

**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO
JEQUITINHONHA E MUCURI - UFVJM**

BETHANIA ALVES DE AVELAR FREITAS

ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE CITOTÓXICA E

INIBIÇÃO DE CITOCINAS *IN VITRO* DE PREPARAÇÕES DE PARTES

AÉREAS DA PLANTA *Ageratum fastigiatum*

**DIAMANTINA - MG
2013**

BETHANIA ALVES DE AVELAR FREITAS

**ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE CITOTÓXICA E
INIBIÇÃO DE CITOCINAS *IN VITRO* DE PREPARAÇÕES DE PARTES
AÉREAS DA PLANTA *Ageratum fastigiatum***

Tese de doutorado apresentada ao Programa Multicêntrico de Ciências Fisiológicas Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

**Orientador: Prof. Dr. Gustavo Eustáquio Brito Alvim de Melo
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Etel Rocha Vieira**

**DIAMANTINA - MG
2013**

Ficha Catalográfica – Serviço de Bibliotecas/UFVJM
Bibliotecário Anderson César de Oliveira Silva, CRB6 – 2618.

F866a Freitas, Bethânia Alves de Avelar
Análise da composição química, atividade citotóxica e inibição de
citocinas *in vitro* de preparações de partes aéreas da planta *Ageratum*
fastigiatum. / Bethânia Alves de Avelar Freitas. – Diamantina:
UFVJM, 2013.
105 p. : il.

Orientador: Gustavo Eustáquio Brito Alvim de Melo
Coorientador: Etel Rocha Vieira

Tese (Doutorado – Curso de Pós-Graduação em Ciências
Fisiológicas) - Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde,
Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

1. *Ageratum fastigiatum*. 2. Anti-inflamatório. 3. Planta medicinal.
4. Citotoxicidade. 5. Óleo essencial. I. Título II. Universidade Federal
dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

CDD 615.321

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

**ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE CITOTÓXICA E
INIBIÇÃO DE CITOCINAS *IN VITRO* DE PREPARAÇÕES DE PARTES
AÉREAS DA PLANTA *Ageratum fastigiatum***

Bethânia Alves de Avelar Freitas

Tese apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia, nível de Doutorado, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor.

APROVADA EM 13 / 09 / 2013

Prof.^a Janetti Nogueira Francischi – UFMG

Prof.^a Miriam Teresa paz Lopes – UFMG

Prof. João Luiz de Miranda – UFVJM

Prof.^a Vanessa Amaral Mendonça – UFVJM

Prof.^a Etel Rocha Vieira – UFVJM

**Prof. Gustavo Eustáquio Brito Alvim de Melo
Presidente**

**DIAMANTINA
2013**

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo cuidado;

Ao meu pai Américo e minha mãe Lúcia, pelo exemplo de perseverança, amizade, apoio, dedicação e amor incondicional;

Ao meu marido Daniel Almeida Freitas, que esteve comigo durante essa jornada, sempre apoiando, trazendo otimismo e manifestando carinho. Obrigada pelo amor e pela dedicação.

Ao meu irmão Américo, pelo companheirismo; Aos meus tios, Lucimar, Lucinéia, Lucilene, Estanislau e Luciano, pela bondade, incentivo e prontidão em ajudar;

Ao Professor Dr. Gustavo Eustáquio Brito Alvim de Melo, pelo auxílio na formação acadêmica, pela amizade e o exemplo de Pesquisador;

À Professora Dra. Etel Rocha Vieira, pelo carinho e disposição em coorientar;

Às minhas companheiras Valéria e Michaelle pela ajuda nos experimentos, nas correções dos textos e pela grande amizade que construímos.

À equipe do laboratório de Imunologia da UFVJM, Wagner, Fábio, Josué, Myrlene pelo incentivo, apoio, e trabalho em equipe;

À equipe do Programa Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da UFVJM pelos conselhos e apoio;

Aos funcionários da Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, pelo comprometimento;

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

“Sim, todo amor é sagrado
E o fruto do trabalho
É mais que sagrado, meu amor
A massa que faz o pão
Vale a luz do teu suor
Lembra que o sono é sagrado
E alimenta de horizontes
O tempo acordado de viver”

Beto Guedes, Ronaldo Bastos

RESUMO

Ageratum fastigiatum é uma planta utilizada na medicina popular como anti-inflamatório e analgésico, no entanto, poucos estudos foram realizados a fim de detalhar os mecanismos envolvidos nessa atividade. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade anti-inflamatória *in vitro* do óleo essencial e do extrato diclorometânico de *A. fastigiatum*. Pela técnica de exclusão do azul de tripam por citometria de fluxo foram determinadas concentrações não tóxicas das preparações de *A. fastigiatum*. As concentrações não tóxicas do óleo essencial foram 5×10^{-3} e $1 \times 10^{-2} \mu\text{L/mL}$. Essas concentrações foram utilizadas para a pesquisa do potencial anti-inflamatório do óleo essencial, medido por meio da análise do perfil de citocinas pro (TNF- α e IFN- γ) e anti-inflamatórias (IL-10), em culturas de leucócitos humanos estimulados e não estimulados com PMA (acetato de forbol miristato). Os dados demonstraram que ambas as concentrações inibiram o percentual de linfócitos-TNF+ nas culturas estimuladas com PMA. A análise cromatográfica em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM) revelou como principais constituintes no óleo essencial as substâncias α -pineno (7,51%), limoneno (5,9%), óxido de cariofileno (13,59%), 1,2 epóxido humuleno (8,41%) e 1,6-humulanodien-3-ol (17,71%). O extrato diclorometânico de *A. fastigiatum*, na concentração 20 $\mu\text{g/mL}$, não apresentou toxicidade aos leucócitos do sangue periférico humano e reduziu o percentual de linfócitos-TNF- $\alpha+$ e linfócitos-IFN- $\gamma+$ nas culturas estimuladas com o PMA. Este extrato foi fracionado em coluna de Sephadex LH-20 (150 g). Na análise de citocinas, a fração 10 (AFDM 10), na concentração 10 $\mu\text{g/mL}$, demonstrou efeito anti-inflamatório *in vitro* reduzindo a frequência de linfócitos-TNF- $\alpha+$ e a proliferação de linfócitos estimulados com PHA (fitohemaglutinina). Sugere-se que parte da atividade anti-inflamatória de *A. fastigiatum* se dê pela inibição que os constituintes da planta promovem sobre a ativação de leucócitos.

Palavras-chave: *Ageratum fastigiatum*, anti-inflamatório, planta medicinal, óleo essencial, extrato diclorometânico.

ABSTRACT

Ageratum fastigiatum is a plant used in folk medicine as topical anti-inflammatory and analgesic agent. However, few studies have been conducted with this plant in order to detail the molecular mechanisms involved in its biological activities. Therefore, main purpose of the present study was to investigate the anti-inflammatory activity of the essential oil and leaf rinse dichloromethane of *A. fastigiatum* extract. The cytotoxicity of the compounds was assessed by means of trypan blue exclusion. The essential oil at 5×10^{-3} e 1×10^{-2} $\mu\text{L}/\text{L}$ did not present cytotoxic activity. These two concentrations were used for investigating the anti-inflammatory potential of the essential oil, by analyzing the pro-inflammatory (TNF- α and IFN- γ) and anti-inflammatory (IL-10) cytokine profiles on human leukocyte cultures stimulated and non-stimulated with PMA (phorbol myristate acetate). The data obtained by flow cytometry demonstrated that both concentrations decreased the percentage of lymphocytes -TNF- α + on the cell cultures stimulated with PMA. In the non-stimulated cell cultures there were no changes in the percentage of IL-10+ cells. The gas phase chromatography coupled with mass spectrometry analysis (GC/MS) revealed that the main compounds present in oil samples were: α -pinene (7.51%), limonene (5.9%), caryophyllene oxide (13.59%), 1,2 humulene epoxide (8.41%) and 1,6-humulanodien-3-ol (17.71%). The dichloromethane extract of *A. fastigiatum*, obtained from the washing leaves, at the concentration 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, did not presented cytotoxicic action on the human peripheral blood leukocytes. Following the same protocol performed to cytokines analysis used before, we observed that the dichloromethane *A. fastigiatum* extract also decreased the percentage of lymphocytes-TNF- α + and IFN- γ + on the cell cultures stimulated with PMA. This extract after fractionated on Sephadex LH-20 . The dichloromethane *A. fastigiatum* fraction (AFDM 10) at 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ reducing the frequency of lymphocytes-TNF- α +. Furthermore AFDM 10 decreasing the proliferation of lymphocytes stimulated with PHA (phytohemagglutinin). It is concluded that part of the anti-inflammatory activity of *A. fastigiatum* is give by inhibiting the plant constituents on promoting the activation of leukocytes.

Keywords: *Ageratum fastigiatum*, anti-inflammatory medicinal plant, essential oil, dichloromethane extract.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 -	Imagens de <i>Ageratum fastigiatum</i>	4
FIGURA 2 -	Estratégia de análise da inibição de citocinas por citometria de fluxo	29
FIGURA 3 -	Sequência de procedimentos utilizados para as análises de proliferação celular pela diluição do CFSE.....	32
FIGURA 4 -	Análises de espectrofluorimetria	35
FIGURA 5 -	Análise da técnica de exclusão do azul de tripan em diferentes concentrações por citometria de fluxo.....	36
FIGURA 6 -	Histogramas de análise do ensaio de exclusão do azul de tripan por citometria de fluxo.....	37
FIGURA 7 -	Comparação dos métodos de análise de morte celular.....	38
FIGURA 8 -	Correlação entre percentuais de morte celular analisados pelas técnicas de exclusão do azul de tripan (TB) por citometria e por contagem na câmara de Neubauer (NC) e pela técnica de incorporação do iodeto de propídeo (PI) (A)	39
FIGURA 9 -	Pesquisa de taninos nas partes aéreas de <i>Ageratum fastigiatum</i>	41
FIGURA 10 -	Pesquisa de alcalóides nas partes aéreas de <i>Ageratum fastigiatum</i> ...	42
FIGURA 11 -	Pesquisa de flavonóides nas partes aéreas de <i>Ageratum fastigiatum</i>	43
FIGURA 12 -	Pesquisa de antraquinonas nas partes aéreas de <i>A. fastigiatum</i>	43
FIGURA 13 -	Pesquisa de saponinas nas partes aéreas de <i>A. fastigiatum</i>	44
FIGURA 14 -	Pesquisa de terpenóides nas partes aéreas de <i>A. fastigiatum</i>	45
FIGURA 15 -	Percentual de leucócitos viáveis tratados com diferentes concentrações do óleo essencial de <i>A. fastigiatum</i>	48
FIGURA 16 -	Análise do percentual de linfócitos IL-10 positivos (A), linfócitos	

IFN- γ positivos (B) e TNF- α positivos (C) de culturas de leucócitos estimulados ou não com PMA (acetato de forbol miristato) e tratados ou não com o óleo essencial de <i>A. fastigiatum</i> .	50
FIGURA 17 - Percentual de hemólise em culturas tratadas com diferentes concentrações do extrato de lavagem foliar de <i>Ageratum fastigiatum</i> em diclorometano e com o controle do solvente DMSO 1%	51
FIGURA 18 - Percentual de leucócitos viáveis em culturas tratadas com diferentes concentrações do extrato diclorometânico de <i>Ageratum fastigiatum</i>	52
FIGURA 19 - Análise do percentual de linfócitos IL-10 +(A), linfócitos IFN- γ + (B) e TNF- α + (C) em culturas de leucócitos estimulados ou não com PMA (acetato de forbol miristato) e tratados ou não com o extrato diclorometânico de <i>A. fastigiatum</i>	54
FIGURA 20 - Análise do percentual de linfócitos TNF- α + (A), IFN- γ + (B) e IL-10 + (C) de culturas de leucócitos tratados com AFDM 5 e 10.	58
FIGURA 21 - Análise do percentual de linfócitos TNF- α + (A), IFN- γ + (B) e IL-10 + (C) de culturas de leucócitos tratados com AFDM 4 e 11.....	59
FIGURA 22 - Análise da viabilidade celular em culturas tratadas com AFDM 10.	60
FIGURA 23 - Índice de proliferação de linfócitos não estimulados (controle negativo CN) cultura estimulados com PHA (1 μ g/mL) (CP), e tratadas com diferentes concentrações 2, 6, e 10 μ g/mL de AFDM 10.....	61
FIGURA 24 - Histogramas de análise da proliferação celular em culturas estimuladas com PHA (1 μ g/mL) e tratadas com a diferentes concentrações 2, 6, e 10 μ g/mL de AFDM 10	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Posição sistemática da <i>Ageratum fastigiatum</i>	3
Tabela 2:	Reagentes cromogênicos utilizados na pesquisa da presença de alcalóides nas partes aéreas de <i>Ageratum fastigiatum</i>	16
Tabela 3:	Estratégia metodológica para análises <i>in vitro</i> com as preparações das partes aéreas de <i>A. fastigiatum</i>	22
Tabela 4:	Especificação dos anticorpos monoclonais utilizados nas análises	29
Tabela 5:	Classes químicas presentes na amostra de <i>A. fastigiatum</i>	40
Tabela 6:	Percentual das substâncias identificadas no óleo essencial de <i>Ageratum fastigiatum</i>	47
Tabela 7:	Análise da viabilidade de culturas na presença das frações 4, 5, 10 e 11 (AFDM 4, 5, 10 e 11) do extrato diclorometano nas concentrações 2, 10 e 20 µg/mL através do ensaio de apoptose (marcação com Anexina V e Iodeto de propídeo)	56

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Estudo de plantas medicinais e o Cerrado brasileiro	1
1.2	A família Asteraceae	2
1.3	O gênero <i>Ageratum</i>	2
1.4	A espécie <i>Ageratum fastigiatum</i>	3
1.5	A Inflamação	6
1.6	Compostos de origem vegetal com que modulam a produção de citocinas.	8
1.7	Ensaios de toxicidade	9
2	OBJETIVO.....	11
2.1	Objetivo geral	11
2.2	Objetivos Específicos	11
3	JUSTIFICATIVA	12
4	MATERIAIS E MÉTODOS	13
4.1	Coleta da planta e confecção do extrato diclorometânico e frações e do óleo essencial de <i>A. fastigiatum</i>	13
4.2	Identificação de classes químicas nas partes aéreas de <i>Ageratum fastigiatum</i>	14
4.2.1	Pesquisa da presença de taninos	14
4.2.2	Pesquisa de alcalóides	15
4.2.3	Pesquisa de flavonóides	16
4.2.4	Pesquisa de antraquinonas	17
4.2.5	Pesquisa de saponinas pelo índice de espuma	18
4.2.6	Pesquisa esteróides e terpenóides	19
4.3	Determinação dos constituintes do óleo essencial de <i>Ageratum fastigiatum</i> por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)	19

4.4	Implicações éticas e seleção dos voluntários e coleta da amostra biológica	20
4.5	Obtenção dos leucócitos a partir do sangue periférico dos voluntários	21
4.6	Padronização da técnica de exclusão do azul de tripan por citometria de fluxo	23
4.6.1	Obtenção dos espectros de excitação e emissão de fluorescência do azul de tripan	23
4.6.2	Avaliação da concentração ideal e do tempo de leitura do azul de tripan por citometria de fluxo	23
4.6.3	Comparação da metodologia de exclusão do azul de tripan avaliada por citometria de fluxo com metodologias de avaliação de morte celular já padronizadas	24
4.7	Avaliação da toxicidade, <i>in vitro</i> , do óleo essencial e extrato diclorometânico de <i>Ageratum fastigiatum</i>	24
4.8	Avaliação da atividade hemolítica do extrato diclorometânico de <i>A. fastigiatum</i> , <i>in vitro</i>	25
4.9	Avaliação da toxicidade, <i>in vitro</i> , das frações do extrato diclorometânico de <i>Ageratum fastigiatum</i>	27
4.10	Efeito do óleo essencial, extrato diclorometânico e frações de <i>A. fastigiatum</i> sobre a produção de citocinas, <i>in vitro</i> , por linfócitos humanos	27
4.11	Análise do efeito da fração 10 do extrato diclorometânico de <i>A. fastigiatum</i> (AFDM 10) sobre a proliferação de linfócitos humanos	30
4.12	Análise estatística.....	33
5	RESULTADOS	34
5.1	Padronização da técnica de exclusão de azul de tripan analisada por citometria de fluxo	34
5.1.1	Obtenção dos espectros de excitação e emissão de fluorescência do azul de tripan	34
5.1.2	Avaliação da concentração ideal e tempo de leitura do azul de tripan por	

	citometria de fluxo.....	35
5.1.3	Comparação da metodologia de exclusão do azul de tripan avaliada por citometria de fluxo com a metodologias de avaliação de morte celular já padronizadas.....	38
5.2	Identificação de classes químicas nas partes aéreas de <i>Ageratum fastigiatum</i>	40
5.3	Composição química e atividades biológicas avaliados no óleo essencial de <i>A. fastigiatum</i>	45
5.3.1	Composição química do óleo essencial de <i>A. fastigiatum</i>	45
5.3.2	Toxicidade do óleo essencial de <i>A. fastigiatum</i>	48
5.3.3	Produção e inibição de citocinas pelo óleo essencial de <i>A. fastigiatum</i>	49
5.4	Análises no extrato diclorometânico de <i>A. fastigiatum</i> e suas frações	51
5.4.1	Atividade hemolítica do extrato diclorometânico de <i>A. fastigiatum</i>	51
5.4.2	Toxicidade do extrato diclorometânico de <i>A. fastigiatum</i>	52
5.4.3	Produção e inibição de citocinas pelo extrato diclorometânico de <i>A. fastigiatum</i>	53
5.4.4	Toxicidade das frações do extrato diclorometânico de <i>A. fastigiatum</i>	55
5.4.5	Análise da produção e inibição de citocinas pelas frações AFDM 4, 5, 10 e 11	57
5.4.6	Toxicidade celular induzida por AFDM 10 durante cinco dias.....	60
5.4.7	Análise da inibição da proliferação de linfócitos por AFDM 10.....	61
6	DISCUSSÃO	63
6.1	Padronização da técnica de exclusão do azul de tripan avaliada por citometria de fluxo	63
6.2	Avaliações realizadas no óleo essencial de <i>A. fastigiatum</i>	64
6.3	Análises no extrato diclorometânico de <i>A. fastigiatum</i> e frações	67
7	CONCLUSÃO	70
8	REFERÊNCIAS	71
9	ANEXOS	79

INTRODUÇÃO

1.1 Estudo de plantas medicinais e o Cerrado brasileiro

As plantas e seus metabólitos são fontes importantes de novos fármacos (ITOKAWA *et al.*, 2008). Muitos compostos bioativos, descobertos e isolados a partir de fontes naturais, são hoje utilizados em formulações alopáticas. Um exemplo são os alcalóides da vinca, *Catharanthus roseus*, a vimblastina e vincristina utilizados como agentes clínicos importantes no tratamento de leucemias, linfomas e do câncer testicular (NOBLE *et al.*, 2009). As plantas medicinais contêm misturas de diferentes compostos químicos que podem agir individualmente, ou de forma sinérgica para obter os efeitos terapêuticos desejados (GURIB-FAKIM, 2006). Assim as plantas podem ser usadas como fitoterápicos, ou seus constituintes podem ser utilizados como ponto de partida para elaboração de derivados semi-sintéticos (ITOKAWA *et al.*, 2008).

O Brasil é um país com ampla diversidade vegetal, possuindo plantas nativas e exóticas adaptadas, distribuídas em diferentes biomas. Essa diversidade confere ao país um grande potencial para o desenvolvimento de fitoterápicos e outros fármacos a partir de insumos vegetais. O Cerrado é a segunda maior área de plantas nativas do país (CARAMORI *et al.*, 2004; SOUZA 2012), apresentando cerca de 10.000 espécies vegetais, onde 4.400 são consideradas endêmicas, o que corresponde a 1,5% das plantas do planeta. Esse fato coloca esse bioma entre os seis “hotspots” prioritários para a conservação mundial de espécies nativas (TRINDADE-FILHO e LOYOLA, 2011).

Plantas do Cerrado são conhecidas como fontes de compostos de interesse da indústria de medicamentos e alimentos (CARAMORI *et al.*, 2004). Muitas plantas encontradas no Cerrado possuem atividades biológicas e são utilizadas pela população residente como agentes antimicrobianos, anti-inflamatórios e, antifúngicos, dentre outras atividades (BOONCLARM *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2009; REBECCA *et al.*, 2010). Apesar de terem sido descritas atividades biológicas para muitas das espécies vegetais presentes no Cerrado, ainda são

poucos os estudos acerca dos efeitos terapêuticos dos extratos brutos, ou compostos isolados, provenientes de plantas deste bioma (NAPOLITANO *et al.*, 2005).

1.2 A família Asteraceae

A família Asteraceae inclui um numeroso grupo de plantas encontradas principalmente em regiões tropicais e amplamente distribuídas no Cerrado brasileiro (BREMER *et al.*, 1994). Esta família compreende cerca de 25.000 espécies de plantas distribuídas em cerca de 1400 gêneros (GURIB-FAKIM, 2006).

Embora estudos apontem que várias espécies possuam constituintes bioativos, a maior parte delas ainda não foi submetida a investigações químicas ou de bioprospecção (HIND e BEENTJE, 1996). Dentre as atividades atribuídas às espécies da família Asteraceae, destacam-se as propriedades analgésica, anti-inflamatória e antimicrobiana (EKENAS *et al.*, 2008; KALAYOU *et al.*, 2012; HOSSAIN *et al.*, 2013).

1.3 O gênero *Ageratum*

O gênero *Ageratum*, pertencente à família Asteraceae, compreende cerca de trinta plantas tropicais das quais a espécie mais estudada em termos químicos e biológicos é a *A. conyzoides*. A partir dessa planta foram isoladas e identificadas substâncias das seguintes classes químicas: mono e sesquiterpenos, cumarinas, triterpenos e esteróis, flavonóides polioxigenados, alcalóides pirrolizídnicos, ácidos fenólicos e ácidos graxos. As principais atividades biológicas observadas em *A. conyzoides* foram inseticida, alelopática, gastroprotetora, antimicrobiana e anti-inflamatória (OKUNADE, 2002; SINGH *et al.*, 2002; SHIRWAIKAR 2003; MOODY *et al.*, 2004; NÉBIÉ *et al.*, 2004; MOURA *et al.*, 2005). A falta de informações sobre atividades biológicas nas outras espécies do gênero *Ageratum* pode estar mais relacionada à falta de estudos químicos e de bioprospecção do que à ausência de atividade propriamente dita.

1.4 A espécie *Ageratum fastigiatum*

Ageratum fastigiatum (Gardn.) R. M. King et H. Rob. é uma planta comumente encontrada no Cerrado brasileiro e popularmente conhecida como “matapasto” ou “enxota” (GONÇALVES *et al.*, 2011). A tabela 1 apresenta a posição sistemática da *A. fastigiatum*. A espécie é um subarbusto ramificado, medindo cerca de 1,5 m de altura, com folhas pecioladas e alternadas. A inflorescência contém capítulos subsésseis, e as inflorescências possuem corola lilás (FIG. 1) (DEL-VECHIO-VIEIRA *et al.*, 2008). A planta é utilizada na medicina tradicional como cicatrizante, antimicrobiana, anti-inflamatória e analgésica (DEL-VECHIO *et al.*, 2007).

Tabela 1

Posição sistemática da *Ageratum fastigiatum*.

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

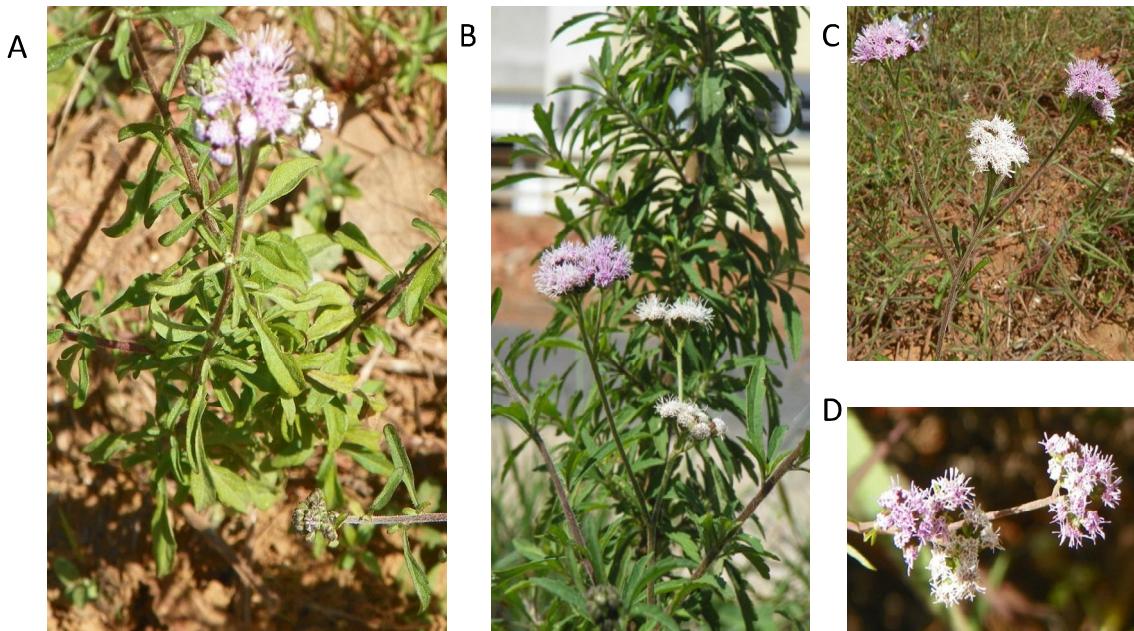


FIGURA 1- Imagens de *Ageratum fastigiatum*. Estrutura total da planta (A e B), inflorescências de corola lilás (C e D).

Em amostras de *A. fastigiatum* coletadas no estado de Goiás, foram isolados os seguintes constituintes: germacreno-D (sesquiterpeno), derivados do nerolidol e cumarinas (a partir das raízes) e, nas partes aéreas, os triterpenos acetato de taraxasterol, lupeol, diterpenos do tipo caurano e lactonas sesquiterpênicas (BOHLMANN *et al.*, 1981; BOHLMANN *et al.*, 1983). Esses foram os primeiros estudos publicados que relataram os constituintes químicos em *A. fastigiatum*.

Gonçalves e colaboradores (2011) avaliaram quimicamente as folhas e inflorescências de *Ageratum fastigiatum* coletadas no município de Diamantina no estado de Minas Gerais e verificaram, por meio de cromatografia gasosa acoplada à espectrômetro de massa (CG-EM), a presença de triterpenos e esteróides. O óleo essencial das folhas e inflorescências apresentou como constituintes majoritários os monoterpenos α -pineno e limoneno, e o sesquiterpeno germacreno. A cumarina ayapina foi isolada a partir do extrato etanólico.

Del-Vechio-Vieira e colaboradores (2009a) avaliaram quimicamente o óleo essencial de *A. fastigiatum* e observaram que os três componentes majoritários foram os sesquiterpenos germacreno-D (24,15 %), α -humuleno (11,15 %) e β -cedreno (10,63 %). Uma vez que já foram relatadas atividades biológicas para alguns dos compostos acima mencionados (YOON *et al.*, 2010; BAE *et al.*, 2012) sugere-se que a espécie *A. fastigiatum* possua biotiavidades relacionadas à esses compostos.

O extrato etanólico de *A. fastigiatum* foi relatado por sua atividade inseticida, sendo tóxico para espécie de triatomíneo *Rhodnius nasutus*, vetor da Doença de Chagas no Nordeste do Brasil, nesse extrato foi identificada majoritariamente a presença de cumarinas, que poderiam ser responsáveis pela toxicidade (AVELAR-FREITAS *et al.*, 2013a). Del-Vechio-Vieira e colaboradores (2007) demonstraram atividade antimicrobiana para o extrato metanólico de *A. fastigiatum*, bem como suas subfrações hexânica e diclorometânica. O extrato e suas frações foram ativas contra *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus typhosa*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*. Além disso, foi demonstrada atividade antinociceptiva do extrato e suas frações no teste em de contorções abdominais induzidos por ácido acético, realizado em modelo animal.

Em outro experimento *in vivo* Del-Vechio-Vieira e colaboradores (2009b) avaliaram a atividade analgésica e anti-inflamatória do óleo essencial de *A. fastigiatum*. Para analisar a atividade analgésica foram utilizados os testes de contorções abdominais por ácido acético e tempo de lambida da pata induzida por formalina, assim como o teste de latência em placa quente. Em todos os testes o óleo essencial de *A. fastigiatum* demonstrou atividade analgésica. Para avaliar o efeito anti-inflamatório, foram realizados os testes de inibição do edema de pata e pleurisia induzidos pela carragenina. Nesses estudos, observou-se uma redução significativa do volume do edema e da migração leucocitária quando os animais foram tratados, por via oral, com o óleo essencial da planta, sugerindo assim a atividade analgésica e anti-inflamatória da *A. fastigiatum*. Raizeiros da cidade de Diamantina-MG também relataram um efeito anti-inflamatório tópico de *A. fastigiatum* (GONÇALVES *et al.*, 2011). Contudo os mecanismos envolvidos na ação anti-inflamatória da planta, bem como os componentes químicos responsáveis por essa atividade, ainda não foram investigados. Estudos já indicaram a

capacidade dos extratos etanólico e acetato de etíla das partes aéreas de *A. fastigiatum* em reduzirem a produção de citocinas inflamatórias *in vitro* em cultura de leucócitos (AVELAR-FREITAS *et al.*, 2013b).

1.5 A inflamação

O processo inflamatório é uma resposta de proteção do organismo a um agente agressor ou a um dano tecidual. Os principais objetivos da inflamação são: eliminar o agressor e prevenir a propagação da infecção, ofertar células e moléculas efetoras para o sítio da infecção e promover o reparo tecidual restabelecendo a homeostasia (revisado por ALESSANDRI *et al.*, 2013). A resposta inflamatória é caracterizada por quatro sinais clássicos: calor, eritema, edema e dor. Uma resposta inflamatória exacerbada pode promover alterações que levam a perda de função do tecido e/ou órgão (TURK, 1994).

A cascata de eventos desencadeada após a entrada do agente agressor ou frente ao dano tecidual resulta no aumento do diâmetro e da permeabilidade vascular, bem como no recrutamento de leucócitos circulantes. Esses eventos ocorrem como consequência de uma interação complexa entre diferentes tipos celulares e os vários mediadores solúveis produzidos durante o processo inflamatório. Os mediadores inflamatórios incluem os metabólitos do ácido araquidônico (AA), histamina, óxido nítrico, espécies reativas de oxigênio, metaloproteinases, quimiocinas e citocinas (KOJ *et al.*, 1988; VAN *et al.*, 2010).

As citocinas são mediadores protéicos produzidos por diferentes tipos celulares (COHEN, 1976). A produção de citocinas é desencadeada quando as células são ativadas por diferentes estímulos, como agentes infecciosos, tumores ou estresse. As citocinas são liberadas por células do sistema imune e células de outros tecidos, e podem ter ação local e/ou sistêmica. A ação das citocinas envolve ativação de fatores de transcrição (como STATs, AP1 e NF-κB) e proteínas kinases (como PKC e MAPK) que regulam a expressão de genes indispensáveis para a manutenção do estado inflamatório (HADDAD, 2002).

Além de ativarem a transcrição gênica, as citocinas são responsáveis pela indução e ativação de enzimas (como iNOS e COX-2), indução da expressão de receptores celulares (como o receptor de IL-2) e de moléculas envolvidas com os processos de adesão e migração celular, tais como E-selectina, ICAM-1, VCAM-1 (HADDAD, 2002).

De maneira geral, as citocinas podem ser divididas em citocinas do tipo 1 e do tipo 2, também conhecidas como pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, respectivamente (CHERWINSKI *et al.*, 1987). Dentre as citocinas do tipo 1 encontram-se o Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), Interferon-gama (IFN- γ) e as Interleucinas 1 β e 12 (IL-1 β e IL-12, respectivamente). A produção e liberação dessas citocinas pró-inflamatórias contribuem para a imunidade celular, caracterizada pela ativação de macrófagos, de linfócitos T citotóxicos e células NK, assim como a produção de anticorpos predominantemente das subclasses IgG1 e IgG3 pelos linfócitos B (DUFFIELD *et al.*, 2003). Além disso, citocinas como o TNF- α , além de promover dano tecidual de forma direta, atuam também sobre o endotélio vascular, estimulando a produção de moléculas de adesão e favorecendo a migração de células para o sítio da inflamação. Embora a inflamação ocorra como um mecanismo de proteção, principalmente nas etapas iniciais dos processos infecciosos, em doenças auto-imunes ou crônico-degenerativas, esses mediadores liberados de forma exacerbada prejudicam o funcionamento fisiológico dos tecidos afetados. Diante disso, como um mecanismo de regulação e modulação da inflamação, citocinas do tipo 2, como IL-10 e TGF- β , inibem a expressão de mediadores pró-inflamatórios, restaurando a homeostasia do tecido após a eliminação dos agentes causadores da resposta inflamatória (HOWARD *et al.*, 1993).

A citocina IL-10 tem efeitos anti-inflamatórios uma vez que inibe ativação de linfócitos T, auxiliares (Th) e linfócitos T citotóxicos (Tc), modulando negativamente a proliferação e a expressão das citocinas IL-2, TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IFN- γ (TAGA *et al.*, 1992). Além disso, a citocina IL-10 inibe a ativação de macrófagos, modulando além da expressão de citocinas inflamatórias, a produção de óxido nítrico (FIORENTINO *et al.*, 1991; CUNHA *et al.*, 1992).

Estudos indicam que as citocinas e seus receptores estão envolvidos na fisiopatologia de muitas doenças inflamatórias como sepse, artrite reumatóide, aterosclerose e asma (FELDMANN e STEINMAN, 2005; FELDMANN e MAINI, 2008). Nessas doenças o desequilíbrio na liberação de citocinas e o recrutamento excessivo de leucócitos favorecem a continuidade do estado inflamatório (FELDMANN *et al.*, 2008). Assim, compostos que inibam a produção de citocinas pró-inflamatórias são alternativas promissoras para o desenvolvimento de novos fármacos anti-inflamatórios.

1.6 Compostos de origem vegetal que modulam a produção de citocinas

Estudos têm demonstrado que muitos compostos derivados de vegetais possuem atividade anti-inflamatória. Compostos de origem vegetal interferem em vias intracelulares envolvidas na produção de citocinas, sobretudo inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (CALIXTO *et al.*, 2004).

Os compostos sesquiterpenos α -humuleno e *trans*-cariofileno, isolados a partir de *Cordia verbenaceae* (Boraginaceae), reduziram a produção de citocinas pró-inflamatórias ao inibir a via do fator de transcrição NF- κ B (FERNANDES *et al.*, 2007; MEDEIROS *et al.*, 2007). O limoneno, um monoterpeno encontrado em diversas plantas como *Citrus natsudaidai* e *Citrus obovoidea*, inibiu a produção de TNF- α em cultura de macrófagos e reduziu outros mediadores inflamatórios como a Prostaglandina E₂ e o Óxido Nítrico (YOON *et al.*, 2010).

A *Silybum marianum* L. (Asteraceae) foi capaz de reduzir a produção de TNF- α em culturas de linfócitos estimulados com Lipopolissacarídeo (LPS), ao inibir a via do fator de transcrição NF- κ B (GIORGI *et al.*, 2012). Já as lactonas sesquiterpênicas extraídas da planta *Vernonia cinerea* (L.) LESS (Asteraceae), além de inibir a produção de TNF- α pela via do fator de transcrição NF- κ B, reduziu a produção de Óxido Nítrico nas culturas estimuladas (YOUN *et al.*, 2012). Algumas classes de moléculas relatadas com atividade anti-inflamatória como terpenos, sesquiterpenos, lactonas sesquiterpênicas também já foram encontradas na

composição de *Ageratum fastigiatum*, o que indica um potencial para atividade anti-inflamatória da planta (BOHLMANN *et al.*, 1983; GONÇALVES *et al.*, 2011).

1.7 Ensaios de toxicidade

Os bioensaios constituem uma etapa importante na avaliação das ações farmacológicas de extratos ou compostos isolados de plantas. Nas fases iniciais, os testes *in vitro* têm prioridade sobre os estudos *in vivo*. Na etapa de triagem, estudos *in vitro* são preferíveis por motivos econômicos, éticos e científicos (GURIB-FAKIM, 2006). O primeiro ensaio biológico *in vitro* que deve ser realizado no estudo com produtos naturais é a análise de toxicidade, que indica concentrações seguras para o uso do produto natural em culturas. Antes de se tornarem fármacos com emprego terapêutico, esses compostos bioativos devem ser submetidos a ensaios *in vivo* e posteriormente a estudos clínicos e toxicológicos (GURIB-FAKIM, 2006).

Diversas técnicas são empregadas para avaliação da morte celular *in vitro*, sendo a mais utilizada a incorporação de corantes vitais pelas células em cultura (KIM *et al.*, 2011). O iodeto de propídeo é um corante capaz de penetrar em células que perderam a seletividade da membrana e intercalar às moléculas de DNA (HAMILTON *et al.*, 1980). Esta técnica é amplamente utilizada para análise da viabilidade celular, porém apresenta como desvantagens o custo elevado e a toxicidade do composto para o experimentador.

O iodeto de propídeo é um corante fluorescente e, portanto, a análise da viabilidade celular por essa técnica pode ser realizada por métodos fluorescentes como a citometria de fluxo (TABERA *et al.*, 2008; EDIDIN *et al.*, 1970). A citometria é uma técnica altamente sensível para a análise de partículas e células fluorescentes. Por essa técnica, as células em suspensão são interceptadas individualmente por um laser que excita compostos presentes na superfície ou no interior da célula, levando à emissão de fluorescência que é captada por sensores fotomultiplicadores e transformada em sinal elétrico (OKADA, 2010).

Outra técnica utilizada para análise da viabilidade celular é o teste de exclusão do azul de tripan, no qual as células não viáveis tornam-se permeáveis à este composto, corando-se de azul, o que permite diferenciá-las das células viáveis, que permanecem incolores, por meio da microscopia óptica (TENNANT, 1964). Embora largamente utilizada, a técnica de exclusão do azul de tripan apresenta limitações. Como a detecção é visual em microscopia óptica, a técnica é dependente da acurácia do pesquisador, apresentando limitações como baixa precisão e sensibilidade reduzida quando comparada às técnicas automatizadas (KIM *et al.* 2011). Além disso, o tempo para leitura ao microscópio é curto, sendo indicado de 3 a 5 minutos, uma vez que o número de células coradas aumenta com o tempo após adição do azul de tripan (JONES & SENFT, 1985).

Estudos prévios demonstraram a capacidade do azul de tripan em emitir fluorescência quando complexado com proteínas (HARRISSO *et al.*, 1981), além disso KUMAR (2008) e colaboradores demonstraram que o azul de tripan é um fluorocromo adequado para a coloração de esporos de fungos micorrízicos. Neste caso a fluorescência foi observada por microscopia fluorescente confocal, com excitações em 488 e 543nm e emissões a partir 585nm.

Tendo em vista a necessidade de um marcador de morte celular que forneça resultados exatos e precisos com baixo risco operacional, e que o azul de tripan pode ser no incorporado ao interior de células não viáveis formando complexos fluorescentes, é possível que a técnica de exclusão do azul de tripan possa ser avaliada por citometria de fluxo.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Caracterizar a composição química de preparações de partes aéreas de *A. fastigiatum* e avaliar, *in vitro*, a atividade citotóxica e efeito das preparações sobre a produção de citocinas por leucócito humanos.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Padronizar o ensaio de exclusão do azul de tripan por citometria de fluxo

2.2.2 Caracterizar a composição química das partes aéreas pulverizadas de *A. fastigiatum*.

2.2.3 Identificar concentrações não tóxicas, *in vitro*, do óleo essencial, extrato diclorometânico e suas frações das partes aéreas de *A. fastigiatum*.

2.2.4 Avaliar, *in vitro*, a indução da produção de uma citocina anti-inflamatória (IL-10) e a inibição de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IFN- γ) em culturas de leucócitos tratadas com o óleo essencial, o extrato diclorometânico e suas frações das partes aéreas de *A. fastigiatum*.

3 JUSTIFICATIVA

O Cerrado é uma região brasileira caracterizada por grande diversidade biológica. No entanto, há dificuldades na preservação ambiental da região (GUARIM NETO e MORAIS, 2003). O Cerrado é especialmente vulnerável por possuir pouca proteção específica pela legislação vigente, e pela biodiversidade local ser considerada de baixo potencial econômico. Nesse contexto, o estudo das plantas medicinais utilizadas tradicionalmente pelas comunidades que residem nesse bioma brasileiro poderia colaborar com a descoberta de novos fármacos, com a valorização da área, além de contribuir com a preservação e reorganização do uso de seus recursos naturais.

A *A. fastigiatum* é uma planta abundante no Cerrado e na micro região de Diamantina-MG é utilizada tradicionalmente como anti-inflamatório tópico. Estudos demonstraram efeito anti-inflamatório e analgésico do óleo essencial de *A. fastigiatum* em modelo animal, sem no entanto indicar os mediadores envolvidos em tal resposta (DEL-VECHIO-VIEIRA *et al.*, 2009). O extrato diclorometânico da planta apresentou atividade analgésica em modelo animal, mas também, não foram sugeridos os mecanismos envolvidos nessa ação (DEL-VECHIO-VIEIRA *et al.*, 2007). Tendo em vista que um dos mecanismos envolvidos na ação anti-inflamatória é redução da produção de mediadores inflamatórios (FERNANDES *et al.*, 2007) e que os extractos acetato de etila e etanólico das partes aéreas de *A. fastigiatum* reduziram a produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IFN- γ (AVELAR-FREITAS *et al.*, 2013), a hipótese deste trabalho é que o efeito anti-inflamatório de *A. fastigiatum* está, em parte, relacionado à modulação de mediadores da inflamação, tais como as citocinas.

Considerando a ação anti-inflamatória atribuída à planta e a importância da produção de citocinas nos eventos envolvidos no desenvolvimento/manutenção da resposta inflamatória, é possível que compostos presentes na *A. fastigiatum* possam inibir a síntese de mediadores químicos pró-inflamatórios ou induzir a síntese de mediadores anti-inflamatórios. Portanto, esse estudo pode contribuir com as fases iniciais da cadeia produtiva de um novo fármaco.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta da planta e confecção do extrato diclorometânico e frações e do óleo essencial de *A. fastigiatum*

As partes aéreas (ramos com folhas e inflorescências) de *A. fastigiatum* foram coletadas em dezembro de 2010, no Campus Juscelino Kubitscheck - UFVJM ($S\ 18^{\circ}12.125'$ $W\ 43^{\circ}34.367'$, altitude 1392 m), localizado no município de Diamantina, Minas Gerais. O material testemunho foi depositado no Herbário DIAM UFVJM, sob número de registro 1300. A identificação foi feita por profissional tecnicamente capacitado. Como preconizado na Instrução Normativa 154/2007 do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) foi obtida a autorização para coleta de material botânico, com registro no Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) 5141849 (Anexo 1).

Devido à presença de lactonas sesquiterpênicas nas espécies coletadas por Bohlmann e colaboradores (1981, 1983), foram obtidos extratos de lavagem foliar em diclorometano, a fim de enriquecer a extração de lactonas (AMBRÓSIO *et al.*, 2008). Após a secagem à temperatura ambiente, cinco alíquotas de 50g das partes aéreas da planta foram submetidas a extrações com 500 mL de diclorometano PA, por um período de 1 minuto. Os extratos obtidos foram filtrados em papel de filtro e concentrados em evaporador rotativo a 30 °C. Após a secagem final foram obtidos 12,1 g do extrato bruto em diclorometano (DCM).

O óleo essencial foi obtido a partir do material fresco recém-coletado de acordo com Método I, da Farmacopéia Brasileira, 5^a Edição (2010). Esse processo baseou-se na hidrodestilação, e a extração teve duração de 4 horas. O óleo essencial foi obtido e acondicionado em frascos e estocados à temperatura de -20 °C, protegido da luz. Foram obtidos 0,06 mL do óleo em 100g de planta fresca (mL/100g x 100), ou seja 0,06%.

Uma alíquota de 1,5g do extrato foliar de lavagem rápida em diclorometano, obtido das partes aéreas da *A. fastigiatum*, coletadas conforme descrito anteriormente, foi fracionada

em coluna Sephadex LH-20 (150 g), após condicionamento e eluição com clorofórmio, obtendo-se 24 frações de 50 mL, que foram concentradas em evaporador rotativo para obtenção da fração seca. Foram obtidas 24 frações que foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD). Algumas frações com perfil semelhante na CCD foram reunidas, obtendo-se ao final 14 frações, as quais foram nomeadas com *Ageratum fastigiatum* diclorometânico (AFDM).

A confecção do óleo essencial e do extrato diclorometânico, bem como o fracionamento do extrato diclorometânico e caracterização química dos compostos, foram realizados em parceria com os pesquisadores do Laboratório de Fitoquímica da UFVJM.

4.2 Identificação de classes químicas nas partes aéreas de *Ageratum fastigiatum*

Para a análise da presença de classes químicas nas partes aéreas de *A. fastigiatum* foram feitas reações cromogênicas conforme Silva e colaboradores (2010) e Bustamante e colaboradores (2010).

4.2.1 Pesquisa da presença de taninos

Para realizar a pesquisa de taninos nas partes aéreas de *A. fastigiatum* 2,5g da droga vegetal pulverizada foram submetidas à decocção por 15 minutos com 50 mL de água destilada. Após esse período, a solução foi filtrada e mantida à temperatura ambiente, e chamada de solução A. Foram realizados três testes gerais de identificação de taninos, juntamente com uma amostra padrão positiva. Assim, a solução A foi distribuída em 4 tubos de ensaio identificados, sendo o tubo 4 o branco da reação. Neste teste, duas reações positivas das três reações realizadas já confirmam a presença de taninos na amostra.

No primeiro teste foram adicionados à 2 ml da solução A, 2 gotas de ácido clorídrico (HCl) e solução de gelatina 2,5% p/v gota a gota. A formação de precipitado indica a reação positiva para taninos.

No segundo teste foram adicionados à 2 mL da solução A, 10 mL de água destilada e 3 gotas de solução de cloreto férrico (FeCl_3) a 1% em metanol. A formação de cor azul é indicativa de taninos hidrolisáveis ou gálicos, e a cor verde é indicativa de taninos condensados ou catéquicos.

No terceiro teste, foram adicionados à 5 mL da solução A, 10 mL da solução de ácido acético a 10% e 5 mL da solução de acetato de chumbo a 10%. A formação de um precipitado esbranquiçado indica a presença de taninos hidrolisáveis.

4.2.2 Pesquisa de alcalóides

Para realizar a pesquisa de alcalóides, 2 g das partes aéreas de *A. fastigiatum* pulverizadas foram adicionadas à 20 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) a 1% v/v. Essa solução foi fervida por 2 minutos e filtrada em algodão. Após filtração a solução foi dividida em duas porções A e B.

Com porção A foi realizada a pesquisa direta de alcalóides. A solução foi dividida em 5 tubos onde foram gotejadas 2 gotas de um dos reagentes cromogênicos (RGA). A tabela 2 apresenta RGAs, com o nome, composição e a cor do precipitado formado quando estes reagem com alcalóides. A turvação e/ou formação de precipitado é um indicativo de alcalóides na amostra.

Com a porção B foi feita a pesquisa confirmatória da presença de alcalóides na amostra. Assim foi adicionado hidróxido de amônio (NH_4OH), à porção B, para tornar o pH básico, em seguida foram adicionados 7 mL de clorofórmio (CHCl_3). Após 10 minutos de extração a camada clorofórmica foi retirada e mantida em banho de água até a completa evaporação do solvente. O resíduo foi dissolvido em 5 mL de H_2SO_4 a 1% v/v. A solução foi

dividida em 5 tubos de ensaio, aos quais foram gotejadas 2 gotas de um dos RGA citados anteriormente. A turvação ou formação ou a formação de precipitado indicam que a reação é positiva. Para ser considerado positivo para alcalóides no mínimo 3 reações confirmatórias, da porção B, devem apresentar resultado positivo.

Tabela 2

Reagentes cromogênicos utilizados na pesquisa da presença de alcalóides nas partes aéreas de *Ageratum fastigiatum*.

RGA	Composição	Cor do precipitado
Dragendorff	Iodo bismutato de potássio	Alaranjado
Mayer	Iodo mercurato de potássio	Branco
Bouchardat/Wagner	Iodo-iodeto de potássio	Marrom
Hager	Ácido pícrico	Amarelo

4.2.3 Pesquisa de flavonóides

Para realizar a pesquisa de flavonóides, 1 g das partes aéreas de *A. fastigiatum* foi fervida com 10 mL de solução etanólica (70%) por dois minutos. A mistura foi filtrada em algodão. A identificação genérica de flavonóides foi feita por quatro reações. Na primeira, denominada reação de Shinoda, foram adicionados à 2 mL do extrato alcoólico seis fragmentos de magnésio (Mg) e 1 mL de HCl concentrado. A coloração entre rósea e vermelha indica a presença de flavonóides na amostra.

A segunda reação foi realizada com cloreto de alumínio. Para isso, um papel filtro foi umedecido com o extrato alcoólico de *A. fastigiatum* e sobre as regiões umedecidas foi

adicionado cloreto de alumínio (AlCl_3) a 5%. A reação foi positiva quando houve intensificação de fluorescência com mudança de cor para verde amarelado.

Foi realizada também a reação de Taubouk, na qual 3 mL do extrato etanólico de *A. fastigiastum* foram adicionados em uma cápsula de porcelana e fervidos em banho de água até a evaporação do solvente. Ao resíduo foram adicionadas gotas de acetona e cristais de ácido bórico e ácido oxálico. Novamente, a solução foi levada ao banho de água até a evaporação do solvente. O resíduo foi dissolvido em 3 mL de éter etílico e foi observado sob luz ultravioleta. O desenvolvimento de fluorescência amarelada ou esverdeada indica que a reação foi positiva.

Por fim, fez-se a reação de Pew, em que 3 mL do extrato foram colocados em uma cápsula de porcelana, fervida até a secura em banho de água. Ao resíduo foram adicionado 3 mL de metanol, e o conteúdo da cápsula foi vertido em um tubo de ensaio. Neste tubo foram adicionados zinco metálico e 3 gotas de HCl concentrado. A reação foi positiva quando houve formação de coloração vermelha.

A amostra de *A. fastigiatum* seria considerada positiva para flavonóides se no mínimo 3 reações apresentassem resultado positivo.

4.2.4 Pesquisa de antraquinonas

Para pesquisa direta de antraquinonas livres adicionou-se 5 mL de NH_4OH em 0,2 g do pó de *A. fastigiatum*. O desenvolvimento de coloração rósea a vermelha indica resultado positivo.

Além da pesquisa direta fez-se a reação conhecida como reação de Bornträger com prévia hidrólise ácida, para análise de glicosídeos antraquinônicos e dímeros. Neste teste, foram adicionados 8 mL de etanol 25% a 1 g do pó de *A. fastigiatum*. A mistura foi fervida e filtrada em algodão. Em seguida adicionou-se à solução H_2SO_4 a 5%. A solução foi aquecida levemente e, após o resfriamento, foram adicionados 5 mL de CHCl_3 (clorofórmio). Após 3 minutos de extração, a fase orgânica foi decantada e retirada. Adicionou-se 5 mL de NH_4OH

diluído, e a solução foi agitada fortemente e, em seguida, mantida em repouso. A presença de coloração rósea ou vermelha na fase aquosa indica a positividade.

A presença de antraquinonas na amostra só é considerada positiva se a reação de Borntrager com hidrólise apresentar resultado positivo; se esta última reação for negativa, o resultado é negativo, mesmo se a reação direta for positiva.

4.2.5 Pesquisa de saponinas pelo índice de espuma

Um grama das partes aéreas pulverizadas de *A. fastigiatum* foi transferido para um erlenmeyer contendo 100 mL de água. A mistura foi fervida por 5 minutos e, em seguida, o pH foi ajustado para pH 7,0 com carbonato de sódio 0,2 M. A solução resfriada foi filtrada e transferida para um balão volumétrico e o volume da solução foi ajustado para 100 mL com água destilada. A solução foi diluída com água destilada nas proporções de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100% em tubos de ensaio (16 x 160 mm). As soluções diluídas foram agitadas vigorosamente, e em seguida, o tubo foi mantido em repouso por 15 minutos.

O índice de espuma (IE) foi calculado para a menor diluição na qual houve formação do anel de espuma com no mínimo 1 cm de altura. A amostra das partes aéreas de *A. fastigiatum* é positiva para saponina se o IE for igual ou superior à 200.

O índice foi calculado conforme a fórmula abaixo:

$$\text{IE} = \frac{p \times 1000}{P \times V}$$

Em que: p = peso da droga, (1g); P = percentual da droga utilizada no preparo do extrato ou teor da planta no extrato em g; V = volume do extrato no tubo de ensaio com espuma de 1cm de altura (sem a diluição, ou seja, volume original em mL).

4.2.6 Pesquisa de esteróides e terpenóides

Para a realização da pesquisa de esteróides e terpenos, foram adicionados 5 mL de clorofórmio à 1 g de *A. fastigiatum* pulverizada e essa preparação foi macerada por 30 minutos. Em seguida, a mistura foi filtrada e transferida para tubo de ensaio, onde foi adicionado 1 ml de anidrido acético. Após suave agitação da mistura acrescentou-se cuidadosamente três gotas de H₂SO₄ concentrado. O desenvolvimento da cor azul seguida da cor verde indica que a reação foi positiva para esteróides e terpenóides, respectivamente.

4.3 Determinação dos constituintes do óleo essencial de *Ageratum fastigiatum* por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)

A análise dos constituintes do óleo essencial de *A. fastigiatum* foi feita por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM), utilizando o equipamento Shimadzu GC-MS-QP2010 equipado com coluna capilar DB-5-MS Agilent J & W (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). Hélio com alta pureza foi usado como gás de transporte a uma pressão de 57,5 kPa, com o fluxo de coluna de 1,00 mL/min. A temperatura no injetor foi de 240 °C e a temperatura do forno progrediu 60-240 °C a 3°C/min. O modo de ionização utilizado foi a ionização por elétrons a 70 eV. Então, sob as mesmas condições experimentais, foi injetada uma série homóloga de hidrocarbonetos lineares (C9 - C24) ALLTECH para realização do cálculo do índice de retenção (IR) de cada constituinte do óleo essencial (VAN DEN DOOL e KRATZ, 1963). A identificação das substâncias na amostra foi realizada por análise e comparação dos espectros de massa obtidos com bibliotecas Wiley 7, NIST 62 e FFNSC 1.3, e por comparação de IR com os relatados na literatura (ADAMS, 1995) e em sites eletrônicos (<[http://webbook.nist.gov / química](http://webbook.nist.gov/química)> e <<http://pherobase.com>>). Os percentuais de cada um dos compostos do óleo foram indicados como percentuais baseados em corrente iônica total.

4.4 Implicações éticas, seleção dos voluntários e coleta da amostra biológica

Uma vez que as células utilizadas para as análises, *in vitro*, da atividade anti-inflamatória foram provenientes do sangue de voluntários saudáveis, a realização desse estudo obedeceu aos princípios éticos para pesquisa envolvendo seres humanos, conforme Resolução 196-96 do Conselho Nacional de Saúde, recebendo a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal dos Vales dos Jequitinhonha e Mucuri (CEP UFVJM, registro 146/10) (Anexo 2). Os procedimentos de coleta foram conduzidos por pessoal treinado e capacitado para tal. Após a utilização da amostra biológica nas análises descritas a seguir, todo o material remanescente foi descartado. Foram incluídos no estudo voluntários saudáveis que apresentaram normalidade no exame de hemograma. Voluntários em uso de corticosteróides ou outras drogas imunossupressoras não foram incluídos no presente estudo. Todos os voluntários assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 3). Ao todo neste estudo foram utilizadas amostras de 34 voluntários, sendo 15 do gênero masculino e 19 do gênero feminino, com idade de $24 \pm 3,5$.

4.5 Obtenção dos leucócitos a partir do sangue periférico dos voluntários

Para avaliação das concentrações tóxicas das preparações das partes aéreas de *A. fastigiatum* utilizadas foram realizados experimentos que avaliaram a viabilidade celular de culturas de leucócitos totais, uma vez que a análise da produção de citocinas foi realizada em culturas de sangue total, onde estão presentes hemácias e os diferentes tipos de leucócitos.

Assim, para obtenção dos leucócitos a partir do sangue total, foi utilizado um protocolo no qual inicialmente lisa-se as hemácias, separando os leucócitos. Para isso, 10 mL de sangue total venoso foram coletados em tubos a vácuo contendo heparina (Vacutainer; Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA) e submetidos à lise de hemácias com 10 mL de uma solução de lise eritrocitária (NH_4Cl 8,3 mg/mL, NaHCO_3 1mg/mL, EDTA 1mg/mL) por 10 minutos, seguido por duas etapas de lavagem e centrifugação (250 g por 7 minutos) dos

leucócitos com salina tamponada - PBS (PBS 0,015 M pH 7,4). A concentração celular foi ajustada para 1×10^7 leucócitos/mL.

Já para a análise da toxicidade das as frações do extrato diclorometânico (AFDM 4, 5, 10 e 11) foi realizado o ensaio de apoptose que é recomendado para análises em células mononucleares do sangue periférico, conhecidas como PMBC. Os ensaios de proliferação celular também foram realizados com PMBC, conforme indicado no protocolo. Além dos testes citados a padronização do ensaio de exclusão do azul de tripan avaliado por citometria de fluxo também foi realizada em PBMCs. As PBMC foram obtidas a partir de 10 mL de sangue periférico venoso após centrifugação em Histopaque 1077 (Sigma, St. Louis, MO, USA) conforme descrito por Bicalho *et al.*, (1981). O anel de PBMC, formado após a centrifugação, foi recolhido e lavado 2 vezes em PBS (200 g, 4°C, 10 min). O precipitado de células foi em seguida suspenso em 1 mL de PBS/BSA 1% ou RPMI (Sigma, St. Louis, MO, USA). Após contagem das células em câmara hemacitométrica de Neubauer, as células foram novamente centrifugadas e suspensas em PBS/BSA 1% ou RPMI (Sigma, St. Louis, MO, USA) suplementado com L-glutamina (Sigma, St. Louis, MO, USA) (2 mM), e coquetel antimicrobiano (penicilina G 100UI/mL, estreptomicina 100 μ g/mL e anfotericina B 250 ng/mL - Sigma, St. Louis, MO, USA) na concentração de 1×10^7 células/mL.

Na tabela 3 estão relacionadas a estratégia e sequência dos experimentos realizados com as preparações das partes aéreas de *A. fastigiatum* e as respectivas amostras biológicas utilizadas.

Tabela 3

Estratégia metodológica para análises *in vitro* com as preparações das partes aéreas de
A. fastigiatum

Preparação	Experimento	Amostra
Óleo Essencial	Citotoxicidade – Exclusão do azul de tripan Perfil de citocinas – Produção de IL-10 e inibição da produção de IFN- γ e TNF- α	Leucócitos totais Sangue total
Extrato de lavagem foliar em diclorometano	Hemólise Citotoxicidade – Exclusão do azul de tripan Perfil de citocinas – Produção de IL-10 e inibição da produção de IFN- γ e TNF- α	Sangue total Leucócitos totais Sangue total
Frações AFDM 4,5,10 e 11	Citotoxicidade – Apoptose Perfil de citocinas – Produção de IL-10 e inibição da produção de IFN- γ e TNF- α	Células mononucleares do sangue periférico Sangue total
Fração AFDM 10	Citotoxicidade (5 dias) – Exclusão do azul de tripan Inibição da proliferação celular	Células mononucleares do sangue periférico Células mononucleares do sangue periférico

4.6 Padronização da técnica de exclusão do azul de tripan por citometria de fluxo

Para padronização da técnica de exclusão do azul de tripan por citometria de fluxo, inicialmente foi determinado o espectro de fluorescência do azul de tripan conjugado com uma proteína, seguido da avaliação da melhor concentração do azul de tripan e do limite do tempo em que as culturas poderiam ser avaliadas após marcação. Por fim, comparou-se a técnica de exclusão do azul de tripan por citometria de fluxo com as técnicas já padronizadas para análises de morte celular. A padronização desta técnica está descrita em anexo (Anexo 4).

4.6.1 Obtenção dos espectros de excitação e emissão de fluorescência do azul de tripan

Para obtenção dos espectros de excitação e emissão, uma alíquota de 2850 µL de azul de tripan 0,02% p/v foi conjugada com 150 µL de BSA (10%). Foram obtidos os espectros de excitação e emissão de fluorescência utilizando o espectrofotômetro de fluorescência Cary Eclipse (Varian, USA). A emissão foi mantida em 0 e a varredura de excitação foi feita entre 220 e 770 nm. Posteriormente, a excitação foi mantida em 0 e a varredura de emissão foi feita entre 220 e 770 nm.

4.6.2 Avaliação da concentração ideal e do tempo de leitura do azul de tripan por citometria de fluxo

Uma alíquota da suspensão celular (5×10^5) de 7 voluntários foi incubada por 30 minutos à 50°C em banho maria, para induzir a morte celular pelo calor, e outra alíquota à 37°C em estufa com 5% de CO₂ como a situação controle. Após o período de incubação, uma alíquota de 10 µL da suspensão celular (PBMC) de 1×10^7 células/mL, totalizando 1×10^5 células mononucleares, foi incubada por cinco minutos com 190 µL de diferentes concentrações de azul de tripan sendo elas 0,002%, 0,004%, 0,04% e 0,08% diluídas em PBS. A viabilidade das culturas foi avaliada por citometria de fluxo após 5, 10 e 20 minutos da

incorporação com o azul de tripan, no comprimento de onda determinado pelo espectro de excitação. Outra alíquota, 10 μ L (1 x10⁵ células) de cada suspensão celular foi também diluída em 100 μ L PBS e 50 μ L da suspensão foi incorporada com 1 μ L de iodeto de propídeo (50 μ g/mL). A marcação com iodeto de propídeo foi utilizada como um controle para análise de morte celular.

4.6.3 Comparação da metodologia de exclusão do azul de tripan avaliada por citometria de fluxo com metodologias de avaliação de morte celular já padronizadas

Uma alíquota da suspensão celular (5x10⁵) de 7 voluntários foi incubada por 30 minutos à 50°C em banho maria, para induzir a morte celular pelo calor, e outra alíquota à 37°C em estufa com 5% de CO₂ como a situação controle.

Ao fim da incubação, as células foram divididas em três alíquotas para marcação com azul de tripan para análises no citômetro de fluxo e contagem na câmara de Neubauer, e a terceira alíquota foi marcada com iodeto de propídeo e avaliada por citometria de fluxo. As suspensões celulares foram incubados com 190 μ L de azul de tripan 0,4% e 0,002% para contagem na câmara de Neubauer e para avaliação por citometria de fluxo, respectivamente. Além disso, 10 μ L (1 x10⁵ células) da suspensão celular foi diluído em 100 μ L PBS e 50 μ L da suspensão foi incorporada com 1 μ L de iodeto de propídeo (50 μ g/mL). As avaliações fluorescentes foram feitas no citômetro de fluxo FACScan no comprimento de onda 660 nm (conhecido no FACScan como FL3), sendo adquirido 15000 eventos na região de linfócitos.

4.7 Avaliação da toxicidade, *in vitro*, do óleo essencial e do extrato diclorometânico de *Ageratum fastigiatum*

Uma vez que os produtos naturais podem conter constituintes tóxicos, foi feita análise da toxicidade do óleo essencial e do extrato diclorometânico de partes aéreas de *A. fastigiatum* a fim indicar concentrações não tóxicas dessas preparações que pudesse ser utilizadas nas

culturas celulares. Para a análise da viabilidade das culturas de leucócitos tratadas com óleo essencial ou extrato diclorometânico de *A. fastigiatum*, 10 mL de sangue total venoso de 7 indivíduos jovens aptos à doação de sangue, foram coletados e submetidos à lise de hemácias com 10 mL de uma solução de lise eritrocitária (NH_4Cl 8,3 mg/mL, NaHCO_3 1mg/mL, EDTA 1mg/mL) por 10 minutos, seguido por duas etapas de lavagem e centrifugação (250 g por 7 minutos) dos leucócitos com salina tamponada - PBS (PBS 0,015 M pH 7,4). A concentração celular foi ajustada para 1×10^7 células/mL. Cinquenta microlitros da suspensão celular (5×10^5 células) foram incubados em meio de cultura RPMI, e acrescidos do óleo essencial ou extrato diclorometânico de *A. fastigiatum* solubilizados em dimetilsulfóxido - DMSO (Sigma-Aldrich, Corporation), em diferentes concentrações. As concentrações do óleo essencial foram 5×10^{-3} , 1×10^{-2} e $2,5 \times 10^{-2}$ $\mu\text{L}/\text{mL}$ e do extrato diclorometânico 20, 60 e 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Culturas celulares tratadas apenas com salina ou com DMSO constituíram o grupo controle e grupo controle do solvente, respectivamente. Ao final da incubação de 24 horas em estufa úmida a 37°C e 5% de CO_2 , os leucócitos foram lavados com PBS (centrifugação a 250 g por 7 minutos) e suspensos em 50 μL de PBS. Dez microlitros das suspensões celulares foram incubados com 190 μL de azul de tripan (0,4% para contagem na câmara de Neubauer e 0,002% de azul de tripan para avaliação por citometria de fluxo). A viabilidade celular foi determinada pelo percentual de células viáveis (não coradas) no universo de células totais.

4.8 Avaliação da atividade hemolítica do extrato diclorometânico de *A. fastigiatum*, *in vitro*

Como a extração rápida com diclorometano das partes aéreas de *A. fastigiatum* favoreceu a extração de lactonas e lactonas sesquiterpênicas, e essas substâncias são potencialmente tóxicas (TIAN *et al.*, 2006; GEETHA *et al.*, 2012), avaliou-se também a atividade hemolítica do extrato. Concentrações do extrato que fossem hemolíticas não poderiam ser utilizadas para as análises de citocinas em sangue total, onde estão presentes leucócitos e hemácias.

Para avaliar se o extrato diclorometânico de *A. fastigiatum* seria capaz de causar lise em hemácias humanas, foi realizado o teste de hemólise conforme Montagner (2007) e modificado como a seguir. Amostras de sangue total foram diluídas a 1:20, adicionando-se 500µL de sangue total a 10 mL de tampão fosfato salina (PBS) em um bêquer. A suspensão foi mantida sob leve agitação em um agitador magnético durante toda a execução do teste. Em seguida, o extrato diclorometânico da partes aéreas de *A. fastigiatum*, diluído em DMSO nas concentrações finais de 125, 60, 30 e 15 e 7,7 µg/mL, foram incubados na presença de 100 µL de suspensão de hemácias. Culturas contendo 100 µL de suspensão de hemácias e o extrato diclorometânico da partes aéreas de *A. fastigiatum* diluído, e apresentando as mesmas concentrações finais, foram submetidos à adição de água ultra pura, para fornecer o controle positivo, que representa 100% de hemólise. Para eliminar a interferência da absorbância do extrato na densidade óptica de cada análise, foram confeccionados os respectivos controles (brancos), nos quais o extrato, nas concentrações testadas, ou o DMSO foram adicionados ao PBS ou à água. Foram confeccionadas também culturas de hemólise espontânea (controle negativo) que consistiram de PBS e 100µL de suspensão de hemácias com seus respectivos brancos (somente PBS) e culturas controle do solvente, onde foram feitas diluições de DMSO, em substituição ao extrato, acrescidas de 100µL da suspensão de hemácias. As culturas foram confeccionadas em tubos de poliestireno e incubadas por 4 horas em estufa úmida a 37°C e 5% CO₂. Após esse período, os tubos foram centrifugados (7 min., a 500 g e 22°C) e 200 µL do sobrenadante foram transferidos para uma placa de 96 poços de fundo chato. Na sequência, foi realizada a leitura da absorbância em 540nm, no leitor de placas. Dos valores de absorbância dos testes e controles foram subtraídos os valores de absorbância de seus respectivos brancos e o resultado do teste de hemólise foi obtido como percentual de hemólise de acordo com a equação:

$$\% \text{ Hemólise} = \frac{\text{Absorbância do extrato} - \text{Absorbância do controle negativo}}{\text{Absorbância do controle positivo} - \text{Absorbância do controle negativo}} \times 100$$

4.9 Avaliação da toxicidade, *in vitro*, das frações do extrato diclorometânico de *Ageratum fastigiatum*

O efeito das frações escolhidas para análise sobre a viabilidade de leucócitos foi avaliado por citometria de fluxo, utilizando um sistema comercial para detecção de células apoptóticas (Kit de apoptose BD Pharmingem, San Diego). Células mononucleares do sangue periférico de indivíduos saudáveis foram incubadas em meio de cultura RPMI e com as frações do extrato diclorometânico de *A. fastigiatum* (AFDM) concentrações 2, 10 e 20 µg/mL.

Após 4 horas de incubação a 5% de CO₂, 37°C e 95% de umidade, as células foram lavadas com PBS-W (PBS 0,015 M pH 7,4 contendo 0,5% de BSA e 0,1% de azida sódica) e marcadas por 15 minutos com iodeto de propídeo (PI) (1µL) e anexina-FITC (1µL). As amostras foram avaliadas em citômetro de fluxo (FACS Scan) até 1 hora após a marcação. A frequência de células viáveis foi determinada pela ausência de marcação por PI e anexina, enquanto a frequência de apoptose e necrose foi determinada pela marcação por anexina+PI e apenas PI, respectivamente (VERMES *et al.*, 1995).

Para análise da viabilidade celular nas culturas tratadas por 5 dias com a fração ativa do extrato diclorometânico, após o período de incubação foi feita a marcação com iodeto de propídeo e com azul de tripan conforme já descrito anteriormente.

4.10 Efeito do óleo essencial, extrato diclorometânico e frações de *A. fastigiatum* sobre a produção de citocinas, *in vitro*, por linfócitos humanos

As amostras de sangue foram colhidas em tubos contendo heparina (Vacutainer; Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA), e alíquotas de 500 µL foram colocadas em tubos de polipropileno (Falcon 2059, Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA). As amostras foram incubadas durante 4 horas a 37 ° C numa atmosfera de 5% CO₂ umidificada, na presença de 500 µl de meio RPMI-1640 (Gibco, Grand Island, NY, EUA) e Brefeldina A (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA) a uma concentração final de 10 µg/mL.

Para a análise do perfil de citocinas em populações leucocitárias na presença do óleo essencial, extrato diclorometânicos e frações, culturas de leucócitos foram incubadas com as preparações em concentrações não tóxicas. As culturas tratadas com os produtos naturais foram ainda estimuladas ou não com o PMA (Sigma, St. Louis, MO, USA) (25 ng/mL). A cultura estimulada com PMA constituiu o controle positivo. Em culturas não tratadas com o PMA foi observado o efeito das preparações de partes aéreas de *A. fastigiatum* sobre a produção da citocina IL-10. Como controle de inibição foi utilizada dexametasona (15 µM), um anti-inflamatório que reduz ativação de leucócitos (SPIES *et al.*, 2010;).

Após quatro horas de incubação, as amostras foram submetidas à lise das hemácias por adição de uma solução de lise eritrocitária e incubadas à temperatura ambiente por 15 min. As amostras lisadas foram centrifugadas, o sobrenadante descartado e as células suspensas em PBS-W (PBS 0,015 M pH 7,4 contendo 0,5% de BSA e 0,1% de azida sódica) e PBS-P (PBS 0,015 M pH 7,4 contendo 0,5% de BSA, 0,1% de azida sódica e 0,5% de saponina) e incubadas por 10 min a temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas por duas vezes com PBS-W. A suspensão celular foi homogeneizada, o volume de cada cultura celular foi distribuído em três novos tubos contendo anticorpos monoclonais, diluídos 1/10 em PBS-P, específicos para as citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-10, seguido de incubação por 30 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Todos os anticorpos monoclonais utilizados foram conjugados com ficoeritrina (PE), a especificação dos anticorpos utilizados se encontra na tabela 4. Terminada a incubação, as células foram lavadas com PBS-W e, por fim, foi avaliado o parâmetro de produção de citocinas intracitoplasmáticas, por citometria de fluxo (FACScan - Becton Dickinson), procedendo-se a aquisição de 30.000 eventos por tubo.

Tabela 4

Especificação dos anticorpos monoclonais utilizados nas análises

Anticorpos monoclonais	Especificidade	Marca	Clone
Anti-IFN- γ humano marcado com PE	Interferon- γ	Biolegend	45.B3
Anti-TNF- α humano marcado com PE	Fator de necrose tumoral- α	Biolegend	MAb11
Anti-IL-10 humano marcado com PE	Interleucina-10	Biolegend	JES3-9D7

Para obtenção e análise dos dados foi utilizado o software CellQuest™. Foram gerados gráficos bidimensionais com distribuição pontual que relacionavam as variáveis de tamanho (FSC) e complexidade interna celular (SSC). De acordo com as duas variáveis avaliadas foram selecionadas a população de linfócitos e, nesta população foi obtido o percentual de células positivas para cada uma das citocinas avaliadas (FIG. 2).

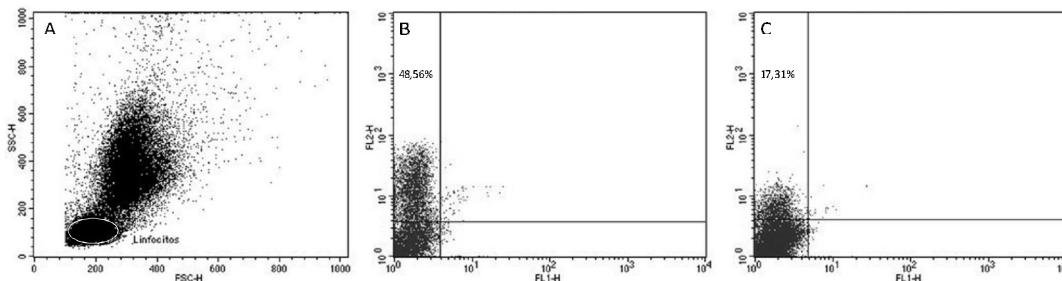


FIGURA 2 – Estratégia de análise da inibição de citocinas por citometria de fluxo. Sequência de procedimentos utilizados para as análises dos percentuais de populações celulares por citometria de fluxo. Gráfico de distribuição pontual FSC (tamanho) x SSC (granulosidade) são utilizados para a seleção da população de linfócito (A). Em seguida são utilizados gráficos de distribuição pontual FL1 x FL2 para avaliar a expressão de citocinas em linfócitos. O segundo gráfico (B) representa uma cultura estimulada com PMA e marcada com anticorpos monoclonais para TNF- α . O último gráfico (C) representa uma cultura estimulada com PMA na presença do óleo essencial de *A. fastigiatum* também marcada com anticorpos monoclonais anti-TNF- α .

4.11 Análise do efeito da fração 10 do extrato diclometânico de *A. fastigiatum* (AFDM 10) sobre a proliferação de linfócitos humanos

Uma vez que a proliferação de linfócitos também está relacionada à sua ativação, foi avaliado o efeito do tratamento com a fração AFDM 10 sobre a proliferação de linfócitos. Para essa análise, foi utilizada a técnica de incorporação e decaimento da fluorescência de CFSE (5-(and-6)-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester), conforme descrito por Lyons e colaboradores (2000). Para isso, 1×10^6 células suspensas em RPMI suplementado com L-glutamina, antibiótico e antimicótico, foram incubadas a 37°C por 10 min em 1000 µL de CFSE (Sigma, St. Louis, MO, USA) (10 µM) diluído em PBS/BSA 0,1%. A reação foi interrompida adicionando-se 10 mL de RPMI completo gelado, seguido de incubação em gelo por 5 min. Após duas lavagens com RPMI completo (200 g, 4° C, 10 min), as células foram suspensas em 500 µL de RPMI.

Para a análise do efeito inibitório de AFDM 10 sobre a resposta proliferativa de linfócitos, foram confeccionadas culturas estimuladas com o mitógeno Fitohemaglutinina (PHA), na presença de AFDM 10. Cerca de 5×10^5 células incubadas em RPMI completo foram estimuladas ou não com 10µL de PHA (Sigma, St. Louis, MO, USA) (1 µg/mL) na presença de AFDM 10 nas concentrações 2, 6 e 10 µg/mL. Como controle de inibição células foram incubadas com PHA e tratadas com dexametasona (15 µM). As culturas foram realizadas em placas de 24 poços e permaneceram por 5 dias em estufa úmida, a 37°C contendo 5% de CO₂. Após o período de incubação, as células foram lavadas 2 vezes com PBS gelado (200 g, 4°C, 10 min).

A proliferação celular foi determinada pela medida do decaimento da fluorescência do CFSE através da citometria de fluxo (FACScan® - Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Após aquisição de 50000 eventos, dentro de uma região (gate) correspondente às células de interesse, foi feita a análise da proliferação celular utilizando o programa Cell-Quest (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). A fluorescência do CFSE foi medida no canal FL1, a intensidade de fluorescência do CFSE foi analisada por histogramas de FL1 em função do número de eventos. A região M1 foi definida como células marcadas com CFSE derivadas

de culturas não estimuladas, que representa o pico de células quiescentes. Os picos de M2 a M6 foram definidos de acordo com picos de diferentes intensidades de CFSE em culturas estimuladas com PHA (FIG. 3). A proliferação foi determinada pelo índice de proliferação (IP), calculado como a seguir:

$$IP = \frac{100 - Y}{Y} \quad (1)$$

sendo,

$$Y(\%) = \frac{X_0}{2} + \frac{X_1}{4} + \frac{X_2}{8} + \frac{X_3}{16} + \frac{X_4}{32} + \frac{X_5}{64} \quad (2)$$

X0 representa a porcentagem de células que não se dividiram (localizadas em M1), e X1 a 6 representam os picos de divisão gradual (localizados de M2 a M6) (ÂNGULO e FULCHER, 1998).

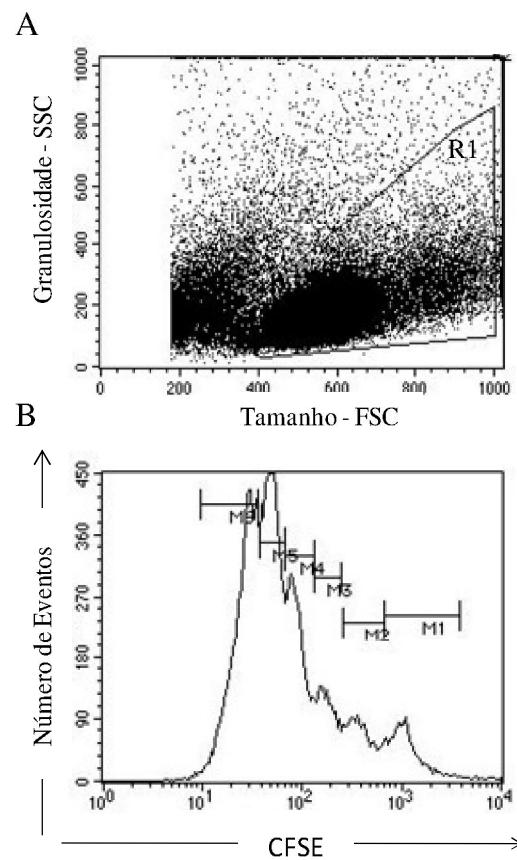


FIGURA 3- Sequência de procedimentos utilizados para as análises de proliferação celular pela diluição do CFSE. Gráfico de distribuição pontual FSC x SSC são utilizados para a seleção das populações desejadas (A). Histogramas de FL1 (CFSE) versos o número de eventos, foram utilizados pra definir as regiões M₁ a M₆, com as quais foi obtido o índice de proliferação (IP) para a população de linfócitos.

4.12 Análise estatística

Inicialmente, foi realizada uma análise descritiva dos dados. Após a análise da normalidade (Shapiro-Wilk), as diferenças entre os dados para as variáveis com distribuição simétrica foram testadas utilizando ANOVA com *Post Hoc* de Tukey. Para as variáveis com distribuição assimétrica, foi utilizado o teste Kruskall-Wallis. As diferenças estatísticas entre dois grupos foram avaliadas por meio do teste Mann Whitney. Diferenças estatisticamente significantes foram consideradas quando $p < 0,05$.

Na comparação da técnica de exclusão do azul de tripan por citometria de fluxo com as técnicas já padronizadas, marcação com iodeto de propídeo analisado por citometria de fluxo e técnica de exclusão do azul de tripan por contagem na câmara de Neubauer, foi utilizada análise de variância ANOVA *two-way* com *Post Hoc* de Tukey. O teste de Pearson foi utilizado em todas as análises de correlação.

5 RESULTADOS

Os resultados serão apresentados em quatro tópicos. Os primeiros resultados serão relacionados à padronização da técnica de exclusão do azul de tripan por citometria de fluxo para análise de viabilidade. No segundo tópico serão apresentados os resultados da identificação de classes químicas nas partes aéreas pulverizadas de *A. fastigiatum*. No terceiro tópico serão apresentados os resultados obtidos com análises no óleo essencial e no último tópico os resultados obtidos nas análises realizadas com o extrato diclorometânico de *A. fastigiatum* e frações.

5.1 Padronização da técnica de exclusão de azul de tripan analisada por citometria de fluxo

5.1.1 Obtenção dos espectros de excitação e emissão de fluorescência do azul de tripan

Os resultados indicaram que o azul de tripan na concentração 0,002% p/v não apresenta picos de excitação entre 220 e 760 nm (FIG. 4A) quando avaliado no fluorímetro. Já complexado com a proteína albumina bovina sérica (BSA) o azul de tripan apresenta picos máximos de excitação em 296, 480 e 648nm. No espetro de emissão, de forma semelhante, somente o azul de tripan complexado com o BSA emitiu fluorescência e, os picos máximos de emissão foram em 470 e 660nm (FIG. 4B).

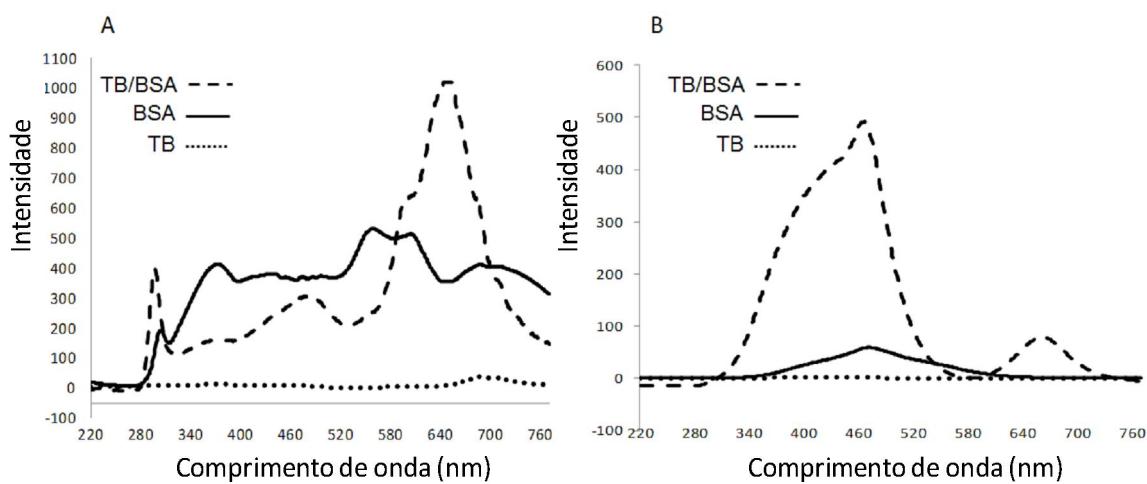


FIGURA 4 – Análises de espectrofluorimetria. Espectro de excitação (A) e emissão (B) de fluorescências de soluções contendo azul de tripan - TB a 0,02% p/v (.....), albumina bovina sérica (BSA) (—) a 10% p/v, e a interação TB/BSA (- - -).

5.1.2 Avaliação da concentração ideal e tempo de leitura do azul de tripan por citometria de fluxo

A concentração de azul de tripan ideal para análises por citometria de fluxo foi 0,002% p/v, uma vez que, nesta concentração, os perfis de leitura foram semelhantes aos controles iodeto de propídeo tanto na situação controle, como quando as células foram induzidas à morte pelo aumento de temperatura. De acordo com os resultados, com o decréscimo da concentração do azul de tripan, também ocorreu um decréscimo na intensidade de fluorescência (FIG. 5).

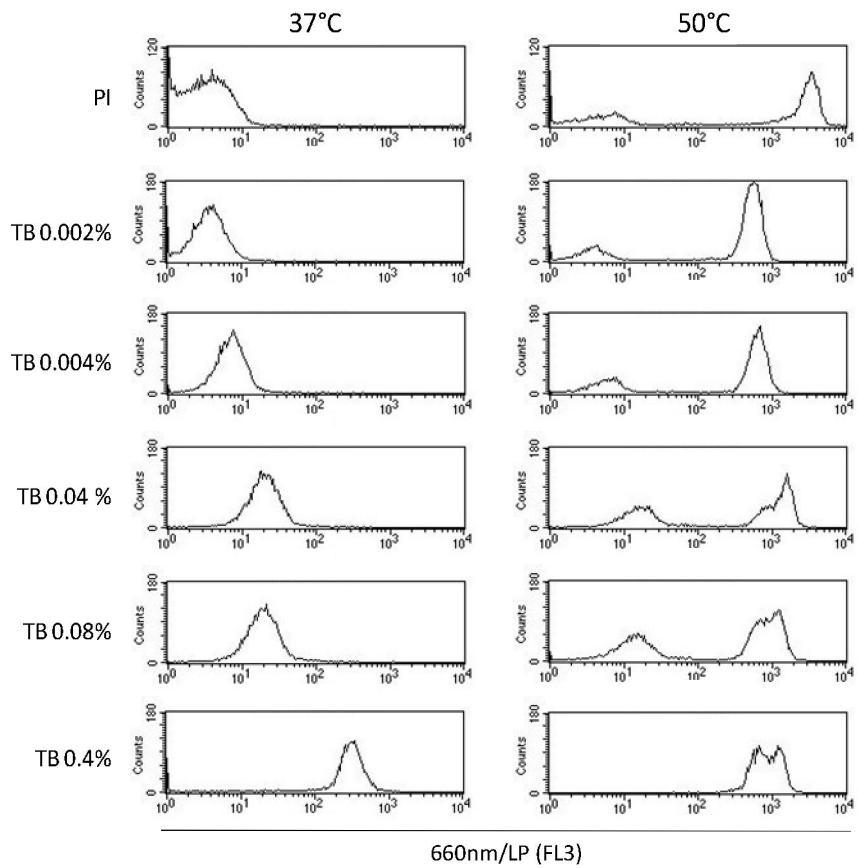


FIGURA 5 - Análise da técnica de exclusão do azul de tripan em diferentes concentrações por citometria de fluxo. Células mononucleares do sangue periférico (PBMC) incubadas a 37 °C e 50°C marcadas com diferentes concentrações de azul de tripan (TB), sendo elas 0,002%, 0,004%, 0,04%, 0,08% e 0,4% p/v e analisadas por citometria de fluxo, (FACScan) utilizando o filtro de 650/LP (FL3 detector). A marcação com ioodeto de propídeo (PI) e análise por citometria de fluxo foi utilizada como método comparativo.

As células marcadas com azul de tripan na concentração 0,002% p/v quando avaliadas nos tempos de 0, 5, 10, 20 e 30 minutos não aumentaram o valor da intensidade de fluorescência (FIG. 6). Assim, não houve aumento da incorporação do azul de tripan em função do tempo.

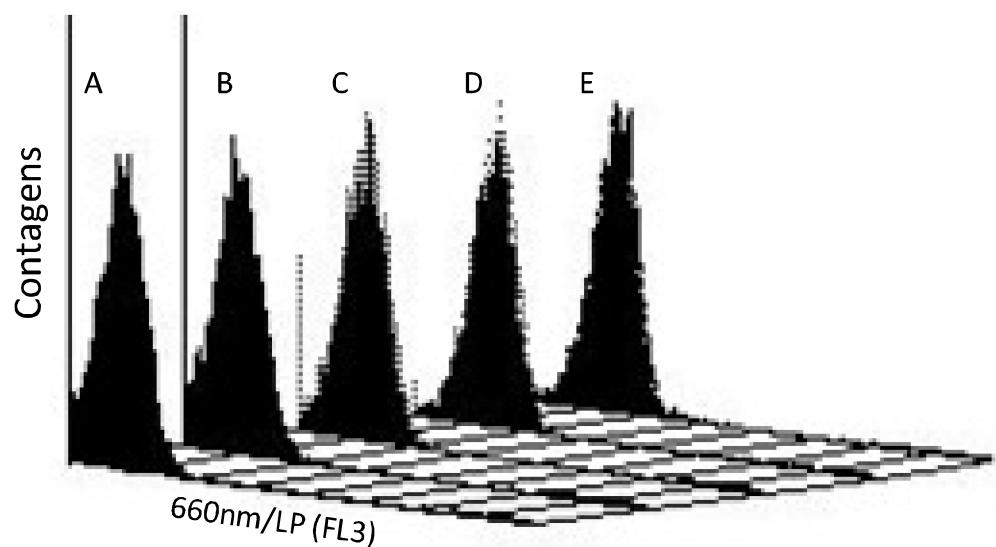


FIGURA 6 - Histogramas de análise do ensaio de exclusão do azul de tripan por citometria de fluxo. O azul de tripan foi utilizado na concentração 0,002% p/v e a avaliação foi feita nos tempos 0 (A), 5 (B), 10 (C), 20 (D) e 30 (E) minutos após a adição de corante.

5.1.3 Comparação da metodologia de exclusão do azul de tripan avaliada por citometria de fluxo com a metodologias de avaliação de morte celular já padronizadas

Os resultados evidenciaram que não houve diferença na avaliação realizada pelas três metodologias, tanto na situação controle como quando as células foram induzidas à morte pelo aumento de temperatura (FIG. 7).

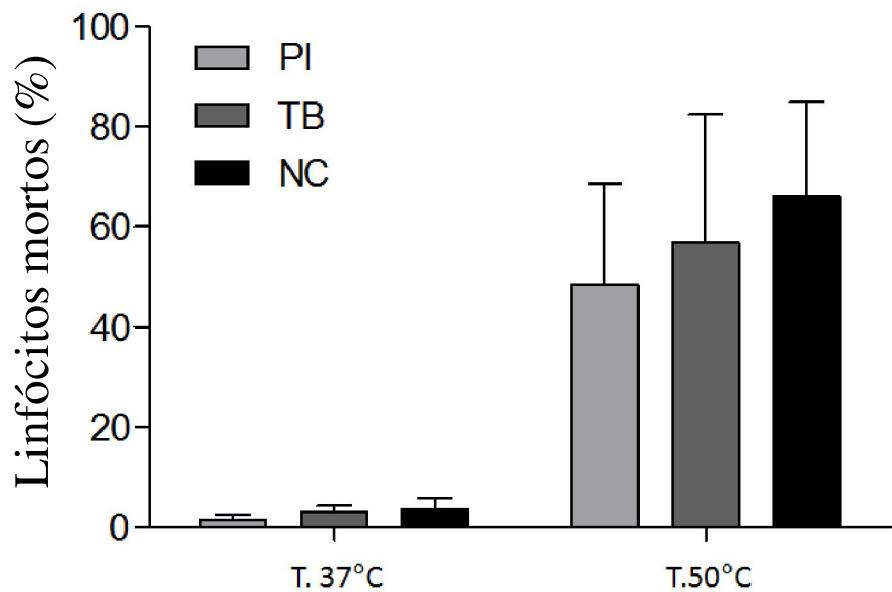


FIGURA 7 – Comparação dos métodos de análise de morte celular. Foram utilizadas as técnicas de exclusão do azul de tripan por citometria de fluxo e contagem na câmara de Neubauer e também a técnica de incorporação do iodeto de propídeo. As células foram incubadas em uma situação controle (T. 37°C) e foram induzidas à morte pelo aumento de temperatura (T. 50°C).

Além disso, houve uma correlação positiva e significativa entre a análise feita com azul de tripan e iodeto de propídeo no citômetro de fluxo ($r^2= 0,9758$). Também houve uma

correlação positiva e significativa entre as análises realizadas com azul de tripan, através da contagem na câmara de Neubauer e da avaliação por citometria de fluxo, porém esta correlação apresentou um valor de coeficiente de correlação menor ($r^2= 0,8986$) (FIG. 8A). Ainda foi observada uma semelhança para os perfis dos histogramas de análise na citometria de fluxo da técnica de exclusão do azul de tripan e incorporação do iodeto de propídeo (FIG. 8B). Os perfis foram semelhantes tanto na situação controle, como quando as células foram induzidas à morte celular.

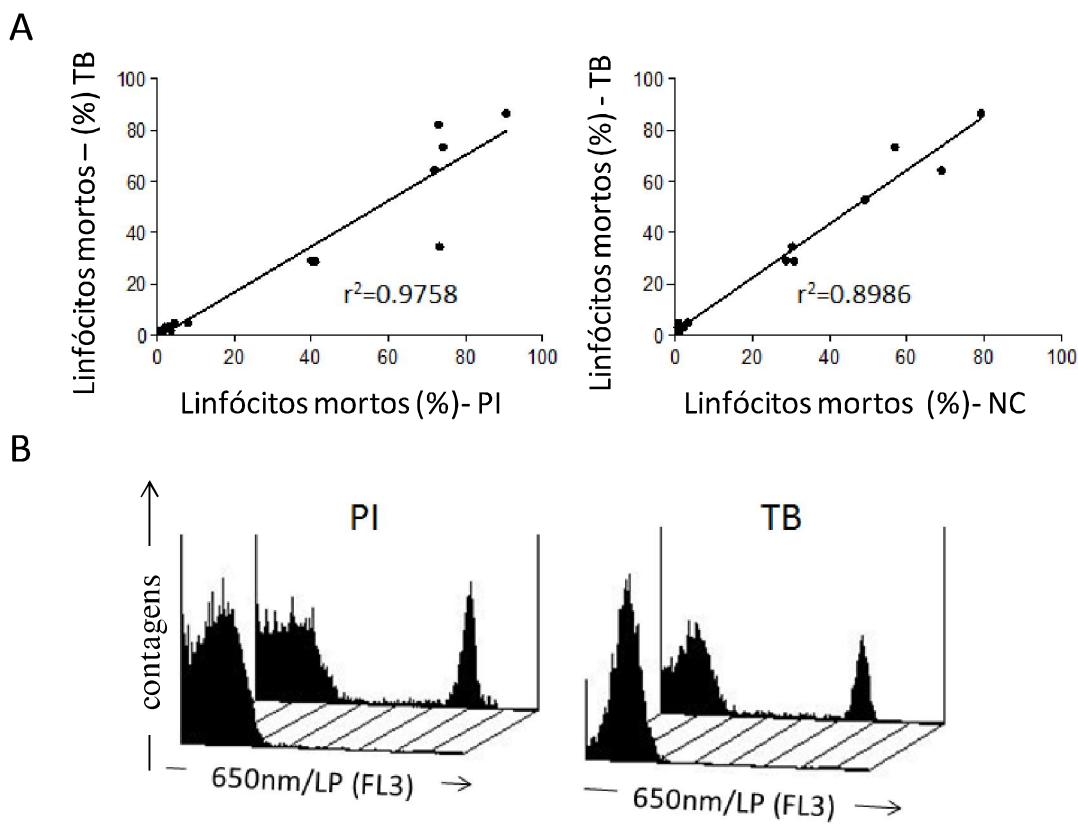


FIGURA 8 – Correlação entre percentuais de morte celular analisados pelas técnicas de exclusão do azul de tripan (TB) por citometria e por contagem na câmara de Neubauer (NC) e pela técnica de incorporação do iodeto de propídeo (PI) (A). Analises de histogramas de avaliação de morte celular pela técnica de azul de tripan por citometria de fluxo (TB) e pela incorporação com iodeto de propídeo (PI) na situação controle e quando as células foram induzidas a morte.

5.2 Identificação de classes químicas nas partes aéreas de *Ageratum fastigiatum*

A tabela 5 apresenta as classes químicas que pesquisadas nas partes aéreas de *A. fastigiatum*. Abaixo são relatados os resultados das reações realizadas para a triagem da identificação das classes químicas.

Tabela 5

Classes químicas presentes nas partes aéreas de *A. fastigiatum*.

Classe Química	Resultado
Taninos	Negativo
Alcalóides	Negativo
Flavonóides	Positivo
Antraquinonas	Negativo
Saponinas	Positivo
Esteróides/Terpenóides	Positivo

Na pesquisa de taninos a reação com gelatina e a reação com cloreto férrico foram negativas, já a reação com acetato de chumbo foi positiva. Mas para que haja uma confirmação, duas das reações deveriam apresentar resultado positivo. Portanto, considera-se a amostra negativa para taninos (FIG. 9).

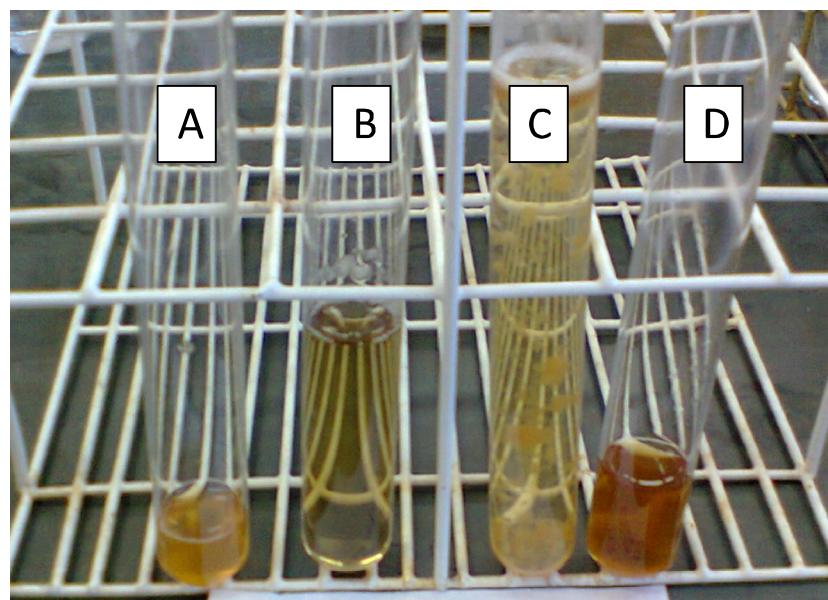


FIGURA 9 - Pesquisa de taninos nas partes aéreas de *Ageratum fastigiatum*. Reação negativa para análise de taninos verificada pela ausência da formação de precipitados na reação com gelatina (A), ausência da formação da cor azul/verde na reação com cloreto férrico (B) e ausência de precipitado esbranquiçado na reação com acetato de chumbo (C). Foi utilizado um controle negativo das reações (D), contendo somente o extrato das partes aéreas de *A. fastigiatum*, para visualização da cor do extrato, para fins de comparação dos resultados obtidos.

Nas partes aéreas de *A. fastigiatum* não foram encontrados alcalóides. A figura 10 apresenta os resultados das reações cromogênicas, tanto na reação direta (FIG. 10A) quanto na pesquisa confirmatória (FIG. 10B). A reação positiva tanto na reação direta como na confirmatória seria evidenciada pelo desenvolvimento de precipitados de coloração: alaranjado, branco, marrom e amarelo, nos tubos representados pela sequência a,b,c e d, respectivamente. Na figura observa-se que não houve formação desses precipitados.

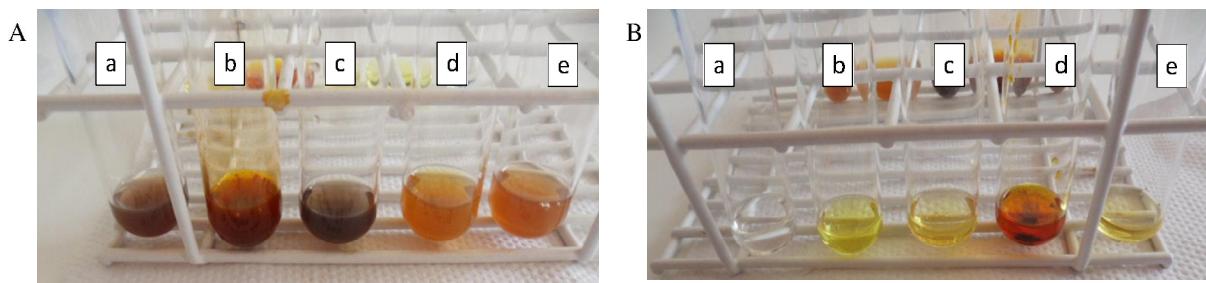


FIGURA 10 - Pesquisa de alcalóides nas partes aéreas de *Ageratum fastigiatum*. Resultado negativo para análise de alcalóides verificado na reação direta (A) e na reação com prévia extração em clorofórmio (B). A reação foi negativa pois não houve formação dos precipitados de cor alaranjado, branco, marrom e amarelo nos tubos tratados com iodo de bismutato de potássio (a), iodo de mercurato de potássio (b), iodo-iodeto de potássio (c) e ácido pícrico (d), respectivamente. Foi utilizado um controle negativo das reações (e), contendo somente o extrato das partes aéreas de *A. fastigiatum*, para visualização da cor do extrato, para fins de comparação dos resultados obtidos.

Em todas as reações realizadas para pesquisa de flavonóides a amostra das partes aéreas de *A. fastigiatum* foi positiva. A figura 11 ilustra a positividade na reação de Shinoda, em que houve desenvolvimento de coloração avermelhada. Na reação de Taubouk e na reação com cloreto de alumínio foi observada emissão de fluorescência sob luz ultravioleta. Na reação de Pew ocorreu formação de coloração vermelha.

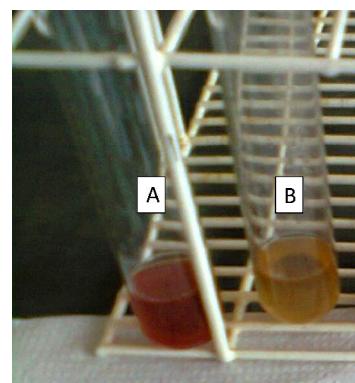


FIGURA 11 - Pesquisa de flavonóides nas partes aéreas de *Ageratum fastigiatum*. Resultado positivo para análise de flavonóides pela reação Shinoda, flavonóides reagem com magnésio em solução ácida, exibindo coloração vermelha (A). Foi utilizado um controle negativo das reações (B), contendo somente o extrato das partes aéreas de *A. fastigiatum*, para visualização da cor do extrato, para fins de comparação do resultado obtido.

Na análise de antraquinonas o resultado foi negativo, tanto na reação direta, como na reação de Bornträger com prévia hidrólise ácida. Indicando que nesta amostra das partes aéreas de *A. fastigiatum* não há a presença de antraquinonas (FIG. 12).

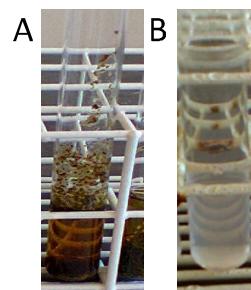


FIGURA 12 - Pesquisa de antraquinonas nas partes aéreas de *A. fastigiatum*. Resultado negativo para antraquinonas evidenciado pela ausência de coloração vermelha tanto na pesquisa direta (A) e na reação de Bornträger com prévia hidrólise ácida (B).

Na pesquisa de saponinas através da determinação do índice de espuma, os resultados indicaram que a partir da terceira diluição (30%) houve formação de espuma persistente por 15 minutos com altura mínima de 1 cm (FIG. 13). Sendo assim, o valor do índice de espuma foi cerca de 333, valor superior a 200, o que indica a presença de saponinas na amostra.

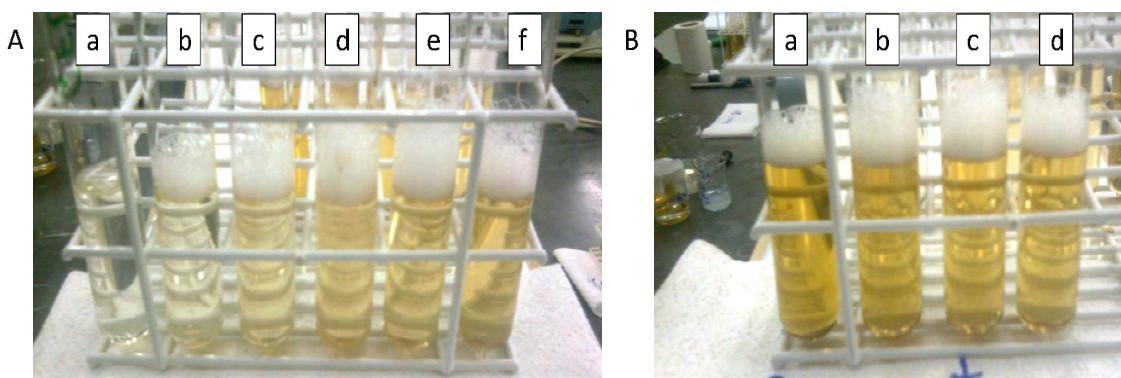


FIGURA 13 - Pesquisa de saponinas nas partes aéreas de *A. fastigiatum*. Resultado positivo para saponinas verificada pela espuma persistente a partir da diluição de 30% (Ac). Cada tubo representa uma diluição sendo elas 10% (Aa), 20% (Ab), 30% (Ac), 40% (Ad), 50% (Ae), 60% (Af), 70% (Ba), 80% (Bb), 90% (Bc) e o extrato não diluído (Bd).

Na pesquisa de esteróides e terpenóides a reação foi positiva, formando rapidamente a coloração azul, seguida da coloração verde. A figura 14 mostra a coloração verde, indicativa da presença de terpenóides.



FIGURA 14 - Pesquisa de terpenóides nas partes aéreas de *A. fastigiatum*. Nesta pesquisa as partes aéreas foram submetidas à extração com clorofórmio seguida de adição de anidrido acético e ácido sulfúrico concentrado. A formação de cor verde indicou a presença de terpenóides na amostra.

5.3 Composição química e atividades biológicas avaliados no óleo essencial de *A. fastigiatum*

No óleo essencial, foi feita análise das substâncias presentes pela técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-MS), e foram realizados os testes da toxicidade e do efeito do óleo essencial sobre a produção de citocinas em linfócitos.

5.3.1 Composição química do óleo essencial de *A. fastigiatum*

Os componentes identificados no óleo essencial assim como os índices de retenção e o valor percentual estão representados na tabela 6. Foram identificados 26 compostos, correspondendo à cerca de 70% da composição do óleo. Dentre as substâncias identificadas, 11 são monoterpenos e 15 sesquiterpenos. Os compostos que não foram identificados não apresentaram espectros de massas compatíveis com os das bibliotecas (seus espectros de massas tinham índice de similaridade (SI) baixo quando comparados aos das espectrotécas) e

não apresentaram índice de retenção compatíveis com aqueles presentes na literatura ou em websites, não sendo possível sua identificação precisa.

Os compostos presentes em maior valor percentual nesta amostra foram α -pineno (7,51%), limoneno (5,9%), *trans*-cariofileno (2,04%), α -humuleno (3,52%), óxido de cariofileno (13,59%), humuleno 1,2-epoxido (8,41%), 1,6-humuladien-3-ol (17,71%) e α -Cadinol (3,36%).

Tabela 6

Percentual das substâncias identificadas no óleo essencial de *Ageratum fastigiatum*

Substâncias	IR ^a	IR _{calc}	% ^b
α-Pineno	939	932	7,51
Sabineno	976	971	0,33
β-Pineno	980	977	0,62
Mirceno	991	988	0,25
Limoneno	1031	1028	5,90
Aldeído α-canfolênico	1127	1126	0,26
<i>trans</i> -Pinocarveol	1139	1140	0,29
<i>trans</i> -Verbenol	1144	1145	0,55
Pinocarvona	1162	1161	0,21
Verbenona	1204	1206	0,58
Carvona	1242	1243	0,47
α-Copaeno	1376	1372	0,99
β-Elemeno	1391	1387	0,56
<i>trans</i> - cariofileno	1418	1415	2,04
α-Humuleno	1454	1451	3,52
γ-Muuroleno	1477	1471	0,58
α-Curcumano	1483	1478	0,42
α-Muuroleno	1499	1495	0,28
γ-Cadineno	1513	1509	0,36
Espatulenol	1576	1572	0,53
Oxido de cariofileno	1581	1577	13,59
Humuleno 1,2-epoxido	1606	1604	8,41
1,6-Humulanodien-3-ol	1619	1617	17,71
<i>epi</i> - α-Cadinol	1640	1639	1,22
α-Muurolol	1645	1642	0,47
α-Cadinol	1653	1651	3,36

^a Índice de retenção indicado na literatura e em websites. ^b Percentuais da área do pico obtidos por normalização das áreas; IR_{calc}: índice de retenção calculado.

5.3.2 Toxicidade do óleo essencial de *A. fastigiatum*

Uma vez que extratos vegetais e solventes são capazes de induzir a morte celular, avaliamos, inicialmente, o efeito de diferentes concentrações do óleo sobre a viabilidade de leucócitos. O óleo essencial de *A. fastigiatum* na concentração de $2,5 \times 10^{-2}$ $\mu\text{L/mL}$ reduziu a viabilidade dos leucócitos do sangue periférico para $89,04 \pm 5,18\%$ (FIG. 15), já as concentrações $0,5 \times 10^{-2}$ e 1×10^{-2} $\mu\text{L/mL}$ de óleo essencial de *A. fastigiatum* não alteraram a viabilidade dos leucócitos ($93,45 \pm 2,27\%$ e $94,87 \pm 2,14\%$, respectivamente) quando comparados ao grupo controle ($96,79 \pm 1,27\%$). Diante dos resultados obtidos, as concentrações de $0,5 \times 10^{-2}$ e 1×10^{-2} $\mu\text{L/mL}$ do óleo essencial foram consideradas não tóxicas aos leucócitos, podendo ser utilizadas nos testes de avaliação do perfil de citocinas, *in vitro*. Houve conformidade nos testes de viabilidade realizados por contagem na câmara de Neubauer e por citometria.

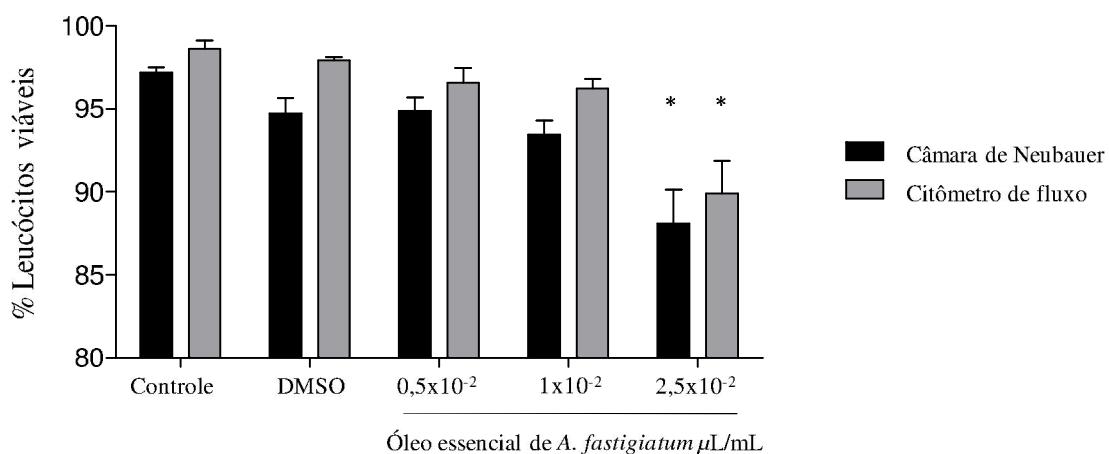


FIGURA 15 - Percentual de leucócitos viáveis tratados com diferentes concentrações do óleo essencial de *A. fastigiatum*. Culturas: controle negativo, controle do solvente (DMSO), e grupos em que as culturas celulares ($n = 7$) foram incubadas na presença do óleo essencial de *Ageratum fastigiatum* nas concentrações $0,5 \times 10^{-2}$, 1×10^{-2} e $2,5 \times 10^{-2}$ $\mu\text{L/mL}$. A avaliação foi feita pela técnica de exclusão com azul de tripan na câmara de Neubauer (■) e por citometria de fluxo (■). Os resultados foram expressos com média \pm erro padrão. * $p \leq 0,05$. Método estatístico utilizado – ANOVA seguida de Tukey.

5.3.3 Produção e inibição da produção de citocinas pelo óleo essencial de *A. fastigiatum*

O possível efeito anti-inflamatório do óleo essencial de *A. fastigiatum* pode se dar tanto pela indução da produção de citocinas anti-inflamatórias como pela diminuição de citocinas pró-inflamatórias. Sendo assim, avaliou-se a produção de IL-10 (citocina anti-inflamatória) por linfócitos do sangue periférico e a inibição da produção de IFN- γ e TNF- α (citocina pró-inflamatórias) em linfócitos estimulados com PMA e simultaneamente tratados com o óleo essencial de *A. fastigiatum*. Os resultados demonstraram que não houve diferença na produção de IL-10 em culturas tratadas com o óleo essencial (FIG. 16 A). Também não houve a inibição da produção de IFN- γ em linfócitos tratados com o óleo essencial e estimulados com PMA (FIG. 16 B). Já o percentual de linfócitos positivos para o TNF- α foi reduzido na presença do óleo nas concentrações $0,5 \times 10^{-2}$ ($26,59 \pm 3,80\%$) e $1 \times 10^{-2} \mu\text{L/mL}$ ($23,86 \pm 3,03\%$) quando comparados ao grupo que foi somente estimulado com o PMA ($40,78 \pm 3,40\%$) (FIG. 16 C).

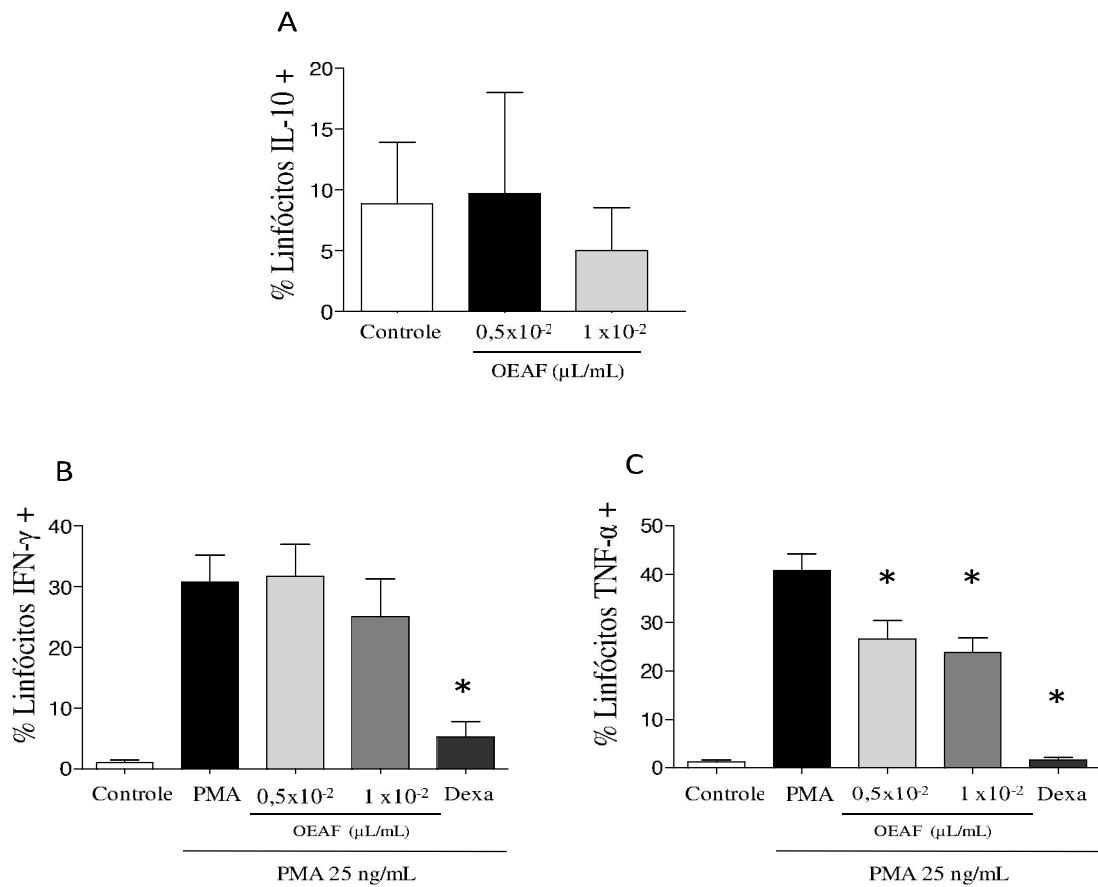


FIGURA 16 - Análise do percentual de linfócitos IL-10 positivos (A), linfócitos IFN- γ positivos (B) e TNF- α positivos (C) de culturas de leucócitos estimulados ou não com PMA (acetato de forbol miristato) e tratados ou não com o óleo essencial de *A. fastigiatum* (OEAf) nas concentrações $0,5 \times 10^{-2}$ e 1×10^{-2} $\mu\text{L/mL}$. Dexametasona ($15 \mu\text{M}$) foi utilizada como controle de inibição de citocinas ($n = 7$). Os resultados foram expressos com média \pm erro padrão. * Diferença em relação ao grupo PMA, $p \leq 0,05$. Método estatístico utilizado – ANOVA seguida de Tukey.

5.4 Análises no extrato diclorometânico de *A. fastigiatum* e suas frações

5.4.1 Atividade hemolítica do extrato diclorometânico de *A. fastigiatum*

Na figura 17 estão expressos os resultados para atividade hemolítica do extrato diclorometânico de *A. fastigiatum*. O extrato nas concentrações iguais ou superiores a 60 $\mu\text{g/mL}$ foi hemolítico, gerando um percentual de hemólise superior a 13%. O controle do solvente DMSO não apresentou atividade hemolítica.

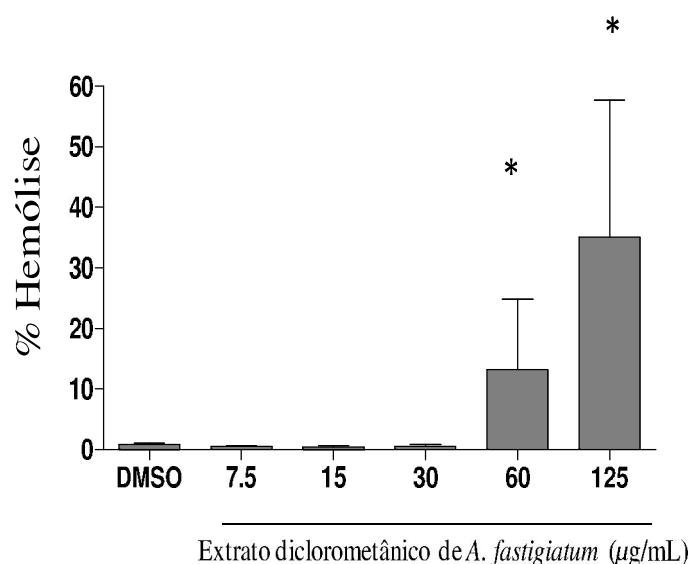


FIGURA 17 - Percentual de hemólise em culturas tratadas com diferentes concentrações do extrato de lavagem foliar de *Ageratum fastigiatum* em diclorometano e com o controle do solvente DMSO 1% ($n = 7$). Os resultados foram expressos com média \pm erro padrão. * Diferença em relação ao grupo controle, $p \leq 0,05$. Método estatístico utilizado – ANOVA seguida de Tukey.

5.4.2 Toxicidade do extrato diclorometânico de *A. fastigiatum* sobre leucócitos humanos *in vitro*

O extrato de *A. fastigiatum* nas concentrações 60 e 125 µg/mL reduziu a viabilidade celular dos leucócitos do sangue periférico para $65,87 \pm 18,61\%$ e $82,58 \pm 13,44\%$, respectivamente (FIG. 18), já a concentração 20 µg/mL não alterou a viabilidade dos leucócitos quando comparados ao grupo controle ($95,57 \pm 2,06\%$ e $95,61 \pm 1,27\%$ respectivamente). A cultura tratada com o controle do solvente, DMSO, não alterou o percentual de viabilidade quando comparado à cultura controle.

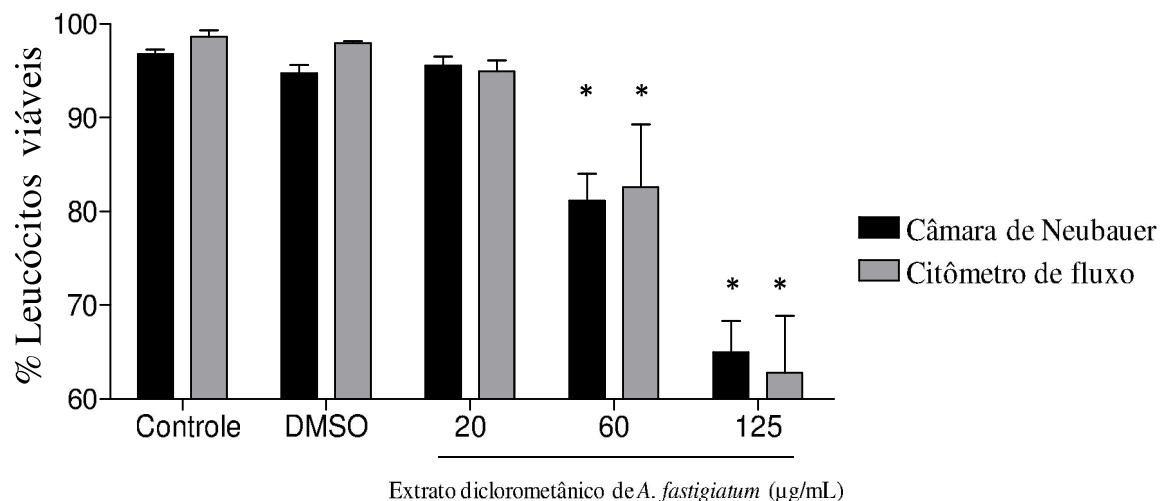


FIGURA 18 - Percentual de leucócitos viáveis em culturas tratadas com diferentes concentrações do extrato diclorometânico de *Ageratum fastigiatum*. Grupos controle negativo, controle do solvente (DMSO), e grupos em que as culturas celulares ($n = 7$) foram incubadas na presença do extrato diclorometânico de *A. fastigiatum* nas concentrações $0,5 \times 10^{-2}$, 1×10^{-2} e $2,5 \times 10^{-2} \mu\text{L}/\text{mL}$. A avaliação foi feita pela técnica de exclusão com azul de tripan na câmara de Neubauer (■) e por citometria de fluxo (■). Os resultados foram expressos com média \pm erro padrão. * $p \leq 0,05$. Método estatístico utilizado – ANOVA seguida de Tukey.

5.4.3 Produção e inibição de citocinas pelo extrato diclorometânico de *A. fastigiatum*

A figura 19 apresenta o efeito do extrato diclorometânico de *A. fastigiatum* sobre a produção e inibição de citocinas promovidos pelo extrato. O extrato na concentração de 20 µg/mL não alterou a produção de IL-10 em linfócitos, quando comparado à cultura controle. Já a produção de IFN-γ e TNF-α em culturas estimuladas com PMA foi reduzida quando os leucócitos foram tratados com o extrato diclorometânico. Culturas estimuladas com PMA tiveram o percentual médio de linfócitos IFN-γ+ de $34,28 \pm 4,22\%$, enquanto as culturas tratadas com o extrato tiveram o valor médio de $25,46 \pm 5,50\%$. Culturas estimuladas com PMA tiveram o percentual médio de linfócitos TNFα+ de $36,69 \pm 4,53\%$, enquanto as culturas tratadas com o extrato tiveram o valor médio de $18.80 \pm 3,95\%$. Como esperado, a dexametasona reduziu o percentual de linfócitos IFN-γ+ e TNF-α+. O controle do solvente, DMSO não alterou o percentual de linfócitos positivos para nenhuma das citocinas avaliadas, indicando que o efeito observado é proveniente do extrato e não do solvente.

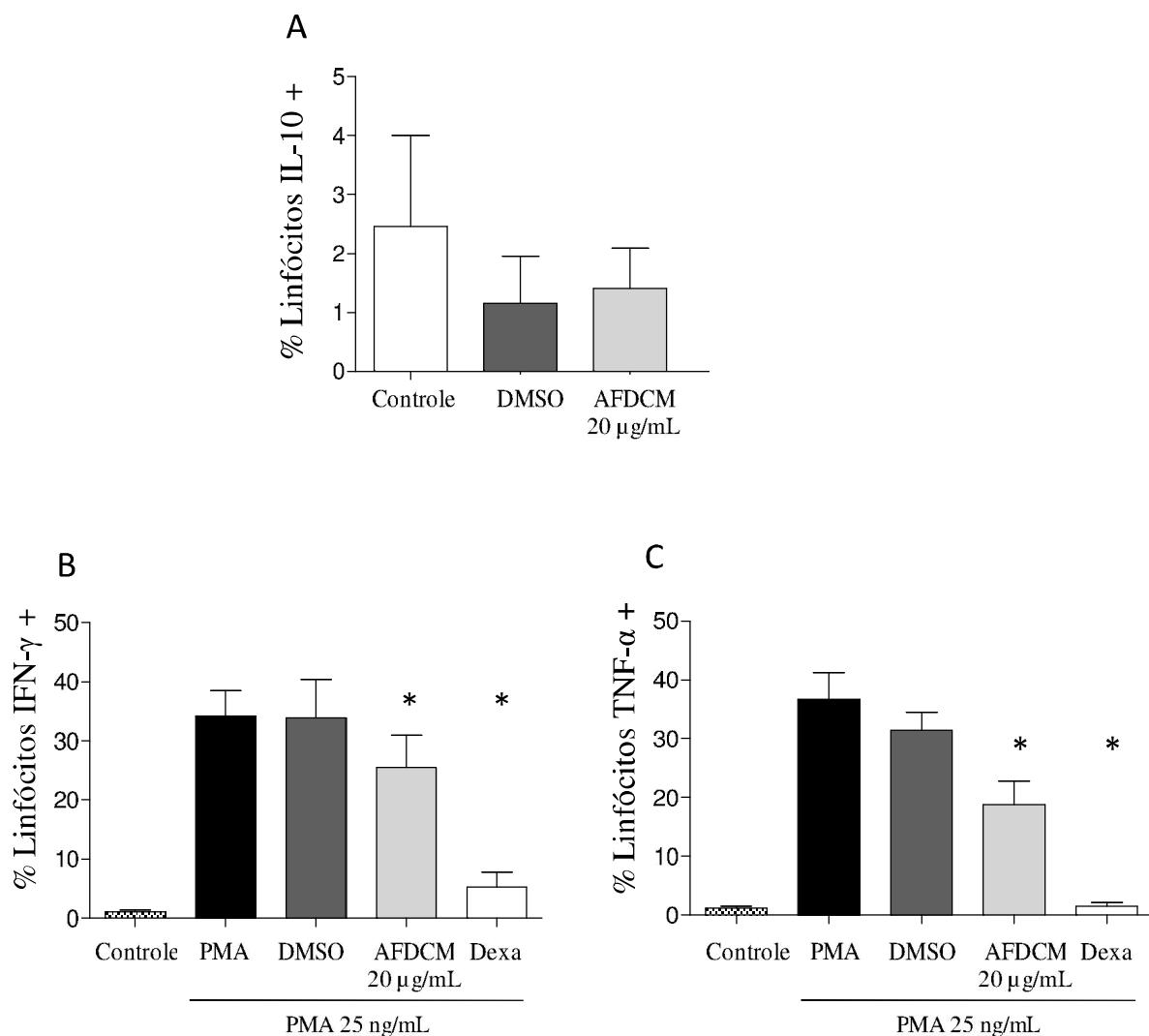


FIGURA 19 - Análise do percentual de linfócitos IL-10 +(A), linfócitos IFN- γ + (B) e TNF- α + (C) em culturas de leucócitos estimulados ou não com PMA (acetato de forbol miristato) e tratados ou não com o extrato diclometânico de *A. fastigiatum* (AFDCM) na concentração 20 μ g/mL. Dexametasona (15 μ M) foi utilizada como controle de inibição de citocinas ($n = 7$). Os resultados foram expressos com média \pm erro padrão. * Diferença em relação ao grupo PMA, $p \leq 0,05$. Método estatístico utilizado – ANOVA seguida de Tukey.

5.4.4 Toxicidade das frações do extrato diclorometânico de *A. fastigiatum*

Foram obtidas 24 frações a partir do extrato de lavagem foliar em diclorometano, após análise por cromatografia em camada delgada algumas frações foram reunidas obtendo-se 14 frações. Pelo critério de maior massa, as frações 4 (0,019g), 5 (0,013g), 10 (0,021g) e 11 (0,025g) foram escolhidas para avaliações. Inicialmente, foram investigadas as concentrações não tóxicas das frações, tendo como base a concentração não tóxica do extrato bruto diclorometânico 20 μ g/mL. As frações foram denominadas *Ageratum fastigiatum* diclorometânico (AFDM) seguidas do número de identificação (4,5, 10 e 11).

Os resultados indicaram que todas as frações foram tóxicas aos linfócitos na concentração de 20 μ g/mL. Já nas concentrações de 10 e 2 μ g/mL as culturas mantiveram a viabilidade semelhantes às observadas no grupo controle (Tabela 7). As culturas tratadas com as frações AFDM 4 e 10 na concentração 20 μ g/mL morreram, principalmente, por apoptose, e após 4 horas de cultura se encontravam em apoptose recente. As culturas tratadas com a fração AFDM 5 também à 20 μ g/mL já encontravam-se em apoptose tardia, e as células tratadas com a fração AFDM 11 na mesma concentração morreram principalmente por necrose. O tratamento com DMSO, solvente das frações, não alterou a viabilidade dos leucócitos.

Tabela 7

Análise da viabilidade de culturas na presença das frações 4, 5, 10 e 11 (AFDM 4, 5, 10 e 11) do extrato diclorometano nas concentrações 2, 10 e 20 µg/mL através do ensaio de apoptose (marcação com Anexina V e iodeto de propídeo), para avaliação de células viáveis, apoptóticas e necróticas (n = 3). Dados expressos em valores percentuais (%).

		Viabilidade	Apoptoserecente	Apoptose tardia	Necrose
Controles	Controle	87.00±1.59	9.84±3.60	2.57±1.90	3.90±0.61
	DMSO	83.81±9.77	11.78±4.15	2.38±1.72	2.02±0.93
AFDM 4	2 µg/mL	83.23±10.22	12.72±8.9050	2.12±1.55	1.91±0.37
	10 µg/mL	73.73±10.22	9.81±6.43	3.42±3.30	18.11±25.34
	20 µg/mL	12.42±5.92 *	77.44±3.99 *	7.69±4.39	2.14±1.32
AFDM 5	2 µg/mL	89.56±3.07	9.45±2.90	0.27±0.13	0.62±0.39
	10 µg/mL	84.05±5.25	12.39±6.12	1.28±1.31	2.49±2.75
	20 µg/mL	37.56±9.46 *	8.62±6.81	45.78±13.27*	8.16±12.63
AFDM 10	2 µg/mL	87.33±3.14	5.50±2.90	1.65±1.32	2.04±0.22
	10 µg/mL	81.34±10.68	20.11±11.20	0.70±0.36	1.24±1.05
	20 µg/mL	59.44±11.45 *	31.21±4.73 *	3.70±1.66	1.58±0.45
AFDM 11	2 µg/mL	90.21±3.78	11.93±2.96	0.28±0.11	0.46±0.24
	10 µg/mL	76.67±10.50	17.04±11.53	0.38±0.31	1.18±1.15
	20 µg/mL	63.10±2.33 *	9.04±2.01	10.37±4.99	20.93±9.90*

AFDM – Frações do extrato diclorometânico de *A. fastigiatum*. * Diferenças estatísticas em relação ao grupo controle,(p ≤ 0,05).

5.4.5 Análise da produção e inibição de citocinas pelas frações AFDM 4, 5, 10 e 11

Na análise do perfil de produção de citocinas em culturas tratadas com PMA, a fração 10 (AFDM 10) na concentração 10 µg/mL reduziu o percentual de linfócitos que produziram TNF- α , cerca de 2,8 vezes quando comparadas as culturas tratadas apenas com PMA (FIG. 12). Nenhuma das frações alterou o perfil da produção de IL-10 e IFN- γ quando comparados aos grupos controles (FIG. 20 e 21).

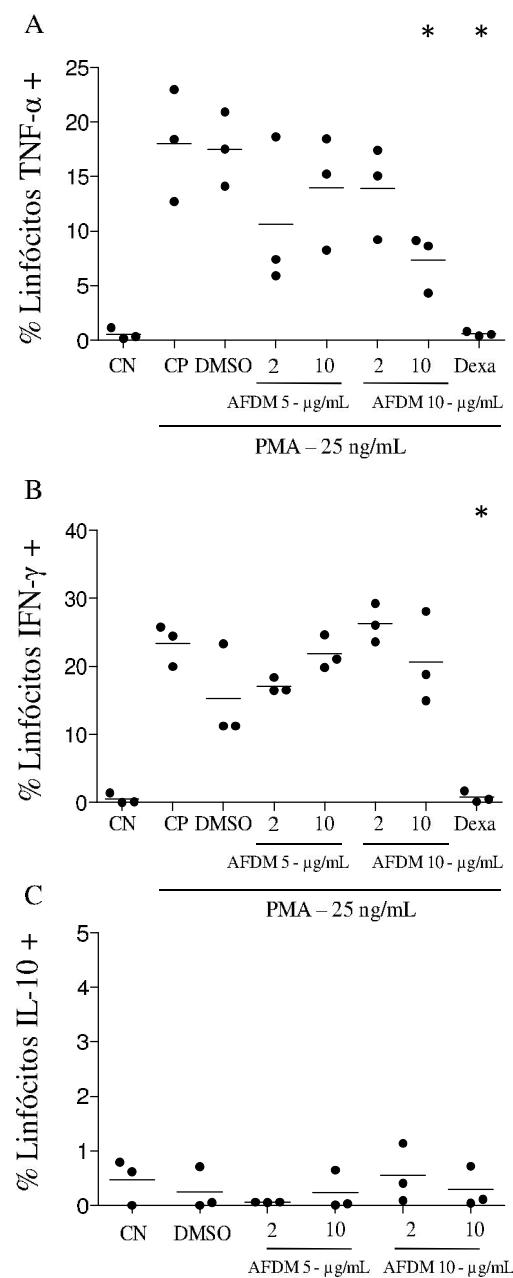


FIGURA 20 - Análise do percentual de linfócitos TNF- α + (A), IFN- γ + (B) e IL-10 + (C) de culturas de leucócitos tratados com AFDM 5 e 10. Controle negativo, não estimulado (CN), controle do solvente (DMSO), controle positivo, estimulado com PMA (CP). A análise para as frações de *A. fastigiatum* AFDM 5 e AFDM 10 nas concentrações 2 e 10 $\mu\text{g/mL}$ ($n = 3$). Os resultados foram expressos com a dispersão dos pontos e média. Método estatístico utilizado – ANOVA seguida de Tukey.

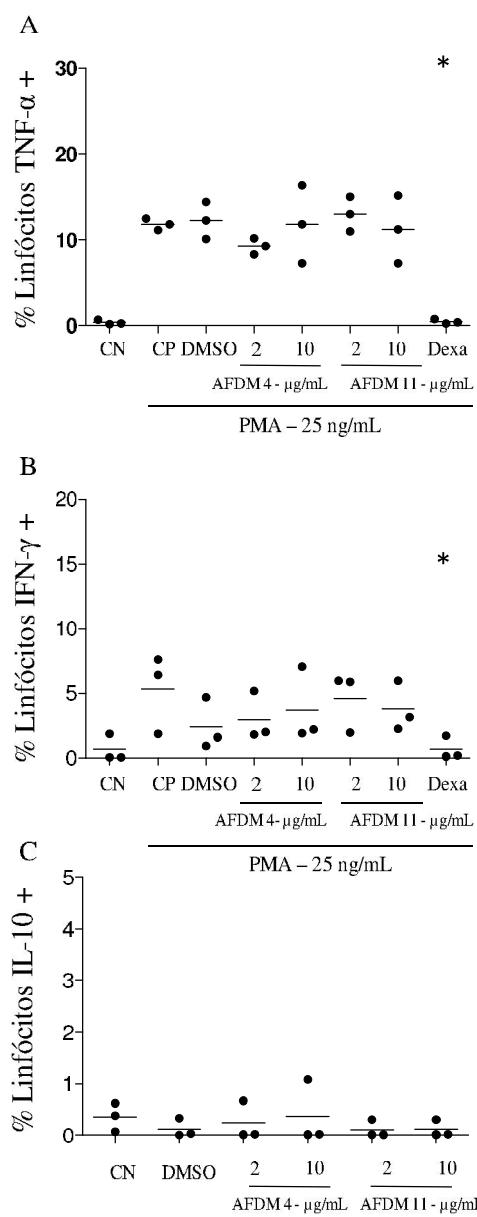


FIGURA 21 - Análise do percentual de linfócitos TNF- α + (A), IFN- γ + (B) e IL-10 + (C) de culturas de leucócitos tratados com AFDM 4 e 11. Controle negativo, não estimulado (CN), controle do solvente (DMSO), controle positivo, estimulado com PMA (CP). A análise para as frações de *A. fastigiatum* AFDM 4 e AFDM 11 nas concentrações 2 e 10 $\mu\text{g/mL}$ (n=3). Os resultados foram expressos com a dispersão dos pontos e média. Método estatístico utilizado – ANOVA seguida de Tukey.

5.4.6 Toxicidade celular induzida por AFDM 10 durante cinco dias

Nas análises de proliferação celular as células ficaram em contato com um mitógeno por 5 dias. Assim é necessário que as culturas tratadas com diferentes concentrações de AFDM 10 por 5 dias estejam viáveis. Os resultados abaixo indicam que todas as concentrações avaliadas 2, 6 e 10 $\mu\text{g/mL}$ de AFDM 10 mantiveram a viabilidade da cultura semelhante ao grupo controle. O grupo controle de morte apresentou diferença em relação a todos os outros grupos. Houve correlação entre as três técnicas utilizadas para essa análise (FIG 22).

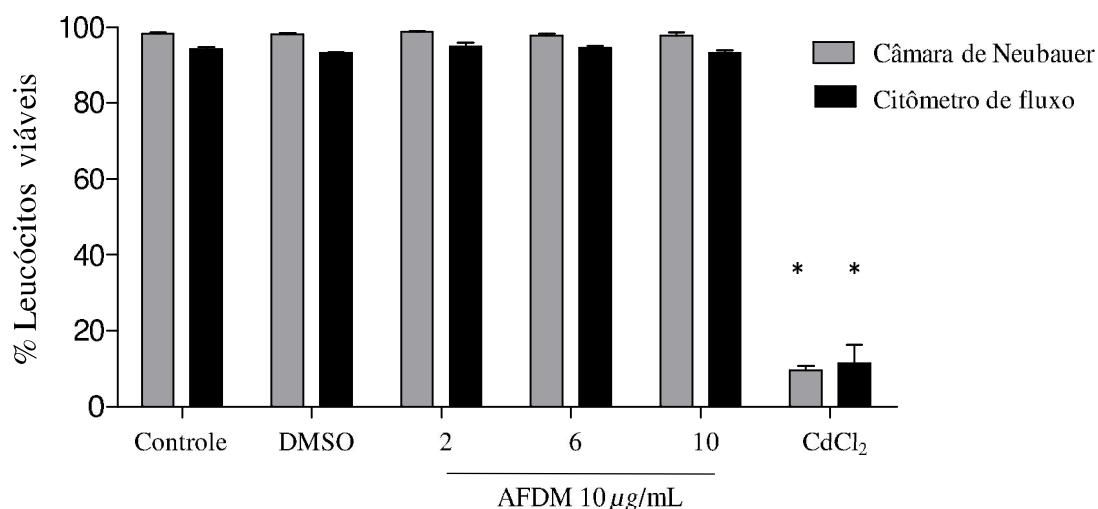


FIGURA 22 – Análise da viabilidade celular em culturas tratadas com AFDM 10. Percentual de leucócitos viáveis nos grupos controle, controle do solvente (DMSO), controle de morte celular (CdCl_2) e grupos em que as culturas celulares foram incubadas na presença de AFDM 10, fração do extrato diclorometânico de *Ageratum fastigiatum*, nas concentrações de 2, 6 e 10 $\mu\text{g/mL}$. A avaliação foi feita pela técnica de exclusão com azul de tripan na câmara de Neubauer e por citometria de fluxo, Os resultados foram expressos com média \pm erro padrão.
* Diferença estatisticamente significante em relação ao controle. Método estatístico utilizado – ANOVA seguida de Tukey.

5.4.7 Análise da inibição da proliferação de linfócitos por AFDM 10

Os resultados indicaram que AFDM 10 reduziu o índice de proliferação de forma dose dependente (FIG 23). Sendo que linfócitos tratados com AFDM 10, 10 μ g/mL reduziram a proliferação cerca de 14 vezes quando comparado a cultura estimulada com PHA. A figura 24 mostra os histogramas com os perfis de proliferação para os diferentes grupos. Os dados demonstram que à medida que há um aumento na concentração de AFDM 10 na cultura há uma diminuição da população de linfócitos com menor intensidade de fluorescência, indicando uma menor proliferação.

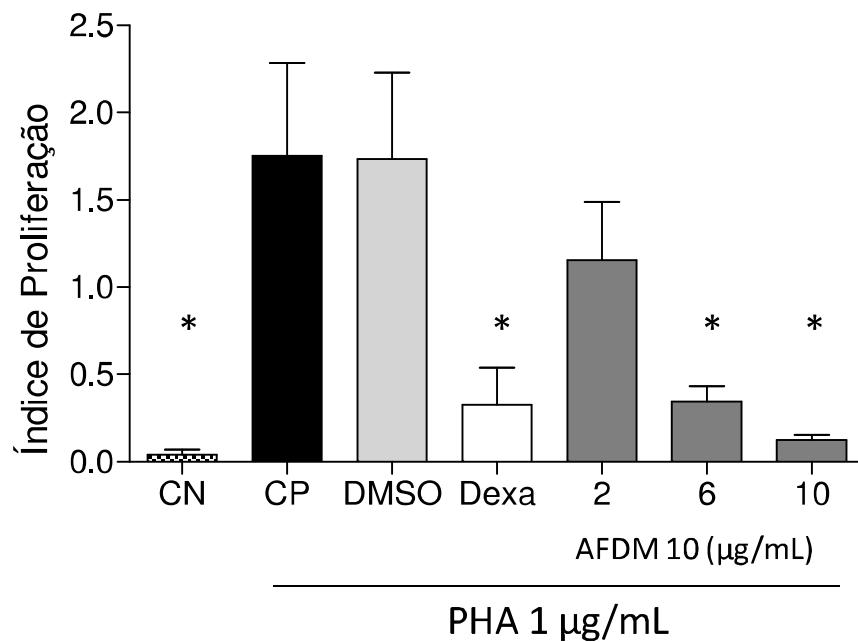


FIGURA 23- Índice de proliferação de linfócitos não estimulados (controle negativo CN) cultura estimulados com PHA (1 μ g/mL) (CP), e tratadas com diferentes concentrações 2, 6, e 10 μ g/mL de AFDM 10 (uma fração do extrato diclorometânico de *A. fastigiatum*). No controle de inibição foi utilizado dexametasona 15 μ M. Resultados foram expressos com média \pm erro padrão. * Diferença em relação ao grupo PHA, $p \leq 0,05$. Método estatístico utilizado – ANOVA seguida de Tukey.

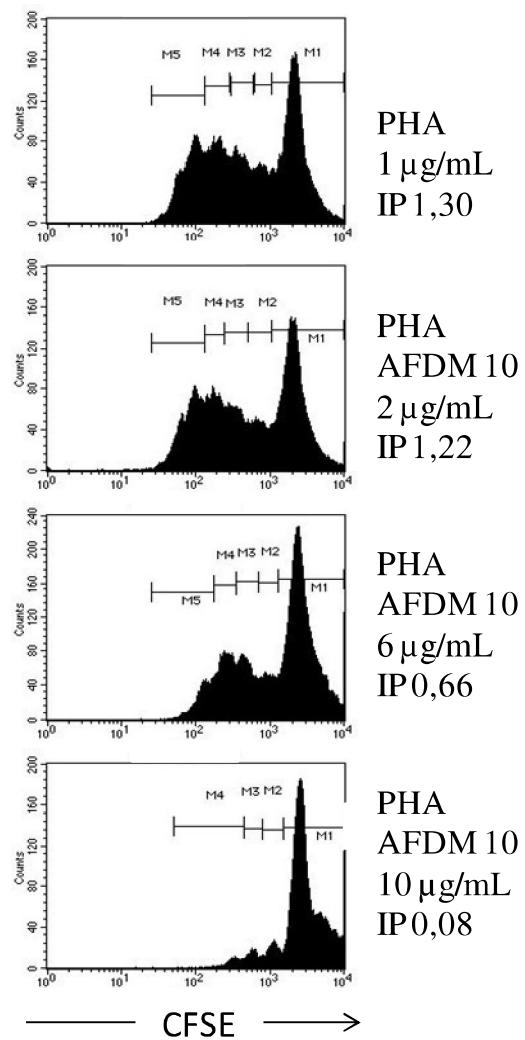


FIGURA 24 - Histogramas de análise da proliferação celular em culturas estimuladas com PHA (1 µg/mL) e tratadas com a diferentes concentrações 2, 6, e 10 µg/mL de AFDM 10 (uma fração do extrato diclorometânico de *A. fastigiatum*). Sendo IP o índice de proliferação, calculado conforme descrito na metodologia.

6 DISCUSSÃO

A discussão será feita em três tópicos, sendo o primeiro relacionado à padronização do ensaio de exclusão do azul de tripan por citometria de fluxo, seguido dos resultados encontrados nas análises do óleo essencial. No terceiro tópico serão discutidos resultados obtidos com o extrato de lavagem foliar das partes aéreas de *A. fastigiatum* em diclorometano e suas frações. A composição química das partes aéreas de *A. fastigiatum* será discutida dentro dos tópicos relacionados.

6.1 Padronização da técnica de exclusão do azul de tripan avaliada por citometria de fluxo

Os resultados indicaram que o azul de tripan quando complexado com proteínas torna-se excitável e emite fluorescência, como observado também por Harriso e colaboradores (1981). O laser de argônio, conhecido como laser azul, presente em citômetros de fluxo, é uma fonte de luz que excita fluorocromos no comprimento de onda 488 nm, essa fonte será capaz de excitar o azul de tripan, uma vez que um dos seus picos máximos de excitação é em 480 nm, próximo ao valor de 488 nm. Já a emissão poderá ser avaliada no comprimento de onda da fluorescência vermelha, que no citômetro FacsCan® é observada no canal de fluorescência 3 (FL3), que capta emissões superiores à 650nm. Kumar e colaboradores (2008) demonstraram que o azul de tripan é um fluorocromo adequado para a coloração de esporos de fungos micorrízicos arbusculares e análise foi feita em comprimento de onda da fluorescência vermelha, o que corresponde ao FL3 no Facscan®.

Células marcadas com azul de tripan, na concentração 0,002% p/v, forneceram os perfis de leitura semelhantes ao das células que incorporaram o iodeto de propídeo, uma técnica já padronizada para análise de morte celular por citometria de fluxo (VERMES *et al.*, 1995). As células avaliadas não incorporaram mais o azul de tripan com o tempo. O mesmo

não acontece com o azul de tripan 0,4% p/v, utilizado para a contagem na Câmara de Neubauer. Jones e Senft (1985) observaram que com o passar do tempo, as células vão incorporando mais o azul de tripan na concentração 0,4%, o que prejudica a análise de viabilidade. Portanto, para a contagem na Câmara de Neubauer é indicada a incubação máxima de 5 minutos das células com o azul de tripan. Já para análise por citometria de fluxo, há uma segurança para a realização da leitura utilizando o azul de tripan (0,002% p/v) em até 30 minutos após a marcação.

As três metodologias fornecem resultados semelhantes, apresentam forte correlação entre si, e são capazes de identificar diferenças de valores percentuais de morte celular. Porém a contagem realizada na câmara de neubauer (CA), apresenta a desvantagem de que o número de células contadas (115 ± 35) foi inferior ao número de células avaliadas na citometria de fluxo (cerca de 15 mil células por análise). O valor avaliado pela contagem na câmara de Neubauer é mais influenciado por erros de pipetagem, e erros ligados ao pesquisador, enquanto o valor avaliado na citometria de fluxo é menos influenciado por esses erros devido ao número de células avaliadas, cerca de 15 mil células (KIM *et al.*, 2011).

Uma vez que os resultados indicaram que o azul de tripan pode ser utilizado como um marcador de morte celular por citometria de fluxo de forma comparável ao iodeto de propídeo, essa metodologia foi empregada neste estudo nas análises realizadas para avaliar toxicidade dos produtos naturais obtidos das partes aéreas de *A. fastigiatum*. Para fins de comparação também foi realizada a contagem na câmara de Neubauer. Houve correlação entre as duas metodologias utilizadas e, não houve diferença entre as técnicas em nenhuma das análises realizadas.

6.2 Avaliações realizadas utilizando o óleo essencial de *A. fastigiatum*

As substâncias aldeído α -canfolênico, *trans*-pinocarveol, *trans*-verbeol, α -curumano e 1,6-humulanedien-3-ol foram identificados pela primeira vez em *A. fastigiatum* neste estudo. Dentre estes o 1,6-humulanedien-3-ol foi um dos compostos presentes em maior valor

percentual nesta amostra (17,71%). Os monoterpenos limoneno, α - e β -pineno e os sesquiterpenos *trans*-cariofileno, α - humuleno, α -copaeno e espatulenol foram detectados em outros estudos realizados com óleos essenciais de *A. fastigiatum* (DEL-VECHIO-VIEIRA *et al.*, 2009a, 2009b; GONÇALVES *et al.*, 2011). No entanto, comparado com os estudos anteriores, houve diferenças qualitativas dos mono e dos sesquiterpenos que compõem os óleos essenciais de *A. fastigiatum*. Essas diferenças refletem as variações que ocorrem em óleos essenciais de plantas de mesma espécie, em virtude de variações genéticas, ontogenéticas e ambientais (LIMA *et al.*, 2003; GOBBO-NETO e LOPES, 2007). A identificação de classes dos compostos de fato já havia indicado a presença de terpenóides na amostra das partes aéreas de *A. fastigiatum* estudada, isso direcionou a análise dos espectros obtidos na análise da composição química do óleo essencial.

Diante dos resultados obtidos na análise de toxicidade, as concentrações de $0,5 \times 10^{-2}$ e $1 \times 10^{-2} \mu\text{L/mL}$ do óleo essencial de *A. fastigiatum* foram consideradas como não tóxicas aos leucócitos e utilizadas nos testes de avaliação do perfil de citocinas *in vitro*. A atividade anti-inflamatória *in vitro*, foi avaliada pelo modelo de indução de produção de citocinas com PMA. O PMA possui a característica de ativar leucócitos, induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (BISHAYI *et al.*, 2002). Assim, culturas tratadas simultaneamente com PMA e produtos naturais poderiam indicar o efeito de inibição da produção de citocinas. Dessa forma, foi avaliado o efeito do óleo essencial de *A. fastigiatum* em inibir a produção de citocinas em leucócitos humanos ativados. Os resultados indicaram que o óleo essencial de *A. fastigiatum* reduziu o percentual de linfócitos que produziram TNF- α , quando comparados as culturas tratadas somente com PMA. Não houve um aumento da produção de IL-10 nas culturas tratadas com o óleo essencial de *A. fastigiatum*. A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória que inibe ativação de macrófagos, de linfócitos T e contribui para a atividade anti-inflamatória (HOWARD *et al.*, 1993). No entanto, o efeito anti-inflamatório observado no óleo essencial de *A. fastigiatum* pode ser devido à diminuição de uma citocina inflamatória (TNF- α) e não pela indução da produção de citocinas anti-inflamatórias. A eficácia de redução da produção de citocinas em linfócitos promovida pelo óleo essencial de *A. fastigiatum* na concentração $1 \times 10^{-2} \mu\text{L/mL}$ foi cerca de 43% em relação à eficácia da dexametasona.

O TNF- α é um mediador importante na resposta imune inflamatória, capaz de induzir a expressão de moléculas de adesão no endotélio, favorecendo o recrutamento celular para o sítio da inflamação (WAJANT *et al.*, 2009; APOSTOLAKI *et al.*, 2010). Portanto, a diminuição de TNF- α pode resultar em diminuição da migração leucocitária e redução do número de leucócitos no sítio da inflamação. Esse efeito pode ser benéfico em inflamações exacerbadas e em algumas doenças auto-imunes. Após o tratamento com o óleo essencial de *A. fastigiatum* foi observada, justamente, a redução da migração leucocitária para o local da inflamação induzida por carragenina em animais (DEL-VECHIO-VIEIRA *et al.*, 2009). Embora no estudo acima citado as citocinas não tenham sido avaliadas, é possível que a modulação de citocinas esteja envolvida nesta ação.

O óxido de cariofileno, um dos compostos presentes no óleo essencial de *A. fastigiatum* (13,59%) demonstrou também diminuir o edema de pata induzido por carragenina, neste estudo os autores não demonstraram a participação das citocinas, mas é possível que elas estejam envolvidas diminuindo a permeabilidade do endotélio no tecido inflamado (CHAVAN *et al.*, 2010). Outros compostos presentes no óleo como α -pineno (7,51%), limoneno (5,9%), *trans*-cariofileno (2,04%) e α -humuleno (3,52%) isolados de outras plantas demonstraram inibir a citocina TNF- α em diferentes modelos (FERNANDES *et al.*, 2007; BAE *et al.*, 2012; MEDEIROS *et al.*, 2007; YOON *et al.*, 2010). O limoneno parece interferir na via da proteína p38 (HIROTA *et al.*, 2010), já os compostos *trans*-cariofileno e α -humuleno parecem interferir na via do NF- κ B (MEDEIROS *et al.*, 2007).

Os resultados sugerem que parte da atividade anti-inflamatória do óleo essencial de *Ageratum fastigiatum* pode ser devida à diminuição da citocina pró-inflamatória TNF- α por linfócitos ativados. Na amostra do óleo essencial analisada, foram encontradas moléculas capazes de alterar a produção desta citocinas suportando os achados da atividade anti-inflamatória *in vitro*.

6.3 Análises no extrato diclorometânico de *A. fastigiatum* e frações

A metodologia de lavagem foliar rápida com diclorometano favorece a extração de lactonas, porque os tricomas presentes nas folhas da planta rapidamente sofrem rompimentos e liberam as lactonas estocadas (AMBRÓSIO *et al.*, 2008). Bohlmann (1983) coletou amostras das partes aéreas de *A. fastigiatum* e encontrou lactonas sesquiterpênicas nas amostras. O uso popular da planta como anti-inflamatório tópico na forma de emplasto (GONÇALVES *et al.*, 2011), pode também indicar que a maceração prévia das folhas seja uma força mecânica para a liberação de lactonas que poderiam ser responsáveis por parte da atividade anti-inflamatória de *A. fastigiatum*. É possível que neste extrato também estejam presentes terpenos e flavonóides majoritários na constituição desta planta. Essas classes químicas descritas foram encontradas nas partes aéreas de *A. fastigiatum*, e também podem contribuir para a ação anti-inflamatória.

A alta toxicidade do extrato aos leucócitos e às hemácias pode ser devido à ação de lactonas, que são substâncias tóxicas. Como na concentração de 20 µg/mL não há toxicidade, nem aos leucócitos nem às hemácias, essa concentração foi utilizada nos testes de produção de citocinas utilizando amostras de sangue total. Os resultados indicaram que ambas as citocinas inflamatórias avaliadas, TNF- α e IFN- γ , tiveram a produção diminuída quando as células foram tratadas com o extrato diclorometânico de *A. fastigiatum*. Comparada à dexametasona a eficácia do extrato na redução de TNF- α e IFN- γ foi cerca de 50,93 % e 30,4 %, respectivamente. De forma semelhante, os extratos em acetato de etila e etanólico das partes aéreas de *A. fastigiatum* demonstraram essa ação de inibir a produção de citocinas inflamatórias *in vitro*, porém, ambos os extratos não reduziram os percentuais de linfócitos produtores de TNF- α e sim a intensidade de produção desta citocina. No extrato etanólico foi encontrada e isolada uma cumarina conhecida como ayapin ou 6,7-methylene-dioxide coumarin, ainda não foi descrito atividade anti-inflamatória para essa molécula. Já no extrato acetato de etila das partes aéreas de *A. Fastigiatum*, foram encontrados terpenos dentre eles o majoritário foi o lupeol (51%) que já foi descrito com atividade anti-inflamatória (AVELAR-FREITAS *et al.*, 2013b).

Gonçalves e colaboradores (2011) identificaram o triterpeno lupeol como principal constituinte da fração clorofórmio da partição do extrato em acetato de etila (51,06%) em extrato de *A. fastigiatum*, também coletada em Diamantina. O lupeol extraído de *Crataeva religiosa* Forst. F. (Capparaceae) foi capaz de reduzir a migração celular no exsudato inflamatório e inibir a produção de IL-2 e TNF- α em modelo murino de inflamação por carragenina (AHMAD *et al.*, 2009). O IFN- γ é uma citocina envolvida com ativação de células, como macrófagos e linfócitos T auxiliares do tipo 1, e também envolvida no aumento da expressão de moléculas de apresentação de antígeno. Além disso, esta citocina favorece a diferenciação de linfócitos T auxiliares (Th) para um fenótipo inflamatório Th1 (ELYAMAN *et al.*, 2009). Assim, a diminuição de IFN- γ culmina com um efeito anti-inflamatório, reduzindo a ativação de leucócitos no sítio da inflamação, sobretudo em inflamações crônicas. É possível que os constituintes do extrato, tais como o lupeol e algumas lactonas, interfiram em vias de ativação importantes para a síntese do TNF- α e IFN- γ . Lactonas são biologicamente ativas, diminuindo a produção de citocinas inflamatórias por inibirem a via do fator de transcrição NF- κ B (LIAW *et al.*, 2013; FONSECA *et al.*, 2011).

Foi avaliada a viabilidade dos leucócitos frente às concentrações 2, 10 e 20 μ g/mL de AFDM 4, 5,10 e 11. Essas frações foram escolhidas pelo critério de maior massa. Na concentração 20 μ g/mL, todas as frações avaliadas alteraram a viabilidade, já nas concentrações de 2 e 10 μ g/mL as culturas mantiveram a viabilidade semelhante às culturas controle. A morte celular gerada pela concentração 20 μ g/mL das frações AFDM 4, 5 e 10 foi principalmente causada pelo mecanismo de morte programa conhecido como apoptose, já a fração 11 gerou morte pelo mecanismo de necrose. Compostos indutores de apoptose são candidatos promissores para análise de atividade anti-tumoral (TIAN *et al.*, 2006; GEETHA *et al.*, 2012).

Quanto à produção de citocinas, a fração AFDM 10 reduziu o percentual de linfócitos que produziram TNF- α . Comparado à dexametasona, AFDM 10 teve uma eficácia maior nesta inibição do que o extrato bruto (64%). A fração AFDM10 também reduziu a proliferação de linfócitos, indicando que a fração tem ação sobre ativação de leucócitos. Tanto a produção de citocinas, como a proliferação celular refletem o grau de ativação das células (BOYMAN *et*

al., 2007). Dessa forma, o efeito inibitório de AFDM 10 sobre a proliferação de células estimuladas suporta a ideia de que, parte da atividade anti-inflamatória de *A. fastigiatum*, seja devida à ação dos constituintes químicos presentes na planta sobre a ativação de leucócitos. Nenhuma das frações avaliadas reduziu o percentual de linfócitos que produziram IFN- γ , como o extrato bruto de lavagem foliar das partes aéreas de *A. fastigiatum* em diclorometano. Assim, é possível que os constituintes envolvidos nessa ação estejam em uma fração não avaliada ou que a inibição de IFN- γ seja por uma ação sinérgica de constituintes presentes em diferentes frações que quando separados não promovem o mesmo efeito. Estudos adicionais estão sendo conduzidos para a caracterização química do extrato em diclorometano e, também, para a caracterização da fração ativa, a fração 10. Como o extrato em diclorometano apresenta muitas substâncias de baixa polaridade que poderiam afetar a coluna do HPLC (C-18), não foi realizada a análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas. Optou-se pelo fracionamento em coluna Sephadex e análise das frações obtidas por infusão (injeção) direta no espectrômetro de massas. No entanto, a caracterização química da fração e subfrações diclorometânicas de *A. fastigiatum* ainda está em andamento.

7 CONCLUSÃO

Tomados em conjunto, os dados apresentados permitem sugerir que, pelo menos parte da atividade anti-inflamatória relatada para a planta *A. fastigiatum*, possa ser devida à presença de compostos que interfiram em vias de sinalização importantes na ativação de linfócitos. A ativação de linfócitos pode ser demonstrada pela produção de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ e TNF- α , bem como pela proliferação celular.

8 REFERÊNCIAS

- ADAMS R.P., Identification of essential oil components by gas chromatography/ mass spectroscopy. Illinois: Allured Publishing Corporation 1995.
- ALESSANDRI, A.L., SOUSA, L.P., LUCAS, C.D., ROSSI, A.G., PINHO, V., TEIXEIRA, M.M. Resolution of inflammation: Mechanisms and opportunity for drug development. *Pharmacol Ther*, doi: 10.1016/j.pharmthera.2013.04.006. [Epub ahead of print], 2013.
- AMBRÓSIO, S.R., OKI, Y., HELENO, V.C., CHAVES, J.S., NASCIMENTO, P.G., LICHSTON, J.E., CONSTANTINO, M.G., VARANDA, E.M., DA COSTA, F.B. Constituents of glandular trichomes of *Tithonia diversifolia*: relationships to herbivory and antifeedant activity. *Phytochemistry*. v.69, n.10, p. 2052-60, 2008.
- ANGULO, R., FULCHER, D.A. Measurement of *Candida*-specific blastogenesis: comparison of carboxyfluorescein succinimidyl ester labelling of T cells, thymidine incorporation, and CD69 expression. *Cytometry* v. 34, n.3, p. 143-51.
- APOSTOLAKI, M., ARMAKA, M., VICTORATOS, P., KOLLIAS, G., Cellular Mechanisms of TNF Function in Models of Inflammation and Autoimmunity. *Curr Dir Autoimmun* v.11, p. 1-26, 2010.
- AVELAR-FREITAS, B.A., DIAS, J.V.L., TIBAES, G.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, 2013a.
- AVELAR-FREITAS, B.A., ALMEIDA, V.G., SANTOS, M.G., GRAEL, F.F.G., GREGÓRIO, L.E., ROCHA-VIEIRA, E., BRITO-MELO, GEA. 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, p. 111-15, 2013b.
- BAE, G.S., PARK, K.C., CHOI S.B, JO, I.J., CHOI, M.O., HONG, S.H., SONG, K., SONG, H.J., PARK, S.J. Protective effects of alpha-pinene in mice with cerulean induced acute pancreatitis. *Life Sci.*, v. 17-18, p. 866-71, 2012.
- BICALHO, H.M., GONTIJO, C.M., NOGUEIRA-MACHADO, J.A. A simple technique for simultaneous human leukocytes separation.. *J Immunol Methods* v.40, n.1, p.115-6, 1981.
- BISHAYI B., SAMANTA, A.K., Modulation of interleukin-8 receptor expression by lipopolysaccharide (LPS) and phorbol myristate acetate (PMA) in human peripheral monocytes--a preliminary study. *Indian J Physiol Pharmacol* v. 46, n. 4, 407-22, 2002.

BOHLMANN, F., AHMED, M., KING, R.M., ROBINSON, H. Labdane and eudesmane derivatives from *Ageratum fastigiatum*. *Phytochemistry*, v. 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*, v. 22, p. 983-986, 1983.

BOONCLARM, D, SORNWATANA, T., ARTHAN, D., KONGSAEREE, P., SVASTI, J. beta-Glucosidase catalyzing specific hydrolysis of an iridoid beta-glucoside from *Plumeria obtusa*. *Acta Biochim Biophys Sin*, v. 38, n.8, p. 563-70, 2006.

BOYMAN, O., PURTON, J.F., SURH, C.D., SPRENT, J. Cytokines and T-cell homeostasis. *Curr Opin Immunol*. v.19, n. 3, p. 320-6, 2007.

BUSTAMANTE, K.G.L., LIMA, A.D.F., SOARES, M.L., FIUZA, T.S., TRESVENZOL, L.M.F., BARA, M.T.F., PIMENTA, F.C., PAULA, J.R. Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico bruto da casaca da sucupira branca (*Pterodon emarginatus* Vogel) – Fabaceae. *Ver. Bras. Pl. Med.*, v. 13, n.3, p. 341-345, 2010.

CALIXTO, J.B., CAMPOS, M.M., OTUKI, M.F., Santos, A.R. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. *Planta Med*, v. 70, n. 2, p. 93-103, 2004.

CARAMORI, S. S, LIMA SC, FERNANDES KF. Biochemical characterization of selected plant species from Brazilian Savannas. *Braz Arch Biol Techn* v. 47, p 253–259, 2009.

CHAVAN, M.J. , WAKTE, P.S., SHINDE, D.B., Analgesic and anti inflammatory activity of Caryophyllene oxide from *Annona squamosa* L. bark *Phytomedicine* v.17, p.149-151, 2010.

CHERWINSKI, H.M., SCHUMACHER, J.H., BROWN, K.D., MOSMANN, T.R. Two types of mouse helper T cell clone. III. Further differences in lymphokine synthesis between Th1 and Th2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays, and monoclonal antibodies. *J Exp Med*. n.166, v.5, p.1229-44. 1987.

COHEN S. Cell mediated immunity and the inflammatory system. *Hum Pathol* v.7, n.3, p.249-64, 1976.

CUNHA, F.Q., MONCADA, S., LIEW, F.Y. Interleukin-10 (IL-10) inhibits the induction of nitric oxide synthase by interferon-gamma in murine macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. v. 182, n. 3, p.1155-9, 1992.

DEL-VECHIO-VIEIRA G., SOUSA O.V., YAMAMOTO C.H., KAPLAN M.A.C. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of *Ageratum fastigiatum* (Asteraceae). *Rec. Nat. Prod*, v. 3, n.1, p. 52-57, 2009a.

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*. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, v.52, n.5, p. 1115-1121, 2009b.

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*, v.18, p.769-776, 2008.

DEL-VECHIO-VIEIRA, G., SOUSA, O.V., YAMAMOTO, C.H., KAPLAN, M.A.C. Atividades antinociceptiva e antimicrobianade *Ageratum fastigiatum* (Gardn.) R. M. King et H. Rob. (Asteraceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 88, p. 181-184, 2007.

DUFFIELD, J.S. The inflammatory macrophage: a story of Jekyll and Hyde. *Clin Sci (Lond)*, v. 104, n.1, p. 27-38, 2003.

EDIDIN M. A rapid, quantitative fluorescence assay for cell damage by cytotoxic antibodies. *J Immunol* v. 104, p. 1303, 1970.

EKENÄS, C., ZEBROWSKA, A., SCHULER, B., VREDE, T., ANDREASEN, K., BACKLUND, A., MERFORT, I., BOHLIN, L. Screening for anti-inflammatory activity of 12 Arnica (Asteraceae) species assessed by inhibition of NF-kappaB and release of human neutrophil elastase. *Planta Med*, v. 74, n. 15, p.1789-94, 2008.

ELYAMAN, W., BRADSHAW, E. M., UYTENHOVE, C., DARDALHON, V., AWASTHI A., IMITOLA, J., BETTELLI, E., OUKKA, M., VAN SNICK J., RENAULD. J. C., KUCHROO, V.K., KHOURY, S.J. IL-9 induces differentiation of TH17 cells and enhances function of FoxP3+ natural regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. v. 4, p.106-131, Mai. 2009.

FELDMANN, M., MAINI, S.R. Role of cytokines in rheumatoid arthritis: an education in pathophysiology and therapeutics. *Immunol Rev.*, v. 223, p. 7-19, 2008.

FELDMANN, M., STEINMAN, L. Design of effective immunotherapy for human autoimmunity. *Nature*, v. 435, p. 612-9, 2005.

FERNANDES, E.S., PASSOS, G.F., MEDEIROS, R., DA CUNHA, F.M., FERREIRA, J., CAMPOS, M.M., PIANOWSKI, L.F., CALIXTO, J.B. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophylleneisolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. *Eur J Pharmacol*, v. 569, n. 3, p. 228-36, 2007.

FIORENTINO, D.F., ZLOTNIK, A., MOSMANN, T.R., HOWARD, M., O'GARRA, A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol*. v. 147, n. 11. p. 3815-22, 1991.

FONSECA, L.C., DADARKAR, S.S., LOBO, A.S., MISHRA, P.B., THAKKAR, A.D., CHANDRABABU, S., PADIGARU, M. NF-κB-mediated anti-inflammatory activity of the sesquiterpene lactone 7-hydroxyfrullanolide. *Eur J Pharmacol.* v.657, p. 41-50, 2011.

GEETHA, B.S., NAIR, M.S., LATHA, P.G., REMANI, P. Sesquiterpene lactones isolated from *Elephantopus scaber* L. inhibits human lymphocyte proliferation and the growth of tumour cell lines and induces apoptosis in vitro. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:721285. doi: 10.1155/2012/721285.

GIORGI, V.S., PERACOLI, M.T., PERACOLI, J.C., WITKIN, S.S., BANNWART-CASTRO, C.F. Silibinin modulates the NF-κb pathway and pro-inflammatory cytokine production by mononuclear cells from preeclamptic women. *J Reprod Immunol.*, v. 95, n. 1-2, p. 67-72, 2012.

GOBBO-NETO, L., LOPES, N.P., 2007. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quím Nova* 30: 374-381.

GONÇALVES, L. D., ALMEIDA, H. R., DE 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*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 21, n. 6, p. 936 – 942, 2011.

GOODWIN, J.S., ATLURU, D., SIERAKOWSKI, S., LIANOS, E.A. Mechanism of action of glucocorticosteroids. Inhibition of T cell proliferation and interleukin 2 production by hydrocortisone is reversed by leukotriene B4. *J Clin Invest.* v. 44, n. 4, p 244-50.

GUARIM NETO, C., MORAIS, R.G. Recursos medicinais de espécies do Cerrado de Mato Grosso: Um estudo bibliográfico. *Acta Bot. Bras.*, v. 17, n. 4, p. 561-584, 2003.

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

HADDAD J.J. Cytokines and related receptor-mediated signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun.*, v. 297, n. 4, p. 700-13, 2002.

HAMILTON V.T., HABBERSETT M.C., HERMAN C.J. Flow Microfluorometric Analysis of Cellular DNA: Critical Comparison of Mithramycin and Propidium Iodide. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. v.28, n.10, p. 1125-1128, 1980.

HARRISSON, F., CALLEBAUT M., VAKAET L. Microspectrographic analysis of trypan blue-induced fluorescence in oocytes of the Japanese quail. *Histochemistry* v. 72, n. 4, p. 563-78,1981.

HIND, D. J. N., BEENTJE, H. J., Compositae: Systematics. *Royal botanic Gardens*, v. 1, p. 621-626, 1996.

- HIROTA, R., ROGER, N.N., NAKAMURA, H., SONG, H.S., SAWAMURA, M., SUGANUMA, N. Anti-inflammatory effects of limonene from yuzu (*Citrus junos* Tanaka) essential oil on eosinophils. *J Food Sci.* v. 75, n.3, p.87-92, 2010.
- HOSSAIN H., KARMAKAR, U.K., BISWAS, S.K., SHAHID-UD-DAULA, A., JAHAN, I.A., ADNAN, T., CHOWDHURY, A. Antinociceptive and antioxidant potential of the crude ethanol extract of the leaves of *Ageratum conyzoides* grown in Bangladesh. *Pharm Biol*, [Epub ahead of print], 2013.
- HOWARD, M., MUCHAMUEL, T., ANDRADE, S., MENON, S. Interleukin 10 protects mice from lethal endotoxemia. *J Exp Med.* v. 177, n. 4, p. 1205-8, 1993.
- ITOKAWA, H., MORRIS-NATSCHKE, S. L., AKIYAMA, T. &LEE, K. H. Plant-derived natural product research aimed at new drug discovery. *Journal of Natural Medicines* v. 62, n. 3, p. 263-280, 2008.
- JONES K.H. & SENFT J.A. An Improved Method to Determine Cell Viability by Simultaneous Staining with Fluorescein Diacetate-Propidium Iodide. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. v.33, n.1, p.77-79, 1985.
- KOJ, A., MAGIELSKA-ZERO, D., BERETA, J., KURDOWSKA, A., ROKITA, H., GAULDIE, J. The cascade of inflammatory cytokines regulating synthesis of acute phase proteins. *Tokai J Exp Clin Med.* v. 13, n. 6, p. 255-64, 1988.
- KUMAR T., MAJUMDAR A., DAS P., SARAFIS V., GHOSE M. Trypan blue as a fluorochrome for confocal laser scanning microscopy of arbuscular mycorrhizae in three mangroves. *Informa Healthcare DOI:10.1080/10520290802336161*, 2008.
- LIAW, C.C., CHEN, Y.C., HUANG, G.J., TSAI, Y.C., CHIEN, S.C., WU, J.H., WANG, S.Y., CHAO, L.K., SUNG, P.J., HUANG, H.C., KUO, Y.H. Anti-inflammatory lanostanoids and lactone derivatives from *Antrodia camphorata*. *J Nat Prod.* v.76, n. 4, p. 489-94, 2013.
- KALAYOU, S., HAILESELASSIE, M., GEBRE-EGZIABHER, G., TIKU'E, T., SAHLE, S., TADDELE, H., GHEZU, M. In-vitro antimicrobial activity screening of some ethnoveterinary medicinal plants traditionally used against mastitis, wound and gastrointestinal tract complication in Tigray Region, Ethiopia. *Asian Pac J Trop Biomed.*, v. 2, n. 7, p. 516-22. 2012.
- KIM J.S., NAM M.H., AN S.S.A., LIM C.S., HUR D.S., CHUNG C., CHANGA J.K. Comparison of the Automated Fluorescence Microscopic Viability Test With the Conventional and Flow Cytometry Methods. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* v. 25, p. 90-94, 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* v. 10, p.71-77, 2003.

LYONS, A.B. Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. *J Immunol Methods*. v. 243, p. 147-54.

MEDEIROS, R., PASSOS, G.F., VITOR, C.E., KOEPP, J., MAZZUCO, T.L., PIANOWSKI, L.F., CAMPOS, M.M., CALIXTO, J.B. Effect of two active compounds obtained from the essential oil of *Cordia verbenacea* on the acute Inflammatory responses elicited by LPS in the rat paw. *Br J Pharmacol*, v. 151, n. 5, p. 618-27, 2007.

MONTAGNER, C. Atividades antifúngica, citotóxica (células tumorais humanas) e hemolítica de cumarinas naturais e semi-sintéticas. 2007. 126 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

MOODY, J.O., ADEBIYI, O.A., ADENIYI, B.A. *Aloe vera* and *Ageratum conyzoides* enhance the anti-microbial activity of traditional medicinal soft soaps (Osedu)? *Journal of Ethnopharmacology*, v. 92, p. 57-60, 2004.

MOURA, A.C.A., SILVA, E.L.F., FRAGA, M.C.A., WANDERLEY, A.G., AFIATPOUR, P., MAIA, M.B.S. Antiinflamatory and chronic toxicity study of the leaves of *Ageratum conyzoides* L. in rats. *Phytomedicine*, v. 12, p. 138-142, 2005.

NAPOLITANO, D.R., MINEO, J.R., DE SOUZA, M.A., DE PAULA, J.E., ESPINDOLA, L.S. Down-modulation of nitric oxide production in murine macrophages treated with crude plant extracts from the Brazilian Cerrado. *J Ethnopharmacol* v. 99, p. 37-41, 2005.

NÉBIÉ, R.H. C., YAMEOGO, R.T., BELANGER, A., SIB, F.S. Chemical composition of essential oils of *Ageratum conyzoides* from Burkina Faso. *Comptes Rendus Chimie*, v. 7, n. 10-11, p. 1019-1022, 2004.

NOBLE, C. O., GUO Z., HAYES, M. E., MARKS, J. D., PARK, J. W., BENZ, C. C., KIRPOTIN, D. B., Drummond D. C. Characterization of highly stable liposomal and immunoliposomal formulations of vincristine and vinblastine. *Cancer Chemother Pharmacol*, v. 64, n. 4, p. 741-751, 2009.

OKADA Y. Flow cytometry—the basis of cell surface analysis and clinical application. *Rinsho Byori*. v. 58, n. 11, p. 1121-30.

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

REBECCA, M.A., ISHII-IWAMOTO, E.L., GRESPAN, R., CUMAN, R.K., CAPARROZ-ASSEF, S.M., MELLO, J.C., BERSANI-AMADO, C.A. Toxicological studies on *Stryphnodendron adstringens*. *J Ethnopharmacol*, v. 83, n. 1-2, p. 101-4, 2002.

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

- SILVA, C.A.M., SIMEONI, L.A., SILVEIRA, D. Genus Pouteria: Chemistry and biological activity. *Braz J Pharmacogn*, v. 19, p. 501–509, 2009.
- SILVA, N.L.A., MIRANDA, F.A.A., CONCEIÇÃO, M.G. Triagem Fitoquímica de Plantas de Cerrado, da Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. *SCIENTIA PLENA*, v. 6, n. 2, p. 1-17, 2010.
- SINGH, H.P., BATISH, D.R., KOHLI, R.K. Allelopathic effect of two volatile monoterpenes against bill goat weed (*Ageratum conyzoides* L.). *Crop Protection*, v. 21, p. 347-350, 2002.
- SPIES, C.M., GABER, T., HAHNE, M., NAUMANN, L., TRIPMACHER, R., SCHELLMANN, S., STAHLN C., BURMESTER, G.R., RADBRUCH, A., BUTTGEREIT, F. Rimexolone inhibits proliferation, cytokine expression and signal transduction of human CD4+ T-cells. *Immunol Lett*. v. 131, n. 1, p. 24-32, 2010.
- SOUZA, P.M., ELIAS, S.T., SIMEONI, L.A., DE PAULA, J.E., GOMES, S.M., GUERRA, E.N., FONSECA, Y.M., SILVA, E.C., SILVEIRA, D., MAGALHÃES, P.O. Plants from Brazilian Cerrado with potent tyrosinase inhibitotory activity. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0048589, 2012.
- TABERA S., PÉREZ-SIMÓN J.A., DÍEZ-CAMPELO M., SÁNCHEZ-ABARCA L.I., BLANCO B., LÓPEZ A., BENITO A., OCIO E., SÁNCHEZ-GUIJO F.M., CAÑIZO C., MIGUEL J.F.S. The effect of mesenchymal stem cells on the viability, proliferation and differentiation of B-lymphocytes. *haematologica* v. 93, n. 9, p. 1301-1309, 2008.
- TENNANT JR. Evaluation of the trypan blue technique for determination of cell viability. *Transplantation* v. 2, p. 685, 1964.
- TIAN, Z., CHEN, S., ZHANG, Y., HUANG, M., SHI, L., HUANG, F., FONG, C., YANG, M., XIAO, P. The cytotoxicity of naturally occurring styryl lactones. *Phytomedicine*. v.13, n.3, p. 181-6, 2006.
- TRINDADE-FILHO J, LOYOLA RD. Performance and consistency of indicator groups in two biodiversity hotspots. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal. pone. 0019746, 2011.
- TURK J.L. Inflammation: John Hunter's "A treatise on the blood, inflammation and gun-shot wounds". *Int J Exp Pathol.*, v. 75, n. 6, p. 385-95, 1994.
- VAN DEN DOOL H., KRATZ, P.D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J. Chromatogr*. v. 11, p. 463-471, 1963.
- VAN, E.R.K.M.J, WOPEREIS, S., RUBINGH, C., VAN, VLIET T., VERHEIJ, E., CNUBBEN, N.H., PEDERSEN, T.L., NEWMAN, J.W., SMILDE, A.K., VAN, DER GREEF

J., HENDRIKS, H.F., VAN, OMMEN B. Insight in modulation of inflammation in response to diclofenac intervention: a human intervention study. *BMC Med Genomics.*, v. 23, n. 3, p.3-5, 2010.

VERMES, I., HAANEN, C., STEFFENS-NAKKEN, H., REUTELINGSPERGER, C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods.* v.184, n.1, p. 39-51, 1995.

WAJANT, H. The role of TNF in cancer. *Results Probl Cell Differ.* v. 49, p 1-15, 2009.

YOON, W.J., LEE, N.H., HYUN, C.G. Limonene suppresses lipopolysaccharide-induced production of nitric oxide, prostaglandin E2, and pro-inflammatory cytokines in RAW 264.7 macrophages. *J Oleo Sci.*, v. 59, n. 8, p. 415-21, 2010.

YOUN, U.J., PARK, E.J., KONDRAKYUK, T.P., SIMMONS, C.J., BORRIS, R.P., TANAMATAYARAT, P., Wongwiwatthanakit S, Toyama O, Songsak T, Pezzuto JM, Chang LC. Anti-inflammatory sesquiterpene lactones from the flower of Vernonia cinerea. *Bioorg Med Chem Lett.*, v. 22, n. 17, p. 5559-62, 2012.

9 ANEXOS

Anexo 1- Autorização para coleta de material botânico



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico

Número: 26221-1	Data da Emissão: 11/11/2010 14:19
Dados do titular	
Registro no Ibama: 5141849	Nome: Bethânia Alves de Avelar

Ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinarem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas à autorização do Ministério da Ciência e Tecnologia.
2	A autorização não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador quando as atividades forem realizadas em área de domínio privado ou dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso; II) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; III) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; IV) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; V) do Departamento Nacional de Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; VI) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outras.
3	O material biológico colhido deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	É necessário a obtenção de anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como de consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
5	Este documento não abrange a coleta de vegetais hidrófios, tendo em vista que o Decreto-Lei nº 221/1967 e o Art. 36 da Lei nº 8.606/1993 estabeleceam a necessidade de obtenção de autorização para coleta de vegetais hidrófios para fins científicos..
6	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.icmbio.gov.br/sisbio - menu Exportação.
7	Este documento não é válido para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e c) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna.
8	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico.
9	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexplotação.

Táxons registrados

Nível taxonômico	Táxon(s)
FILO	Magnoliophyta

Este documento (Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 48615466



Página 1/1

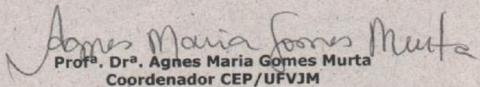
Anexo 2 – Aprovação Comitê de Ética UFVJM

	Comitê de Ética em Pesquisa		
PARECER CONSUBSTANCIADO		Nº de protocolo no Comitê: 146/10	
<input checked="" type="checkbox"/> X PROJETO DE PESQUISA			
<input type="checkbox"/> TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO			
<p>I - Identificação:</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Título do projeto: Caracterização do potencial imunomodulador do extrato de <i>ageratum fastigiatum</i> (garden.) R. M. King et h. Rob. <input type="checkbox"/> Pesquisador responsável: Etel Rocha Vieira, Bióloga/Doutora <input type="checkbox"/> Instituição/Local onde se realizará: UFVJM <input type="checkbox"/> Instituição/Local onde se realizará: FCBS/DCB/UFVJM <input type="checkbox"/> Área de Concentração: 2 – Ciências Biológicas; sub-área – 2.11 – Imunologia <input type="checkbox"/> Data de entrada no CEP: 03/11/2010 			
<p>II - Objetivos: Geral: Caracterizar a atividade imunomoduladora e anti-inflamatória do extrato de <i>A. fastigiatum</i>.</p>			
<p>III- Sumário do projeto:</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Descrição e caracterização da amostra: 25 voluntários da equipe do Laboratório de Imunologia, com idade entre 20 e 39 anos. <input type="checkbox"/> Critérios de inclusão e exclusão: voluntários que não reportem doença infecciosa, autoimune, crônico degenerativa ou de hipersensibilidade e que não façam uso de medicamentos com ação antiinflamatória. <input type="checkbox"/> Adequação da metodologia: A metodologia apresentada no projeto foi considerada adequada. <input type="checkbox"/> Adequação das condições: As condições descritas no projeto foram consideradas adequadas. 			
<p>IV- Comentários do relator frente à Resolução 196/96 e complementares em particular sobre:</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Justificativa do uso do placebo (caso haja): não se aplica <input type="checkbox"/> Justificativa da suspensão terapêutica (wash out): não se aplica <input type="checkbox"/> Estrutura do protocolo: O protocolo apresentado no projeto foi considerado adequado. <input type="checkbox"/> Análise de riscos e benefícios: ok <input type="checkbox"/> Adequação do consentimento e forma de obtê-lo: ok. Como a coordenadora do projeto informa que serão convidados voluntários pertencentes ao laboratório de Imunologia, o CEP considerou que a linguagem técnica utilizada no TCLE está adequada. <input type="checkbox"/> Informação adequada quanto ao financiamento: Foi considerado adequado <input type="checkbox"/> Lista de centros (para estudos multicêntricos): Não se aplica <input type="checkbox"/> Outros 			
<p>V - Pendências</p>			
<p>VI- Observações:</p>			
<p>VII – Motivos da não aprovação</p>			
<p>VIII- Parecer Consustanciado do CEP:</p>			
<p><input checked="" type="checkbox"/> APROVADO. Receberá parecer e certificado do Comitê.</p>			
<p><input type="checkbox"/> PENDENTE. Certificado do Comitê sujeito à resolução das pendências em tempo previsto.</p>			
<p><input type="checkbox"/> NÃO APROVADO. Receberá apenas o parecer do CEP. Submeterá novo projeto ao Comitê.</p>			
<p>Observações ao pesquisador:</p> <p>Para projetos aprovados</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Somente estará autorizado o início da pesquisa, após aprovação do protocolo pelo CEP. 2) O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 - Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d). 3) O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requeiram ação imediata. 4) O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento. 5) Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, Comitê de Ética em Pesquisa da UFVJM, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Rua da Glória, 185, Centro, CEP 39100000 – Diamantina MG – Brasil (38) 35326060 http://www.ufvjm.edu.br/administracao/pro-reitorias/prppg/pesquisa/cep.html 			

junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, item III.2.e).

- 6) Relatórios parcial e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente em dezembro de 2012 e ao término do estudo em dezembro de 2014. Considera-se como antiética a pesquisa descontinuada sem justificativa aceita pelo CEP que a aprovou.

IX- Data da reunião do CEP: 22/03/2011.


Prof. Dr. Agnes Maria Gomes Murta
Coordenador CEP/UFVJM

Prof. Dr. Agnes Maria Gomes Murta
Coordenadora CEP/UFVJM

Anexo 3 – Termo de consentimento livre e esclarecido**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****Termo de esclarecimento****Projeto de pesquisa****Caracterização do potencial imunomodulador do extrato *Ageratum fastigiatum* (Gardn.) R. M. King et H. Rob.**

O objetivo do presente estudo é caracterizar a atividade imunomoduladora da planta *Ageratum fastigiatum*, para o qual você foi escolhido por ter entre 20 e 39 anos, não ter doenças como catapora, lúpus, diabetes, alergia, e não fazer uso regular de antiinflamatórios. Sua participação no estudo consistirá em doar 15 mL de sangue, que será coletado por punção venosa com tubos a vácuo (da mesma maneira que é coletado quando você faz algum exame de sangue), em data e horário a combinar. A partir do sangue serão obtidos os leucócitos para os experimentos em laboratório. Os riscos de sua participação incluem hematoma (roxo no local da coleta de sangue), dor, tontura, enjoô e de contaminação. A coleta será feita por pessoa treinada, em local limpo e reservado, equipado com maca, utilizando material estéril e descartável. Ao doar seu sangue para este projeto você estará contribuindo para o entendimento de como os agrotóxicos interferem com o sistema imunológico (sistema de defesa). Os seus dados serão mantidos em sigilo e sua identidade não será revelada. Só os pesquisadores envolvidos no projeto terão acesso aos dados, que serão utilizados apenas para fins de pesquisa e divulgação científica em congressos, livros e revistas. Não está prevista qualquer forma de remuneração pela sua participação no estudo e você não terá nenhuma despesa (portanto, não está previsto nenhuma forma de ressarcimento). Quaisquer dúvidas que possam surgir durante o andamento deste estudo por parte do voluntário poderão ser esclarecidas junto aos membros da equipe responsáveis pelo projeto, pessoalmente ou por telefone. Você poderá recusar e/ou deixar de participar deste estudo a qualquer momento, sem nenhum constrangimento ou prejuízo na sua relação com os pesquisadores e a UFVJM. Os pesquisadores responsáveis por este projeto podem decidir sobre a sua exclusão do estudo por razões científicas, a respeito das quais você deverá ser devidamente informado. Em caso de qualquer dúvida deverá e/ou poderá entrar em contato a qualquer hora com a pesquisadora responsável Profa. Etel Rocha Vieira pelo telefone 38 35317814 (etelvieira@terra.com.br). Você também poderá contactar o Comitê de Ética em Pesquisa – UFVJM (35326060) para informações sobre a aprovação do projeto pelo comitê.

Termo de livre consentimento pós-informado

Eu discuti os riscos e benefícios da minha participação no estudo intitulado “**Caracterização do potencial imunomodulador do extrato *Ageratum fastigiatum (Gardn.) R. M. King et H. Rob.***” com os pesquisadores envolvidos. Eu li e comprehendi todos os procedimentos que envolvem esta pesquisa e tive tempo suficiente para considerar a minha participação no estudo. Eu perguntei e obtive as respostas para todas as minhas dúvidas. Eu sei que posso me recusar a participar deste estudo ou que posso abandoná-lo a qualquer momento sem qualquer constrangimento ou prejuízo. Eu também comprehendo que os pesquisadores podem decidir a minha exclusão do estudo por razões científicas, sobre as quais eu serei devidamente informado. Não terei nenhuma remuneração e nenhum gasto por participar do projeto. Tenho uma cópia deste formulário, o qual foi assinado em duas vias idênticas e rubricadas.

Portanto, aqui forneço o meu consentimento para participar do estudo intitulado “Caracterização do potencial imunomodulador do extrato *Ageratum fastigiatum (Gardn.) R. M. King et H. Rob.*”, durante todos os testes realizados.

Diamantina, _____

Assinatura do voluntário:_____

Testemunha:_____

Testemunha:_____

Declaro que expliquei todos os objetivos, benefícios e riscos deste estudo ao voluntário, dentro dos limites de meus conhecimentos científicos.

Pesquisador responsável:_____

Etel Rocha Vieira

Comitê de Ética em Pesquisa da UFVJM

Rua da Glória, 185 – Centro – Diamantina

Coordenação: profa. Agnes Maria Gomes Murta

(38) 35326060/35326000

cep.secretaria@ufvjm.edu.br



Anexo 4 - Padronização da análise por citometria de fluxo da técnica de exclusão do azul de tripan**Use of trypan blue exclusion assay by flow cytometry**

Avelar, BA¹; Almeida, VG¹; Pinto, MCX²; Mourão, FAG³; Massensini, AR³; Rocha-Vieira, E¹; Brito-Melo, GEA¹.

- 1- Laboratory of Immunology. Integrated Center of Health Researches – CIPq/Saúde – of the Federal University of the Jequitinhonha and Mucuri Valleys– UFVJM. Diamantina, Minas Gerais. Brazil.
- 2- Neuroscience Laboratory. Medicine Faculty of the Federal University of Minas Gerais. Belo Horizonte, Minas Gerais. Brazil.
- 3- Neuroscience Center. Biological Science Institute of the Federal University of Minas Gerais. Belo Horizonte, Minas Gerais. Brazil.

Running headline: Trypan blue exclusion assay by flow cytometry

Correspondent author: Gustavo Eustáquio Brito Alvim de Melo. Federal University of Jequitinhonha and Mucuri Valleys. Campus JK. Laboratory of Immunology – CIPq/Saúde. Rodovia MGT367 Km 583, 5000 - Alto da Jacuba. Diamantina – Minas Gerais. Brasil. 39100-000. Phone number: 55 38 35321235. Fax number: 55 38 35321200. e-mail: gbrrito1998@yahoo.com

Financial support – FAPEMIG, CNPq, CAPES and UFVJM.

Abstract

Dye exclusion tests are used to determine the number of live and dead cells. These assays are based on the principle that intact plasmatic membranes of the live cells exclude specific dyes, including trypan blue (TB), eosin, or propidium iodide (PI), whereas dead cells do not. Although widely used, the TB exclusion test at 0.4% w/v, has limitations as of dye being incorporated by live cells after a short exposure time, as well as interpersonal variability,

which is related to the expertise of the analyst's. In this way, the study aims to propose an alternative test to evaluate cell viability that combines TB exclusion test and high sensitivity of the flow cytometry technique, since previous studies have shown the TB's ability to emit fluorescence when make complexes with proteins. According to our results, TB/BSA and TB/cytoplasmatic protein interactions emit fluorescence at 660nm, detectable by cytometry when used the red band pass filter at 650nm/LP (FL3 fluorescence channel). TB at 0.002% w/v was defined as optimum concentration able to distinguish unstained living cells from fluorescent dead cells and promoted stable fluorescence even 30 minutes after cell treatment. Although previous studies have shown that TB promotes green fluorescence quenching, the use of TB solution at 0.002% on human live T-cell stained by anti-CD3 (FITC) monoclonal antibody did not affect green fluorescence. We also observed a remarkable correlation ($r^2=0.98$) between percentage of CD3/FITC fluorescent cells after treatment with PI or TB dyes, as well as similar double-stained cell profile on FL1xFL3 dotplot graphs. Additionally, TB exclusion tested by cyometry showed a high correlation with conventional trypan blue exclusion test using Neubauer-chamber cell counting ($r^2=0.89$) and PI assay ($r^2=0.97$). Taken together, the results presented here show that TB exclusion assay by flow cytometry as an alternative tool for cell viability analysis.

Key terms: trypan blue, fluorescence, flow cytometry, exclusion test.

1 Introduction

Cell viability analysis is a useful tool in several experimental procedures including tumor susceptibility, microbiological resistance as well as spontaneous cell death after submission to different experimental conditions (1, 2, 3, and 4). It has been established that cellular membrane integrity is a basic criteria for distinguishing dead and live cells (5), thus dyes able to intake cytoplasm of dead cells in a selective way have been widely used as vital dye. Trypan blue (TB) method is a very common assay to estimate cytotoxicity degree on experimental investigations (6, 7, 8) where dead cells losing membrane selectivity retains TB

dye into cytoplasm instead live cells that remain unstained (6). In this way, the relative number of dead and live cells is obtained by optical microscopy counting of the stained (dead) and unstained (live) cells, using a Neubauer chamber. However, when TB is used in its usual concentration (0,4% w/v), it establishes that cell counting needs to be done preferentially 3-5 minutes after dye addition, since live cells start to incorporate the TB and promote a mistake on the number of dead cell counted. This limitation, besides the variability promoted by the analyst's experience, is an issue that compromises the reliability of the assay (9, 10).

Previous studies have shown that TB-protein interaction emits fluorescence (11). According to Harrisson (1981) the trypan blue injected subcutaneously on Japanese quails was adsorbed on exogenous yolk and the binding sites in oocytes were visualized by fluorescence microscopy (12). Recently, a phagocytosis protocol, by flow cytometry, was proposed for distinguishing ingested particles from those attached to the cell surface. In this study, fixed *Candida albicans* stained with CFSE (green fluorescence) were submitted to phagocytic action by neutrophils, *in vitro*. After different incubation times, trypan blue was added to the cell cultures and since TB did not penetrate into live cells, ingested yeasts retained their green fluorescence (13), while membrane-bound *C. albicans* displayed a double-positive red and green^{Low} fluorescence caused by the quenching effect promoted by TB at 0.4% w/v on green fluorescence emitted by CFSE, in acidic pH conditions (14). Furthermore, Kumar and colleagues have suggested that TB is an appropriate dye for arbuscular mycorrhiza spores detection by confocal fluorescence microscopy. This protocol used an excitation wavelength at 488nm, and emition starting at 585nm. Although TB presents the ability to emit fluorescence when make complexes with proteins, few studies has been done for improving trypan blue exclusion test, making the adequate adaptations for fluorescent revelation. Up to date, the propidium iodide (PI) staining followed by flow cytometry analysis is one of the widely established assays for viability evaluation (15, 16). Similarly to TB assay, PI presents the ability to intake dead cells with low membrane selectivity and to form complexes with DNA structure (17, 18, and 19). Here, we aimed to propose trypan blue exclusion test by flow cytometry as an alternative tool, also cheaper and reliable, able to be used together phenotype analysis, with no interference in cell viability along the time, as well as no green fluorescence quenching as previously reported.

2 Materials and Methods

2.1 Peripheral Blood Mononuclear Cells – PBMC

A venous blood sample, (approximately 10 mL) was collected into heparinized tubes from seven healthy humans (22 ± 2.0 years old) 6 hours before the experiment. Blood collection was performed between 7:30 and 8:30 am following stringent blood-draw criteria: no reported infection or symptoms of infection for 7 days, subject stated: adequate sleep (6-9 h), no exercise or alcohol use for 24 h, no topical corticosteroid use or aspirin for 48 h, no systemic antihistamines or corticosteroid use for 1 week, and no immunizations during the previous 3 weeks.

Blood and all reagents for Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) isolation were kept at room temperature throughout the purification. PBMC were isolated by centrifugation using Ficoll-Hypaque (Sigma, USA) as described by Gazzineli et al. (20), adapted as the follow. Briefly, the blood was gently put over Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and centrifuged at 520g. PBMC were collected from the interphase after Ficoll separation and washed three times with PBS (0.015 M PBS pH 7.4). The cell suspensions were adjusted to 1.0×10^7 cells/mL.

2.2 Determination of the fluorescence emitted by trypan blue/protein complex.

The fluorescence emitted by tripan blue/protein interaction was performed using the spectrofluorophotometer Shimadzu RF-5301PC (Columbia, MD, USA). Briefly, control solutions constituted by trypan blue at 0,02% (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) or bovine serum albumin (BSA) at 10% (INLAB, São Paulo, SP), as well as the test solution (trypan blue at 0,02% plus BSA at 10%) were prepared using distilled and deionized water, followed by spectrofluorophotometer analysis. Using the spectrum measurement mode setting, we

performed the emission and excitation scans to obtain the excitation and emission spectra. The excitation slit was adjusted to 5 and emission slit to 20, being the spectral analysis achieved between 220 and 770 nm. Each analysis was performed in triplicate and collected by RF-5301PC software (Columbia, MD, USA). The spectral curve was designed and analyzed by GraphPad Prism 5.0 software (La Jolla, CA, USA). A complementary experiment, different BSA's solutions, ranging from 1.8 to 10.0 mg/mL was added to TB solutions at 0.02% w/v and analyzed by spectrofluorophotometer using a fixed excitation and emission wavelength at 488nm and 660nm, respectively. To confirm the fluorescence emitted by the interaction between TB and cytoplasmatic proteins, PBMC were submitted to staining with DAPI and TB at 0,002% w/v simultaneously and analyzed by fluorescence microscopy (AxioImager.M2, Carl Zeiss, Germany).

2.3 Trypan blue exclusion test using Neubauer chamber counting.

5.0×10^5 PBMC were pre-incubated in a 95% O₂, 5% CO₂ air-humidified environment at 37°C or in water bath at 50°C for 30 minutes. After pre-incubation, 1.0 $\times 10^5$ PBMC were placed into 5 mL round bottom tubes and incubated with 190 μ L of tripan blue solution at 0.4% diluted in PBS to perform the trypan blue exclusion test using Neubauer chamber counting.

2.4 Trypan blue exclusion test using flow cytometry assay.

To evaluate the fluorescence emitted by dead cells stained with trypan blue, 10 microliters of PBMC suspension (1.0×10^5 cells) was submitted to heat stress (50°C) pre-treatment for 30 minutes followed by staining with 190 microliters of trypan blue solutions at 0.002%, 0.004%, 0.04%, 0.08% and 0.4% w/v in PBS. After this step, all the cell suspensions were incubated at 95% O₂, 5% CO₂ air-humidified environment at 37°C for 5, 10, 20 and 30 minutes. The dead cell suspensions treated with trypan blue and evaluated immediately after dye addition was used as time zero control. To evaluate the fluorescence emitted by live PBMC we performed

the same protocol, removing the high temperature pre-treatment step. For all experiments, propidium iodide (PI) cell staining assay by flow cytometry was used as comparative method.

To evaluate whether TB promotes quenching of the green fluorescence as previously reported, 100ul of heparinized blood samples were incubated with 2ul of undiluted monoclonal antibody anti-human CD3-FITC (Cat 11-0038-73, Clone UCHT1 eBioscience), in the dark, for 30 minutes, at room temperature. Following the incubation, erythrocytes were lysed using 100ul of Lysing Solution (Optlyse-B, Immunotech) for 5 minutes, followed by addition of distilled water and reincubated for 10 minutes. After incubation the cells were washed twice with 1ml of Phosphate Buffered Saline containing 0.01% of sodium azide. The cells were shared into four new tubes. In two of them, the cells were incubated with 190 μ L trypan blue solution at 0.002% or 0.4% w/v. In the third tube, the cells were added to 100uL of PBS plus 1 μ L of propidium iodide using a stock solution at 50 mg/mL (Cat No 51-66211E, BD Pharmangen, San Diego, CA, USA). To the fourth tube, the leukocytes were added to 190 microliters of PBS. After 15 minutes, 15,000 cells were acquired and analyzed by flow cytometry.

2.5 Flow cytometry.

The flow cytometer FACScan (BD, San Diego, CA) used in this study has the blue laser that at 488nm and the following filters: band pass filters 530/30nm (FL1 = green fluorescence detector) and 586/42 (FL2 = orange fluorescence detector), as well as the long pass filter 650/LP (FL3 = red fluorescence detector). The size and granularity parameters are evaluated on the 488nm detectors (blue) based on the forward and side scatters, respectively. For both PI and trypan blue treated cells, 15,000 events were acquired into lymphocytes gate based on size versus granularity (FSC X SSC) dotplot graphs. The fluorescence was evaluated in FL3 histograms or FL1xFL3 dotplot graphs. Unstained and stained cells were reported as percentage of living and dead cells, respectively. The beads CalibriteTM (BD Catalog no. 340486, San Diego, CA) were used for 3-color flow cytometer compensation setup. The

instrument settings for compensation was FL1 - 1,3% of FL2, FL2 - 20.0% FL1, FL2 - 0.0% FL3 and FL3 - 12,7% FL2.

2.6 Statistical analysis

GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego California USA) was used for the statistical analysis and p-values ≤ 0.05 were considered statistically significant. Data are reported as mean percentage \pm SD. The Shapiro-Wilk test was used to evaluate the data normality. It was used analysis of variance (two-way ANOVA) with repeated measures with post hoc Tukey test for variables viability. Pearson's test was used in all correlation analysis.

3 Results

3.1 Trypan blue-protein complex emits fluorescence

Previous studies have shown that trypan blue fluoresces when it interacts to proteins (12). Here we analyzed the excitation and emission spectra using trypan blue solutions at 0,02% or BSA at 10% alone, as well as the solution containing TB/BSA interaction to verify optimal wavelengths for excitation and emission able to be used in the further flow cytometry evaluation. The trypan blue/BSA excitation spectrum presented a high peak at 296, 485 and 648nm (Figure 1A). On the emission spectra (Figure 1B), we found maximum emission at 483nm and 660nm wavelengths, the latter able to be detectable by the long pass filter 650nm/LP (FL3) at the FACScan cytometer. As demonstrated, there are no peaks in the emission spectrum curves corresponding to the TB solubilized separately. On the other hand, BSA solution presented an emission pick at 463nm, in a spectrum's region not detectable by FL3 long pass filter at the FACScan cytometer. Despite the cytometer FACScan to use a laser source at 488nm, we decided to verify the fluorescence emitted by the TB/BSA interaction

fixing the excitation and emission wavelength at 488nm and 660nm, respectively. Keeping TB concentration at 0.02% and adding BSA solutions ranging from 1.8 to 10 mg/ml, we observed that the fluorescence emitted by TB/BSA interactions was dose-dependent (Figure 2A). Once we observed that BSA and TB interaction emit fluorescence, we aimed verify whether the cytoplasmatic proteins could promote similar behavior when complexed to TB. To achieve this issue, we treated PBMC with TB and DAPI simultaneously. According to results, the cells containing TB/cytoplasmatic protein interactions were able to emit fluorescence detectable by fluorescence microscopy, using the excitation wavelength at 488nm and emission filter at 650nm (Figure 2B).

3.2 Standardization of the trypan blueexclusion assay using flow cytometry.

Despite trypan blue can form complexes with proteins located inside the cytoplasm and outside the plasmatic membrane, we used different TB concentrations, as well as incubation times aiming to find an optimum experimental condition able to distinguish live cells, whose TB/protein interaction exist only on the cell surface, and dead cells, whose TB/protein interaction exist in both cytoplasm and cell surface. Additionally, previous study have shown that live cells in contact with TB at 0.4% longer than 5 minutes may incorporate the dye and provide over estimated number of dead cells, we also evaluated whether the optimal TB concentration obtained for cytometry proposes could produce similar imprecision. According to results presented in the figure 3, TB at 0.002% w/v was able to distinguish live and dead cells once provided the optimal fluorescence emission at 660nm (FL3) able to distinguish dead cells and retain live cells into negative region usually located between 10^0 and 10^1 on FL3-based histograms. Additionally, TB at 0,002% w/v did not change the fluorescence intensity emitted by live cells when incubated till 30 after dye addition (Figure 4). All results were comparable to PI assay.

3.3 Comparative analysis between trypan blue exclusion test by flow cytometry, propidium iodide staining and conventional trypan blue exclusion test using Neubauer chamber cell counting.

Aiming to verify whether the standardized cytometry-based trypan blue assay could promote similar results as compared to the conventional methods, we performed a comparative analysis between the trypan blue (at 0.002%) exclusion test by flow cytometry (TB), PI exclusion test by flow cytometry (PI) and percentage of cells stained with TB at 0.4% using neubauer chamber cell counting (NC). The cell counting in Neubauer Chamber was performed no longer than 3 minutes after cell staining. The three methodologies presented no differences in the percentage of dead or live cells in both protocols: with or without high-temperature pre-treatment (Figure 5). Without high-temperature pre-treatment (Figure 5A).

There was a very high correlation between trypan blue exclusion assay by flow cytometry and PI ($r^2 = 0.9758$) and NC ($r^2=0.8986$) assays (figure 5B). Interestingly, the assays using PI and TB analyzed on the long pass filter at FL3=650nm/LP histograms (figure 5C), as well as dotplot graphs (data not shown), presented a very similar fluorescence profile.

3.4 Trypan blue at 0.002% w/v does not promote quenching in FL1.

Trypan blue at 0.2 and 0.4% w/v, in acidic conditions, promotes a decrease in FL1 fluorescence (quenching). To determine whether cell treatment with TB at 0.002%w/v in physiologic pH promotes FL1 quenching, we stained 100ul of peripheral blood with specific monoclonal antibody anti-human CD3-FITC followed by TB or PI staining. The results showed that trypan blue at 0.002% w/v, in physiologic pH, did not interfere on FL1-530/30nm fluorescence (Figure 6) and produced similar results to those obtained by the cell cultures treated with PI or PBS (control). After the death induction using high temperature (50°C) pre-treatment, the flow cytometry exclusion assays using TB or PI presented a similar percentage of live and dead cells confirmed by the high correlation between these methodologies ($R^2=0.9805$), as well as a very similar dot plot graph profiles on flow cytometry analysis (Figure 7).

4 Discussion

The number of live and dead cells in an experiment can be estimated by use of several markers including dyes that intercalate into DNA (EMA, PI, 7-AAD, DAPI and Trypan Blue), reagents which bind to phosphatidylserine (Annexin V) and the amine reactive dyes (UViD, ViViD, GrViD, OrViD). Among the tests using dyes the Trypan Blue (TB) exclusion assay, using optical microscopy, and labeling of cells with Propidium Iodide (PI) followed by flow cytometry analysis, are widespread used by the scientific community.

Previous studies have shown that TB emits fluorescence when it interacts with proteins (12). Busetto et al. (14) reported a fluorescence-based experiment to evaluate the phagocytic action of neutrophils *in vitro*. In this assay, fixed *Candida albicans* stained with CFSE (green fluorescence) were added to the neutrophil cultures besides TB labeling. Since TB did not penetrate live cells, ingested yeasts retained their green^{high} fluorescence, while membrane-bound *C. albicans* displayed a double-positive red and green^{Low/Negative} fluorescence (14). Studies conducted by Herrison et al. (1981) also shown that trypan blue injected subcutaneously was adsorbed on exogenous yolk and stored in oocytes of Japanese quails. The dye binding sites were visualized by fluorescence microscopy. The analysis revealed that yolk granules exhibited a deep red fluorescence radiation with a maximum intensity at 670 nm when green or blue excitation light was used. Given these studies, we questioned whether the cells submitted to TB exclusion test might be evaluated by flow cytometry.

Initially, to verify if the TB fluorescence could be detectable by FACScan cytometer, excitation and emission spectra of the TB/protein (BSA) interaction was compared with those obtained by TB and BSA alone. According to the results, the TB/BSA interaction emitted fluorescence peaks at 490nm and 660nm wavelength. Furthermore, human lymphocytes stained with TB revealed that TB/intracellular protein interactions get similar results on analysis by microscopy able to detect red fluorescence at 660nm. In human peripheral blood mononuclear cells, TB emitted remarkable fluorescence demonstrated by overlapping of blue and red fluorescences after simultaneous labeling with DAPI and TB (Figure 2). This result, besides flow cytometry analysis for cell size (FSC) and granularity (SSC), demonstrated that

red fluorescence evaluated by flow cytometry was not produced by possible technical artifacts. Interactions between TB and cytoplasmic proteins may, however, be influenced by the protein diversity and quantity within specific cell populations. Certain cells, such as monocytes and neutrophils present high proteogenic activity to support the effector functions in the phagocytosis process. The high levels of protein granules inside the cells may lead to the phenomenon known as auto fluorescence, common in phenotypic analysis by flow cytometry. Therefore, it is recommended that for each cell type, an optimal TB concentration needs to be adjusted.

Concerning the affinity of trypan blue for proteins, the presence of red fluorescent cells after treatment with trypan blue dye could indicate the presence of the complex TB/protein both inside and outside of cells. Dead cells present permeable membrane that culminate in dye retention which favoring TB/protein complex formations within the cytoplasm. Already the membrane integrity of living cells prevents dye penetration, but did not prevent TB/protein binding outside of the cell surface. Optical microscopy assays, which measure the incorporation of this dye by dead cells, do not have sufficient sensitivity to detect the Trypan blue bound to membrane proteins of viable cells, whose morphology to keep intact. Thus, in optical microscopy-based assays, the presence of blue stained cells reveals the number of dead cells that have lost membrane selectivity and retained the dye within the cytoplasm. Flow cytometric assay is a high sensibility technique, and because of this it was necessary to find an optimum concentration of TB able to distinguish viable cells, which have a basal level of fluorescence due to TB/protein complex on the cell surface, from dead cells, where TB/protein complex occurs in both cytoplasm and outside of the cell membrane. Thus, we treated a suspension of live and dead cells using different concentrations of TB, in order to confine the population of viable cells, which do not incorporate the TB intracellularly, into a log scale region between 10^0 and 10^1 (negative red-fluorescence region) as well as to distinguish dead stained cells on FL3-based histograms. The heat pre-treatment to induce cell death was chosen in order to avoid possible chemical interferences between the cytotoxic agent and TB/protein formation. Therefore, when using cytotoxic agents, it is highly recommended to conduct a preliminary assay to evaluate possible chemical interferences of the cytotoxic agent and the TB/protein complex formation, as well as to evaluate the ability of the compound to emit

fluorescence by itself, as doxorubicin, a widely drug used in cytotoxic assays which emits FL3 fluorescence by itself (26). According to our data, TB at 0.002% promoted similar results to the PI staining and was setup as optimal concentration for further analysis (Figure 3).

Furthermore, studies have shown that live cells, when treated with TB at 0.4% w/v, start to incorporate the dye after five minutes of exposition to the dye addition. Here we observed that live human leukocytes treated with TB at 0.002% till 30 minutes after staining presented no differences in the viability profile (figure 4). This stable interaction between TB and cytoplasmatic proteins could be useful for experiments that require the analysis of a large number of samples. The trypan blue-based cell viability assay by flow cytometry showed a strong correlation with propidium iodide - PI and the counting of stained cells in Neubauer chamber - CA (by optical microscopy), confirming the reliability of the test proposed here. Interestingly, the histograms obtained from PI and TB analysis were quite similar (Figure 5C). According to previous studies, trypan blue in concentrations greater than 0.1%, in acidic conditions, is capable of producing quenching green fluorescence (14). Thus, another issue was to determine the possibility of simultaneous evaluation of cell viability by TB and cell surface staining using the Fluorescein Isothiocyanate (FITC) by flow cytometry. In our proposed assay, we used PBS buffer which maintains the pH closer to 7.2 and under these physiologic pH conditions, we observed the fluorescence levels of the CD3-FITC⁺antibody were kept even at high TB concentrations (0.4%). The FL1 fluorescent peak of the cells treated with TB at 0.002% was identical to the fluorescence peak of the cells treated with anti-CD3-FITC and PBS. In the comparative analysis between PI and TB assays after FITC staining, we observed a high correlation, as well as a very similar profile in the dotplot graphics obtained by the two techniques (Fig. 7C).

Although the results presented here are quite consistent and comparable to those obtained by PI staining methodology, is not our aim to suggest the TB assay by flow cytometry as a substitute to other established techniques used for cell viability analysis. The main objective of this study was to present an adaptation of a technique already known and widespread in scientific experimentation, able to be utilized as an additional and alternative tool for providing reliable results. However, it is up to the investigators to decide the value of its application in view of the

existing limitations of the tert.

5 Literature Cited

1. Chan LL, Wilkinson AR, Paradis BD, Lai N. Rapid Image-based Cytometry for Comparison of Fluorescent Viability Staining Methods. *J Fluoresc* 2012; 22:1301–1311.
2. Chen SF, Lu WF, Wen ZY, Li Q, Chen JH. Preparation, characterization and anticancer activity of norcantharidin-loaded poly(ethylene glycol)-poly(caprolactone) amphiphilic block copolymer micelles. *Pharmazie*. 2012; 67(9):781-8.
3. Altiok N, Ersoz M, Koyuturk M. Estradiol induces JNK dependent apoptosis in glioblastoma cells. *Oncol Lett*. 2011; 2(6):1281-1285.
4. Puoci F, Morelli C, Cirillo G, Curcio M, Parisi OI, Maris P, Sisci D, Picci N. Anticancer Res. Anticancer activity of a quercetin-based polymer towards HeLa cancer cells. 2012; 32(7):2843-7.
5. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenberghe P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WE, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nuñez G, Peter ME, Tschoopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B, Melino G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* 2009; 16(1):3-11.
6. Tennant JR. Evaluation of the trypan blue technique for determination of cell viability. *Transplantation* 1964; 2:685-94.
7. Song K, Li W, Wang H, Wang H, Liu T, Ning R, Wang L. Investigation of coculture of human adipose-derived stem cells and mature adipocytes. *Appl Biochem Biotechnol*. 2012;167(8):2381-7
8. Zanatta G, Steffens D, Braghierioli DI, Fernandes RA, Netto CA, Pranke P. *Braz J Med Biol Res*. Viability of mesenchymal stem cells during electrospinning. 2012;45(2):125-30.
9. Kim JS, Nam MH, An SSA, Lim CS, Hur DS, Chung C, Chang JK. Comparison of the Automated Fluorescence Microscopic Viability Test With the Conventional and Flow Cytometry Methods. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 2011; 25: 90–94.
10. Jones KH and Senft JA. An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. *J Histochem Cytochem* 1985 33: 77-79.

11. Kumar T, Majumdar A, Das P, Sarafis V, Ghose M. Trypan blue as a fluorochrome for confocal laser scanning microscopy of arbuscular mycorrhizae in three mangroves. Biotechnic & Histochemistry 2008; 83(3-4): 153-159.
12. Harrisson, F, Callebaut M, vakaet L. Microspectrographic analysis of trypan blue-induced fluorescence in oocytes of the Japanese quail. Histochemistry 1981; 72(4): 563-78.
13. Van Amersfoort ES, Van Strijp JA. Cytometry. Evaluation of a flow cytometric fluorescence quenching assay of phagocytosis of sensitized sheep erythrocytes by polymorphonuclear leukocytes. 1994; 1;17(4):294-301.
14. Busetto S, Trevisan E, Patriarca P, Menegazzi R. A. A single step, sensitive floecytofluorometric assay for the simultaneous assessment of membrane bound and albicans in phagocytosing neutrophils. Cytometry A. 2004; 58(2):201-6.
15. Tabera S, Pérez-Simón JA, Díez-Campelo M, Sánchez-Abarca LI, Blanco B, López A, Benito A, Ocio E, Sánchez-Guijo FM, Cañizo C, Miguel JFS. The effect of mesenchymal stem cells on the viability, proliferation and differentiation of B-lymphocytes. *haematologica* 2008; 93(9): 1301-1309.
16. Edidin M. A rapid, quantitative fluorescence assay for cell damage by cytotoxic antibodies. *J Immunol* 1970; 104: 1303-6.
17. Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, Gorczyca W, Hotz MA, Lassota P, Traganos F. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry* 1992; 13:795-808.
18. Riccardi C, Nicoletti I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat Protoc.* 2006;1(3):1458-61.
19. Fried J, Perez AG, Clarkson BD. Flow cytofluorometric analysis of cell cycle distributions using propidium iodide. Properties of the method and mathematical analysis of the data. *J Cell Biol.* 1976;71(1):172-81.
20. Gazzinelli G, Katz N, Rocha RS, Colley DG. Immune responses during human schistosomiasis mansoni. X. Production and standardization of an antigen-induced mitogenic activity by peripheral blood mononuclear cells from treated, but not active cases of schistosomiasis. *J Immunol* 1983; 130(6):2891-5.

21. Rieger AM, Hall BE, Luong le T, Schang LM, Barreda DR. Conventional apoptosis assays using propidium iodide generate a significant number of falsepositives that prevent accurate assessment of cell death. *J Immunol Methods.* 2010; 358(1-2):81-92.
22. Davis HW, Sauter RW. Fluorescence of Trypan blue in frozen-dried embryos of the rat. *Histochemistry.* 1977; 54(3):177-89.
23. Pereira de Souza CC, Moreira Prado G, da Conceição Freitas RC, Silva Santos Guimarães P, Calegário de Oliveira L, Eustáquio Alvim Brito-Melo G, de Figueiredo Conte Vanzela AP. Analysis of *Aspergillus nidulans* germination, initial growth and carbon source response by flowcytometry. *J Basic Microbiol.* 2011;51(5):459-66.
24. Steinwall O, Klatzo I. Selective vulnerability of the blood-brain barrier in chemically induced lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* 1966; 25:542-559.
25. Hamberger A, Hamberger B. Uptake of catecholamines and penetration of trypan blue after blood-brain barrier lesions. *Z Zellforsch* 1966; 70: 386-392.
26. Quan ZW, Yang Y, Li JY, Gong W, Qin YY, Li SG. The mechanisms of somatostatin induced enhanced chemosensitivity of gallbladder cancer cellline to doxorubicin: cell cycle modulation plus target enzyme up-regulation. *Biomed Pharmacother.* 2010; 64(7):451-7.

Figures

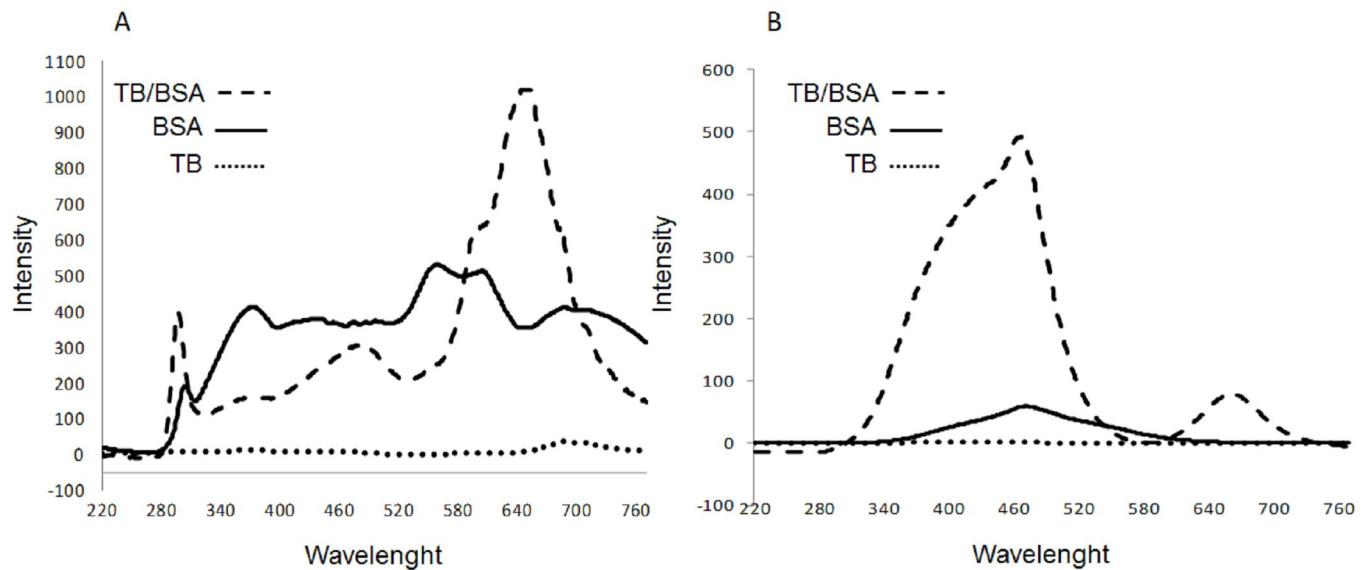


Figure 1 – Spectrofluorophotometry analysis of the excitation (A) and emission (B) spectra of the solutions containing trypan blue - TB at 0,02% w/v (.....), BSA (—) at 10 w/v, and TB/BSA (- - -) interaction. BSA (bovine serum albumin), TB (trypan blue).

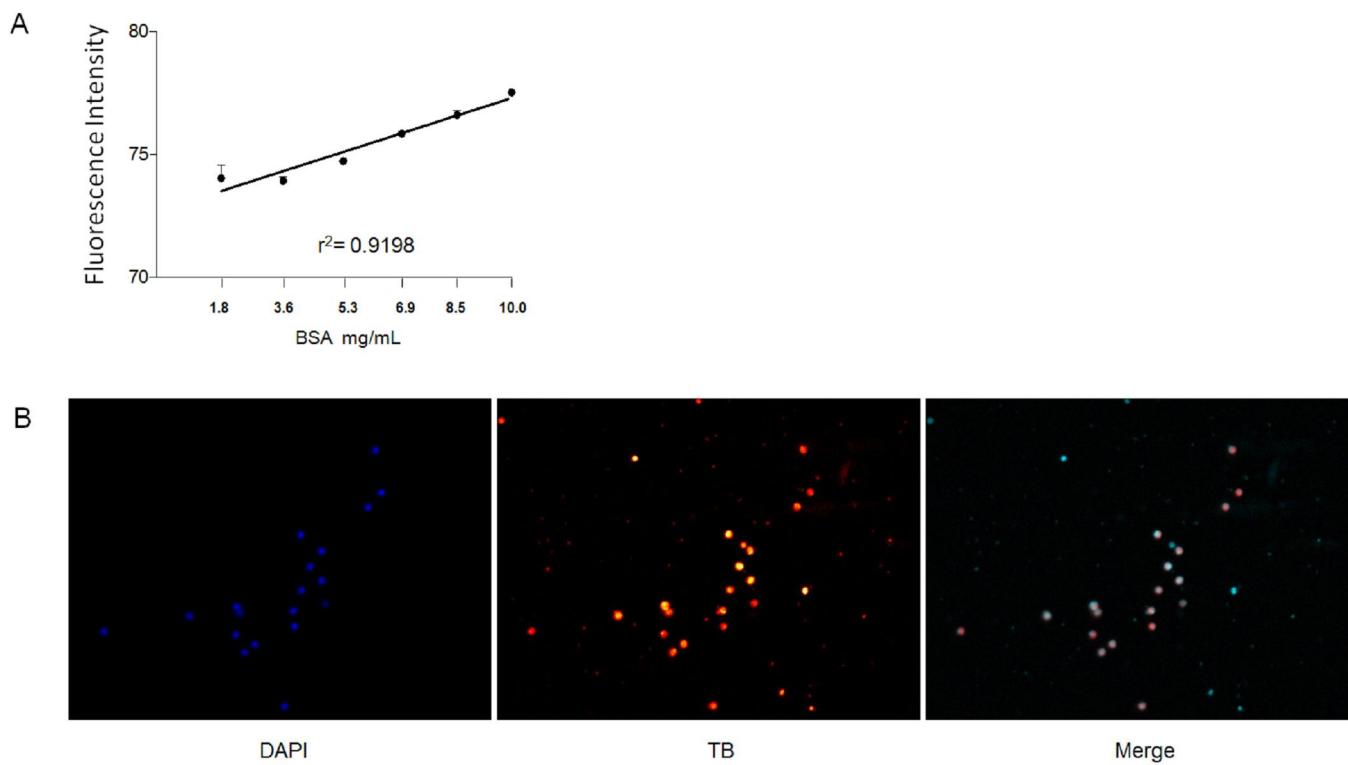


Figure 2 – Fluorescence analysis of the TB/BSA interaction. (A) Growing BSA concentrations were added TB solution at 0.002%. The fluorimeter was setup to use a fixed excitation and emmission wavelengh at 488nm and 660nm, respectively. (B) Human PBMC co-stained with DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) and TB (trypan blue). DAPI excitation 365 and emission band pass filter DAPI-445/50 nm, TB excitation at 488nm and emission fluorescence detected by LP/515 nm.

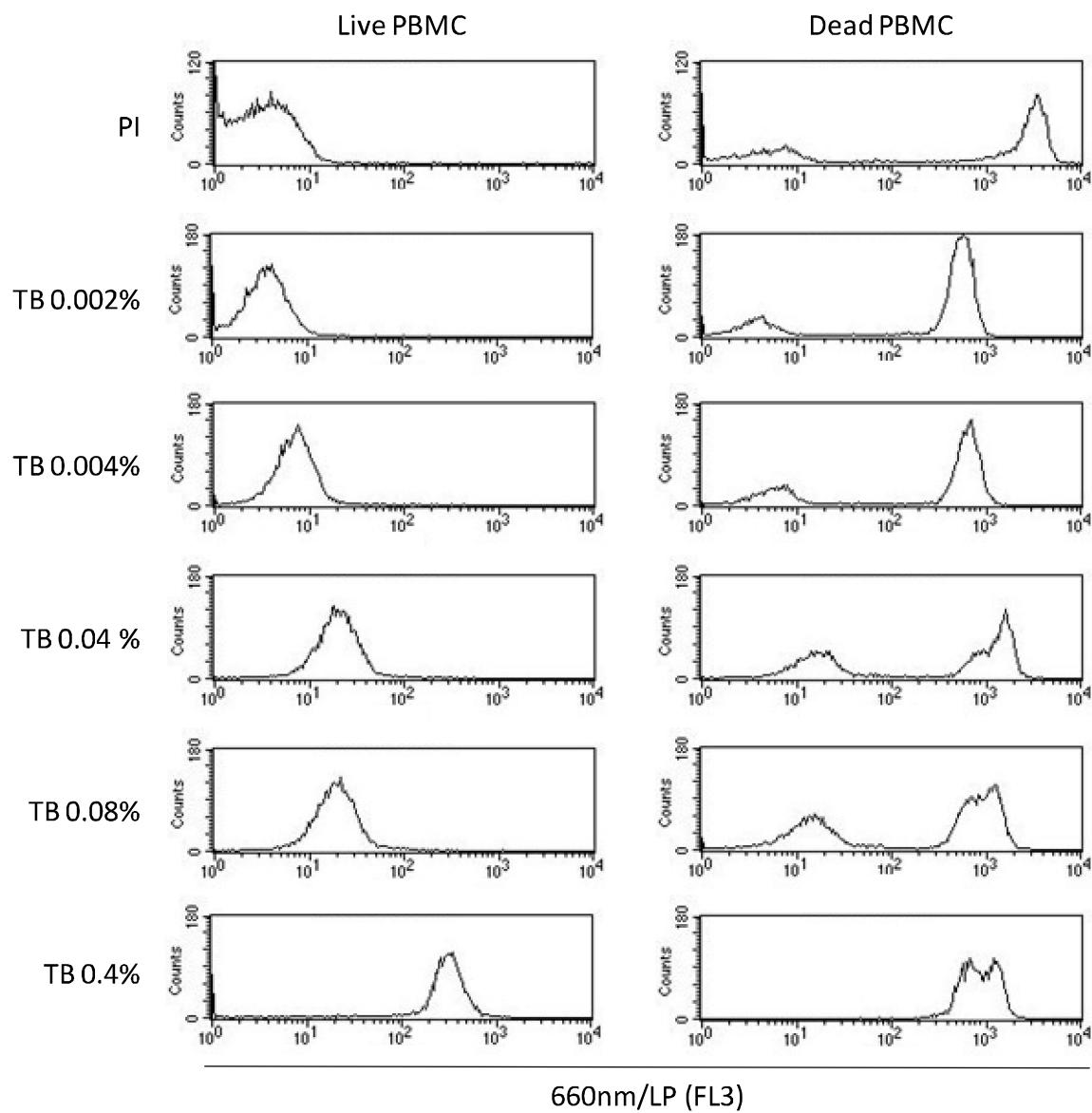


Figure 3 – Live and dead PBMC stained with TB (trypan blue) solutions at 0.002%, 0.004%, 0.04%, 0.08% and 0.4% w/v and analyzed by FACScan cytometer, using the long pass filter 650/LP (FL3 detector). PI (propidium iodide) assay by flow cytometry was used as comparative method.

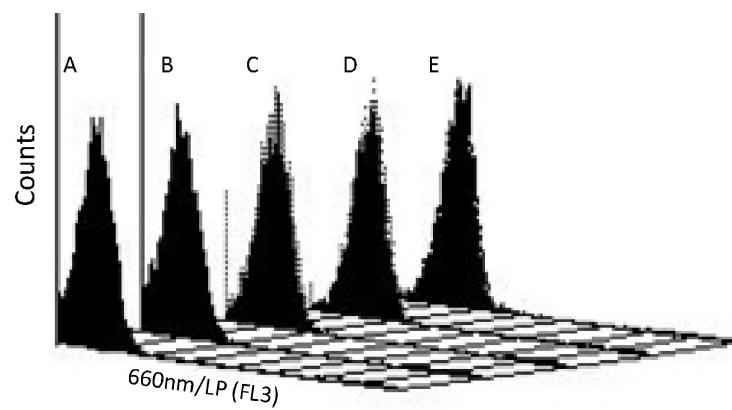


Figure 4 – Histogram analysis of the TB (trypan blue) exclusion assay by flow cytometry in order to evaluate TB (at 0.002% w/v) incorporation by live cells after 0 (A), 5 (B), 10 (C), 20 (D) and 30 (E) minutes after dye addition.

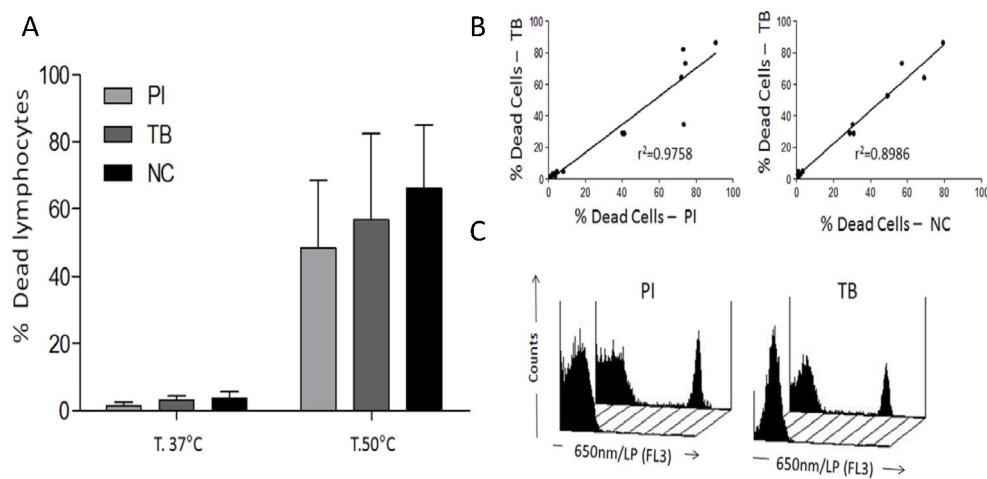


Figure 5 – (A) Comparative analysis between trypan blue exclusion test using flow cytometry (TB), propidium iodide staining (PI) and conventional trypan blue exclusion test using Neubauer chamber cell counting (NC). (B) Pearson's correlation test between PI and TB or NC and TB. (C) Fluorescent intensity histogram profiles of the PI and TB flow cytometry analysis.

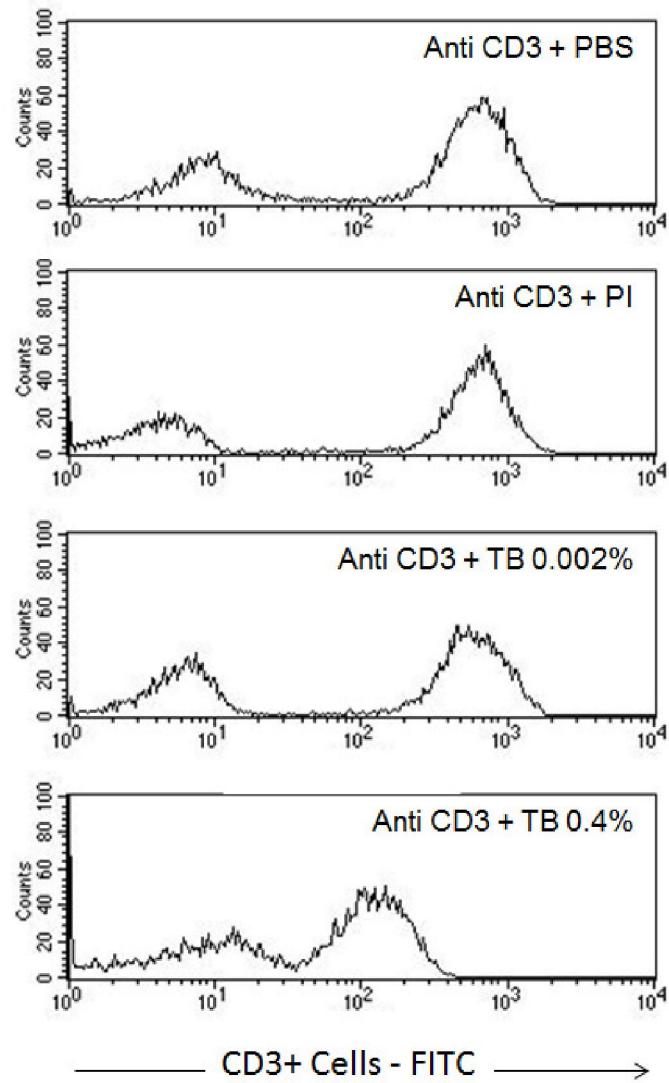


Figura 6 – Profile of T-lymphocytes stained with monoclonal antibody anti CD3-FITC followed by treatment with PI (propidium iodide) and TB (trypan blue) at 0.002% and 0.4% w/v or PBS (untreated control).

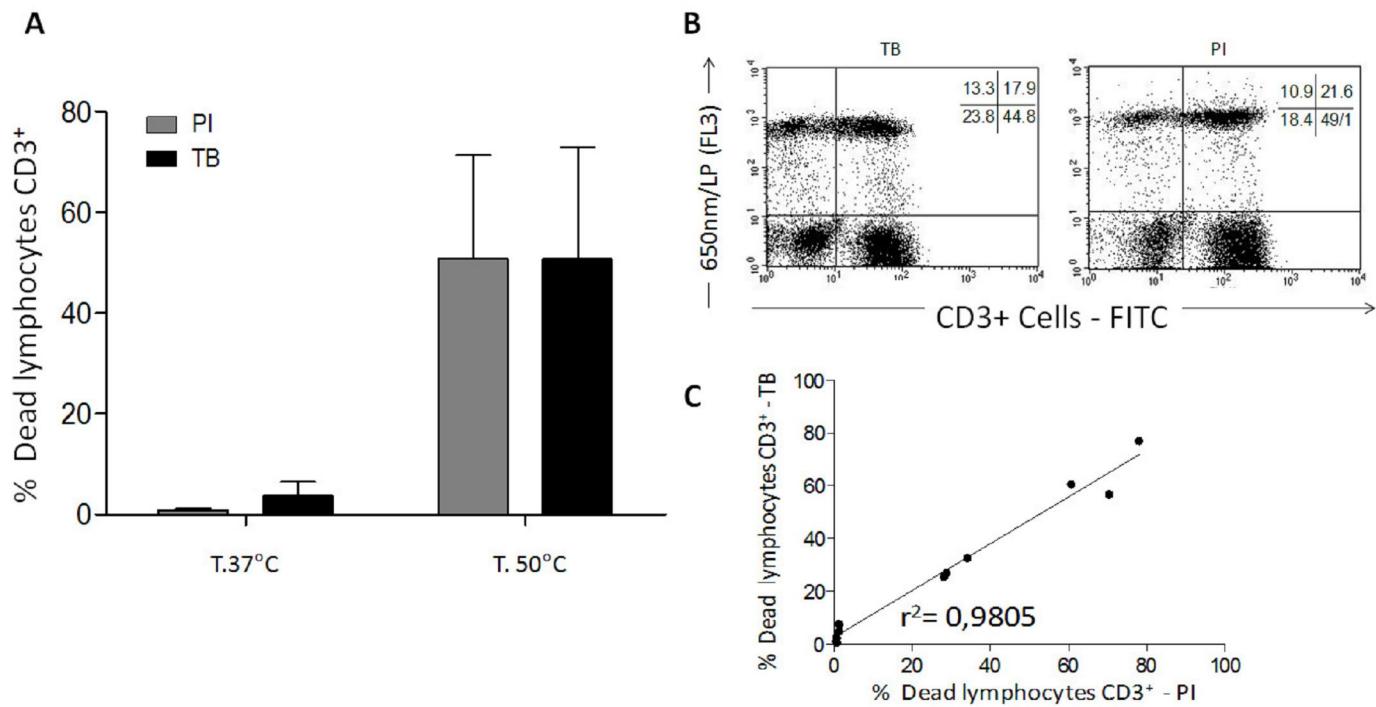


Figura 7 – (A) Percentage of dead human T-lymphocytes (CD3-FITC+ cells) submitted to cell culture at the temperatures 37°C (physiologic temperature) or 50°C (high-stress temperature) followed by staining with TB (trypan blue) or PI (propidium iodide). (B) Dotplot graph profile between human lymphocytes submitted to pre-treatment with high-stress temperature (50°C) followed by staining with TB and PI and monoclonal antibody anti CD3-FITC+. (C) Pearson's correlation test between dead CD3+ lymphocytes using PI and TB flow cytometry assays.