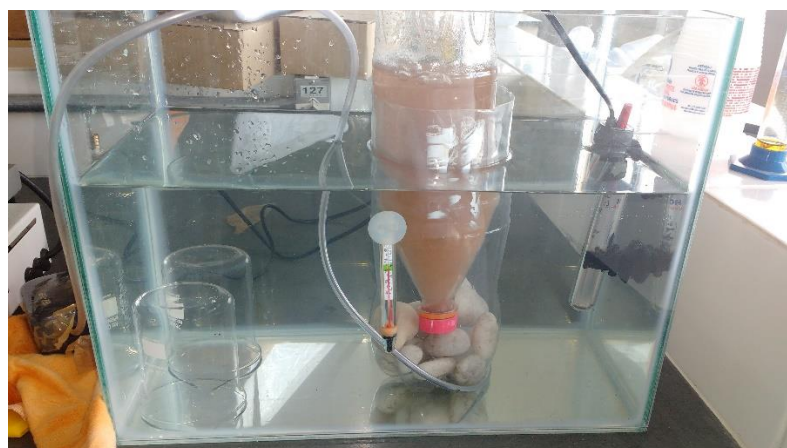
Fonte: Autor

4.8 Padronização do bioensaio com *Artemia salina*

Cistos de *A. salina* foram cedidos pelo Prof. Dr. Marcelo Mattos Pedreira, do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias da UFVJM.

Para a padronização do ensaio, foram realizados vários testes para a adequação da temperatura da água, pH, intensidade de aeração, luminosidade, concentração de sal marinho. A temperatura da água foi avaliada na faixa de 26°C a 30°C. A avaliação do pH da água, foi realizada variando-se o pH de 7 a 9, para isso utilizando NaOH 0,1 mol/L. A intensidade de aeração foi avaliada em baixa e média. A avaliação da luminosidade foi em 24 horas de luz intensa ou no ciclo de 12 horas com iluminação. O sal marinho foi colocado no sistema nas concentrações variando de 15g/L a 30g/L. Os parâmetros usados para averiguação das padronizações foram a motilidade dos náuplios após 24 horas da eclosão dos cistos. A Figura 9 ilustra a fase de eclosão dos cistos em sistema montado e utilizado pelo grupo do Laboratório de Síntese Orgânica e Produtos Naturais do Departamento de Farmácia/UFVJM.

Figura 9 – Sistema utilizado no processo de eclosão dos cistos de *Artêmia salina*



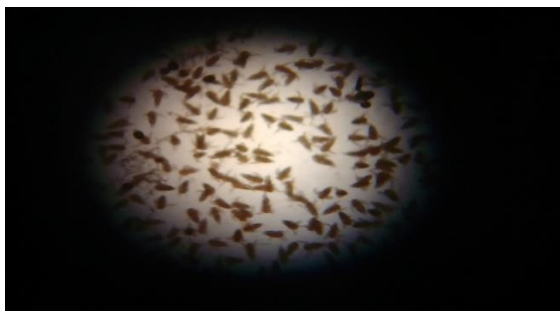
Fonte: Autor

4.9 Avaliação da toxicidade do extrato etanólico de *Ageratum fatigiatum* sobre *Artemia salina*

Os ensaios para avaliação da toxicidade do extrato e das fases (ou frações) foram conduzidos de acordo com metodologia pré-estabelecida (MEYER et al., 1982; LIMA et al., 2011).

Os cistos de *A. salina* foram incubados em água salgada artificialmente (15 g de sal marinho dissolvidos em 1,5 L de água com uma gota de anticloro). A cultura foi mantida sob aeração e agitação constantes, com pH ajustado em 8, a 28-29 °C por 48 horas (com luminosidade constante) para a eclosão dos cistos. Após a eclosão as larvas são chamadas de náuplios. Para visualizar e separar os náuplios, foi empregada em lupa modelo Q714z1 (Quimis®) e uma pipeta de Pasteur, respectivamente. Na Figura 10 há uma imagem de náuplios obtidas através da lupa, com aumento de 20 vezes.

Figura 10 – Náuplios de *Artemia salina* em aumento de vinte vezes na lupa



Fonte: Autor

O ensaio de toxicidade foi realizado em triplicada, utilizando as condições ambiente estipuladas durante a padronização do ensaio e utilizadas para obtenção dos náuplios (eclosão dos ovos). Para cada repetição do experimento, foram utilizados 60 tubos de ensaio, cada um contendo 10 mL de água salgada artificialmente; em cada tubo foram acondicionados 10 náuplios. Os tubos contendo náuplios foram divididos em cinco grupos, que receberam tratamentos diferentes: (I) controle negativo, contendo água do mar artificial e Tween 80 a 5% ; (II) controle positivo de toxicidade, contendo dicromato de potássio($K_2Cr_2O_7$) a 0,1%; (III) três grupos teste com diferentes concentrações (01mg/ml, 05 mg/ml, 10 mg/ml) do extrato etanólico, da fase diclorometânica, da fase hexânica e da fase hidroalcoólica.

Os tubos de ensaio preparados foram incubados por 24 horas. Após este período foram contadas as artêmias mortas em cada tubo, com auxílio da lupa. Os dados foram analisados e expressos como CL_{50} (concentração letal média) e percentual de mortalidade. O percentual de mortalidade foi estatisticamente avaliado através de Análise de Variância (ANOVA one-way) seguida pelo teste de Tuckey (Graph Pad Prism 8.0).

Como a quantidade de artêmias mortas é um indicador para a toxicidade da amostra em análise, as diferentes amostras foram analisadas de acordo com a CL_{50} . Esta, é capaz de propor qual é a concentração de cada amostra que possibilita matar 50% da quantidade total de artêmias.

Calculando-se a média de cada triplicata da amostra e então, analisa o desvio padrão das mesmas e considerando o limite amostral (determinando pelos controles), consegue-se calcular a toxicidade da amostra, seu CL_{50} , quanto menor a toxicidade da amostra, maior será a CL_{50} .

4.10 Avaliação da toxicidade do extrato etanólico de *Ageratum fastigiatum* sobre Células L929

Para a avaliação da citotoxicidade do extrato etanólico bruto e suas respectivas frações foi utilizada a linhagem de células CLL I NCTC da American Type Culture Collection (ATCC) 929-clone da linhagem L, proveniente de tecido conjuntivo de camundongo, denominada L929, fornecida pelo Laboratório de Imunopatologia (LIMP) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). Foram utilizados criotubos contendo a linhagem criopreservada, em seguida foi descongelado a temperatura ambiente. A suspensão foi transferida para uma garrafa de cultura estéril de 75 cm² (TPP ®), contendo 9 mL de meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco®), 1% de solução estabilizada de penicilina (1000 U/mL)/estreptomicina

(10 µg/mL) (Sigma®) e 2 mM de L-Glutamina (Sigma®). Posteriormente a suspensão foi incubada em estufa (Ultrafase®, modelo HF 212 UV), a 37°C, em atmosfera umidificada a 95% e com 5% de dióxido de carbono (CO₂), até atingir 80% de confluência, sendo que a verificação foi realizada diariamente em microscópio óptico invertido (Meddilux, modelo MDL 150 TAI) e a troca do meio sendo realizada quando necessário. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com tampão fosfato salino (PBS) e foi adicionado 1 mL de solução de tripsina-EDTA (Sigma®) para promover a dispersão da monocamada celular. Depois das células desprendidas, a tripsina foi inativada pela adição de 9 mL do meio RPMI suplementado. A suspensão de células foi concentrada por meio da centrifugação (2500 rpm, 18°C, 10 minutos), em centrífuga (Thermo®), modelo BR4i multifunction) e, ressuspensas em meio RPMI suplementado. Dessa suspensão retirou-se uma alíquota de 20 µL, a qual foi adicionada o corante Azul de Tripán 0,4% para contagem de células em câmara de Neubauer, sendo a concentração de células ajustada para 1×10^5 células/mL para a realização dos experimentos de citotoxicidade, conforme estabelecido por Oliveira (2016).

4.10.1 Ensaio para determinação da citotoxicidade do extrato bruto e suas frações

A viabilidade das células foi avaliada pela técnica do 3-[4,5-dimetiltiazol-2il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), baseado em MOSMANN *et al.*(1983) após exposição das células ao extrato etanólico bruto e suas fases. A técnica baseia-se na atividade da enzima mitocondrial succinato desidrogenase, que reage com o brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2il]-2,5-difeniltetrazólio, levando a redução e posterior formação dos cristais de formazano, que é um composto colorido que é solúvel em alguns solventes orgânicos como o DMSO. Somente células (mitocôndrias) viáveis podem realizar essa redução do corante, então, a quantidade de formazano formado é diretamente proporcional à viabilidade celular, podendo ser medida em espectrofotômetro de múltiplos poços (leitor de microplaca) (MOSMANN *et al.*, 1983; MUJEEB, KHAN & PATHAK 2018; DUTTA *et al.*, 2005; ARAUJO *et al.*, 2008).

Em placas de 96 poços (Sarstedt®) foi adicionado 100 µL da suspensão celular na concentração de 1×10^5 células/mL, conforme padronizado por OLIVEIRA (2016). Estas células foram incubadas por 24 horas em estufa, a 37°C, em atmosfera com 5% de CO₂, posteriormente o meio foi removido cuidadosamente para não retirar as células aderidas. Em seguida, as células L929 foram tratadas com concentrações seriadas do extrato etanólico bruto e suas fases (1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81 µg/mL). Neste ensaio foram adicionados à placa um controle de crescimento celular (células e meio RPMI suplementado), controle de morte celular

(CdCl₂ a 360 µg/mL e células); controle de solvente (meio na presença de DMSO a 0,125% e células); controle dos extratos brutos e suas frações e, controle do meio RPMI. Todas as amostras foram testadas em triplicata e em três experimentos independentes.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

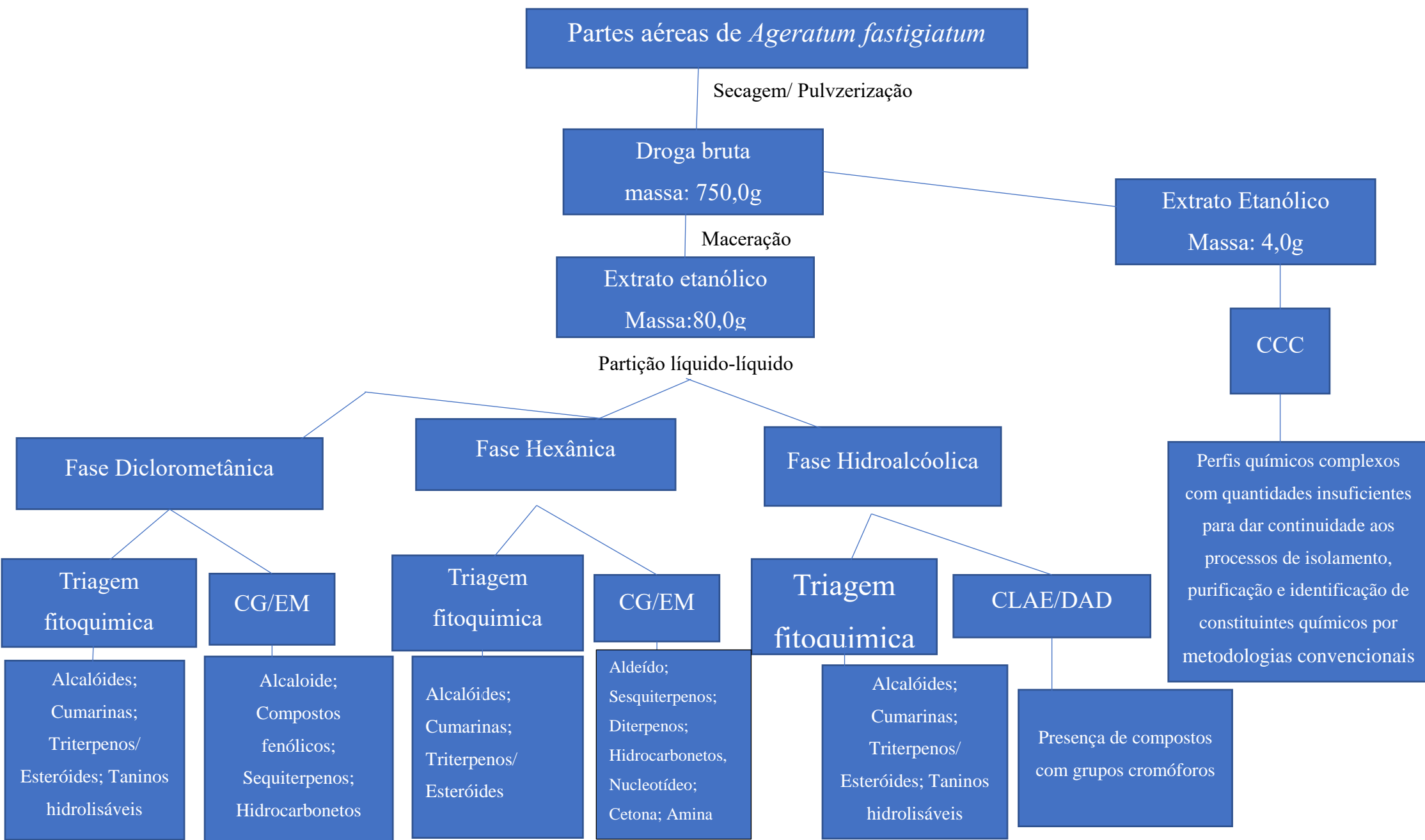
5.1 ESTUDO FITOQUÍMICO

A análise fitoquímica das frações obtidas a partir do extrato bruto das partes aéreas de *A. fastigiatum*, foi realizada no intuito de contribuir para enriquecer o conhecimento do perfil químico desta espécie e de seu extrato. Existem na literatura vários estudos fitoquímicos desta espécie, estes avaliaram o óleo essencial, extratos etéreos, em acetato de etila, metanólico e etanólico obtido das folhas e inflorescências (BOHLMANN *et al.* (1981 e 1983) DELVECHIO-VIEIRA *et al* 2009, GOLÇALVES *et al* 2011, AVELAR-FREITAS, 2013b).

A presente pesquisa avaliou o extrato etanólico das partes aéreas, no entanto, estudando separadamente suas frações de diferentes polaridades. Isso pode levar a detecção de substâncias que seriam mais dificilmente detectadas em extrato bruto total, devido a sua menor concentração relativa neste último.

Na Figura 11 - Esquema dos principais resultados obtidos no estudo fitoquímico de *Ageratum fastigiatum* mostra o esquema com os principais resultados obtidos desde a massa vegetal seca, produção dos extratos e fases, detecção de compostos por *screening* fitoquímico e identificação de metabólitos por cromatografia gasosa-espectrometria de massas (CG/EM) e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a Detector por arranjo de diodos (CLAE/DAD).

Figura 11 - Esquema dos principais resultados obtidos no estudo fitoquímico de *Ageratum fastigiatum*



5.1.2 *Rendimento do extrato e das fases hexânica, diclorometânica e hidroalcoólica*

Foram utilizados 750g de material vegetal dessecado e rasurado para a produção de 100,29g de de extrato etanólico bruto (rendimento de 13,37%). Utilizou-se 80g do extrato bruto para a partição líquido-líquido e foram obtidos 4,66g de fase hexânica (5,83%), 6,15g de fase diclorometânica (7,89%) e 23,32g da fase hidroalcoólica (29,15%).

5.1.3 *Cromatografia em Coluna Clássica*

A fase hidroalcoólica (4,0g) obtida do extrato etanólico das partes aéreas de *A. fastigiatum* foi submetida à cromatografia em coluna clássica (CCC), obtendo-se 206 frações de aproximadamente 20 mL, reunidas em grupos devido sua similaridade cromatográfica e determinada por cromatografia em camada delgada (CCD), obtendo-se 12 subfrações. Não foi possível o isolamento ou identificação de constituintes químicos das subfrações reunidas, uma vez que apresentavam perfis químicos complexos e em quantidades insuficientes para dar continuidade aos processos de isolamento, purificação e identificação de constituintes químicos por metodologias convencionais.

5.1.4 *Triagem fitoquímica*

Nos ensaios de triagem fitoquímica, foram empregados testes usuais para a detecção de classes de metabolitos especiais nas fases ou frações resultantes de partição líquido-líquido do extrato etanólico das partes aéreas de *A. fastigiatum*. Os resultados são mostrados no Quadro 3.

Quadro 3- Classe dos metabólitos secundários detectados por screening fitoquímico realizado nas fases hexânica, diclorometânica e hidroalcoólica resultantes da partição líquido-líquido do extrato eatanólico das partes aéreas de *Ageratum fastigiatum*

Classe de metabólito secundário	Fase diclorometânica	Fase hexânica	Fase hidroalcoólica
Alcalóides	Negativo	Negativo	Positivo
Antracenosídeos	Negativo	Negativo	Negativo
Antocianinas	*	*	Negativo

Cumarinas	Positivo	Positivo	Positivo
Flavonóides	*	*	**
Saponinas	*	*	Positivo
Taninos condensados	Negativo	Negativo	Negativo
Taninos hidrolisáveis	Positivo	Negativo	Positivo
Triterpenos/ Esteróides	Positivo	Positivo	Positivo

* Teste não realizado devido as características dos metabólitos secundários serem incompatíveis com as polaridades dos extratos. ** Resultado indeterminado por dificuldade de visualização/interpretação da coloração formada; além do teste de Shinoda foi realizado o teste Taubouk para confirmação. No entanto os resultados foram inconclusivos

Fonte: Autor

Em trabalhos anteriores que realizaram estudo fitoquímico (triagem ou estudo mais elaborado, como isolamento e identificação) com alguma parte da *A. fastigiatum* evidenciaram a presença de cumarinas (BOHLMANN *et al.* 1981; GONÇALVES *et al.*, 2011), triterpenos e esteroides (BOHLMANN *et al.* 1981; DEL-VECHIO-VIEIRA *et al.*, 2008; GONÇALVES *et al.*, 2011; AVELAR-FREITAS, 2013b) e de saponinas (AVELAR-FREITAS, 2013b). Essas classes de metabólitos secundários foram observadas na triagem fitoquímica realizada em nosso trabalho. A presença de flavonoides foi descrita em trabalhos anteriores (BOHLMANN *et al.* 1983; AVELAR-FREITAS, 2013b), porém em nosso estudo a presença deste metabólito foi inconclusiva. Os taninos hidrolisáveis e alcaloides foram observados nos testes de triagem realizados nesta pesquisa de triagem, representando o primeiro relato desses metabólitos em *A. fastigiatum*.

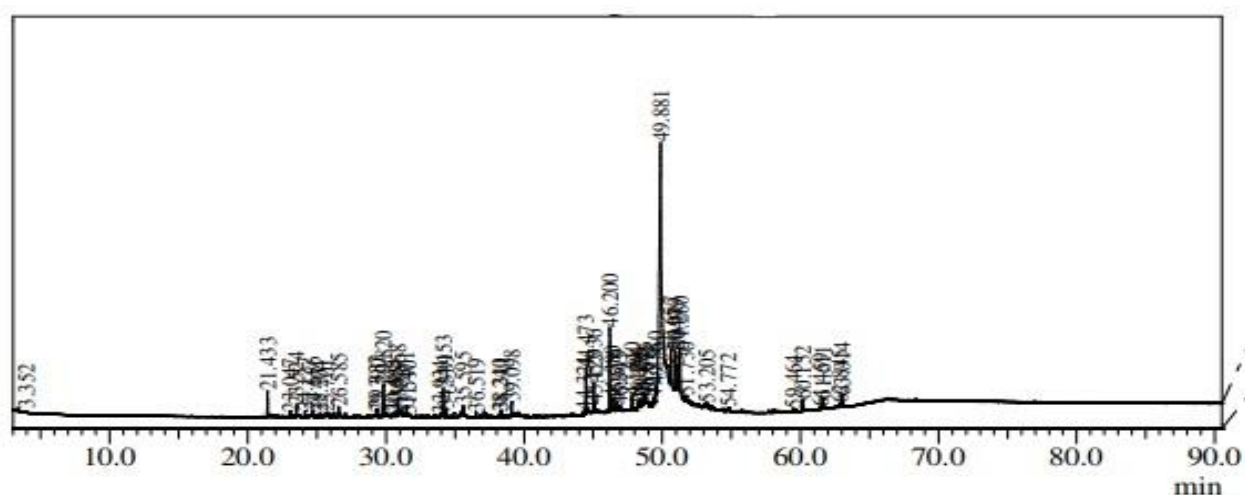
Essas diferenças qualitativas de detecção de classes de metabólitos entre plantas da mesma espécie podem ter ocorrido pela baixa concentração do metabólito no extrato ou nas fases, devido a variação genética, diversidade ambiental, alterações relacionadas ao crescimento e ao desenvolvimento das plantas (LIMA *et al.*, 2003; GOBBO-NETO e LOPES, 2007).

As classes detectadas têm potencial anti-inflamatório, analgésico e cicatrizante, como evidenciado na literatura. Em especial, saponinas, esteroides e triterpenos com potencial anti-inflamatório e taninos com potencial cicatrizante (SIMÕES *et al.*, 2001). A presença dessas classes de metabólitos secundários pode ser responsável pelo uso medicinal da planta.

5.1.5 Cromatografia gasosa da fase hexânica

A fase hexânica obtida do extrato etanólico das partes aéreas de *A. fastigiatum* foi analisada por CG-EM. O cromatograma está na (Figura 12). No Quadro 4 se encontram as propostas referentes às substâncias presentes na fase hexânica obtida a partir do extrato etanólico da planta. Não foi possível a identificação de alguns constituintes químicos, devido a não existirem semelhanças espectrais e semelhanças de IRR, mediante comparação com literatura e com espectros e informações de IRR das espectrotecas.

Figura 12–Cromatograma obtido em análise por cromatografia gasosa-espectrometria de massas da fase hexânica resultante da partição do extrato etanólico das partes aéreas de *Ageratum fastigiatum*



Fonte: Autor

Quadro 4– Proposta de dados qualitativos e quantitativos dos compostos presentes na fase hexânica obtida por partição do extrato etanólico das partes aéreas da *Ageratum fastigiatum*

Pico	T.R> (min)	Nome	IS	CAS	Area do pico (%)
1	3.350	1,2,4,4-Tetrametilciclopenteno	93	65378-76-9	0.06
2	21.435	Aromadendreno	89	489-39-4	1.32
3	23.045	Driminol	80	19078-37-6	0.21
4	23.525	Espatulenol	89	72203-24-8	0.47
5	24.125	α Cedreno	85	13567-54-9	0.25

6	24.685	Globulol	84	489-41-8	0.24
7	25.20	Biciclo [7.2.0] undecan-5-ol	82	79580-01-1	0.11
8	25.700	Cadin-4-en-10-ol	85	481-34-5	0.18
9	26.585	1-Naftalenamina	84	09/07/2298	0.46
10	29.330	cedrano-diol	77	13567-40-3	0.39
11	29.390	Pirazina	75	108-50-9	0.14
12	29.820	*			1.55
13	30.495	Neofitadieno	91	504-96-1	0.10
14	30.665	Fitona	84	502-69-2	0.21
15	30.860	*			0,96
16	31.470	1,4-Metanoazuleno-7 (1H) -ona	77	65437-70-9	0.55
17	31.590	*			0,09
18	33.935	1-naftaleno propanol	77	69782-87-2	0,09
19	34.155	3-Buten-2-ona	80	79-69-6	1,39
20	34.340	Ácido hexadecanóico	90	628-97-7	0,37
21	35.595	*			0,42
22	36.519	*			0,24
23	38.240	*			0,21
24	38.310	Linolenato de etila	86	544-35-4	0,29
25	39.098	*			0,76
26	44.324	*			0,192
27	44.473	*			2,33
28	45.036	*			2,21
29	45.125	*			0,25
30	46.200	*			4,51
31	46.380	*			1,09
32	46.670	*			0,49
33	46.945	*			0,17
34	47.810	*			0,67
35	48.170	*			0,34
36	48.295	*			0,44
37	48.475	*			0,31
38	48.686	*			0,40

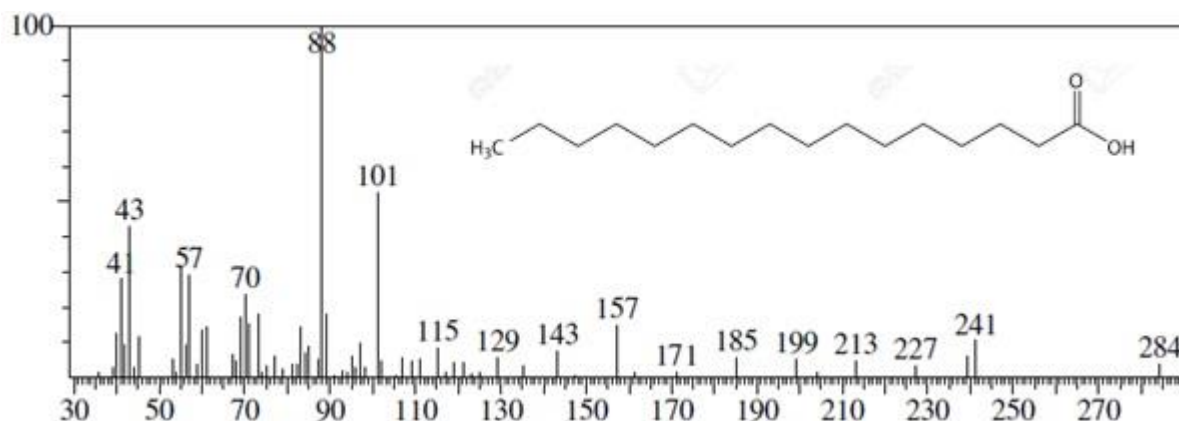
39	48.875	*			0,25
40	49.376	*			0,27
41	49.560	*			0,76
42	49.881	*			59,87
43	50.657	*			2,87
44	50.980	Humuleno	74	6753-98-6	2,55
45	51.049	*			1,35
46	51.280	*			4,37
47	51.730	*			0,44
48	53.205	*			0,17
49	54.772	*			0,14
50	59.465	β -amirina	88	559-70-6	0,18
51	60.155	Lupeol	88	545-47-1	0,8
52	61.460	Acetato de taraxasterol	79	6426-43-3	0,22
53	61.610	Acetato de lupeol	88	1617-68-1	0,58
54	62.845	Acetato de pseudotaraxasterol	84	4586-65-6	0,17

*Pico não identificado

Através da análise foram detectados 54 constituintes na fase hexânica. Destes, foram propostas as identificações de 24 constituintes químicos. Espatuleno, Aromadendreno, α -Cedreno, Drimenol, Humuleno são representantes de sesquiterpenos, comuns em óleos essenciais e em extratos de baixa polaridade. No estudo de Del Vecchio e colaboradores (2009) foram também relatadas a presença de α cedreno, cedrano-diol, humuleno, espatuleno em óleo essencial de partes aéreas de *A. fastigiatum*. A presença de constituintes graxos, como ácido hexanóico e o linolenato de etila, foi proposta, além de triterpenos (β -Amirina, Lupeol, Acetato taraxasterol, Acetato de lupeol, Acetato de pseudotaraxasterol) e diterpenos (fitona e neofitadieno). Nos trabalhos de Gonçalves e colaboradores (2011) e de Bohlmann e colaboradores (1981, 1983) já haviam sido descritos os triterpenos (β -Amirina, Lupeol, Acetato taraxasterol, Acetato de lupeol, Acetato de pseudotaraxasterol).

A seguir são discutidas as interpretações de alguns espectros de massas obtidos experimentalmente de alguns constituintes relatados pela primeira vez na espécie. A figura 13 representa o espectro do ácido hexadecanóico (ácido palmítico) obtido experimentalmente.

Figura 13- Espectro do ácido hexadecanóico obtido a partir de análise da fase hexânica (resultante da partição do extrato etanólico de *Ageratum fastigiatum* por Cromatografia Gasosa-Espectrometria de massas



Fonte: autor

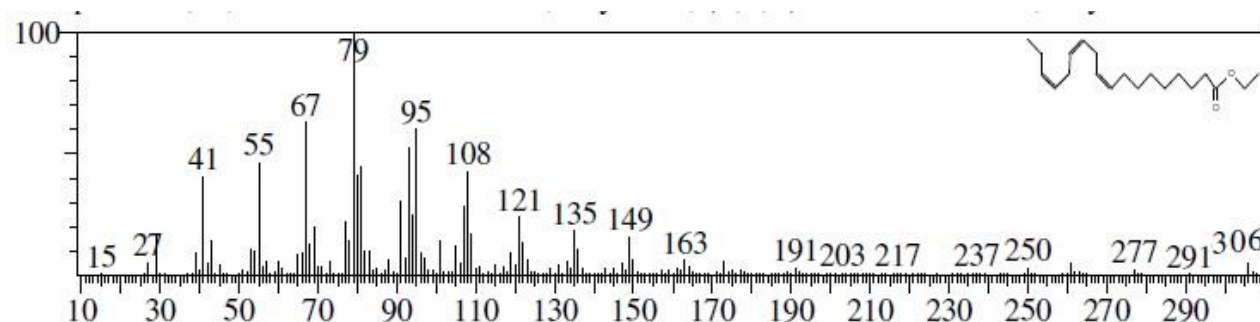
Esse éster de ácido é um composto comumente encontrado em espécies vegetais, principalmente em frações apolares como a hexânica e forma uma das principais classes na composição das ceras epicuticulares. Através dos seus íons moleculares, os ésteres de ácidos podem ser caracterizados pela espectrometria de massas, gerados a partir de um rearranjo com transferência dupla de hidrogênios, formando um íon de razão m/z com massa molecular do ácido mais um hidrogênio [M_{Ac} (massa molecular do ácido) + 1]. Assim, pode-se determinar a presença do ácido hexadecanoico a partir do íon de m/z 284 (SIQUEIRA *et al.*, 2003).

Alguns sinais espectrais foram analisados, por exemplo, o pico em m/z 88 é referente ao íon produzido por rearranjo de McLafferty com quebra da ligação β em relação à carbonila de ácidos alifáticos. Íon de m/z 227 refere-se a um rearranjo envolvendo a expulsão de duas unidades de carbono (C2 a C3) e; m/z 213, representando um rearranjo envolvido na eliminação de três carbonos (C2 a C4) (CRISTIE, 2018).

As quebras sucessivas das ligações C-C são responsáveis por outros fragmentos, na qual ocorre retenção de carga pelo fragmento alquila (m/z 43, 88, 101), formado pela remoção de um átomo de hidrogênio de um hidrocarboneto; ou pelo fragmento que contém o oxigênio (m/z 73, 101, 115, 129, 143, 157, 171, 185, 199) com intervalos de 14 unidades de massas (CH_2), que são comuns em hidrocarbonetos e seus ácidos carboxílicos correspondentes (SILVERSTEIN *et al.*, 2007).

A Figura 14 representa o espectro do linolenato de etila obtido experimentalmente

Figura 14- Espectro do linolenato de etila obtido a partir de análise da fase hexânica (resultante da partição do extrato etanólico de *Ageratum fastigiatum* por Cromatografia Gasosa-Espectrometria de massas

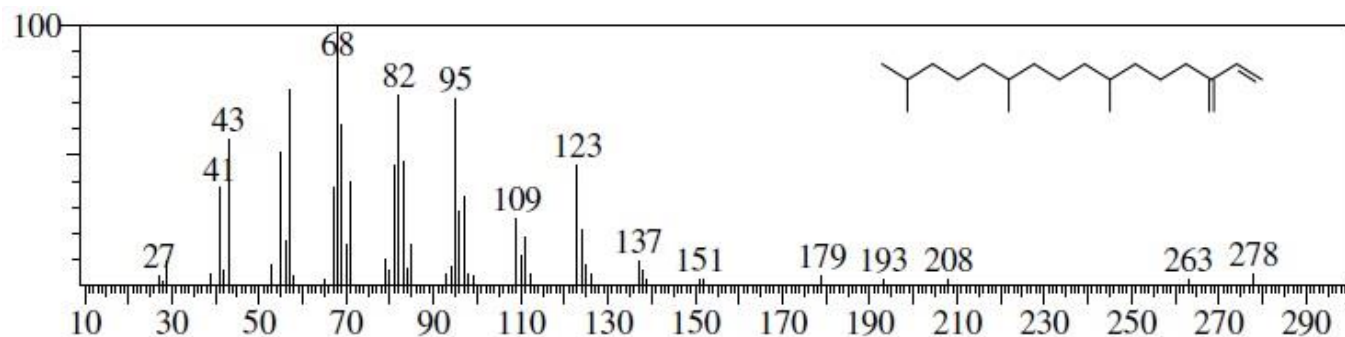


Fonte: Autor

O linolenato de etila é um éster graxo poli-insaturado (três insaturações). De acordo com SIMÕES (2007), o sinal do íon molecular desta substância se encontra na razão m/z 306. Segundo SIMÕES (2010), os ésteres que apresentam muitas insaturações, como o linolenato de etila, geralmente demonstram íons moleculares com abundância muito baixa, assim como este metabólito, no qual o sinal do íon molecular, encontrado na razão m/z 306. Outros sinais de alta intensidade, como em m/z 149 [$C_{11}H_{17}^+$], 95 [$C_7H_{11}^+$], 79 [$C_6H_7^+$] e 67 [$C_5H_7^+$] são provenientes de fragmentações que ocorreram subsequentes na cadeia carbônica do éster graxo.

A Figura 15 representa o espectro de um diterpeno. O constituinte Neofitadieno possui padrão de fragmentação: m/z 278 [$C_{20}H_{38}$], 123 [C_9H_{16}], 68 [C_5H_9] e 43 [C_4H_5], como observado no espectro obtido experimentalmente e confirmado na literatura (LEANDRO, 2011).

Figura 15 - Espectro do neofitadieno obtido a partir de análise da fase hexânica (resultante da partição do extrato etanólico de *Ageratum fastigiatum* por Cromatografia Gasosa-Espectrometria de massas



Fonte: Autor

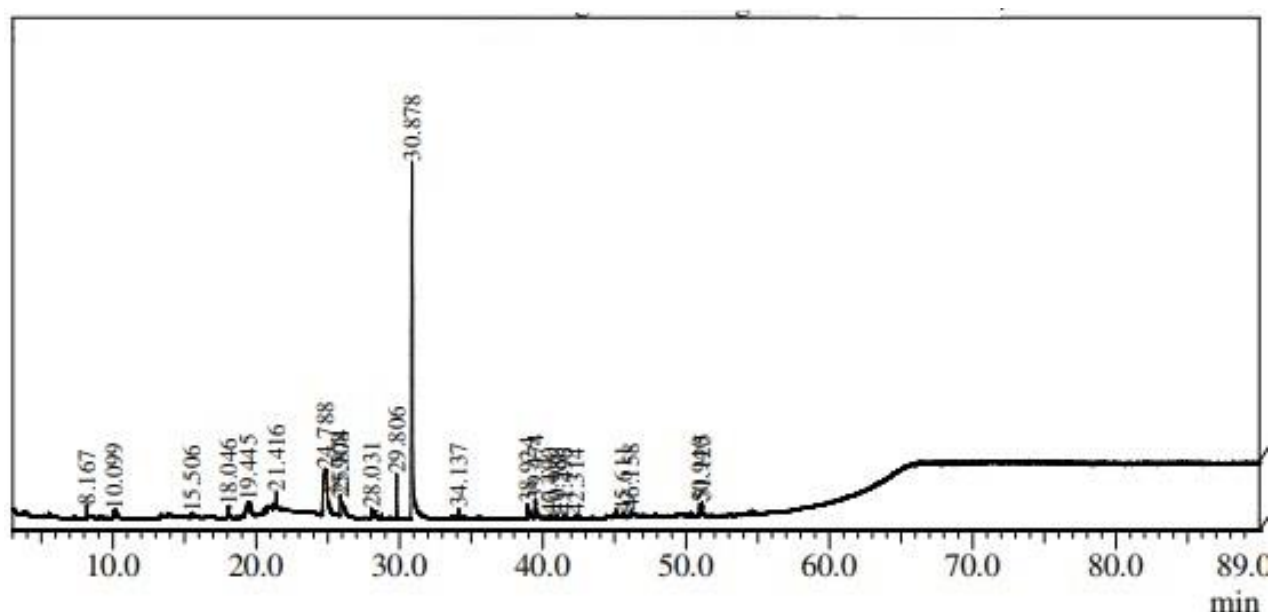
Atividades do ácido palmítico e do linolenato de etila já foram estudadas e foi observado que apresentam atividade anti-inflamatória; por outro lado, extratos vegetais apresentando neofitadieno em sua constituição também apresentam a mesma atividade. (APARNA *et al*, 2012; PARK *et al*, 2014). A planta tem seu uso popular vinculado a quadros de inflamação, dor e cicatrização. Esses lipídeos e o terpenóide descrito podem contribuir com a ação da planta, se estiverem presentes nas preparações de uso popular.

Pode-se destacar ainda os constituintes Humuleno, conhecido pela sua ação anti-inflamatória e analgésica atuando por bloqueio da ação da enzima ciclo-oxigenase 2; esta enzima, está presente no metabolismo das prostaglandinas, que são substâncias envolvidas nos processos inflamatórios e na sintomatologia desses processos (SANTOS,2007; DORES,2010) Dessa forma, a presença do Humuleno pode corroborar o uso da planta na medicinal popular como anti-inflamatório. Da mesma forma, os constituintes lupeol e acetato de lupeol devem contribuir para atividade medicinal popular da planta, pois estes terpenóides apresentam atividade anti-inflamatória em diversos modelos de inflamação cutânea relacionada com inibição da liberação de mediadores inflamatórios como a prostaglandina E2, fator de necrose tumoral- α e a interleucina 1- β e está associado à diminuição da produção de iNOS (enzima óxido nítrico sintase induzível).(FERNANDEZ, *et al*, 2001; LUCETTI *et al*, 2011).

5.1.6 Cromatografia gasosa da fase diclorometânica

A fase diclorometânica obtida do extrato etanólico das partes aéreas de *A. fastigiatum* foi analisada por CG-EM. O cromatograma resultante da análise está representado na Figura 16. As propostas de identificação de constituintes de encontram no Quadro 5.

Figura 16 - Cromatograma obtido em análise por cromatografia gasosa-espectrometria de massas da fase diclorometânica resultante da partição do extrato etanólico das partes aéreas de *Ageratum fastigiatum*



Fonte: Autor

Quadro 5 – Proposta de dados qualitativos e quantitativos dos compostos presentes na fase diclorometânica obtida por partição do extrato etanólico das partes aéreas da *Ageratum fastigiatum*

Pico	T.R> (min)	Nome	IS	CAS	Area do pico (%)
1	8.165	H-1-Piridina	92	270-91-7	0,76
2	10.099	*			2,11
3	15.505	Guaiacol -4-vinil	73	7786-61-0	0,45
4	18.046	*			1,08
5	19.445	Guanosina	85	118-00-3	5,57
6	21.415	*	88	10219-75-7	1,03

7	24.790	Metil β -D-glicopiranosídeo	89	709-50-2	19,19
8	25.874	*			1,41
9	25.908	*			3,04
10	28.030	Alcól Coniferílico	85	458-35-5	1,23
11	29.805	*		19078-37-6	3,07
12	30.880	*		58175-07-8	52,53
13	34.135	4- (2,5,6,6-Tetrametil-1-ciclo- hexen-1-il) -3-buten-2-ona	80	79-69-6	0,52
14	38.925	3'-Acetil licopsamina	84	73544-48-6	1,35
15	39.474	*			2,94
16	40.490	Propenal	72	318512-81-1	0,33
17	40.985	2- (1-Propenil) -4-metoxifenol	71	97-54-1	0,24
18	41.496	*			0,27
19	42.314	*			0,26
20	45.610	*			0,34
21	46.160	*			0,35
22	50.940	*			0,75
23	51.125	*			1,38

*Pico não identificado

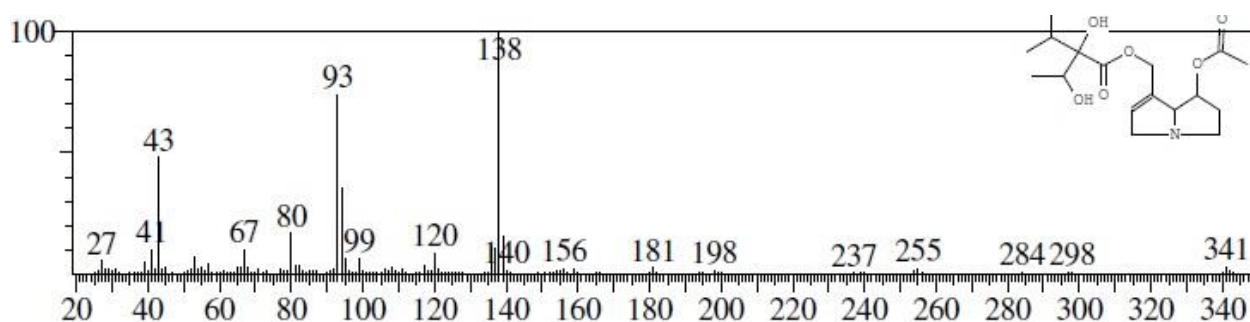
Foram detectados 23 constituintes, destes foram propostas as identificações de 12 constituintes. Entre eles estão compostos de metabolismo primário, como base nitrogenada e monossacarídeo. Foram detectados também um aldeído (propenal), uma cetona (3-buten-ona) e, especialmente compostos fenólicos: guaiacol, 2-(1-Propenil)-4-metoxifenol e álcool coniferílico) e um alcaloide, o 3'-acetil licopsamina. Esses constituintes não haviam sido descritos em trabalhos anteriores para esta espécie vegetal.

Na Figura 17 está representado o espectro, obtido experimentalmente, do alcaloide pirrolizidínico, acetil licopsamina. Na triagem fitoquímica da fase diclorometânica não houve detecção da classe dos alcaloides, isso pode ser explicado pelas reações típicas (Dragendorff, Mayer) serem mais sensíveis para alcaloides na forma de sal. Na fase diclorometânica devem prevalecer os alcaloides na forma de base livre. Além disso, a concentração dos alcaloides na fase diclorometânica poderia ser baixa o suficiente para não ser detectada na triagem usual. No entanto, sendo CG-EM mais sensível que a triagem clássica, foi possível sugerir a presença de

alcaloide através da técnica hifenada. Na triagem fitoquímica foi proposta a presença de alcaloides na fase hidroalcoólica.

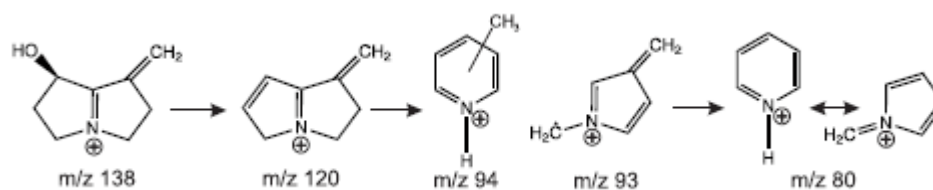
O espectro de massas (Figura 17) apresenta os sinais referentes aos fragmentos característicos de alcaloides pirrolizidínicos. O sinal de m/z 138 (pico base) deve ter originado da clivagem do ester alílico evidenciando a presença de um grupo OH no carbono C-3 (WITTE et al., 1993). Os íons de m/z 138, 94, 93 e m/z 80 tiveram suas formações sugeridas por um mecanismo de segmentação α , que por sua vez originou o íon de m/z 93 por uma cisão homolítica entre C-5 e C-6 e entre C-7 e C-8, seguido de rearranjo. A formação sugerida dos íons fragmentos podem ser observada na Figura 18.

Figura 17 – Espectro da acetil-licpsamina obtido a partir de análise da fase diclorometânica (resultante da partição do extrato etanólico de *Ageratum fastigiatum* por Cromatografia Gasosa-Espectrometria de massas



Fonte: Autor

Figura 18 – Fragmentação proposta da acetil-licopasamina



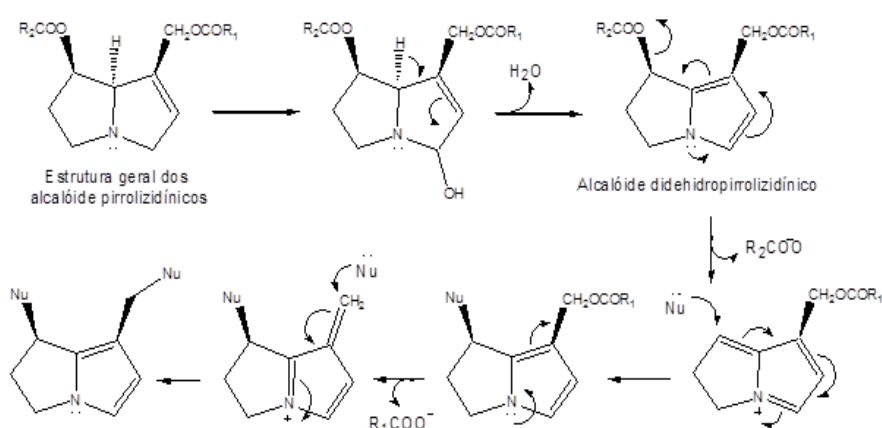
Fonte: JIMENEZ (2013)

Os alcaloides pirrolizidínicos e as plantas que os contém são assuntos de pesquisas científicas porque muitas destas plantas são utilizadas na medicina tradicional (WIEDENFELD & RÖDER, 1984). Esses alcaloides são encontrados principalmente em plantas das famílias Boraginaceae, Fabaceae, e nas tribos Senecioneae e Eupatorieae da família Asteraceae (WIEDENFELD & RÖDER, 1991). O primeiro relato da presença desses alcaloides pirrolizidínicos no gênero *Ageratum* foi feito com a espécie *Ageratum conyzoides* por

WIEDENFELD & RÖDER (1991), sendo encontrado a licopsamina. A ingestão de alcaloides pirrolizidínicos por seres humanos ocorre através de alimentos, ou através do uso de plantas medicinais (MOLYNEUX et al., 2011). No entanto, esses alcaloides são considerados potencialmente tóxicos e cancerígenos, com tropismo hepático.

Os efeitos tóxicos e cancerígenos dos alcaloides pirrolizidínicos estão relacionados com a sua estrutura química. Apenas os alcaloides 1,2-insaturados são capazes de serem metabolizados a intermediários hepatotóxicos, enquanto os alcaloides saturados não são hepatotóxicos. (Figura 19) (WIEDENFELD & RÖDER, 1984).

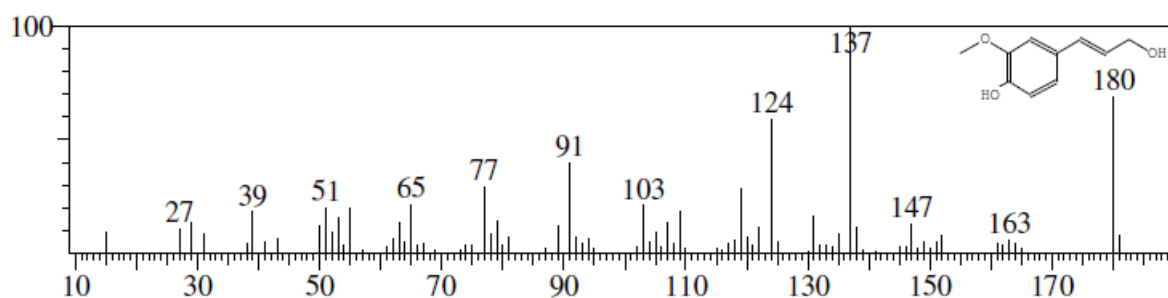
Figura 19 – Esquema do mecanismo de formação do pirrol reativo (didehidropirrolizidínico) e posteriores modificações nucleofílicas de alcaloides pirrolizidínicos



Fonte: FRESNO (1999)

O álcool coniferílico (coniferol) é classificado como um fenilpropanóide ou monolignol e é um dos precursores para a formação das ligninas, comum em vegetais lenhosos arbustivos ou arbóreos (MARTÍNEZ et al., 2009). O espectro de massas do coniferol (Figura 20) apresenta o pico do íon molecular intenso (m/z 180); isso ocorre, pois a presença do anel aromático na molécula estabiliza o fragmento que gera o pico. O pico base (m/z 137) se forma pela perda de um $-COCH_3$. O pico em m/z 91 confirma a presença do anel aromático com cadeia carbônica lateral; essa cadeia pode perder o grupo $-COCH_3$ e o fragmento resultante origina, por rearranjo, um fragmento estável, o íon tropílio (C_7H_7) (SILVERSTEIN et al., 2007). Nos espectros de massas dos fenóis é encontrado um pico com m/z 77 e um pico correspondente à perda de um $-CO$. (MCLAFFERT & TURECEK, 1993; SILVERSTEIN et al., 2007).

Figura 20 – Espectro do álcool coniferílico obtido a partir de análise da fase diclorometânica (resultante da partição do extrato etanólico de *Ageratum fastigiatum* por Cromatografia Gasosa-Espectrometria de massas



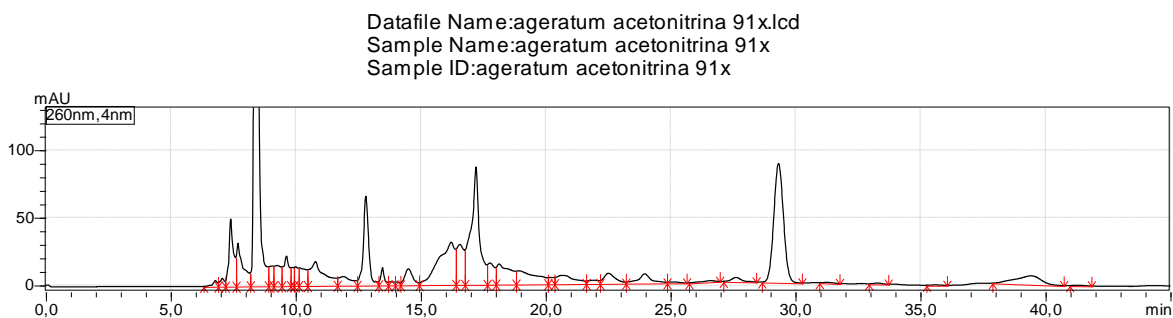
Fonte: Autor

O álcool coniferílico é um constituinte que apresenta atividade anti-inflamatória, provavelmente por inibição de produção de NO (KIM, *et al* 2012). Pode-se destacar o Guaiacol-4-vinil que de acordo com a literatura pode resultar da degradação de compostos fenólicos como a curcumina. Esses compostos fenólicos e seus produtos de degradação possuem atividade biológica significativa, como propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias regula negativamente os níveis de mRNA de IL-6 em macrófagos murinos em células cultivadas (ESATBEYOGLU, *et al.*, 2015). Dessa maneira, esses compostos fenólicos, junto a outros constituintes podem contribuir para os efeitos relatados para a planta na medicina popular.

5.1.7 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a Detector por arranjo de diodos (CLAE/DAD) do extrato hidroalcoólico

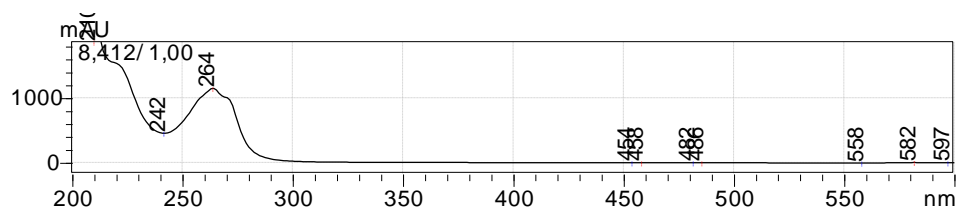
A fração hidroalcoólica do extrato etanólico das partes aéreas de *A. fastigiatum* foi avaliada por CLAE/DAD, obtendo-se o cromatograma e o espectro de um dos componentes da mistura gerados pelo detector UV-DAD, representados respectivamente nas Figura 21 e Figura 22.

Figura 21 - Cromatograma obtido pela Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector por arranjo de diodos (CLAE-DAD) para a fração hidroalcoólica do extrato etanólico das partes aéreas de *Ageratum fastigiatum*



Fonte: Autor

Figura 22 - Espectro obtido pela Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector por arranjo de diodos (CLAE-DAD) do componente eluído no tempo 7,67 min, presente na fração hidroalcoólica do extrato etanólico das partes aéreas de *Ageratum fastigiatum*



Fonte: Autor

No espectro obtido é possível observar uma banda de absorção com λ máximo de 205 nm e uma banda de menor intensidade de 264 nm evidenciando a presença de um sistema aromático e/ou insaturações conjugadas (SILVERSTEIN, *et al*, 1994). Os demais espectros obtidos a partir de outros componentes da amostra apresentaram um perfil muito semelhante. Devido a ausência de padrões de constituintes fenólicos ou com grupos cromóforos para comparação, não é possível, no momento, obter mais informações sobre os constituintes químicos da fase hidroalcoólica. A triagem fitoquímica detectou na fase hidroalcoólica a presença de constituintes fenólicos, tais como cumarinas e taninos, dessa forma, esses espectros

de UV-Vis de substâncias com grupos cromóforos vêm reforçar os resultados da triagem clássica.

5.2 ENSAIOS BIOLÓGICOS

5.2.1 Padronização do bioensaio com *Artemia salina*

Os resultados dos testes realizados para a padronização do bioensaio com *A. salina* estão apresentados no Quadro 6:

Quadro 6 - Resultados dos testes com variação de temperatura da água, aeração, pH, concentração de sal marinho e luminosidade para padronização do bioensaio com *Artemia salina*.

PARÂMETRO AVALIADO	Motilidade dos náuplios após 24h de eclosão dos cistos	
TEMPERATURA (°C)	26	+
	27	+
	28	+++
	29	+++
	30	++
AERAÇÃO	Média	+++
	Baixa	+
pH	7	+
	8	+++
	9	++
CONCENTRAÇÃO SAL MARINHO (g/L)	15	+++
	30	+
LUMINOSIDADE	Ciclo/claro-escuro 12h	+

Claridade
durante 24h

+++

+: baixa motilidade dos náuplios;

++: média motilidade dos náuplios;

+++: alta motilidade dos náuplios.

Fonte: Autor

A temperatura foi um fator limitante na padronização do ensaio, pois em determinadas temperaturas os cistos não eclodiam ou, se eclodiam, as artêmias não sobreviviam por muito tempo (morriam em média após 12 horas). O melhor resultado foi à temperatura de 28°C.

A intensidade de aeração deve ser média para que os náuplios sobrevivam por mais tempo. Baixa aeração não era suficiente para mantê-los vivos por mais tempo, bem como a aeração intensa.

Observou-se que experimentalmente que, de acordo com Meyer e colaboradores (1982) e Lima e colaboradores (2011), o pH deve estar ajustado entre 8 a 9 e a cultura deve ser iluminada durante todo processo, sem ciclos de claro-escuro, para melhor viabilidade das artêmias.

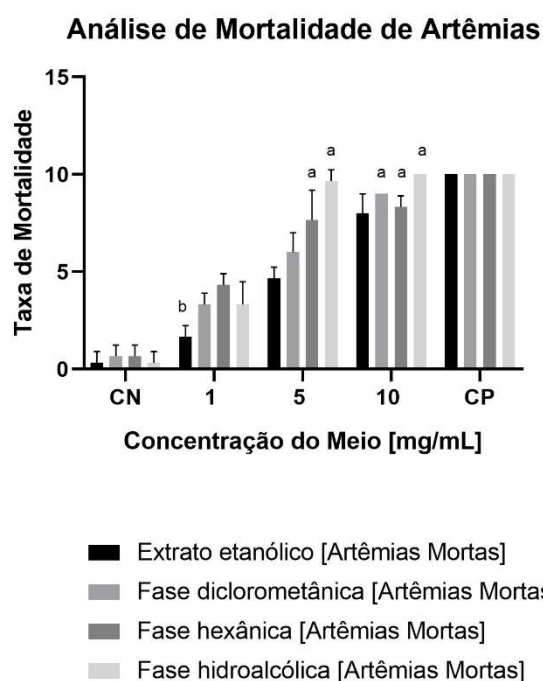
Nas concentrações avaliadas do sal marinho, houve uma maior mobilidade das artêmias na concentração de 15g/L, sendo essa melhor condição para o parâmetro de salinidade.

Assim, foram definidas as condições para serem conduzidas os ensaios de toxicidade do extrato de *A. fastigiatum* e de suas frações sobre *A. salina*.

5.2.2 Avaliação da toxicidade utilizando Artemia salina

Nas análises de mortalidade das artêmias (Figura 23), o extrato etanólico foi o considerado como o menos tóxico em comparação com as fases (frações), não sendo capaz de matar todas as artêmias na maior concentração (10mg/mL) e tendo a atividade de sua concentração mínima (1mg/ml) comparável à do controle negativo. Já nas análises com a fase diclorometânica ocorreram mais mortes dos espécimes, com efeito máximo na concentração máxima (10mg/ml). A fase hexânica e a hidroalcóolica na concentração média (5mg/ml) já causaram mortalidade praticamente de todos os espécimes.

Figura 23– Avaliação da toxicidade do extrato etanólico das partes aéreas de *Ageratum fastigiatum* e de suas frações hexânica, diclorometânica e hidroalcoólica sobre viabilidade de larvas de *Artemia salina*



a: Não possui diferença estatística significativa em relação ao Controle Positivo (CP) (Amostra one way/ Teste de tukey <0,01)

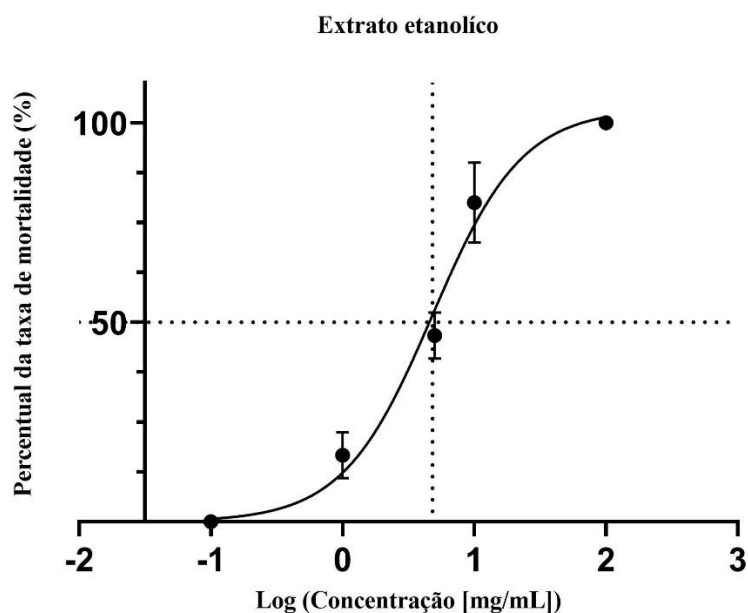
b: Não possui diferença estatística significativa em relação ao Controle Negativo (CN) (Amostra one way/teste de tukey p<0,01)

Fonte: Autor

Nas análises dos valores de CL_{50} , o extrato etanólico obteve CL_{50} de 4,814mg/mL e foi considerada a amostra com menor toxicidade (Figura 24). As Figuras 25, 26, 27 apresentam gráficos indicativos da CL_{50} das fases hexânica, diclorometânica e hidroalcoólica, respectivamente. Na fase diclorometânica houve um aumento nas mortes, podendo ter sido ocasionada pela maior concentração de substâncias tóxicas em relação à sua concentração presente no extrato bruto, obtendo CL_{50} de 2,592mg/mL (Figura 25). A fase hexânica proporcionou maior toxicidade às artêmias, chegando a CL_{50} igual 1,459mg/mL (Figura 26). Já a fase hidroalcoólica pode ser considerada a mais tóxica, apresentando CL_{50} de 1,333mg/mL

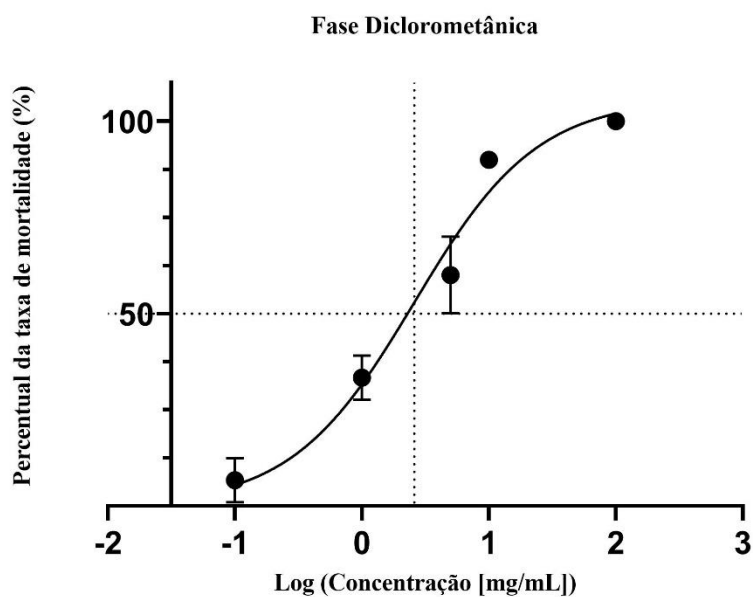
(Figura 2727). Obviamente a toxicidade ocorre devido a presença de metabólitos diversos, não sendo possível atribuir a ação um único metabólito ou classe de metabólitos, uma vez que a composição desses produtos de de *A. fastigiatum* são qualitativamente e quantitativamente complexa. Provavelmente, a combinação de diferentes metabólitos é responsável pelas atividades biológicas de um extrato ou de suas frações.

Figura 24 – Gráfico da CL₅₀ do extrato etanólico das partes aéreas de *Ageratum fastigiatum* sobre náuplios de *Artemia salina*



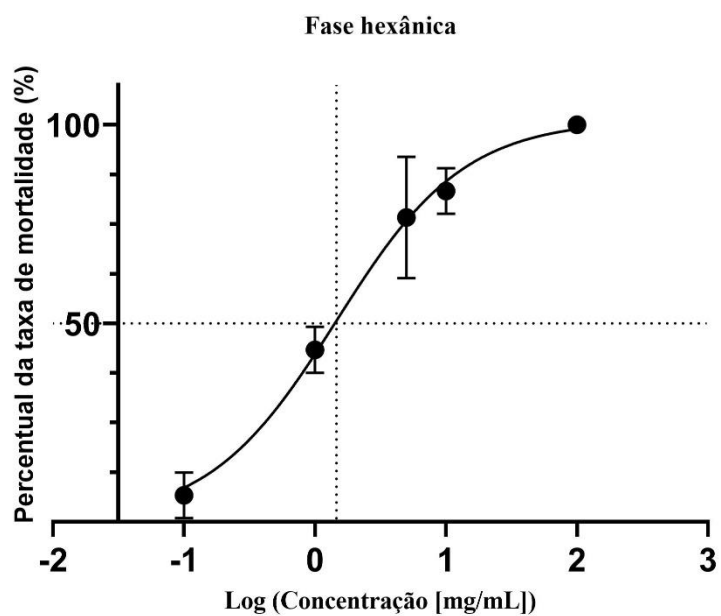
Fonte: Autor

Figura 25 – Gráfico da CL₅₀ da fase diclorometânica do extrato etanólico das partes aéreas de *Ageratum fastigiatum* sobre náuplios de *Artemia salina*



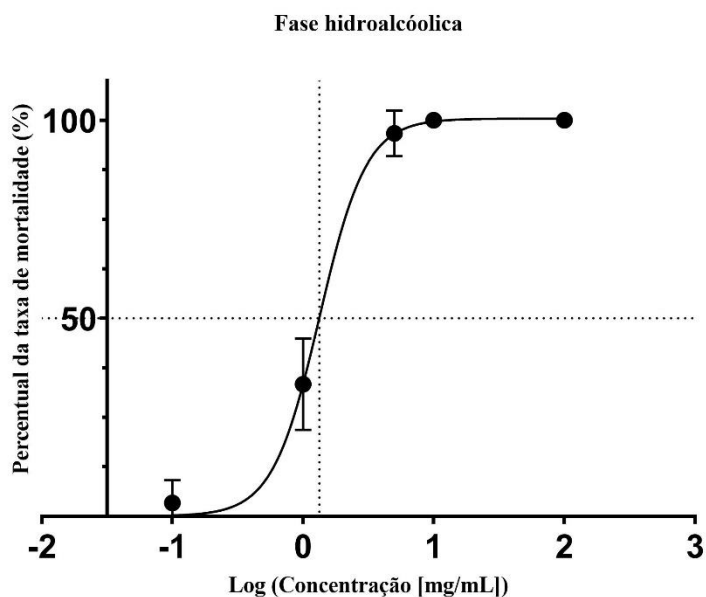
Fonte: Autor

Figura 26– Gráfico da CL₅₀ da fase hexânica do extrato etanólico das partes aéreas de *Ageratum fastigiatum* sobre náuplios de *Artemia salina*



Fonte: Autor

Figura 27 – Gráfico da CL₅₀ da fase hidroalcoólica do extrato etanólico das partes aéreas de *Ageratum fastigiatum* sobre náuplios de *Artemia salina*



Fonte: Autor

Meyer e colaboradores (1982) estabeleceram uma relação entre o grau de toxicidade e a dose letal média, CL_{50} , apresentada por extratos de plantas sobre larvas de *A. salina*. Desde então, considera-se que quando são verificados valores acima $1.000 \mu\text{g/ml}$ (1mg/ml), estes, são considerados atóxicos. Nas análises realizadas com *A. fastigiatum* a CL_{50} foi maior que 1mg/ml , assim pode-se considerar que o extrato e as fases apresentam baixa toxicidade às larvas de *A. salina*. Dessa forma, os constituintes químicos presentes no extrato e nas fases tem baixa toxicidade para as artemias devido à complexidade de interações entre as diferentes moléculas presentes e/ou devido sua baixa concentração no extrato ou nas fases ou ainda, devido à resistência do crustáceo a certas substâncias e às concentrações em que se apresentam.

5.2.3 Avaliação da citotoxicidade do extrato etanólico bruto e de suas fases

O extrato etanólico bruto, as fases hexânica, diclorometânica e hidroalcoólica das partes aéreas de *Ageratum fastigiatum* apresentaram diferentes graus de toxicidade sobre as células L929. Os valores de CC_{50} (Concentração que inibe 50% das células) variaram de $11,39$ a $174,2 \mu\text{g/mL}$ (tabela 3) e, a fração diclorometânica foi a mais tóxica frente à linhagem de fibroblastos, chegando a reduzir $95,48\%$ da viabilidade das células na maior concentração testada. O extrato etanólico bruto promoveu um percentual de morte celular que variou de $92,42$

a 32,33%, com faixa de concentração tóxica de 1000 a 15,62 $\mu\text{g/mL}$ e CC_{50} de 62,92 $\mu\text{g/mL}$ frente à linhagem L929 (Figura 28, Tabela 3).

Na análise da citotoxicidade das frações obtidas a partir do extrato etanólico bruto, foi observado que a mesmas também apresentaram elevada toxicidade sobre as células L929. A fração hexânica foi significativamente tóxica na faixa de concentração de 1000 a 7,81 $\mu\text{g/mL}$, com percentual de morte celular variando de 93,84 a 33,34% e CC_{50} de 36,69 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 28, Tabela 3). A fração diclorometânica também apresentou toxicidade para as células L929 em todas as concentrações testadas (1000 a 7,81 $\mu\text{g/mL}$), sendo a fração que mais reduziu a viabilidade destas células, com percentual de morte celular variando de 95,48 a 47,15% e CC_{50} de 11,39 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 28, Tabela 3). A última fração avaliada frente às células de mamífero foi a hidroalcoólica, apresentando porcentagem de morte celular variando de 55,67 a 19,38, com faixas de concentração citotóxica de 1000 a 125 $\mu\text{g/mL}$ e CC_{50} de 174,2 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 28, Tabela 3).

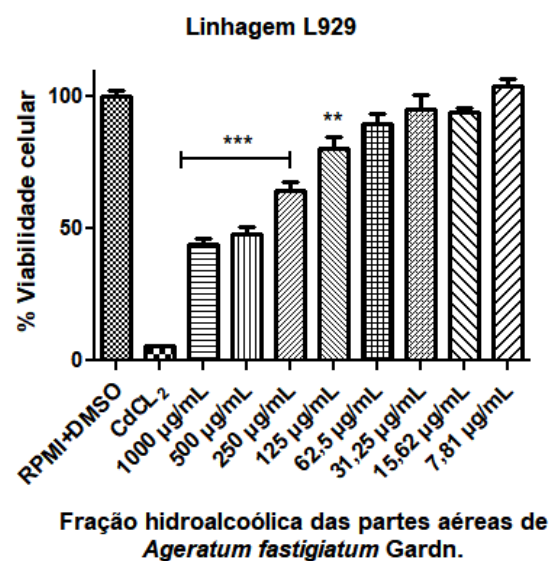
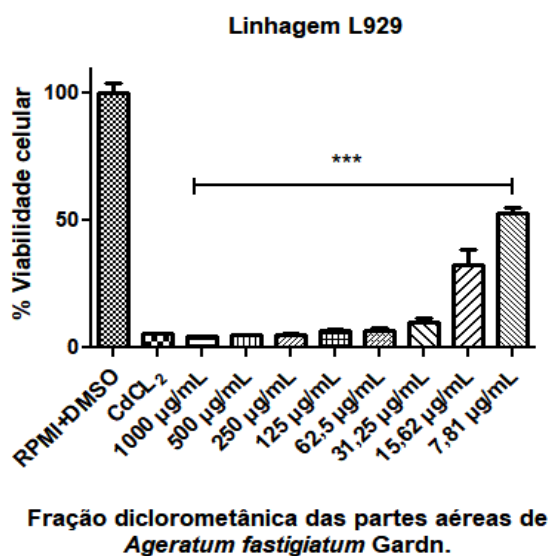
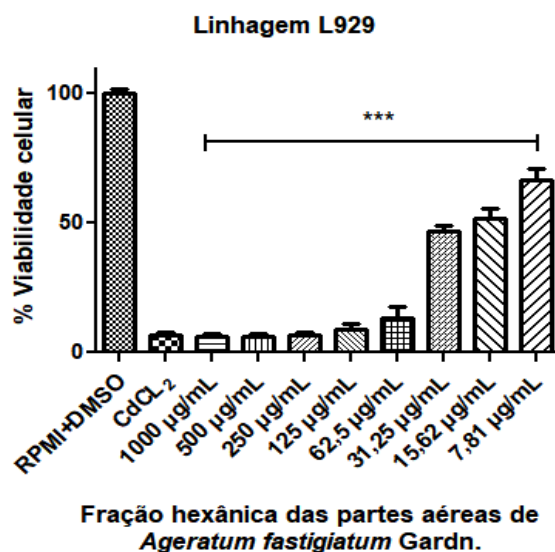
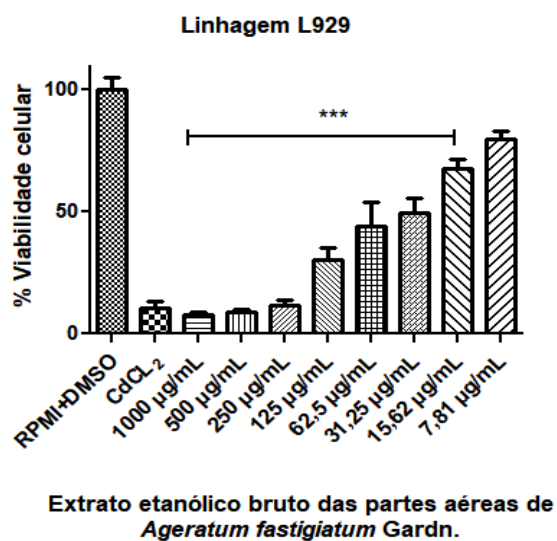
Tabela 3 - Resultados da avaliação da citotoxicidade do extrato etanólico bruto e frações das partes aéreas da espécie vegetal *Ageratum fastigiatum* sobre células L929

Extrato/Fração	Faixa de Concentrações Ativas (Fc) (µg/mL)	% de Morte Celular (Mc)	CC₅₀ (µg/mL)
Extrato etanólico	1000 a 15,62	92,42 a 32,33	62,92
Fase Hexânica	1000 a 7,81	93,84 a 33,34	36,69
Fase Diclorometânica	1000 a 7,81	95,48 a 47,15	11,39
Fase Hidroalcoólica	1000 a 125	55,67 a 19,38	174,2

Fc = faixa de concentrações ativas (diferenças significativas em $p < 0,05$, intervalo de confiança de 95% comparada aos respectivos controles negativos ou viabilidades); Mc = redução das viabilidades celulares observadas para a maior e menor concentração ativa do extrato; CC₅₀ = Concentração que inibe 50% das células. Os resultados apresentam a avaliação de três experimentos independentes realizados em triplicata.

Fonte: Autor

Figura 28 - Avaliação da citotoxicidade do extrato etanólico bruto e frações das partes aéreas de *Ageratum fastigiatum* sobre a linhagem L929.



Os resultados foram expressos como média do percentual de viabilidade celular \pm desvio padrão de três experimentos, realizados em triplicata e estes foram comparados com os resultados obtidos para o controle de crescimento (RPMI ou MEM+DMSO). (**) e (***) correspondem as diferenças significativas com $p \leq 0,01$ e $p \leq 0,0001$ respectivamente, considerando intervalo de confiança de 95%.

Fonte: Autor

Segundo Rajabi (2005) testes realizados utilizando o MTT em células L929 e o bioensaio utilizando *artemia salina* são comparáveis, assim, apesar de não se observar

toxicidade elevada sobre as artemias, pode-se perceber uma toxicidade maior sobre cultura de células. Isso foi observado, pelo menos, nas concentrações avaliadas, nas metodologias, e nos tipos de célula de organismo pluricelular empregados.

Diferenças de toxicidade em diferentes células e em diferentes organismos podem ocorrer, pois a toxicidade pode estar envolvida com os tipos de substâncias presentes em extratos e os tipos de receptores presentes em células isoladas ou em um organismo. Além disso, um organismo pluricelular tem a bioquímica e a compartimentalização (em sistemas) mais complexa que a de uma célula.

É possível afirmar que mais estudos de toxicidade com extratos de *A. fastigiatum*, especialmente conduzidos com animais mamíferos e em diferentes modelos experimentais, devem ser realizados para se avaliar melhor essa questão.

De qualquer maneira, foi proposta a presença de substância tóxica, pertencente a classe de alcaloides pirrolizidínicos, em *A. fastigiatum*. Esse dado é importante para se repensar os estudos que se façam com *A. fastigiatum* com objetivo de se obter fitoterápicos. De antemão, pode-se indicar que um uso mais seguro da planta (ou de futuros fitoterápicos) seja pela via tópica, como ocorre com o confrei ou *Symphitum officinales* (agente cicatrizante).

Os dados dessa pesquisa poderão direcionar os estudos que relacionam constituintes tóxicos de plantas. Isso é muito importante, porque muitas plantas utilizadas popularmente podem ser tóxicas, cancerígenas ou causar efeitos colaterais que a população que as utiliza, ainda não conhece. Assim, futuros estudos científicos sobre tais plantas, poderão esclarecer as pessoas sobre as virtudes ou os perigos desses recursos naturais. Um exemplo clássico é o do *Shymphytum officinale* L., planta originária da Europa e da Ásia, introduzida e utilizada no Brasil: o confrei, como é conhecido, foi usado durante muito tempo na medicina popular como agente cicatrizante (uso tópico) e para tratamento de úlceras gástricas (uso oral). Essa ação cicatrizante se deve à presença de alantoína. No entanto, após estudos sobre a planta foi descoberta a presença de alcalóides pirrolizidínicos, substâncias comprovadamente hepatotóxicas e cancerígenas. Assim, atualmente, o uso do confrei por via oral é condenado, recomendando-se o seu uso tópico durante períodos curtos (4 a 6 semanas ao ano) (FRESNO, 1999; LORENZI & MATOS, 2002; BRASIL, 2004).

A toxicidade observada nos ensaios deve ser devida não só à presença do alcaloide, mas de um grupo de substâncias pertencentes a classes químicas diversas. O

extrato e as fases ou frações são fitocomplexos, assim diversos constituintes concorrem para a atividade biológica (terapêutica ou tóxica) desses produtos vegetais.

6. CONCLUSÕES

Através de estudos fitoquímicos foi detectado no extrato etanólico de *A. fastigiatum* um alcaloide potencialmente tóxico, além de outros metabólitos que ainda não haviam sido descritos na literatura para esta planta medicinal e que apresentam atividade anti-inflamatória.

A realização de estudos de toxicidade em dois diferentes modelos experimentais detectou citotoxicidade de produtos da planta.

Dessa forma, a presença de alcaloide pirrolizidínico e a citotoxicidade detectada são importantes dados para orientar mais pesquisas de preparações da planta que já são usadas empiricamente pela medicina popular, bem como reavaliar estudos com a planta na intenção de se produzir fitoterápico com seu extrato. Além, claro, de orientar um uso popular mais cauteloso ou controlado dos preparos medicinais da planta.

No entanto, estudos toxicológicos utilizando outros modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* devem ser realizados para esclarecer a toxicidade no uso dessa planta medicinal pela população humana. E a detecção de citotoxicidade pode ser um indicativo de que seria interessante realizar pesquisas no intuito de se avaliar ação antitumoral de extratos e de substâncias isoladas da planta.

Por outro lado, a proposição da presença de constituintes sabidamente anti-inflamatórios no extrato etanólico é importante para corroborar o uso da planta e de seus produtos na medicina popular.

Concluindo, este trabalho é uma contribuição para a construção de um conhecimento maior sobre *A. fastigiatum*, planta medicinal nativa e utilizada pela população da região onde a UFVJM está inserida.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, L. M. S.; CAMARGO, A. J. A. Cerrado: Ecologia e Caracterização. Brasília, DF. **Embrapa Informação Tecnológica**; Planaltina, DF. Embrapa Cerrados, p. 249, 2004.

AKINYEMI, K. O.; OLADAPO, O.; OKWARA, C. E.; IBE, C. C.; FASURE, K. A. Screening of crude extracts of six medicinal plants used in SouthWest Nigerian unorthodox medicine for antimethicillin resistant *Staphylococcus aureus* activity. **BMC complementary and alternative medicine**, vol. 5, n. 1, p. 6-8, 2005.

ALMASSY LOPES, R. C.; ARMOND, C.; SILVA, F.; CASALI, V. W. D. Folhas de chá: plantas medicinais na terapêutica humana, 1 ed., Viçosa: UFV, 2005.

ALMEIDA, A. M.; PRADO, P. I.; LEWINSOHN, T. M. Geographical distribution of Eupatorieae (Asteraceae) in southeastern and south Brazilian mountain ranges. **Plant Ecol**, vol. 174, p. 163-181, 2004.

ALVES, H. M. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**. n. 3, p.10-15, 2001.

AMAL, M. M. N.; SAMI, A. K.; MARCEL, K.; RETO, B.; WAI, E. A.; THOMAS, J. S. The antiprotozoal activity methylated flavonoids from *Ageratum conyzoides* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129 p. 127–130, 2010.

AMARANTE C. B., Müller; A. H., Póvoa; M. M., DOLABELA M. F. Phytochemical study bioassay-guided by tests of toxicity on *Artemia salina* and antiplasmodial activity from stem of aninga (*Montrichardia linifera*). **Acta Amazon**, vol. 41, p. 431–434, 2011.

ANDERSON, J. E.; GOETZ, C. M.; McLAUGHLIN, J. L.; SUFFNESS, M. A blind comparison of simple bench-top bioassay and human tumour cell cytotoxicities as antitumor prescreens. **Phytochem Analysis**, vol. 2, p. 107-111, 1991.

APARNA, V.; DILLEP, K. V.; MANDAL, P. K.; KARTHE, P.; SADASIVAN, C.; HARIDAS, M. Anti-inflammatory property of n-hexadecanoic acid: structural evidence and kinetic assessment. *Chemical Biology Drugs*, vol. 80, p. 434–439, 2012.

ARAÚJO, S.; TEXEIRA SILVA, M. F. S.; DANTAS, T. V. M. et al. Avaliação in vitro da atividade citotóxica de drogas antivirais em fibroblastos caprinos. **Ciência Animal**, vol. 18, n. 1, p.25-31, 2008.

ARCANJO, D. D. R, Bioactivity evaluation against *Artemia salina* Leach of medicinal plants used in Brazilian Northeastern folk medicine. **Brazilian Journal of Biology.**, São Carlos, vol. 72, n. 3, p. 505-509, 2012.

AVELAR-FREITAS, B. A. **Análise da composição química, atividade citotóxica e inibição de citocinas in vitro de preparações de partes aéreas da planta *Ageratum fastigiatum***. Tese (Doutorado pelo curso Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2013.

AVELAR-FREITAS, B. A.; ALMEIDA, V. G.; SANTOS, M. G.; SANTOS, J. A. T.; BARROSO, P. R.; GRAEL, C. F. F.; GREGÓRIO, L. E.; ROCHA-VIEIRA, E.; BRITO-MELO, G. E. A. Essential oil from *Ageratum fastigiatum* reduces expression of the pro-inflammatory cytokine tumor necrosis factor-alpha in peripheral blood leukocytes subjected to in vitro stimulation with phorbol myristate acetate. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 2, p. 129–133. 2015.

AVELAR-FREITAS, B. A.; DIAS, J.V.L.; TIBÃES, C.G; ROCHA, C.A.; BAHIA-OLIVEIRA, G.H.; GRAEL, C.F.F, PIRES, H.H.R The effect of *Ageratum fastigiatum* extract on *Rhodnius nasutus*, vector of Chagas disease. **Revista Brasileira de Farmacognosia.**, v.23, n.2, p.366-369, 2013.

AVELAR-FREITAS, B. A.; LUCAS, A. C.; VALÉRIA, G. A.; MICHAELLE, G. S, GRAEL, C. F. F.; GREGÓRIO, L. E.; ROCHA-VIEIRA, E.; BRITO-MELO, G. E. A. The effect of ethanolic and ethyl acetate extracts of *Ageratum fastigiatum* (Asteraceae)

on cytokine production in lymphocytes stimulated in vitro with PMA (Phorbol Myristate Acetate). **Academia Journal of Medicinal Plants**, v. 1, n. 4, p. 111-115, 2013.

AVELAR-FREITAS, Bethânia A. **Análise da composição química, atividade citotóxica e inibição de citocinas in vitro de preparações de partes aéreas da planta *ageratum fastigiatum***. Tese (Doutorado) – Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2013.

BALADRIN, M. F.; KLOCKE, J. A.; WURTELE, E. S.; BOLINGER, W. H. Natural plant chemicals: Sources of industrial and medicinal materials. **Science**, vol. 228, n. 4304, p. 1054-1060, 1985.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, n. 5, p. 431-441, 2005.

BOHLMANN, F.; AHMED, M.; KING, R. M.; ROBINSON, H. Labdane and eudesmane derivatives from *Ageratum fastigiatum*. **Phytochemistry**, vol. 20, p. 1434-1435, 1981.

BOHLMANN, F.; LUDWIG, G. W.; JAKUPOVIC, J.; KING, R. M.; ROBINSON, H. A. Daucanolide further farnesene derivatives from *Ageratum fastigiatum*. **Phytochemistry**, vol. 22, p. 983-986, 1983.

BORTHAKUR, N.; BARUAH, A. K. S.; BHAGAT, S. D. Search for precocenes in *Ageratum conyzoides* Linn of North-East India. **Journal of the Indian Chemical Society**, v. 64, n. 9, p. 580–581, 1987.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos**. Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. – Brasília: Ministério da Saúde, p. 148, 2006.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Programa nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. Brasília - DF, 2008.

BRASIL/ ANVISA. Resolução RE nº89, de 16 de março de 2004. Lista de registro simplificado de fitoterápicos. **Diário Oficial da União**; Poder Executivo, 18 de março de 2004.

BUTER, B.; ORLACCHIO, C.; SOLDATI, A.; BERGER, K. Significance of genetic and environmental aspects in the field cultivation of *Hypericum perforatum*. **Planta Medica**, vol. 64, n. 5, p. 431-437, 1998.

CALABRIA, L. M.; EMERENCIANO, V. P.; SCOTTI, M. T.; MARBY, T. J. Systematics, Evolution, and biogeography of Compositae. **International Association for Plant Taxonomy**, Vienna, Austria, p. 73-88, 2009.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, vol. 55, n. 3, p. 37-39, 2003.

CAMPOS, D. R.; YONAMINE, M.; ALVES, M. J. N. N.; MOREAU, R. L. M. Determinação de esteróides androgênicos anabólicos em urina por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas **Revista Brasileira Ciências Farmacêuticas**, vol. 41, n. 4, 2005.

CARVALHO, J. C. T. Fitoterápicos antiinflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. **Tecmedd**. Editora, São Paulo, 2004.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O Estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, vol. 31, n. 3, p. 623-636, 2008.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 6^a ed. Lisboa, Portugal: Fundação Calouste Gulbenkian, 2002.

COSTA, A. F. *Farmacognosia*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1031p, 2002.

COSTA, L. A. **Efeito do extrato etanólico de *Ageratum fastigiatum* (Gardn.) R. M. King et H. Rob. e de sua fração sobre a produção de citocinas e proliferação de linfócitos humanos, in vitro**. Dissertação (Mestrado) – Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2016.

CRISTIE, W. W. Mass Spectrometry of Unesterified Fatty acids and their Trimethylsilyl Esters. **The Lipid Web**. Acesso em 29 de dezembro de 2018. Disponível em: <<http://www.lipidhome.co.uk/ms/others/ffa-tms/index.htm>. 2018>.

DEL-VECHIO-VIEIRA, G.; BARBOSA, M. V. D.; LOPES, B. C.; SOUSA, O. V.; SANTIAGO-FERNANDES, L. D. R.; ESTEVES, R. L.; KAPLAN, M. A. C. Caracterização morfoanatômica de *Ageratum fastigiatum* (Asteraceae). **Braz. J. Pharmacog**, vol. 18, p. 769-776, 2008.

DEL-VECHIO-VIEIRA, G.; BARBOSA, M. V. D.; LOPES, B. C.; SOUSA, O. V.; SANTIAGO-FERNANDES, L. D. R.; ESTEVES, R. L.; KAPLAN, M. A. C. Caracterização morfoanatômica de *Ageratum fastigiatum* (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol. 18, p. 769-776, 2008.

DEL-VECHIO-VIEIRA, G.; BARBOSA, M. V. D.; LOPES, B. C.; SOUSA, O. V.; SANTIAGO-FERNANDES, L. D. R.; ESTEVES, R. L.; KAPLAN, M. A. C. Caracterização morfoanatômica de *Ageratum fastigiatum* (Asteraceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, vol. 18, p. 769-776, 2008.

DEL-VECHIO-VIEIRA, G.; SOUSA, O. V.; MIRANDA, M. A.; SENNA-VALLE, L.; KAPLAN, M. A. C. Analgesic and Anti-inflammatory Properties of essential Oil from

Ageratum fastigiatum. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, vol. 52, ed. 5, p. 1115-1121, 2009.

DEL-VECHIO-VIEIRA, G.; SOUSA, O. V.; YAMAMOTO, C. H.; KAPLAN, M. A. C. Atividades antinociceptiva e antimicrobiana de *Ageratum fastigiatum* (Gardn.) R. M. King et H. Rob. (Asteraceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, vol. 88, p. 181-184, 2007.

DI STASI, L. C. Plantas Mediciniais: Arte e Ciência. São Paulo, SP: Unesp, 1996.

DORES, R. G. R.; REHDER, V. L. G.; DUARTE, M. C. T. Validação do uso popular de alguns extratos e óleos essenciais medicinais. **Informe Agropecuário**, vol. 31, ed. 255, p. 40-46, 2010.

DOS SANTOS, D. C.; DAVID B., J. M.; DAVID C., J. P. Composição química, atividade citotóxica e antioxidante de um tipo de própolis da Bahia. **Quim Nova**, vol. 40, p. 171-175, 2017.

DUTTA, A.; BANDYOPADHYAY, S.; MANDAL, C. Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis. **Parasitology International**, vol. 54, p.119-22, 2005.

ELISABETSKY, E.; SIMÕES, E.P. Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 5^a ed. Da UFRGS/UFSC, p. 107-122, 2004.

EMERENCIANO, V. P.; MILITÃO, J. S. L. T.; CAMPOS, C. C.; ROMOFF, P.; KAPLAN, M. A. C.; ZAMBON, M.; BRANT, A. J. C. Flavonoids as chemotaxonomic markers for Asteraceae. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29, n. 9, p. 947-957, 2001.

ESATBEYOGLU, T.; ULBRICH, K.; REHBERG, C.; ROHN, S.; RIMBACH, G. Thermal stability, antioxidant, and anti-inflammatory activity of curcumin and its degradation product 4-vinyl guaiacol. *Food Function*, vol. 6, p. 887–893, 2005

FERNANDEZ, M. A.; DE LAS HERAS, B.; GARCIA, M. D.; SAENZ, M. T., VILLAR, A. New insights into the mechanism of action of the anti-inflammatory triterpene lupeol. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*., vol: 53:p. 1533-1539, 2001.

FRANKLIN OHIKHENA, Uangbaoje; Olubunmi, WINTOLA ABOSEDE; Anthony, JIDE AFOLAYAN. Toxicity Assessment of Different Solvent Extracts of the Medicinal Plant, *Phragmanthera capitata* (Sprengel) Balle on Brine Shrimp (*Artemia salina*). *International Journal of Pharmacology*, vol. 12, p. 701-710, 2016.

FRESNO, A.M.V. Farmacognosia General. Editorial Sintesis, Espanha, p. 335, 1999.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quim. Nova*. Vol. 30, p. 34-381, 2007.

GONÇALVES, L. D.; ALMEIDA, H. R.; OLIVEIRA, P. M.; LOPES, N. P.; TURATTI, I. C. C.; ARCHANJO, F. C.; GRAEL, C. F. F. Contribution for the phytochemical studies of *Ageratum fastigiatum*. *Braz. J. Pharmacog*, vol. 21, p. 936-942, 2011.

GUIMARÃES, A. J. M.; ARAÚJO, G. M.; CORRÊA, G. F. Estrutura fitossociológica em área natural antropizada de uma vereda de Uberlândia, MG. *Acta Bot Bras*, vol. 16, p. 317-329, 2002.

GURIB-FAKIM, A. Medical plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol Aspects Med*, v.27, n.1 p. 1-93, 2006.

IQBAL, M.C.; JAYASINGHE, M.; U. L. B., HERATH; H. M. T. B., WIJESEKARA; K. B., FUJIMOTO; Y. A. Fungistatic chromene from *Ageratum conyzoides*. *Phytoparasit*, vol. 32, n. 2, p. 119-126, 2004.

JAGETIA, G. C.; SHIRWAIKAR, A.; RAO, S. K.; BHILEGAONKAR, P. M. Evaluation of the radioprotective effect of *Ageratum conyzoides* L. extract in mice, exposed to different doses of gamma radiation. **Journal of pharmacy and pharmacology**, vol. 55, n. 8, p. 1151-1158, 2003.

JIMENEZ, J. B. **Phytochemical and analytical studies of feed and medicinal plants in relation to the presence of toxic pyrrolizidine alkaloids**. Dissertação. Bonn (Germany): University of Bonn; 2013.

JOLY, A. B. Botânica: introdução a taxonomia vegetal, 7ª ed., Cia Editora Nacional: São Paulo, 1967.

JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A.; STEVENS, P.F.; DONOGHUE, M.J. Sistemática vegetal: um enfoque filogenético. 3ª ed. **Artmed**, Porto Alegre, p. 612, 2009.

KHAN, T.; AHMAD, R.; AZAD, I. Computer-aided drug design and virtual screening of targeted combinatorial libraries of mixed-ligand transition metal complexes of 2-butanone thiosemicarbazone. **Computational Biology and Chemistry**, vol. 75, p. 178-19, 2018.

KIM, K. H., MOON E.; KIM, H.K.; OH, J. Y.; KIM, S. Y. Phenolic constituents from the rhizomes of *Acorus gramineus* and their biological evaluation on antitumor and anti-inflammatory activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* Vol. 22, p. 6155–6159, 2012.

LEANDRO, L. M. Estudo fitoquímico e atividades biológicas de *Eperua duckeana* e *Eperua glabriflora* (Fabaceae). 2011. 217f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2011.

LIEBERMAN, M. A brine shrimp bioassay for measuring toxicity and remediation of chemicals. **Journal of Chemical Education**, vol. 76, no. 12, p. 1689-1690, 1999.

LIMA, C.P.; CUNICO, M. M.; TREVISAN, R. R.; PHILIPPSEN, A. F.; MIGUEL, O.G.; MIGUEL, M. D. Efeito alelopático e toxicidade frente à *Artemia salina* Leach dos extratos do fruto de *Euterpe edulis* Mart. **Acta Botanica Brasilica**, vol. 25, ed. 2, p. 331-336, 2011.

LIMA, H. R. P.; KAPLAN, M. A. C.; CRUZ, A. V. M. Influência dos fatores abióticos na produção e variabilidade de terpenóides em plantas. **Floresta Ambient.** vol. 10, p.71-77, 2003.

LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S.L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; DARNELL, J. Molecular Cell Biology. Freeman and Company Inc.: New York, p. 475, 1999.

LÓPEZ, C. A. A. Considerações gerais sobre plantas medicinais. **Ambiente: Gestão e Desenvolvimento**, vol.1, p.19-27, 2006.

LORENZI, H; MATOS, F. J. A. Plantas medicinais no Brasil. **Instituto Plantarum**, 2002.

LORENZI. H.; MATOS, F. J. A. Plantas medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas. Instituto Plantarum, p. 512, 2002.

LUCETTI, D. L.; LUCETTI, E.C.; BANDEIRA, M. A.; VERAS, H. N.; SILVA, A. H.; LEAL, L. K.; LOPES, A. A.; ALVES, V. C.; SILVA, G. S.; BRITO, G. A.; VIANA, G.B. Anti-inflammatory effects and possible mechanism of action of lupeol acetate isolated from *Himatanthus drasticus*(Mart.) **Plumel Journal Inflammatory.**, (Londres), 2010

MACBAE, W. D.; HUDSON, J. B.; TOWERS, G. H. N. Studies on the pharmacological activity of amazonian euphorbiaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 22, no. 2, p. 143-172, 1988.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA, V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas Mediciniais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MARTÍNEZ, C.; SEDANO, M.; MENDOZA, J.; HERRERA, R.; RUTIAGA, J. G.; LOPEZ, P. Effect of aqueous environment in chemical reactivity of monolignols. A New Fukui Function Study. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, vol. 28, p. 196–201, 2009.

MATOS, F. J. A. Introdução a fitoquímica experimental. Fortaleza: Edições UFC, p: 45-64, 1997.

MAYORGA, P., PÉREZ, KR., CRUZ, SM. CÁCERES, A. Comparison of bioassays using the anostracan crustaceans *Artemia salina* and *Thamnocephalus platyurus* for plant extract toxicity screening. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol. 20, no. 6, p. 897-903, 2010.

MCLAFFERTY, F. W.; TURECEK, F. Interpretation of mass spectra. 4^a edição. California: University Science Books, 1993.

McLAUGHLIN, J. L.; ROGERS, L. L. The use of biological assays to evaluate botanicals. **Drug Information Journal**, vol. 32, p. 513-524, 1988.

MENDONÇA, R. C.; FELFILI, J. M.; WALTER, B. M. T.; SILVA JÚNIOR, M. C.; REZENDE, A. V.; FILGUEIRAS, T. S.; NOGUEIRA, P. E.; FAGG, C. W. Flora vascular do cerrado: Checklist com 12.356 espécies. In Cerrado: ecologia e flora. Embrapa-CPAC, Planaltina, p.417-1279, 2008.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAN, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; McLAUGHLIN, J. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medical Plant Research**, vol. 45, n.1, p. 31-34, 1982.

MOLYNEUX, R.J.; GARDNER, D. L.; COLEGATE, S.M.; EDGAR, J.A. Pyrrolizidine alkaloid toxicity in livestock: a paradigm for human poisoning? *Food Additives & Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & ampr; Risk Assessment*, v. 28, n. 3, p. 293-307, 2011.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. ***Journal of Immunological Methods***, vol. 65, n. 1, p. 55-63, 1983.

MOURA, A. C. A; SILVA, E. L. F; FRAGA, M. C. A.; WANDERLEY, A. G.; AFIATPOUR, P.; MAIA, M. B. S. Antiinflammatory and chronic toxicity study of the leaves of *Ageratum conyzoides* in rats. ***Phytomedicine***, vol. 12, n. 1-2, p. 138-192, 2005.

MUJEEB, F.; KHAN, A. F.; PATHAK, N. **Phytochemical Study of Aegle marmelos: Chromatographic Elucidation of Polyphenolics and Assessment of Antioxidant and Cytotoxic Potential**, 2018.

NGUTA, J. M., & MARIA, J. M. Brine shrimp toxicity and antimalarial activity of some plants traditionally used in treatment of malaria in Msambweni district of Kenya. ***Journal of Ethnopharmacology***, vol. 148, p. 988–992, 2013.

NUNES, L. C. C.; GALINDO, A. B.; DEUS, A. S. O.; ARCANJO, D. D. R.; RANDAU, K. P.; XAVIER, H. S.; CITÓ, A. M. G. L.; ROLIM-NETO, PJ. Variabilidade sazonal dos constituintes da própolis vermelha e bioatividade em *Artemia salina*. ***Revista Brasileira de Farmacognosia***, vol. 19, n. 2B, p. 524-529, 2009.

OKUNADE, A. L. *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae). *Fitoterapia*, vol.73, p. 1-16, 2002.

OLIVEIRA, F. **Triagem da atividade antitumoral e antimicrobiana de plantas nativas do Cerrado da região de Diamantina Vale do Jequitinhonha/Minas Gerais**. Tese (Mestrado Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2016.

PARK, S.Y.; SEETHARAMAN R.; KO M. J., KIM, K. Y.; KIM, T. Y.; M.K. Ethyl linoleate from garlic attenuates lipopolysaccharide-induced pro-inflammatory cytokine production by inducing heme oxygenase-1 in RAW264.7 cells, *International Immunopharmacology*, vol.19, p. 253–261, 2014.

PINTO, C. A.; SILVA, D. H. S; BOLZANI, U. S.; LOPES, N. P.; EPIFÂNIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Quim. Nova**, vol. 25, p. 45-61, 2002.

RAJABI, S.; RAMAZANI, A.; HAMIDI, M. *Artemia salina* as a model organism in toxicity assessment of nanoparticles. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2015.
RAJABI, S.; RAMAZANI, A.; HAMIDI, M.; NAJI, T. *Artemia salina* as a model organism in toxicity assessment of nanoparticles. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 23, p. 20, 2015.

RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. T. Fitofisionomias do bioma cerrado. P. 89-166. In: S.M. Sano & S.P. Almeida. Cerrado: ambiente e flora. Planaltina, Embrapa-CPAC, 1998.
RIOS, F. J. B. **Digestibilidade in vitro e toxicidade de lectinas vegetais para náuplios de *Artemia sp.*** Dissertação (mestrado em Bioquímica) Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 1995.

SANTOS PIMENTA, L. P.; PINTO, G. B.; TAKAHASHI, J. A.; SILVA, L. G. F.; BOAVENTURA, M. A. D. Biological screening of *Annonaceous Brazilian Medicinal Plants* using *Artemia salina* (Brine Shrimp Test). **Phytomedicine**, vol. 10, 209–212, 2003.

SANTOS, A. S.; REHDER, V. L. G.; PIANOWSKI, L. F.; CALIXTO, J. B.; MAGALHÃES, P. M. Composição química de frações ativas do óleo essencial de *Cordia verbenacea* DC. In: 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia – SP, **Sociedade Brasileira de Química**, 2007.

SHIRWAIKAR, A.; BHILEGOANKAR, P. M.; MALINI, S.; KUMAR, J. S. The gastroprotective activity of the ethanol extract of *Ageratum conyzoides*. **Journal Ethnopharmacology**, v. 86, n. 1, p. 117-121, 2003.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 5. ed. Rio de Janeiro: LTC, 1994.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia – da planta ao medicamento. 6ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/ UFSC, 2001.

SIMÕES, J. B. **Caracterização da assinatura espectral de biodiéseis e sua correlação com propriedades relevantes de combustíveis**. Monografia apresentada ao Centro de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Campos dos Goytacazes, RJ. 2007.

SIMÕES, J. B. **Estudo de propriedades espectroscópicas e térmicas de biodiéseis e sua correlação com propriedades importantes de combustíveis**. Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais. Universidade Estadual do Norte Fluminense. Campos dos Goytacazes, RJ, 2010.

SIQUEIRA, D. S.; DOS PEREIRA, A.; DE AQUINO NETO, F. R. *et al.* Determinação de compostos de massa molecular alta em folhas de plantas da amazônia. **Quim. Nova**, vol. 26, No. 5, 633-640, 2003.

SOUTO, F. J. B.; DE MEDEIROS ROCHA, R. M.; WATANABE, T. Influência de parâmetros ambientais sobre *Artemia* sp. (*Branchiopoda: Artemiidae*) em uma salina artesanal do Estado do Rio Grande do Norte. **Revista Nordestina de Biologia**, v. 14, n. 1/2, p. 1-16, 2000.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira. Instituto Plantarum, p. 297-298, 2008.

SUDATTI, D. B. **Implicacoes ecologicas da variaão da concentração do sesquiterpeno elatol em Laurencia obtusa.** Dissertação (Mestrado em Biologia Marinha). Universidade Federal Fluminense, Niteroi, 2004.

TROPICOS. Disponível em <www.tropicos.org> Acessado em 19 de dezembro de 2018>

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI. Disponível em <<http://mapeamento.ufvjm.edu.br/plano-diretor/campus-jk/por-capitulos/capitulo-06-proposta.pdf>> Acesso em 07 de dezembro de 2019.

VECHIA, C. A. D.; MORAIS, B.; SCHONELL, A. P.; DIEL, K. A. P.; FAUST, C; MENIN, C.; GOMES, D. B.; ROMAN, JUNIOR W. A. Isolamento químico e validação analítica por cromatografia líquida de alta eficiência de quercitrina em *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae). **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Campinas, vol.18, n.1, supl. I, p.288-296, 2016.

VEERURAJ, A. Isolation and Identification of Cytotoxic and Biological Active Toxin from the Puffer Fish *Arothron stellatus*. **Toxicological research**, vol. 32, p. 215-233, 2016.

VERDI L.G.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): Aspéctos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, 28: 85-94, 2005.

VIANA, P. L.; LOMBARDI, J. A. Florística e caracterização dos campos rupestres sobre canga na serra da calçada, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguesia**. vol. 58, n. 1, p. 159-177, 2007.

VIEIRA, R. F.; MARTINS, M. V. M. Recursos genéticos de plantas medicinais do Cerrado: uma compilação de dados. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, vol. 3, n. 1, p. 13-36, 2000.

WIEDENFELD, H.; RÖDER, E. Pyrrolizidine Alkaloids from *Ageratum conyzoides*. **Planta Medica**, vol. 57, n. 6, p. 511-590, 1991.

WIEDENFELD, V. H.; RÖDER, R. Pyrrolizidinalkaloide. *Deutsche Apotheker Zeitung*, v. 124, n. 43, p. 2116-2122, 1984.

ZDERO, C.; BOHLMANN, F. Systematics and evolution within the compositae, seen with the eyes of a chemist. **Plant systematics and evolution**, v. 171, n. 1-4, p. 1-14, 1990.