

ATIVIDADE BIOLÓGICA E AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA FENOLOGIA DE
Eupatorium maximilianii SCHRAD. (MATA PASTO)

ANA CAROLINA GUZZO MONTEIRO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

JUNHO – 2015

ATIVIDADE BIOLÓGICA E AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA FENOLOGIA DE
Eupatorium maximilianii SCHRAD. (MATA PASTO)

ANA CAROLINA GUZZO MONTEIRO

“Tese de Doutorado apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Produção Vegetal.”

Orientador: Prof. Silvério de Paiva Freitas.

CAMPOS DOS GOYTACAZES-RJ
JUNHO DE 2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCTA / UENF 167/2015

Monteiro, Ana Carolina Guzzo

Atividade biológica e avaliação preliminar da fenologia de *Eupatorium maximilianii* SCHRAD (mata pasto) / Ana Carolina Guzzo Monteiro. – 2015.

98 f. : il.

Orientador: Silvério de Paiva Freitas

Tese (Doutorado - Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2015.

Bibliografia: f. 73 – 98.

1. Planta medicinal 2. Planta daninha 3. Atividades biológicas 4. Fenologia 5. Mata pasto I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. II. Título.

CDD– 633.88

ATIVIDADE BIOLÓGICA E AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA FENOLOGIA DE
Eupatorium maximilianii SCHRAD. (MATA PASTO)

ANA CAROLINA GUZZO MONTEIRO

“Tese de Doutorado apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Produção Vegetal.”

Aprovada em 03 de junho de 2015

Comissão Examinadora

Professora Cristiane da Silva Stabenow (D.Sc. Produção Animal) - IFF

Professora Fernanda Antunes (D.Sc. Medicina) – CCTA/UENF

Engenheira Agrônoma Glória Cristina da Silva Lemos (D.Sc. Produção Vegetal) –
CCTA/UENF

Professor Silvério de Paiva Freitas (D.Sc. Fitotecnia) – CCTA/UENF

(Orientador)

A Deus;
Aos meus pais, Osvaldo e Margarete;
À minha filha Eduarda;
À minha irmã Camilla;
Ao meu esposo Carlos Eduardo.

DEDICO ESTE TRABALHO

AGRADECIMENTOS

A Deus em primeiro lugar, pela força e pelo amparo ao longo da minha vida;

Agradeço a UENF pela oportunidade de realização do curso de doutorado e pela bolsa como suporte financeiro;

A FAPERJ pelo financiamento do projeto;

Agradeço ao Professor Silvério de Paiva Freitas, pela orientação, pela grande oportunidade e pela confiança;

À Doutora Glória Cristina de S. Lemos, por toda amizade, colaboração, dedicação, incentivo e ensinamentos;

Agradeço aos professores integrantes da banca examinadora, Cristiane Stabenow, Glória Lemos e Fernanda Antunes, por terem aceitado participar e contribuir com este trabalho;

À professora Fernanda Antunes, pela grande ajuda, pelos ensinamentos e pela dedicação para o desenvolvimento do presente trabalho;

À professora Maria Cristina Canela, pela colaboração nos ensaios;

À professora Daniela Barros pela colaboração;

Ao professor Manuel Vazquez pela disponibilização de materiais;

À minha amada mãe Margarete, por todo incentivo, amor, sabedoria e confiança; te amo muito!

À minha filha Eduarda, que me incentiva a cada dia, amor sem medida;

Ao meu marido Carlos Eduardo, pelo carinho e companheirismo;

À minha família, meu pai Osvaldo, minha irmã Camilla, meus sobrinhos Giovana Vittoria, Giulia e Pablo, por todo carinho;

A Mariana por toda ajuda na realização dos experimentos;

A Rosana pela colaboração e pelo companheirismo;

A todos os amigos e companheiros do laboratório;

E a todos aqueles que, direta ou indiretamente, colaboraram na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1- INTRODUÇÃO	1
2- OBJETIVOS.....	3
2.1- Objetivo geral.....	3
2.2- Objetivos específicos.....	3
3- REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3.1- Família Asteraceae.....	4
3.2- Gênero <i>Eupatorium</i>	5
3.3- <i>Eupatorium maximilianii</i>	6

3.4- Química e atividade biológica	9
3.5- Avaliação das atividades biológicas.....	11
3.5.1-Atividade antioxidante	12
3.5.2- Atividade anticolinesterásica.....	17
3.5.3- Atividade antinociceptiva.....	20
3.5.4- Avaliação da toxicidade	24
3.6- Fenologia	25
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1- Material vegetal.....	28
4.2- Extração do óleo volátil	29
4.3- Identificação dos constituintes dos óleos voláteis.....	29
4.4- Preparo do extrato hidroalcoólico	30
4.5- Atividades Biológicas	30
4.5.1- Atividade antioxidante	30
4.5.1.1- Avaliação qualitativa	30
4.5.1.2- Avaliação quantitativa	30
4.5.2- Atividade anticolinesterásica.....	31
4.5.2.1- Avaliação quantitativa	31
4.5.3- Atividade antinociceptiva.....	33
4.5.3.1- Teste de pressão crescente na pata (Von Frey)	33
4.5.3.2- Teste da placa quente.....	34
4.5.4 Teste da locomoção forçada em cilindro giratório (rota rod)	35
4.5.5- Avaliação da toxicidade sobre <i>Artemia salina</i> Leach	36
4.6- Fenologia	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
5.1- Extração do óleo volátil	39
5.2- Extrato hidroalcoólico bruto.....	40

5.3- Atividade antioxidante	40
5.4- Atividade anticolinesterasica.....	43
5.5- Atividade antinociceptiva.....	45
5.5.1- Avaliação da pressão crescente na pata	45
5.5.2- Avaliação do teste da placa quente (hot plate)	46
5.6- Avaliação da locomoção forçada em cilindro giratório (rota rod)	50
5.7- Toxicidade aguda com <i>Artemia salina</i> Leach.....	51
5.8- Fenologia	52
6. CONCLUSÕES	58
REFERÊNCIAS.....	60

RESUMO

MONTEIRO, Ana Carolina Guzzo; D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. junho de 2015. Atividade biológica e avaliação preliminar da fenologia de *Eupatorium maximilianii* SCHRAD (mata pasto). Orientador: Silvério de Paiva Freitas.

A espécie *Eupatorium maximilianii* Schrader pertence à família Asteraceae, nativa do continente americano. No Brasil esta espécie é encontrada principalmente nas regiões Centro-Oeste, Sul e Sudeste. Entre as plantas daninhas, esta espécie é conhecida como mata pasto, por colonizar amplamente áreas abertas e/ou degradadas, causando sérios prejuízos econômicos à atividade pecuária. Na região Norte Fluminense a *E. maximilianii* é conhecida como arnica, arnica branca e arnica campista, sendo utilizada na medicina popular, apresentando diversas aplicações, desde o uso para diminuir colesterol, como depurativo do sangue, para tratamento de corrimento vaginal, até em torções e pancadas em geral. Apesar do grande uso popular da espécie, não há estudos que caracterizam e comprovem suas atividades biológicas. Neste sentido, objetivou-se com este trabalho verificar a atividade antioxidante, anticolinesterásica, antinociceptiva e a toxicidade, presente nos extratos e/ou óleos essenciais da espécie *E. maximilianii* e verificar as fenofases da espécie vegetal ao longo de três anos. A avaliação da atividade antioxidante foi realizada qualitativa e quantitativamente, baseada no método fotolorimétrico do DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila). Para o ensaio qualitativo, o extrato foi solubilizado em metanol e aplicado em triplicata sobre placas cromatográficas GF254. Na avaliação quantitativa, foram utilizados 200 mg dos extratos brutos dissolvidos em 1mL de metanol, a partir desta solução foram preparadas concentrações de 10, 100 e 1000 µg/mL, feitas em triplicata, usou-se o BHT (2,6-di-(tert-butil)-4-metilfenol) como padrão. Após uma hora, as leituras

foram realizadas em 515 nm no espectrofotômetro. Os dados foram relatados pela média \pm desvio padrão e avaliados por análise de variância One-Way ANOVA. A atividade anticolinesterásica foi baseada em Ellman et al.(1961), seguindo um método fotocolorimétrico para avaliar a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE). Nesse método, a atividade da AChE é medida, em um comprimento de onda determinado, 405 nm, seguindo a variação da absorbância do meio onde a acetilticolina é hidrolizada pela AChE. A atividade antinociceptiva foi avaliada seguindo as seguintes metodologias, teste de pressão crescente na pata (Von Frey); teste da placa quente (Hot Plate) e a avaliação da atividade motora foi feita pelo teste da locomoção forçada em cilindro giratório (rota rod). A toxicidade aguda foi realizada através do teste com *Artemia salina*, a DL₅₀ foi calculada através do método de análise de Probitos, com 95% de intervalo de confiança, pelo programa SAEG 9.1. Os resultados foram relacionados segundo uma escala onde a DL₅₀ <80 $\mu\text{g}/\text{mL}$, altamente tóxico; entre 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, moderadamente tóxico; e DL₅₀ >250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, com baixa toxicidade ou não tóxico. O ensaio fenológico foi desenvolvido inicialmente na Unidade de Apoio à Pesquisa do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UAP/CCTA/UENF) e posteriormente na Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro (PESAGRO-RIO), sendo verificadas as mudanças das fenofases e a precipitação pluviométrica mensal durante o período. Os resultados indicaram atividade antioxidante positiva; atividade anticolinesterásica foi classificada como moderada (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e potente (2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ até 10000 $\mu\text{g}/\text{mL}$), segundo Vinutha et al. (2007). O efeito analgésico, sugerido pelo uso popular da espécie *E. maximilianni*, pôde ser comprovado por meio do teste de Von Frey, rota rod e da placa quente. A DL₅₀ foi de 548,90, sendo considerada uma baixa toxicidade aguda. Em relação ao estudo fenológico, a espécie apresenta maior crescimento vegetativo na primavera-verão, estando relacionada aos meses com maiores índices pluviométricos.

ABSTRACT

MONTEIRO, Ana Carolina Guzzo; D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Jun, 2015. Biologic activity and fenologic preliminar evaluation of *Eupatorium maximilianii* SCHRAD (kill pasture). Advisor: Silvério de Paiva Freitas.

The species *Eupatorium maximilianii* Schrader belongs to the Asteraceae family, native to the Americas. In Brazil this species is found mainly in the Midwest, South and Southeast. Among the weeds, this species is known as kill pasture, by colonizing wide open and / or degraded area, causing serious economic losses to livestock activity. In the North Part of Rio de Janeiro State *E. maximilianii* is known as arnica, arnica and arnica white camper and is used in folk medicine, with applications ranging from use to reduce cholesterol as blood cleanser for the treatment of vaginal discharge, even in twists and bumps in general. Despite the large popular use of the species, there are no studies that characterize and prove its biological activities. In this sense, the aim of this study was to verify the antioxidant activity, acetylcholinesterase, antinociceptive and toxicity, present in the extracts and / or essential oils of *E. maximilianii* sort and check the phenophases of plant species during the period 2012 to 2014. Evaluation of antioxidant activity was carried out qualitatively and quantitatively, based on photolorimetric method of DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hidrazila). For the qualitative assay, the extract was solubilized in methanol and applied in triplicate on chromatographic plates GF254. The quantitative analysis was based on 200 mg of crude extract dissolved in 1 mL of methanol, from this solution concentrations were prepared in 10, 100 and 1000 mg / mL, made in triplicate used to BHT (2,6-di- (tert-butyl) -4-methylphenol) as standard. After one hour, the readings were performed at 515 nm in a spectrophotometer. Data were reported

as mean \pm standard deviation and evaluated by analysis of variance One-Way ANOVA. The anticholinesterase activity was based on Ellman et al. (1961), following a photolorimetric method to evaluate the activity of the enzyme acetylcholinesterase (AChE). In this method, AChE activity is measured in a certain wavelength, 405 nm following the variation of absorbance of the medium where the acetylthiocholine is hydrolyzed by AChE. The antinociceptive activity was assessed following three red testing, increasing pressure test in the paw (Von Frey); test of forced locomotion in rotary drum (Route rod); hot plate test (Hot Plate). Acute toxicity was performed using the test with *Artemia salina*, the LD50 was calculated by probit analysis method, with 95% confidence interval, by SAEG 9.1 program. The results were expressed on a scale where the LD50 <80 ug / ml, was highly toxic; between 80 mg / mL and 250 ug / ml, moderately toxic; and LD50 > 250 mg / mL, with low toxicity or non-toxic. The phenological assay was developed initially in Support Unit Research Center for Agricultural Sciences and Technology of North Part of Rio de Janeiro State University Darcy Ribeiro (UAP / CCTA / UENF) and later at the Agricultural Research Company of the State of Rio de Janeiro (PESAGRO- RIO), and checked the changes of phenophases and the monthly rainfall during the period. The results indicated positive antioxidant activity; anticholinesterase activity was classified as moderate (1000 ug / ml) and potent (2000 ug / ml to 10,000 ug / ml), according to Vinutha et al. (2007). The analgesic effect, suggested by the popular use of *E. maximilianni* species, could be seen through the Von Frey test route rod and hot plate. The LD50 was 548.90 and is considered a low acute toxicity. Regarding the phenological study, the species is more vegetative growth in spring and summer, and is related to the months with the highest rainfall.

1- INTRODUÇÃO

A espécie *Chromolaena maximiliani* sin. *Eupatorium maximiliani* Schrader, é um subarbusto perene de 60 a 180 cm de altura, com ramos pubescentes e estriados, nativa do continente americano, pertence à família Asteraceae. Encontrada comumente no Sudeste do Brasil, é conhecida popularmente como mata pasto entre as plantas daninhas (Lorenzi, 2008), sendo ainda utilizada na medicina popular, e conhecida, na região Norte Fluminense, como arnica, arnica branca e arnica campista.

Um problema bastante comum relacionado a esta espécie é a capacidade de lotação em pastagens, causando sérios prejuízos econômicos à atividade pecuária. Segundo Santos et al. (2006), atualmente, um dos maiores problemas do sistema de produção de bovinos no Brasil é a pastagem degradada, com alta infestação de plantas daninhas, como aroeirinha (*Schinus terebintifolius*) e mata pasto (*Chromolaena maximiliani* sin. *Eupatorium maximiliani*).

Diversas plantas consideradas daninhas podem, contudo, apresentar potencial medicinal. A própria característica da planta invasora pode ser útil e deve ser aproveitada como um grande potencial para a produção de produtos fitoterápicos. Sua utilização em comunidades mais afastadas dos grandes centros

urbanos, além da diminuição da pressão exercida sobre o extrativismo de plantas nativas da região, são aspectos positivos tornando necessários mais estudos sobre plantas medicinais (Rigotti, 2009).

Características da espécie tais como, alta produção de sementes e capacidade de colonizar áreas abertas e, ou degradadas, indicam a diferenciação de espécies como a *E. maximilianii* com outras consideradas economicamente viáveis. Embora características como variabilidade genética, plasticidade fenotípica e a fenologia sejam de grande importância para determinar o sucesso do estabelecimento da espécie na comunidade vegetal (Harper, 1977).

Segundo Lieth (1974), a fenologia da planta é o estudo da ocorrência de eventos biológicos repetitivos e das causas de sua ocorrência em relação às forças seletivas bióticas e abióticas, bem como, da sua inter-relação entre as fases caracterizadas por estes eventos, dentro de uma mesma ou de espécies diferentes. Estudos fenológicos geram informações relevantes do ponto de vista do manejo adequado da espécie.

Quando a fitoquímica e a atividade biológica de uma determinada espécie não são definidas anteriormente, é importante realizar estudos fenológicos da espécie de interesse, além de verificar as principais atividades biológicas atribuídas às espécies de preferência pertencentes ao mesmo gênero, para obtenção de uma base metodológica adequada.

A espécie *E. maximilianii* apresenta uma grande variedade de uso na medicina popular, desde aplicação para diminuir colesterol, depurativo do sangue, corrimento vaginal, até em torções e traumas em geral (Posse, 2007). Porém, nenhuma atividade biológica desta planta foi estudada, havendo com isso a necessidade de pesquisas para avaliar sua potencialidade como planta medicinal e a sua toxicidade, visto sua ampla utilização pela população.

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo geral

Avaliar atividades biológicas e monitorar a fenologia da espécie *Eupatorium maximilianii*.

2.2- Objetivos específicos

- Obter o extrato hidroalcoólico bruto a partir das folhas da espécie vegetal estudada;
- Avaliar a atividade antioxidante, anticolinesterásica, antinociceptiva presente no extrato hidroalcoólico bruto;
- Avaliar o efeito do extrato hidroalcoólico bruto no desempenho locomotor de roedores;
- Avaliar a toxicidade aguda do extrato hidroalcoólico bruto de *E. maximilianii* frente à *Artemia salina*;
- Identificar intervalos de desenvolvimento da espécie em função do tempo, considerando, fase vegetativa, floração, frutificação e desfolha.

3- REVISÃO DE LITERATURA

3.1- Família Asteraceae

Asteraceae é a maior família de angiospermas, compreendendo 25.000 espécies pertencentes a 1.600 gêneros dispostos em 17 tribos e três subfamílias (Bremer, 1994). No Brasil, a família está representada por aproximadamente 196 gêneros e cerca de 1.900 espécies (Barroso, 1991).

As folhas são geralmente inteiras ou ligeiramente denteadas (Scheffer, 1989), semelhante à forma de espátula, sempre simples, podendo ser opostas, alternas ou verticiladas e com tricomas glandulares que secretam óleos essenciais, encontrando-se também glândulas no tecido foliar (Joly, 1979).

As inflorescências são do tipo capítulo, constituído de um receptáculo achatado, côncavo ou convexo, sobre o qual se inserem flores sésses, sendo o conjunto envolvido por brácteas involucrais denominadas filárias. As flores apresentam simetria radial ou zigomorfa até bilabiadas.

Esta família apresenta grande interesse econômico, devido ao fato de grande parte de seus representantes serem empregados, por exemplo, na alimentação, na fabricação de cosméticos, na medicina e na ornamentação de ambientes (Dillon, 1980). A família é a única representante das Asterales, uma

das 11 ordens da Asteridae, a subclasse mais avançada das Magnoliopsida. O sucesso evolutivo do táxon parece mais decorrente do grande número de compostos de defesa que apresenta do que propriamente a sua morfologia floral especializada (Cromquist, 1981).

Possui a tendência de acúmulo de poliacetilenos, diterpenoides, lactonas, sesquiterpênicas, alcaloides e flavonoides, protegendo contra a herbivoria e invasão de microrganismos, conferindo vantagem seletiva à maioria das espécies pertencentes a esta família (Abad et al., 1995).

Existem muitos sistemas de classificação que abordam essa família vegetal. Segundo o sistema proposto por Jeffrey (1978), a Asteraceae é dividida em 2 subfamílias (Lacticoideae e Asteroideae) e 17 tribos, das quais, 8 são da primeira (Lactuceae, Mutisieae, Eremothamanceae, Arctotideae, Carduceae, Vernonieae, Liabeae e Eupatorieae) e 9 são da última (Senecioneae, Tageteae, Heliantheae, Inuleae, Anthemideae, Ursineae, Calenduleae, Cotuleae e Astereae), respectivamente.

3.2- Gênero *Eupatorium*

O gênero *Eupatorium* (Asteraceae) compreende aproximadamente 600 espécies, com a maioria nativa da América do Sul, das quais mais de 250 são nativas do Brasil em que 49 foram descritas no Rio Grande do Sul.

Segundo King e Robinson (1987), a tribo Eupatorieae foi alvo de uma revisão taxonômica, embasada principalmente em dados morfológicos macro e microscópicos, resultando na reclassificação de algumas espécies do gênero *Eupatorium* em *Chromolaena*. Este gênero é o maior da tribo e têm muitas espécies originárias da América tropical, algumas das quais estendem sua distribuição até o sul dos Estados Unidos.

Diversas espécies pertencentes ao gênero *Eupatorium*, são utilizadas na medicina popular, como anti-inflamatório, antibiótico, analgésico, entre outros (Albertasse et al., 2010). A literatura apresenta diversos resultados com extratos vegetais e óleos essenciais de várias espécies deste gênero, assim como mostra o resultado do trabalho realizado com a espécie *E. polystachyum*, onde foi verificado que esta espécie apresenta atividade antioxidante frente ao ensaio com DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) (Souza et al., 2007). Substâncias com propriedades medicinais obtidas de espécies do gênero *Eupatorium* apresentam

uma variedade de uso popular, apresentando atividade diurética, antiespasmódica, no tratamento da diarreia, náuseas, hepatoprotetor, antitumoral, antileucêmico, estimulante cardíaco, expectorante e anti-hemorragico (Sharma et al., 1998).

A espécie *E. ballotifolium* Kunth apresentou em seu óleo volátil, onze substâncias com potencial anticolinesterásico, apresentando-se deste modo como um forte candidato natural auxiliar no tratamento do mal de Alzheimer (Albuquerque et al., 2010). Foi isolado da espécie *E. capillifolium* o ácido cóstico, um composto de núcleo cadinano, que apresenta atividade antibacteriana (Sharma et al., 1998).

Segundo Schneider et al., (2005), foram detectados 81 compostos no óleo extraído das folhas de *E. laevigatum*, sendo 19 monoterpenos e 54 sesquiterpenos e os demais não identificados. A atividade antioxidante foi medida através do teste do carbonil, os resultados mostraram que houve atividade sequestrante de radicais livres no óleo essencial testado.

De acordo com King e Robinson (1987), o óleo volátil de diversas espécies do gênero *Eupatorium*, como encontrados em *E. cannabinum* e *E. adenophorum* podem apresentar cromenos, cumarinas, e compostos relacionados, como os benzofuranos, além de mono e sesquiterpenos. Esses compostos apresentam atividades biológicas como larvicidas, virucida, antiprotozoária, antimicrobiana e inseticida.

Apesar de estudos sobre os constituintes químicos e a atividade biológica correspondente a algumas espécies do gênero *Eupatorium*, a espécie *Eupatorium maximilianii*, usada na medicina popular em todo o Brasil para cicatrização de feridas, inchaços, torções, reumatismo, entre outros usos, não possui até o presente momento sua composição química e sua potencial atividade biológica caracterizada.

3.3- *Eupatorium maximilianii*

A espécie *E. maximilianii* é um subarbusto perene de 60 a 180 cm de altura, com ramos pubescentes e estriados, nativa do continente americano, facilmente reconhecida pela inserção quase em ângulo reto de seus ramos secundários com a haste principal. Apresenta florescimento intenso durante os

meses de fevereiro a abril, épocas com maiores precipitações pluviométricas (Lorenzi, 2008).

Esta espécie, também é classificada como *Chromolaena maximiliani*. (Schrad ex DC) R.M. King e H.Rob., com ocorrência nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul do Brasil, sendo conhecida popularmente como mata pasto entre as plantas daninhas (Lorenzi, 2008), e dentre as plantas medicinais, como arnica, arnica branca, arnica campista, arnica do campo, arnica do mato, bastante popular na Região Norte Fluminense.

Taxonomicamente pertence a classe Equisetopsida C. Agardh; subclasse Magnoliidae Novák ex Takht.; superordem Asteranae Takht.; ordem Asterales Link; família Asteraceae Bercht. & J. Presl; gênero *Chromolaena* ex. DC. R.M. King & H.Rob.

A espécie *E. maximiliani*, (Figura 1) apresenta caule com coloração verde com intensa pigmentação arroxeada, ramificação dicotômica cruzada nas porções superiores da planta, sendo as bifurcações em ângulo mais aberto. Folhas simples, opostas cruzadas, pecioladas, ovaladas, com a margem serrada até bem próximo da base. Limbo com 4 ou 5 nervuras que saem da base e irradiam para o ápice. As folhas nesta espécie se dispõem tomando uma posição quase perpendicular em relação aos ramos. Inflorescência do tipo pleiocásio de capítulos, caracterizada por apresentar numerosos capítulos pedunculados saindo de um mesmo ponto e alcançando quase a mesma altura, sendo que os capítulos mais velhos, cujas flores são as primeiras a se abrirem, ocupam a posição central.

Os capítulos são margeados por brácteas escamosas dispostas de forma helicoidal, e as flores do capítulo com corola lilacina. Diferencia-se de *C. laevigata* pela posição dos ramos dicotômicos cruzados e pelas folhas com pecíolo mais desenvolvido e limbo mais afastado do caule. A propagação ocorre por meio de sementes (Esteves, 2001).



Figura 1- capítulos margeados por brácteas - *Eupatorium maximilianii*.

Esta espécie é comum em áreas abertas, desocupadas, áreas de pastagem e bordos de fragmentos florestais, indicando maior necessidade de luz, apresenta maior tolerância a altas temperaturas e a radiação ultravioleta (Moreira e Bragança, 2010). Possui maior vigor em solos argilosos, sendo planta daninha particularmente importante em pastagens, onde restringe a capacidade de lotação, trazendo sérios prejuízos econômicos à pecuária (Lorenzi, 2008).

Segundo Hafez (1958), os estômatos de folhas iluminadas tendem a fechar quando expostos ao ar não circulado e a abrir quando expostos ao ar circulado. Estudos sobre a estrutura foliar da *Eupatorium maximilianii* mostraram que a folha é hipoestomática e que a epiderme, em vista frontal, apresenta células de parede sinuosa e forma irregular com comprimento de 54 μ m. As formas irregulares são decorrentes das ondulações bem pronunciadas de suas paredes, que são recobertas por fina camada de cutícula, tanto na face adaxial quanto abaxial, indício de proteção contra a perda de água (Ayoama, 2005).

Os estômatos são anomocíticos e ocasionalmente ciclocíticos. As células estomáticas apresentam comprimento médio de 30 μ m dispostas no mesmo nível das demais na epiderme. De acordo com Metcalfe e Chalk (1988) estômatos anomocíticos são característicos da família Asteraceae, já os ciclocíticos são mais raros. Sessões transversais da lâmina foliar evidenciaram epiderme uniestratificada e mesofilo dorsiventral com espessura média de 129 μ m. O mesmo é constituído por parênquima diferenciado em duas camadas em paliçada e três a cinco camadas de células com formatos irregulares e amplos espaços

intercelulares formando parênquima lacunoso. Os feixes vasculares colaterais encontram-se na porção central do mesófilo e são envoltos por uma camada de células sem cloroplastos, denominada endoderme (Ayoama, 2005).

Na face abaxial há presença de tricomas tectores longos, pluricelulares formados por até 13 células, unisseriados, não ramificados e com comprimento médio de 520 µm. Na face adaxial tem tricomas tectores curtos, pluricelulares, constituídos por até 5 células, unisseriados, não-ramificados com comprimento médio de 196 µm, ocorrendo apenas na região das nervuras. Já os tricomas glandulares capitados e bisseriados ocorrem nas duas superfícies foliares (Ayoama, 2005).

3.4- Química e atividade biológica

A espécie *Eupatorium maximilianii* apresenta diversas aplicações na medicina popular, porém até o momento nenhuma atividade biológica foi estabelecida. As principais aplicações populares estão relacionadas ao tratamento de reumatismo, traumas em geral, coceiras, queda de cabelo, corrimentos vaginais, contusões e outras (Boscolo e Valle, 2008).

O conhecimento da química sobre a tribo Eupatoriae, como no caso de muitas plantas, originou-se de observações gerais e usos acumulados desde tempos antigos. Alguns membros desta tribo, como a espécie *Eupatorium cannabinum*, são usados na Índia para o tratamento da icterícia, escorbuto, inflamações e úlcera, na Itália como medicamento homeopático. *Eupatorium odoratum* é utilizado na Índia e na América do Sul como ictiotóxico. *Eupatorium perfoliatum* tem sido usado contra febres, doenças respiratórias, inflamações e verminoses. *Eupatorium adenophorum* é usado como anticoagulante; outras aplicações da espécie *Eupatorium* incluem ação diurética, antiespasmódica, contra náuseas, diarreia, difteria, hepatoprotetor, apresenta efeito antitumoral, antileucêmico, estimulante cardíaco, hemostático, expectorante, antimalárico, anti-hemorrágico e no tratamento de doenças da pele (Sharma et al., 1998).

No Brasil algumas espécies são melíferas, como a *E. bupleurifolium*, indicada para moléstias pulmonares também usada como aromática, emoliente e excitante. *E. triplinerve* é usada como estimulante, sudorípara, estomáquica, digestiva, contra diarreias, adstringente, no combate ao cólera, tétano e no tratamento de feridas (Pio Corrêa, 1984). As principais pesquisas estão

relacionadas às atividades antimicrobiana, citotóxica, antitumoral, anti-inflamatória e imunomoduladora.

Souza (2007) avaliou a composição química dos óleos voláteis obtidos por hidrodestilação das folhas e inflorescências frescas de espécies de *Eupatorium* L.; por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massa e pela técnica de *headspace*. Foram analisadas 33 espécies distribuídas em oito seções. Dentre as espécies analisadas, observou-se recorrência no padrão qualitativo, apresentando compostos acíclicos ou de núcleo pinano e *p*-mentano entre outros monoterpenos majoritários e de compostos de núcleo cariofilano, germacrano, aromadrendano e cadinano entre os sesquiterpenos. Outros compostos também detectados foram sesquiterpenos de núcleo bisabolano, santalano, elemano e compostos alifáticos.

As variações quantitativas analisadas entre os óleos, segundo o autor, foram relevantes, apresentando grandes diferenças na proporção de monoterpenos e sesquiterpenos, como também entre sesquiterpenos hidrocarbonados e oxigenados. De acordo com o estudo, a maior parte dos óleos, com fração volátil composta principalmente por monoterpenos, apresentou resultado positivo quanto à atividade antioxidante e anticolinesterásica, sendo, portanto, mais evidenciada para a espécie a *E. laevigatum*, da qual foi isolado o sesquiterpeno furânico levigatina.

O estudo realizado sobre a análise dos constituintes químicos e da atividade biológica da espécie *E. macrocephalum*, realizado no Paraguai, mostrou que foram isolados e identificados seis triterpenos, sendo eles, acetato de lupeoila, lupeol (sendo estes os constituintes majoritários), taraxasterol, acetato de taraxasterila, α e β amirina. Três esteroides: estigmasterol, sitosterol, epinasterol. Três saponinas esteroidais: acetato de 3-O- β -D- glicopiranosil estigmasterol, acetato de 3-O- β -D- glicopiranosil epinasterol e acetato de 3-O- β -D- glicopiranosil sitosterol. Um diterpeno, (-) 9,15-diidroxicauran-19-ato de β -D- glicopiranosila e um flavonoide, 3',4',5'-tridoxi-6,7-dimetoxiflavona e seis derivados do ácido cinâmico. Os resultados mostram que as frações obtidas a partir dos extratos e o flavonoide isolado apresentaram atividade citotóxica sobre células do carcinoma de Erhlich, além de causar inibição da enzima humana DNA-Topoisomerase I e II (Vega, 2007).

Em um estudo sobre o potencial químico de plantas daninhas da família Asteraceae realizado em Diamantina, Minas Gerais, por Gott et al.(2010),

descreveu e quantificou o perfil fitoquímico de 12 espécies. A triagem fitoquímica dos extratos etanólicos mostrou a presença de taninos, esteroides, triterpenos, antocianinas e flavonoides, indicando potencial bioativo como pesticidas destas espécies decorrente da presença destas substâncias.

Nunes et al., (2008) avaliaram o efeito tóxico do extrato hidroalcoólico bruto de *E. maximilianii*, através da DL_{50} , e genotóxico através do teste de micronúcleo *in vivo*. Foram utilizadas soluções com concentrações crescentes de 10, 100, 500 e 1000 $mg.kg^{-1}$ para o teste da DL_{50} , sendo 6 camundongos machos para cada dose, foi observada baixa toxicidade do extrato, pois não houve morte em nenhum grupo. Para o teste de micronúcleo *in vivo* utilizou-se seis camundongos Swiss, administrando-se, através de gavagem, uma dose de 200 $mg.kg^{-1}$ de peso corpóreo do animal durante 5 dias. O controle negativo recebeu somente água e o controle positivo foi tratado com ciclofosfamida a 50 $mg.kg^{-1}$ via intraperitoneal, dose única. Os resultados mostraram que a quantidade de micronúcleos em eritrócitos policromáticos apresentou diferença significativa em relação ao controle negativo assim como em relação ao controle positivo.

Portanto, apesar de a *Eupatorium maximilianii* Schrad. não ter demonstrado toxicidade aguda, apresentou um grande potencial genotóxico em células animais. Esse é um resultado importante por ser uma planta amplamente usada pela população, apresentando uso tópico e oral, logo necessitando de critérios rigorosos quanto à sua administração.

3.5- Avaliação das atividades biológicas

A prospecção de fármacos vegetais envolve a avaliação de extratos de plantas por meio de bioensaios selecionados de acordo com a atividade biológica alvo. Estas atividades podem ser classificadas de acordo com sua ação sobre o organismo, como estimulantes (Kasabri et al., 2010), analgésicas (Goldman et al., 1983; Góes et al., 2005;), anestésicas (Oliveira et al., 2005), antimicrobianas (Trindade et al., 2009), anticolinesterásicas (Souza, 2007), anticoagulantes (Chaves et al., 2010), diuréticas (Silva e Filho, 2002), hipotensoras (Soares, 2008), hipoglicemiante (Negri, 2005), colagogas, coleréticas (Fuck et al., 2005), depurativas (Lorenzi e Matos, 2002), remineralizantes, reconstituintes (Souza e Felfili, 2006), antioxidante (Souza et al., 2007), larvicida (Barreto et al., 2006), moluscicida (Diniz et al., 1997), antiviral (Cechinel Filho, 2000), antiespasmódica

(Stefanini et al., 2002), anti-inflamatória (Maciel et al., 2002), antiparasitária (Almeida et al., 2007), tóxica (Resende et al., 2007), entre outras.

Os sistemas de bioensaio devem ser simples, sensíveis, reprodutíveis, e adequados a doença ou sintoma alvo, além do conhecimento, sempre que possível, da constituição química do extrato vegetal ou da característica do grupo principal do(s) princípio(s) ativo(s) (López, 2006).

3.5.1-Atividade antioxidante

Seguindo a tendência de maior preocupação com a saúde e foco na prevenção de doenças, tem-se observado um aumento nos estudos sobre produtos naturais com potencial antioxidante. A atividade antioxidante de alguns compostos presentes em extratos vegetais tem despertado interesse pelo seu significativo efeito na prevenção do estresse oxidativo, causa primária de muitas doenças crônicas não transmissíveis como as cardiopatias, aterosclerose e problemas pulmonares. Além dos danos oxidativos no DNA que influenciam de forma importante nos processos de mutagênese e carcinogênese (Poulsen et al., 1998).

Durante séculos, populações de diferentes culturas têm utilizado produtos naturais, para diversas finalidades terapêuticas. Os compostos bioativos mais comumente encontrados em vegetais, frutas e hortaliças são as substâncias fenólicas, que são formadas no metabolismo secundário dos vegetais, podendo ser encontradas na forma livre ou ligadas a açúcares e proteínas. Possuem várias funções como: crescimento da planta, propriedades sensoriais, processos germinativos da semente, defesa contra pragas e danos oxidativos (Liu, 2007).

Em animais e humanos, os estudos têm apontado que os compostos fenólicos são capazes de bloquear as estruturas radiculares, devendo-se isto à estrutura química, formada por pelo menos um anel aromático com grupamentos hidroxila. Assim, vêm crescendo os estudos com produtos naturais com o intuito de identificar e quantificar os componentes bioativos destes vegetais a fim de utilizá-los na alimentação da população e com isso reduzir o risco do surgimento de doenças (Bartosz, 1997).

O termo radical livre pode ser definido como um conjunto de moléculas orgânicas e inorgânicas que contêm em sua estrutura um ou mais elétrons não pareados, independentes na sua existência. Ou seja, são átomos ou moléculas

altamente reativos, que contêm número ímpar de elétrons em sua camada eletrônica e este não emparelhamento de elétrons da última camada confere alta reatividade a esses átomos ou moléculas (Halliwell, 1997).

Tal configuração eletrônica faz dos radicais livres moléculas muito instáveis, com meia-vida muito reduzida e com elevada reatividade química. O excesso desses radicais no organismo humano torna crítica a manutenção de muitas funções fisiológicas normais (Pompella, 1997). Os radicais livres podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana plasmática e o seu alvo celular (proteínas, lipídios, carboidratos e DNA) está relacionado com o seu sítio de formação (Anderson, 1996; Yu & Anderson, 1997).

Esses radicais livres, cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio, são classificados como espécies reativas de oxigênio (EROs) ou espécies reativas de nitrogênio (ERNs), respectivamente. As principais EROs distribuem-se em dois grupos, os radicalares: hidroxila (HO), superóxido (O_2), peroxila (ROO) e alcoxila (RO); e os não radicalares: oxigênio, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hipocloroso (HClO). Como ERNs pode-se citar o cátion nitrosonium (NO^+), o ânion nitroxila (NO^-) e o peroxinitrito ($ONOO^-$) (Droge, 2002).

Os radicais livres se formam em uma gama de reações de oxidorredução. No entanto, pode ceder o elétron solitário, oxidando-se, ou podem receber outro elétron, reduzindo-se, como o que ocorre com o radical superóxido (O_2), que apresenta uma baixa capacidade de oxidação. Portanto, os radicais livres podem provocar ou serem resultados dessas reações de oxidorredução. O radical OH apresenta uma alta capacidade de difusão e, por isso, é o mais reativo na indução de lesões nas moléculas celulares (Ferreira e Matsubara, 1997).

Além das causas endógenas, existem diversas causas exógenas que levam à formação de radicais livres, como radiações gama, poluentes, praguicidas entre outros. O fumo é uma importante fonte exógena desses radicais, pois a combustão do cigarro produz óxidos de nitrogênio levando à oxidação das moléculas biológicas (Elsayed, 2001).

Radicais livres oxigenados são constantemente gerados *in vivo* para propósitos fisiológicos como, por exemplo, defesa contra micro-organismos patogênicos. Em alguns casos são produzidos em excesso; quando isso acontece, ocorre o estresse oxidativo (Guo et al., 2003). Algumas situações

geradoras de estresse oxidativo incluem: ativação de fagócitos por micro-organismos, hiperóxia, alguns xenobióticos, radiação ionizante, isquemia e exercício físico extenuante (Yu, 1994).

As EROs quando geradas em excesso, são extremamente tóxicas e quando o organismo encontra dificuldades em neutralizá-las elas se tornam potencialmente perigosas, podendo causar diversas doenças como tumores, diabetes, infertilidade, gastrite e causam danos oxidativos no DNA, lipídios e nas proteínas (Chen et al., 2006).

A concentração desses radicais pode se elevar devido à maior geração intracelular ou pela deficiência dos mecanismos antioxidantes, promovendo um desequilíbrio no organismo. Esse desequilíbrio desfavorável que ocorre entre as moléculas oxidantes e antioxidantes é o que caracteriza o estresse oxidativo (Cerutti, 1994). Este desbalanço entre a grande quantidade de radicais livres formados e a baixa capacidade da remoção pelos sistemas de defesa antioxidante, ocasiona danos moleculares às estruturas celulares tendo como consequência alteração funcional e prejuízo das funções vitais em diversos tecidos e órgãos (Dröge, 2002).

Uma das principais consequências do estresse oxidativo é a peroxidação lipídica, ela ocorre em ácidos graxos poli-insaturados e é iniciada por um radical OH que captura um átomo de hidrogênio de um carbono metileno de cadeia polialquil do ácido graxo. O oxigênio é mais solúvel em um meio apolar que em meio polar, permitindo que as membranas biológicas tenham uma elevada concentração de gás oxigênio na região hidrofóbica medial, onde este tem potencial para realizar o maior dano aos ácidos graxos poli-insaturados existentes na membrana. Desta forma, a membrana plasmática se torna a estrutura mais susceptível à desestruturação provocada pela peroxidação lipídica, fazendo com que ela perca a forma de mosaico fluido, a flexibilidade e, por fim, sua função biológica. Assim, um ácido graxo com um elétron desemparelhado reage com o gás oxigênio gerando um radical peróxil, produto altamente reativo e pode se combinar com outros radicais semelhantes, alterando as proteínas das membranas (Mcbride et al., 1988).

Diante dos danos causados pelos mecanismos radicalares, as proteções conhecidas do organismo contra as EROs e ERNs abrangem os antioxidantes. (Barreiros, et al., 2006). Estes podem ser definidos como quaisquer substâncias

que, presentes em baixas concentrações quando comparadas a um substrato oxidável, atrasam ou inibem a oxidação desse substrato ou de um radical livre de forma eficaz (Handelman, 2001). Os antioxidantes que representam a defesa dos organismos contra as EROs e ERNs são divididos em dois grupos principais: os enzimáticos, que apresentam origem endógena, e os não enzimáticos, que são de origem exógena (Souza et al., 2007).

Entre os antioxidantes enzimáticos têm-se as proteínas do plasma, a glutathione, clorofilina, L-cisteína, enzimas superóxido dismutase, catalase, NADPH-quinona oxidoreductase, glutathione peroxidase e enzimas de reparo; os exógenos, provenientes da dieta, são, por exemplo, o α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno (pró-vitamina A), ácido ascórbico (vitamina C) e os compostos fenólicos em que se destacam os flavonoides e os ácidos fenólicos (Pietta, 2000).

Outra classificação segundo Bravo (1998), coloca os antioxidantes como primários e secundários. Alguns exibem mais de um mecanismo de atividade e são referidos como antioxidantes de múltipla função. Os primários ou inibidores da reação, são aceptores de radicais livres e atuam atrasando ou inibindo a iniciação ou interrompendo a propagação da autoxidação. Os tocoferóis estão presentes em diversos alimentos e são antioxidantes primários; outro grupo de compostos naturais são os carotenoides, que também são antioxidantes primários (Reische, 1998).

Os antioxidantes secundários ou preventivos agem por diversos mecanismos. Eles diminuem a taxa de oxidação por diferentes formas, mas não convertem radicais livres em produtos mais estáveis. Podem quelar metais pró-oxidantes e desativá-los, repor hidrogênio para antioxidantes primários, decompor hidroperóxidos a espécie não radicais, desativar o oxigênio singlete, absorver radiação ultravioleta, ou agir sequestrando o oxigênio. São sinergistas, pois promovem a atividade dos antioxidantes primários. Ácido cítrico, ácido ascórbico e ácido tartárico são exemplos de antioxidantes secundários (Reische, 1998).

Os alimentos de origem vegetal de diversas espécies são fontes de diversos compostos que apresentam atividade antioxidante natural (Moure et al., 2001). Diversos estudos têm demonstrado a importância do consumo de alimentos que contenham substâncias com atividade antioxidante para prevenção de doenças crônicas como doenças cardiovasculares, câncer e distúrbios cerebrais degenerativos (Chu et al., 2000).

Um dos grupos antioxidantes mais encontrados em plantas são os compostos fenólicos, sendo que a classe dos flavonoides se destaca. A atividade antioxidante é devida principalmente à sua propriedade redox, que permite que eles ajam com agentes redutores ou doadores de hidrogênio. Além disso, eles também apresentam um potencial quelante de metais (Harbone, et al., 2000). A atividade antioxidante de produtos naturais pode ser avaliada *in vitro* por diversas técnicas, dentre as mais utilizadas estão o método de sequestro de radicais livres utilizando o DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), este reagente pode ser obtido diretamente por dissolução em meio orgânico (Brand-Williams et al., 1995); o sistema β -caroteno/ácido linoleico, em que avalia a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico. O método está fundamentado em medidas espectrofotométricas da descoloração (oxidação) do β -caroteno induzida pelos produtos de degradação oxidativa do ácido linoleico, método este descrito originalmente por Marco (1968) e modificado por Miller (1971).

Cromatografia de camada delgada – CCD (Conforti et al., 2002); o ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), este método investiga a capacidade dos antioxidantes em bloquear a ação dos Radicais Peroxila (ROO) através da doação de hidrogênio, foi desenvolvido originalmente por Cao et al.,(1993); o método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), baseado na capacidade dos fenóis em reduzir o Fe^{+3} em Fe^{+2} (Benzie e Strain, 1996; Stratil et al., 2006); ABTS⁺ (2,2'-azinobis- (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)), que consiste em se monitorar o decaimento do cátion-radical ABTS produzido pela oxidação do ABTS⁺, quando amostra contendo antioxidantes é adicionada (Re et al., 1999) e o método Rancimat, que determina a estabilidade oxidativa da amostra, através da detecção de ácidos voláteis a 110°C (Garcia et al., 2006); a quimioluminescência do luminol, o princípio geral deste método está baseado na habilidade do luminol e de compostos relacionados em gerar luminescência sob um fluxo de radicais livres (quimiluminescência, QL). A produção de espécies reativas de oxigênio gera certa luminescência, a qual pode ser aumentada através da inserção do luminol no sistema.

A adição de um antioxidante no sistema, como um “sequestrador” de radicais, resulta em uma extinção da QL, comumente em um pronunciado período

de indução. Outras versões do método diferem no tipo de radical livre ativo produzido e no modo como este é produzido (Roginsky e Lissi, 2005).

Dentre todos os métodos o que vem sendo mais utilizado na avaliação da atividade antioxidante de extratos vegetais é o DPPH, por apresentar maior facilidade de execução, não apresentar custos elevados e fornecer resultados confiáveis (Roginsky e Lissi, 2005).

Diversas espécies do gênero *Eupatorium* foram avaliadas para o teste da atividade antioxidante, frente ao reagente DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) por bioautografia, o método é baseado na captura do radical DPPH por antioxidantes, produzindo um decréscimo da absorbância a 515 nm (Brand-Williams et al., 1995). As espécies que apresentaram melhores resultados foram *E. ligulifolium*, *E. oblongifolium*, *E. ericoides*, *E. inulifolium* e *E. laevigatum*, sendo que a última espécie apresentou resultado mais significativo em relação às demais (Souza, 2007).

3.5.2- Atividade anticolinesterásica

A atividade anticolinesterásica está relacionada à Doença de Alzheimer (DA), que é uma doença neurodegenerativa, progressiva, que afeta principalmente a população idosa, responsável por 50-60% dos casos de demência em pessoas com mais de 65 anos de idade. O principal sintoma associado a DA envolve deficiência orgânica cognitiva, principalmente perda de memória. Outras características associadas com os estágios avançados da DA incluem déficit na linguagem, depressão e problemas de comportamento, inclusive agitação, alterações de humor e psicose (Francis et al., 1999).

A neurotransmissão colinérgica é especialmente afetada em pacientes com a DA e um dos mais promissores caminhos para tratar esta doença é aumentar o nível do neurotransmissor acetilcolina no cérebro, usando inibidores da acetilcolinesterase (AChE), visto que esta é a enzima responsável pela degradação desse neurotransmissor, a acetilcolina (Kasa et al., 1997). Na tentativa de promover a restauração da função colinérgica e dessa forma, a elevação do nível da acetilcolina pode se mostrar útil para amenizar a deficiência da aprendizagem, um dos principais sinais da doença (Lane et al., 2005).

Os principais metabólitos secundários relacionados à inibição da enzima AChE e conseqüentemente que apresentam potencial uso como tratamento para

a DA, são os alcaloides. Dentre eles pode se destacar a fisostigmina, um alcaloide indólico isolado das sementes da espécie *Physostigma venenosum* (Fabaceae), foi o inibidor reversível da colinesterase mais estudado nas fases iniciais de desenvolvimento de fármacos antidemência. No entanto, apesar de apresentar melhoras significativas no comportamento, possui fortes efeitos hepatotóxicos (Cummings, 2000). Também se destacam os terpenos encontrados em óleos essenciais de espécies como *Cymbopogon citratus*, *Citrus limonia*, *Citrus medica* e *Citrus sinensis*, onde foi observada atividade inibidora da AChE (Conforti et al., 2007).

O método fotocolorimétrico de Ellman e colaboradores descrito em 1961 é bastante difundido e muito utilizado em diversas análises atualmente para avaliação da atividade anticolinesterásica de extratos vegetais. O princípio deste método consiste em determinar a atividade inibidora da AChE através da mensuração da taxa de produção de tiocolina à medida que a acetiltiocolina é hidrolisada pela acetilcolinesterase. Com a continuação da reação, o produto formado, tiocolina, e o reagente de Ellman, ácido 5,5 – ditiobis-2- nitrobenzico (DTNB), reagem produzindo o ânion amarelo. A taxa da produção do composto colorido é avaliada em espectrofotômetro UV/VIS em 412 ou 405nm. Este método é bastante sensível e pode ser aplicado a pequenas quantidades de tecido e em baixas concentrações da enzima (Ellman et al., 1961).

Baseados no princípio da reação descrita por Ellman, Rhee e colaboradores (2001) desenvolveram um método para detecção de substâncias inibidoras através de Cromatografia em Camada Delgada (CCD). Este método qualitativo é bastante útil para realização de triagem em diversas amostras e na avaliação de espécies vegetais com potencial atividade anticolinesterásica; ao mesmo tempo, através deste método, pode-se selecionar e direcionar o isolamento de inibidores encontrados em extratos vegetais. Possui a vantagem da rapidez nos resultados, baixo custo e além das informações como a localização desta atividade em extratos e frações (Seidl, 2010; Reist, 2008).

Há também outro método que realiza uma triagem da atividade anticolinesterásica utilizando a cromatografia em camada delgada, baseado em uma reação diferente onde o reagente acetato de naftila é o substrato que sofre quebra pela acetilcolinesterase formando o 1-naftol, o qual continua a reagir com o reagente colorimétrico sal *Fast Blue B* para formar um sal de diazônio de

coloração violeta. Bem como na metodologia de Ellman et al., (1961) modificada por Rhee (2001), os inibidores são diretamente detectados na cromatoplaça pela formação de manchas brancas sobre o fundo, neste caso, violeta. Esse método foi desenvolvido por Martson e colaboradores em 2002 (Martson, et al, 2002).

Irth (2006) descreveu uma metodologia para triagem para inibidores da acetilcolinesterase em extratos naturais através de Cromatografia Líquida de Alta *Performance* – espectrometria de massa, baseado no mesmo princípio de Ellman. Além deste, outros métodos surgiram, como ensaios fluorimétricos utilizando substratos fluorogênicos (Rhee et al., 2003), detecção potenciométrica ou eletroquímica (Kaneda et al., 1985), mas a maioria destes possui o mesmo princípio de Ellman.

Atualmente existem quatro medicamentos com mecanismo de ação antiacetilcolinesterase licenciados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e comercializados no Brasil: Tacrina, Rivastigmina, Donepezil e Galantamina. A Tacrina foi o primeiro aprovado para o tratamento da DA, mas, apesar de sua eficácia, muitos pacientes não toleraram os seus efeitos hepatotóxicos (Brufani et al., 1997). Os de segunda geração, Rivastigmina, Donepezil e Galantamina, são mais utilizados e têm seus efeitos adversos mais toleráveis (Brufani et al., 1997; Michaelis, 2003).

Os fortes efeitos adversos, como náuseas, tonturas, junto aos altos custos da medicação, são importantes fatores que fazem com que o paciente não dê continuidade ao tratamento, o que torna importante a busca de novas alternativas terapêuticas. Diante disto, a busca por novos caminhos para tratamento da DA, como a utilização de plantas que apresentem atividade anticolinesterásica, seria de grande interesse para a população brasileira.

Diversos estudos têm sido realizados no Brasil com o objetivo de selecionar plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da DA. Segundo Trevisan et al., (2006), a espécie *Kalanchoe brasiliensis*, pertencente ao gênero *Kalanchoe*, apresentou resultado significativo na inibição da AChE. Foram realizados ensaios qualitativos, em cromatografia em camada delgada fina e ensaio quantitativo, teste em microplaca. Os resultados indicaram que o extrato hidroalcoólico obtido das folhas frescas da planta, na concentração de 2mg/mL inibiu a enzima em 100%.

Souza (2007) avaliou a atividade anticolinesterásica de trinta e três espécies de *Eupatorium*. A ação dos óleos voláteis obtidos foi avaliada por bioautografia frente à enzima AChE. Todos os óleos, extraídos das espécies estudadas apresentaram atividade inibitória moderada, principalmente os que apresentaram em sua constituição maior percentual de monoterpenos (α -pineno).

Através do uso popular, várias plantas têm sido utilizadas para o tratamento de distúrbios cognitivos, incluindo doenças neurodegenerativas e diversos distúrbios neurológicos, como ocorre na DA. Assim, abordagens etnofarmacológicas têm conduzido a identificação de inibidores potenciais da enzima AChE a partir de recursos vegetais (Souza, 2007).

3.5.3- Atividade antinociceptiva

O conceito de dor hoje mundialmente usado é o da Associação Internacional de Estudos da Dor (IASP), em que a dor é considerada uma “Experiência sensorial e emocional desagradável, associada a dano presente ou potencial, ou descrita em termos de tal dano”. Deste modo, a sensação de dor protege o corpo de uma possível ameaça ou lesão.

A percepção de estímulos nocivos ocorre através de receptores sensoriais especializados, os nociceptores, localizados em quase todo o organismo. Os nociceptores constituem a parte terminal periférica de fibras que conduzem os potenciais de ação propagados até o corno dorsal da medula espinhal e porção caudal do nervo trigêmeo. Essas fibras são os axônios de células sensoriais primárias, conhecidas como neurônios aferentes primários, localizadas em gânglio dorsal da medula espinhal. O mecanismo fisiopatológico envolvido nas doenças neurocomportamentais e que ocasiona dor é muito discutido (Basbaum e Jessell, 2000).

A transdução do estímulo doloroso ocorre nas terminações nervosas das fibras C não-mielinizadas e nas fibras A δ mielinizadas. A maioria dos nociceptores responde a estímulos mecânicos, térmicos e químicos, razão pela qual são chamados de nociceptores polimodais (Yunjong Lee et al. 2005).

Os componentes sensoriais da dor são denominados nocicepção e incluem o processo de reconhecimento e detecção do estímulo, a geração de um potencial de ação a partir dessa estimulação e a transmissão dessa informação até os centros de reconhecimento da dor. Além disso, em condições patológicas,

podem ocorrer alterações na capacidade de percepção de estímulos nocivos, fazendo com que estímulos inócuos sejam percebidos como nocivos, sendo conhecido como alodinia, ou desenvolvendo uma sensibilidade aumentada a estímulos dolorosos, hiperalgesia. (Loeser e Treeder, 2008).

Vários mediadores químicos conhecidos presentes no local lesado podem estimular os nociceptores e, portanto, promover a dor. Dentre os mediadores inflamatórios incluídos neste grupo estão a histamina e a bradicinina. Estes mediadores atuam através de receptores ligados à proteína G, produzindo uma variedade de efeitos pró-inflamatórios que incluem vasodilatação e edema. A bradicinina também estimula atividade enzimática da fosfolipase A2 ligada à membrana que, por sua vez, provoca a desesterificação da membrana levando à liberação do ácido araquidônico livre (ácido eicosatetraenóico) e à biossíntese subsequente de prostaglandinas. As prostaglandinas são potentes vasodilatadoras e importantes mediadores na dor inflamatória (Wienecke et al. 2008).

Outro fator que está relacionado a processos patológicos gerando sensação dolorosa é o desequilíbrio do estado redox celular caracterizado como estresse oxidativo, que já foi observado em diferentes tipos de estados patológicos, como artrite reumatoide, lesão da isquemia-reperfusão, diabetes, bem como nas doenças de Alzheimer e Parkinson. Nestes quadros, as EROs foram apontadas como mecanismos de lesão celular, bem como mantenedoras do processo patológico. Da mesma forma, foi evidenciado que tratamento com substâncias antioxidantes promove uma melhora do quadro clínico em humanos, bem como em modelos animais (Perez et al. 2003).

Visto o grande interesse e importância da busca e conhecimento sobre espécies vegetais que possam ser utilizadas para amenizar estados patológicos, diversas metodologias são utilizadas com intuito de avaliar o potencial biológico que determinadas plantas possuem, dando a elas as características de plantas medicinais.

Existem diversos métodos utilizados para avaliar a atividade antinociceptiva de extratos vegetais, entre os quais se destaca o ensaio da contorção abdominal induzida por ácido acético, em que ácido acético é usado como agente irritante. (Koster et al., 1959).

O uso de filamentos de Von Frey é utilizado para avaliar a sensibilidade tecidual ao estímulo mecânico, sendo bastante aplicado clinicamente. Entretanto, tal método passou a ser utilizado também para experimentos laboratoriais no sentido de avaliar a influência de fármacos sobre a sensibilidade nociceptiva em animais. Além disso, essa técnica foi transformada em um método eletrônico, usado primeiramente em humanos (Jensen et al., 1986) e, posteriormente, em ratos e camundongos (Cunha et al., 2004). Os experimentos são realizados com um analgesímetro digital, que consiste em um transdutor de pressão adaptado a um contador digital de força, expresso em gramas. O contato do transdutor de pressão com a pata é realizado através de uma ponta descartável de polipropileno. Os animais são colocados em caixas de acrílico durante 15-30 minutos para adaptação. O assoalho da caixa é feito de arame não maleável na forma de rede.

As alterações nos limiares nociceptivos são avaliadas exercendo-se uma pressão linearmente crescente no centro da região plantar dos membros pélvicos do animal até a produção de uma resposta caracterizada como sacudida (flinches) da pata estimulada. Os estímulos são repetidos por até seis vezes, em geral até o animal apresentar três medidas similares com uma clara resposta de flinch após a retirada da pata. A intensidade de hipernocicepção é quantificada como a variação na pressão obtida subtraindo-se a média de três valores expressos em gramas (força) observada antes do procedimento experimental (0 hora) da média de três valores em gramas (força) após a administração dos estímulos, que variam de acordo com o experimento (Jensen et al., 1986). Particularmente, o teste de Von Frey é utilizado para avaliar através do estímulo mecânico inócuo e crescente (alodinia mecânica), a sensibilidade tecidual provocada pela incisão (Le Bars et al., 2001)

O teste da formalina é um método de avaliação comportamental utilizado para medir a efetividade de agentes antinociceptivos. Este modelo de dor está associado à lesão tecidual, no qual se quantifica a resposta comportamental provocada pela injeção subcutânea de formalina diluída na pata traseira do animal.

O uso de testes comportamentais e neurológicos é ferramenta essencial na caracterização fenotípica de modelos animais para doenças neurológicas. O teste da barra rotatória ou rota rod é um dos mais antigos empregados na área de

estudo dos efeitos motores induzidos por uso de drogas em estudos pré-clínicos e na descrição do fenótipo de mutantes induzidos geneticamente para doenças cerebelares, extrapiramidais e neuromusculares.

Esta metodologia é a mais apropriada para detectar o efeito do relaxamento muscular ou da incoordenação motora promovida por agentes farmacológicos, como por exemplo, relaxantes musculares esqueléticos, ansiolíticos ou depressores do sistema nervoso central (Pinto e Ko, 2012).

O método da placa quente mensura a reatividade dos animais (camundongos e/ou ratos) ao estímulo térmico. Neste ensaio, dentre os parâmetros avaliados, observa-se o tempo de latência e como resposta nociva o ato do animal em levantar ou lambe uma das patas posteriores, após a exposição à placa aquecida (Woolfe e Macdonald, 1944). Este teste avalia a participação de mecanismos centrais na antinocicepção promovida pelo extrato vegetal. Este teste é seletivo para componentes analgésicos tipo opioide, só permitindo avaliar substâncias com esse tipo de analgesia (Janssen et al., 1963).

Em relação às classes de metabólitos secundários que mais caracterizam a atividade analgésica, verifica-se que principalmente os óleos essenciais, alcaloides e flavonoides são exemplos de metabólitos que apresentam essa atividade biológica (Simões et al., 2003).

O estudo realizado com extratos diclorometano, metanólico e aquoso de espécies do gênero *Eupatorium* comprovou atividade analgésica e imunomoduladora das mesmas. Dentre as espécies foi destacada a *E. polystachyum* em que seu óleo volátil apresentou seis compostos majoritários (β -pineno, β -mirceno, limoneno, β -cariofileno, biciclogermacreno e germacreno-D) que por meio de ensaios farmacológicos, demonstraram ação anestésica e analgésica para o β -mirceno (Clavin et al., 2000).

O estudo realizado por Rocha (2006) verificou que o extrato hidroalcoólico bruto da arnica brasileira, *Solidago microglossa* DC., apresentou atividade analgésica. O resultado foi obtido a partir dos testes de contorções abdominais induzidos por ácido acético e o teste da placa quente. Observou-se que o extrato das folhas de *Solidago microglossa* DC., apresentou alta atividade analgésica, aumentando o limiar da dor, induzida por injeção intraperitoneal de ácido acético demonstrando significativo efeito analgésico periférico. Também foi verificado que

houve um pequeno efeito analgésico central, principalmente na dose de 300 mg/kg via oral, do extrato das folhas da arnica brasileira.

Pires et al. (2004), investigaram a atividade analgésica do extrato metanólico de *Capsicum frutescens* (pimenta malagueta), utilizando o teste da placa quente e o teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético, o extrato metanólico foi administrado em camundongos pela via oral. Os resultados mostraram que houve uma inibição dose-dependente no número de contorções abdominais, contudo, não houve alteração na reatividade dos animais ao estímulo térmico, indicando que não envolve a participação de mecanismos centrais no efeito antinociceptivo do extrato metanólico.

3.5.4- Avaliação da toxicidade

Os testes para avaliação da toxicidade de produtos naturais são de grande importância na seleção destes materiais e na adequação do seu uso pela população. O primeiro tipo de teste toxicológico a que são submetidos os compostos de interesse é de agudo-letal, que consiste de uma análise após curta exposição (24 horas) do composto com o organismo bioindicador. Dentre os bioensaios, o organismo mais utilizado em testes de toxicidade aguda é o microcústacio *Artemia salina* Leach, pois apresenta vantagens devido à sua capacidade para formar cistos dormentes, sua praticidade de manuseio e cultivo, por ser um método rápido e barato, além de ser um bioindicador capaz em uma avaliação toxicológica pré-clínica, sendo um dos testes mais utilizados para avaliação da toxicidade de extratos vegetais (Barosa et al, 2003).

No bioensaio com *Artemia salina* Leach. são definidos valores da dose letal média (DL_{50}), em $\mu\text{g/mL}$ de compostos ou extratos, sendo que dezenas de substâncias ativas conhecidas apresentam toxicidade ao realizar este teste (Meyer, 1982). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a atividade é considerada significativa quando a estimativa do valor da DL_{50} é menor que 1000 $\mu\text{g/mL}$ (Krishnaraju, 2005), esta informação é importante em relação ao uso popular da espécie vegetal.

A toxicidade para extratos vegetais neste bioensaio é classificada conforme os seguintes critérios baseados nos níveis de DL_{50} em *Artemia salina* Leach: $DL_{50} < 80 \mu\text{g/mL}$, altamente tóxico; entre 80 $\mu\text{g/mL}$ e 250 $\mu\text{g/mL}$, moderadamente tóxico; e $DL_{50} > 250 \mu\text{g/mL}$, com baixa toxicidade ou não tóxico (Krishnaraju, 2005).

Outros métodos de avaliação para estudos toxicológicos ainda são utilizados, como o ensaio para toxicidade aguda, método de classes (OECD, 2001) e o estudo da toxicidade subaguda (OECD, 1995). Nestes ensaios são utilizados ratos e/ou camundongos para avaliação, os quais são realizados em geral, após o bioensaio com *Artemia salina* Leach.

A espécie *E. maximiliani* é comumente usada em todo Brasil para cicatrização de feridas, inchaços, torções e reumatismo. O modo de aplicação mais utilizado é o de compressa, porém em algumas regiões o preparo dela em garrafadas e decocção é bastante difundido (Nunes et al., 2008). Para um uso seguro da planta, são necessários estudos que definam sua toxicidade frente ao organismo.

3.6- Fenologia

A fenologia estuda a ocorrência de eventos biológicos repetitivos e das causas de sua ocorrência, em relação a fatores bióticos e abióticos, avaliando também a inter-relação entre as fases caracterizadas por estes eventos, em uma mesma ou em diferentes espécies (Lieth, 1974).

Assim, a fenologia, do grego *phainein*, exibir, surgir ou tornar-se visível, é definida como o estudo da regulação do ritmo sazonal dos eventos da história de vida dos organismos (Rathcke e Lacey, 1985). Nos vegetais, as variáveis mais importantes são: brotação, expansão, abscisão das folhas, floração, polinização, fecundação, frutificação, dispersão de sementes e germinação (Fenner, 1998). Em resumo, são definidas quatro principais fenofases em plantas, sendo elas: queda de folhas, formação de folhas novas, floração e frutificação. O estudo de características da folha, como tamanho da nervura, quantificação de clorofila, é uma importante ferramenta para a fenologia, pois fornece informações sobre a relação da planta com as condições ambientais (Antunes e Ribeiro, 1999).

Estudos fenológicos possibilitam prever a época de reprodução, deciduidade e ciclo de crescimento vegetativo, parâmetros que podem ser utilizados para o manejo adequado da flora, e que permitem também prever os padrões reprodutivos da espécie vegetal (Ribeiro e Castro, 1986).

Os estudos fenológicos podem ter diversos enfoques, tais como abordagens ecológicas que relacionam a interação com polinizadores (Rathcke 1983; Stone, 1996), dispersores de sementes (Howe e Smallwood 1982; Levey

1988; Burns, 2005), predadores de sementes (Toy et al., 1992) e herbívoros (Suzuki, 1998); enfoques filogenéticos (Davies e Ashton, 1999; Martin-Gajardo e Morellato, 2003) e evolutivos (Rathcke e Lacey, 1985; Van Schaik et al., 1993).

Estudos comparativos podem também ser realizados dentro de um mesmo ecossistema (Morellato et al., 2000; Bencke e Morellato, 2002) e entre ecossistemas (Frankie et al., 1974). As investigações também podem ser feitas entre as espécies em nível da comunidade (Talora e Morellato, 2000; Ramírez, 2002) ou dentro das espécies em nível populacional (Martin-Gajardo e Morellato 2003; Goulart et al., 2005).

Mudanças climáticas, como variação da temperatura, disponibilidade de luz, umidade relativa do ar e precipitação pluviométrica acarretam distúrbios no metabolismo das plantas e estudos fenológicos servem como ferramentas, gerando informações que levam a aplicações diretas (Law et al., 2000). Dados fenológicos também fornecem informações relevantes para práticas de manejo, através da escolha de espécies com uso potencial na recuperação de áreas degradadas, a partir de informações de suas estratégias fenológicas (Zamith e Scarano, 2004) e na escolha de habitat chave, sendo importante como fonte de recursos sazonais (Wallace e Painter, 2002).

A fenologia de plantas de região tropical é afetada principalmente pela precipitação (Opler et al., 1976), de modo que, nas florestas tropicais os eventos fenológicos como a queda de folhas, brotação e floração estão fortemente relacionados com o total de chuvas e sua distribuição ao longo do ano (Borchert, 1998), assim como, com a disponibilidade de água no solo e na atmosfera (Lemos Filho e Mendonça Filho, 2000).

A espécie *Eupatorium vauthierianum* apresenta fases longas de florescimento e frutificação e produz grande quantidade de sementes que, aliadas à capacidade de colonizar áreas abertas e degradadas, permitem classificá-la como estrategista tipo r, isto é, são espécies colonizadoras, conforme conceito estabelecido por McArthur e Wilson (1967).

Em relação à espécie *E. vauthierianum*, Maluf e Wizenier (1998) verificaram uma defasagem de florescimento de cerca de 20 dias entre as populações mais precoces e as mais tardias. Para as mais precoces, os capítulos estavam com flores em diferentes estádios de desenvolvimento em maio e a plena frutificação ocorreu em meados de junho. Decorreram cerca de 60 dias da

fase de botão floral até a de fruto maduro. O número de frutos (aquênios) por capítulo variou de 10 a 26 e a porcentagem de aquênios férteis por capítulo variou de 5,5 a 100%. Através do estudo da germinação, observou-se variação na capacidade germinativa, tanto dentro, como entre as populações estudadas. A temperatura de 20°C mostrou-se mais eficiente na promoção da germinação que 25°C e 30°C, o mesmo ocorrendo com o fotoperíodo de 12 horas quando comparado ao tratamento de escuro.

Segundo Fernandes (2011), ensaios fenológicos preliminares da espécie *E. maximiliani*, demonstraram que a espécie quando semeada em julho, período de inverno, emerge quatorze dias após a semeadura, florescendo oito meses após (março-abril) e frutificando vinte e cinco dias após o início do florescimento (abril), mantendo-se nesta fase até julho. Foi verificado que esta espécie apresenta maior crescimento vegetativo na primavera-verão, período entre outubro e janeiro.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1- Material vegetal

As partes aéreas e as sementes da espécie *E. maximilianni* foram coletadas na localidade de Guriri, Município de Campos dos Goytacazes – RJ, apresentando as seguintes coordenadas geográficas: 21°54'18,42" S e 41°27'56,55"N com equipamento GPS (Etrex-Garmin). A coleta foi realizada no período de primavera-verão do ano 2012/2013.

Para confirmação da identidade da espécie, amostras de ramos foram coletadas em plantas das respectivas espécies, na época de floração, para herborização e depósito em herbário, juntamente com fotografias. Para tanto, ramos floridos das espécies botânicas e em perfeitas condições, depois de colhidos, foram estendidos entre folhas de jornal, dispostas entre folhas de papelão e prensadas entre grades de madeira amarradas com corda pelo tempo necessário para absorver a umidade da amostra. Depois de desidratada, a planta foi fixada na camisa que se constitui em folha de papel cartão branco (46 x 25 cm), aplicando-se no canto inferior da lateral direita, etiqueta com o nome da família, nome científico e nome popular, local e data da coleta. Por fim, a camisa

foi envolta em papel pardo no tamanho de 2 cm superior ao da camisa, formando a saia da exsicata ou produto final da herborização. As exsicatas se encontram depositadas no Herbário da UENF, número de tombo H6317.

4.2- Extração do óleo volátil

Folhas de *Eupatorium maximilianii* em perfeito estado fitossanitário e de desenvolvimento foram colhidas e colocadas em estufa com circulação de ar a uma temperatura de 40°C por 48h para secagem. Após a secagem as folhas foram rasgadas e pesadas sendo posteriormente submetidas à extração de óleo por hidrodestilação, utilizando um equipamento tipo Clevenger. Foram pesadas 36 g de folhas previamente secas e rasgadas, acondicionadas em um balão de vidro com capacidade de 2L, preenchido com 1,2 L de água destilada (Gomes,2010). Cerca de 20 min após a primeira condensação, foram retirados 5 ml do hidrolato formado no tubo coletor e inseridos 5mL de hexano. A extração teve a duração total de 4 horas, contadas após o início da condensação. O rendimento do óleo foi expresso segundo Gomes (2010), por:

$$TO (\%) = (OE \times 100) / MV$$

Onde:

TO (%): Teor de óleo essencial;

OE: Óleo extraído (g);

MV: Material vegetal seco utilizado (g).

4.3- Identificação dos constituintes dos óleos voláteis

Os óleos voláteis foram submetidos à cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas, com detector seletivo de massa, sob as seguintes condições de operação: coluna cromatográfica do tipo capilar de sílica fundida com fase ligada DB5, de 30 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno, utilizando hélio como gás carreador (1mL/min). As temperaturas foram de 220°C no injetor e 240°C no detector. A temperatura do forno foi programada de 40 a 240°C, com acréscimo de 3°C a cada minuto.

A identificação dos constituintes foi realizada com base na comparação dos índices de retenção da literatura, conforme descrito por Adams, (2007).

4.4- Preparo do extrato hidroalcoólico

O extrato hidroalcoólico foi obtido a partir das folhas previamente secas em estufa de circulação de ar por 48 horas a uma temperatura de 40°C. Posteriormente o material vegetal foi processado em moinho de facas e submetido à maceração estática em solução hidroalcoólica em 70% na proporção de 1:4, por um período de cinco dias, seguindo-se a filtração e concentração, através de rotaevaporação a uma temperatura de 45°C. O extrato foi utilizado em todas as avaliações.

4.5- Atividades Biológicas

4.5.1- Atividade antioxidante

4.5.1.1- Avaliação qualitativa

A avaliação qualitativa da atividade antioxidante dos extratos foi baseada no ensaio do DPPH por CCD descrito por Silva (2005), com adaptações.

O extrato hidroalcoólico bruto foi solubilizado em metanol (5mg/mL) e aplicado em triplicata sobre placas cromatográficas GF254. Após a total evaporação do veículo de solubilização de amostra, a placa foi nebulizada com solução metanólica de DPPH a 0,2 mM. Na avaliação qualitativa, o grau de descoloração indica o potencial antioxidante do extrato, considerada positiva pela descoloração da solução de DPPH borrifado (inicialmente de cor púrpura), decorrente da redução do DPPH, obtendo-se uma coloração amarelada, enquanto que na ausência de atividade antioxidante, a coloração permanece púrpura, a reação foi avaliada após 30 minutos à temperatura ambiente (Frezza et al., 2013).

4.5.1.2- Avaliação quantitativa

A avaliação quantitativa da atividade antioxidante foi realizada pelo método fotolorimétrico do radical livre estável DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazila). Este método se baseia no sequestro do radical DPPH pelos antioxidantes, que produz uma diminuição de absorção em 515 nm. Quando uma solução de DPPH é misturada com uma substância que pode doar um átomo de hidrogênio, a forma reduzida do radical gerado é acompanhada de perda de cor (Ali et al., 2009).

Esta foi inicialmente escolhida por se tratar de uma metodologia simples, rápida e sensível. As substâncias antioxidantes presentes nos extratos reagem

com o DPPH, que é um radical estável, e convertem-no em 2,2-difenil-1-picril hidrazina.

Essa técnica consiste em adicionar 1 mL do extrato em concentrações que variam de 0,1 - 1000 µg/mL em 1 mL de uma solução metanólica de DPPH (0,1 mM). A reação foi processada após uma hora a uma temperatura de aproximadamente 30°C; após, a absorção do DPPH foi verificada em 515 nm em um espectrofotômetro UV-VIS (Shimadzu Mini 1240). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

A atividade sequestradora de radicais livres de cada extrato foi expressa pela relação da absorção de DPPH, com base na solução de DPPH ausente do extrato (controle negativo) e uma solução de um padrão de substância aromática (controle positivo), o BHT (butil-hidroxi-tolueno), visto que esta substância é largamente utilizada pela indústria de alimentos. A capacidade de sequestrar radicais livres foi expressa como percentual de inibição da oxidação do radical e foi calculada mediante a seguinte fórmula (Yen e Duh, 1994):

$$\% \text{ de inibição} = [(ADPPH - A_{\text{Extr}})/ADPPH]*100$$

Onde ADPPH é a absorbância da solução de DPPH e A_{Extr} é a absorbância da amostra em solução.

4.5.2- Atividade anticolinesterásica

4.5.2.1- Avaliação quantitativa

A metodologia utilizada foi baseada em Ellman et al (1961), seguindo um método fotolorimétrico para avaliar a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE). Nesse método, a atividade da AChE é medida em um comprimento de onda determinado, 405 nm, seguindo a variação da absorbância do meio onde a acetilticolina é hidrolizada pela AChE (Figura 2). O aumento da cor amarela é produzido a partir da tiocolina quando reage como íon 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoato (DTNB²⁻), formando o ânion 5-tiol-2-nitrobenzoato (TNB²⁻).

ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB - Aldrich) em tampão fosfato 0,20 mol.L⁻¹, pH 7,3 e, 65µL de solução aquosa 0,0010 mol.L⁻¹ de cloreto de acetilcolina (Aldrich). Em seguida, foi feita a leitura da absorbância em 405 nm a cada um minuto, durante seis minutos, no leitor de placas. A porcentagem de inibição da enzima foi encontrada comparando as absorbâncias do branco e das amostras, os resultados foram expressos pela média e pelo desvio padrão.

4.5.3- Atividade antinociceptiva

De acordo com as normas de bioética e biossegurança, o presente trabalho foi submetido para a CEUA (Comissão de Ética de Uso de Animais), que analisa e emite pareceres, sobre os protocolos de experimentação que envolvam o uso de animais na UENF, tendo como diretrizes os “Princípios Éticos na Experimentação Animal” elaborados pelo COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

A partir da aprovação pela CEUA, foram utilizados quatro grupos contendo, cada um cinco camundongos Swiss machos, adultos, pesando entre 20g e 35g, fornecidos pelo biotério da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF.

4.5.3.1- Teste de pressão crescente na pata (Von Frey)

O limiar de nocicepção mecânica foi medido pelo método de Von Frey eletrônico, conforme descrito por Napimoga et al. (2007). Em uma sala silenciosa, 30 min antes do experimento, os camundongos foram colocados em gaiolas de acrílico (12 x 20 x 17 cm) com piso de grade de arame. O teste consistiu em produzir uma pressão na pata do animal com um transdutor de força de mão adaptado com uma ponta (0,8 mm² diâmetro da ponta, eletrônica de Von Frey, Insight Equipamentos®, Brasil) (Figura 3). Um espelho inclinado sob a grade proporcionou uma visão clara da pata dos camundongos. O estímulo foi automaticamente interrompido, e sua intensidade foi registrada quando a pata foi retirada. O intervalo entre dois ensaios consecutivos na mesma pata foi de 1 min, totalizando cinco ensaios de cada animal. A força máxima aplicada foi de 50g. Os camundongos foram pré-tratados com extrato hidroalcoólico (0,2; 0,4 e 0,8mg.Kg⁻¹, via intraperitoneal (i.p.) e o grupo controle recebeu diazepam (2,0 mg.Kg⁻¹, i.p.), e após duas horas o teste Von Frey foi realizado.



Figura 3 – Analgesímetro digital (Von Frey) e acessórios.

4.5.3.2- Teste da placa quente

O teste da placa quente tem como objetivo determinar a atividade analgésica central, onde a latência, em segundos, ao estímulo térmico, foi mensurada a cada 30 minutos, começando 30 minutos antes e prolongando-se por 2 horas após os devidos tratamentos. Em relação aos tratamentos, um grupo de animais recebeu Morfina (2mg.Kg⁻¹) via intraperitoneal (i.p.), os outros grupos receberam concentrações crescentes do extrato hidroalcoólico (0,2; 0,4 e 0,8 mg.Kg⁻¹, i.p). O tempo de reação do animal ao estímulo térmico caracteriza-se pelo comportamento de levantar ou lambe as patas, considerado indicativo de efeito nociceptivo (Woolfe e Macdonald, 1944). Os animais foram previamente selecionados quanto à sua reatividade ao estímulo nociceptivo, não sendo usados animais cujo tempo de reação fosse superior a 9 segundos. Objetivando impedir a lesão tecidual, foi estabelecido o “cut-off” de 30 segundos quando os animais eram retirados da placa aquecida a uma temperatura de aproximadamente 55°C (D’amour e Smith, 1941).

As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram detectadas pela análise de variância (ANOVA). Para comparação entre as médias dos grupos experimentais, foi utilizado o teste “t” não pareado, admitindo-se diferença significativa a partir de $p < 0,05$ (Sokal e Rohlf, 1995). Essas análises estatísticas foram feitas através do programa GraphPad Prism 3.0.



Figura 4 – Placa quente (Hot Plate).

4.5.4- Teste da locomoção forçada em cilindro giratório (rota rod)

Para avaliar o efeito do extrato no desempenho motor dos camundongos machos utilizou-se o aparelho de rota rod (Figura 5), o aparelho contém uma barra de ferro giratória com velocidade regulável em rotações por minuto (6 rpm), separada em 04 compartimentos, permitindo a avaliação simultânea de vários animais. Camundongos Swiss machos foram separados em diferentes grupos: extrato hidroalcoólico (0,2; 0,4 e 0,8 mg.Kg⁻¹, i.p.) que receberam os diferentes tratamentos administrados 60 minutos antes da avaliação da *performance* locomotora. O controle positivo recebeu Diazepam (2,0 mg.Kg⁻¹, i.p), administrado via intraperitoneal. 30 minutos antes da avaliação, que foi utilizado como controle positivo. Foi analisado o número de quedas de cada animal durante os 3 minutos de observação, sendo que os animais foram pré-

selecionados, onde os que caíram da barra giratória por duas vezes em um intervalo de três minutos cronometrados foram eliminados do teste.



Figura 5 – Aparelho rota rod para camundongos.

4.5.5- Avaliação da toxicidade sobre *Artemia salina* Leach

Para realização do teste de toxicidade aguda com *Artemia salina*, seguiu-se a metodologia proposta por McLaughlin (1995), onde ovos do microcústáceo foram colocados em recipiente contendo água do mar artificial, mantidos à temperatura ambiente (25-30°C) e sob luz artificial. Após um período de 24h, tempo correspondente ao período de eclosão dos ovos, as larvas eclodiram e foram coletadas com auxílio de uma pipeta. Foram utilizados 100 mg do extrato bruto diluído em um volume de 10 mL de [H₂O:DMSO (3:2)], formando assim solução, estoque de 10 mg/mL. Foram adicionadas em tubos de ensaio, alíquotas de 10, 100 e 1000 µL, as quais foram diluídas com água do mar artificial a um volume final de 5 mL.

As concentrações finais das alíquotas do extrato seco foram de 10, 100 e 1000 µg/mL realizado em triplicata. Em cada tubo foram adicionadas 15 larvas de *Artemia salina*, e após 24 horas em presença de luz, foi feita a contagem dos indivíduos vivos e mortos. Para o controle positivo foi utilizado uma solução de

dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$), nas mesmas concentrações das amostras. Para o controle negativo foi utilizado o sistema de solventes H_2O : DMSO (3:2).

A dose letal responsável por matar 50% da população (DL_{50}) foi calculada através do método de análise de Probitos, com 95% de intervalo de confiança, pelo programa SAEG 9.1. Os resultados foram relacionados segundo uma escala para avaliação de extratos vegetais, onde a $DL_{50} < 80 \mu g/mL$, altamente tóxico; entre $80 \mu g/mL$ e $250 \mu g/mL$, moderadamente tóxico; e $DL_{50} > 250 \mu g/mL$, com baixa toxicidade ou não tóxico (Krishnaraju, 2005).

4.6- Fenologia

O ensaio fenológico foi realizado inicialmente na Unidade de Apoio à Pesquisa do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UAP/CCTA/UENF), situada na cidade de Campos dos Goytacazes – RJ, com altitude de 14 m acima do nível do mar e coordenadas geográficas, $21^{\circ}19'23''$ de latitude sul e $41^{\circ}10'40''$ de longitude oeste.

Sementes coletadas no campo foram imediatamente cultivadas em sacos plásticos com substrato comercial Plantmax H® em casa de vegetação, adotando-se amostra de 50 plantas para avaliação do índice de velocidade de emergência (IVE).

O índice de velocidade de emergência (IVE) foi calculado pelo somatório das razões do número de plântulas emergidas no período até estabilização, usando-se a fórmula proposta por Maguire (1962):

$$IVE = \sum_{i=1}^n E_i/N_i + E_2/N_2 + \dots + E_n/N_n$$

Onde:

IVE: índice de velocidade de emergência;

E_1, E_2, E_n : número de plântulas emergidas na primeira, na segunda e na enésima avaliação;

N_1, N_2, N_n : número de dias transcorridos da semeadura até a primeira, a segunda e a enésima avaliação.

Após a germinação e o surgimento de quatro folhas definitivas as mudas foram levadas para uma área localizada na Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro (PESAGRO-RIO). As mudas foram transplantadas (40 plantas) para o campo (cambissolo argilo-siltoso), no espaçamento de 0,5 x 0,8 metros, mantido sob monitoramento mensal para avaliação das etapas fenológicas da espécie. No decorrer do período de estudo, os dados climatológicos referentes à precipitação, foram obtidos a partir da estação meteorológica de Campos dos Goytacazes.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1- Extração do óleo volátil

Através da metodologia proposta para extração do óleo essencial das folhas de *E. maximilianii*, foi obtido um rendimento de aproximadamente 0,24%, contudo houve uma grande dificuldade de separação do óleo do hidrolato.

Segundo Albuquerque et al. (2010), o rendimento do óleo volátil obtido a partir das folhas e inflorescências da espécie *Eupatorium ballotifolium* Kunth por meio do processo de hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger por um período de 2 horas, coletadas na época do verão; apresentou um valor de 0,11% e o óleo obtido dos talos, apresentou um teor menor, de 0,03%.

Souza et al. (2007), avaliaram o rendimento do óleo volátil de outra espécie do gênero *Eupatorium*, *Eupatorium polystachyum* DC, em que foi obtido um rendimento de 1,6% em relação às folhas e 0,9% de óleo obtido das inflorescências frescas da espécie. De acordo com a metodologia proposta no presente trabalho não foi possível identificar os constituintes químicos do óleo volátil.

5.2- Extrato hidroalcoólico bruto

De acordo com a metodologia proposta para o preparo do extrato hidroalcoólico bruto a partir das folhas de *E. maximiliani*, foi obtido um rendimento final de aproximadamente 3,0%. Rocha (2006) realizou um estudo com o objetivo de avaliar a atividade analgésica e anti-inflamatória do extrato hidroalcoólico bruto da arnica brasileira (*Solidago microglossa* D.C.), onde foi empregada a mesma metodologia de obtenção do extrato e o rendimento final foi de 2,55%, visto que este rendimento é considerado adequado para extratos vegetais.

5.3- Atividade antioxidante

Em relação à espécie *E. maximiliani*, não foram encontrados estudos anteriores sobre a sua fitoquímica e nenhuma comprovação de suas potenciais atividades biológicas, entre elas a atividade antioxidante. A atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico da espécie vegetal estudada foi verificada qualitativamente, como positiva em função da descoloração da solução de DPPH borrifado inicialmente de cor púrpura, passando a uma coloração amarelada, comparada à coloração do padrão positivo (BHT), que apresenta coloração amarela (Figura 6).

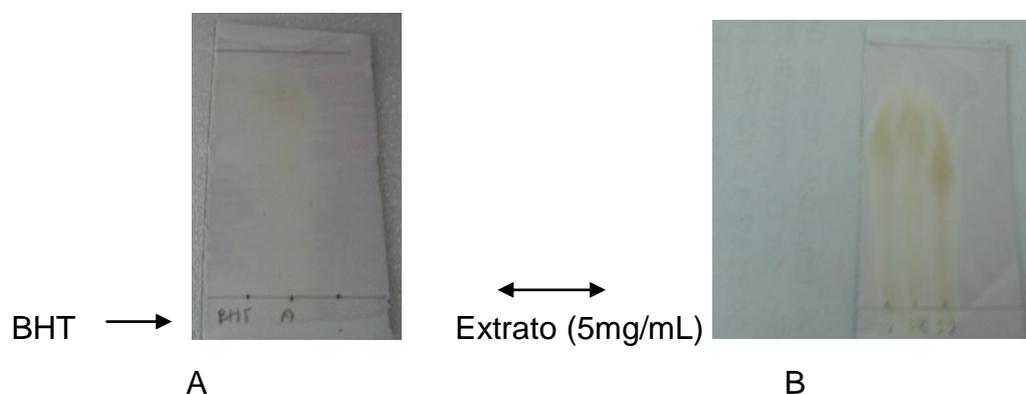


Figura 6- Atividade antioxidante qualitativa do padrão (BHT) em A e em B extrato hidroalcoólico de *E. maximiliani* em triplicata.

Posteriormente foi quantificada a atividade para diferentes concentrações do extrato. De acordo com os resultados da Figura 7, o extrato hidroalcoólico nas concentrações de 1000 $\mu\text{g/mL}$ apresentou uma atividade antioxidante de aproximadamente 97% e para 100 $\mu\text{g/mL}$ foi em torno de 78 % e estes resultados mostraram boa atividade antioxidante da amostra, quando comparados ao padrão BHT utilizado nas mesmas concentrações. Visto que a atividade antioxidante promovida pelo extrato na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ foi aproximadamente 26% superior, quando comparada ao padrão na mesma concentração, que possui uma atividade no valor de 52%. Apenas na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ ($4,6\% \pm 0,9$) a amostra não apresentou atividade antioxidante.

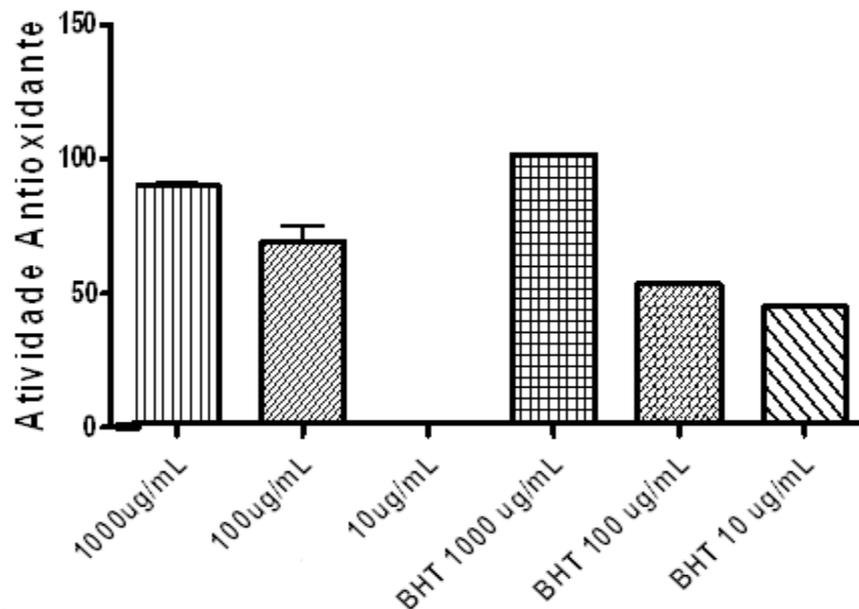


Figura 7- Atividade antioxidante quantitativa do extrato de *E. maximilianii* e do padrão (BHT).

Estudos recentes têm demonstrado que vários extratos de plantas, particularmente os que contêm flavonoides, parecem apresentar uma alta atividade antioxidante, capaz de diminuir os efeitos nocivos gerados pelos radicais livres, e conseqüentemente o surgimento de doenças associadas à ação destes no organismo (Nunes, 2007).

Em relação às plantas do gênero *Eupatorium*, estas apresentam variados constituintes químicos como terpenos (monoterpenos, diterpenos, triterpenos e sesquiterpenos), lactonas, flavonoides e alcaloides pirrolizidínicos (Zhang et al.,

2008). Os flavonoides, que apresentam significativa atividade antioxidante no organismo, foram isolados de várias espécies vegetais pertencentes ao gênero, como em *E. coelestinum* (Le Van e Pham, 1979), *E. adenophorum* (Li et al., 1997), *E. leucolepis* (Herz e Kulantaivel, 1982), *E. angustifolium* (Mesquita et al., 1986), *E. littorale* (Sato et al., 1985), *E. salvia* (González et al., 1990), *E. odorata* (Ha et al., 1995), *E. tinifolium*, *E. ternbergianum* (D'agostino et al., 1990), *E. buniifolium* (Muschiatti et al., 1994), *E. cannabinum* (Stevens et al., 1995) e *E. erythropappum* (Talapatra et al., 1985).

Flavonoides glicosilados foram isolados de *E. tinifolium* (D'agostino et al., 1990), outros glicosídeos foram identificados nas espécies *E. micranthum* (Herz et al. 1978) e em *E. altissimum* (D'agostino et al., 1990).

Segundo Schneider et al.(2005), foram detectados 81 compostos no óleo extraído das folhas de *E. laevigatum*, sendo 19 monoterpenos, e 54 sesquiterpenos e os demais não identificados. A atividade antioxidante foi medida através do teste do carbonil e os resultados mostraram que houve atividade no óleo essencial testado.

Souza (2007) realizou o estudo com espécies pertencentes ao gênero *Eupatorium*, onde foi feita uma avaliação preliminar sobre a sua composição química e atividade antioxidante. As espécies estudadas foram *E. gaudichaudianum* DC., *E. nummularium* Hook. & Arn., *E. intermedium* DC. *E. ligulifolium*, *E. oblongifolium*, *E. ericoides*, *E. inulifolium* e *E.laevigatum*, e *E. serratum* Spreng. Os óleos voláteis foram obtidos por hidrodestilação das folhas e inflorescências frescas. Todas as espécies apresentaram os mesmos compostos majoritários: α -pineno, β -pineno e limoneno. As inflorescências e folhas destas espécies foram analisadas ainda por *headspace* para determinação do perfil químico. Onde α -Pineno e β -pineno estão entre os majoritários nesta fração mais volátil, limoneno aparece também entre os majoritários em *E. serratum* e *E. gaudichaudianum*.

Os óleos voláteis extraídos das espécies de *Eupatorium* foram submetidos ao ensaio de atividade antioxidante, frente ao radical DPPH, por bioautografia em CCD, nas concentrações de 1:10, 1:100 e 1:1000. Para todos os óleos, foi verificado resultado positivo a atividade em diferentes intensidades, conforme a concentração testada. As espécies que apresentaram melhores resultados foram *E. ligulifolium*, *E. oblongifolium*, *E. ericoides*, *E. inulifolium* e *E.laevigatum*, sendo

que a última espécie apresentou resultado mais significativo em relação às demais (Souza, 2007).

5.4- Atividade anticolinesterásica

Inicialmente foi realizada uma triagem testando concentrações crescentes do material vegetal, de acordo com a metodologia proposta para o ensaio em microplaca. Para avaliação da atividade anticolinesterásica em extratos vegetais, Vinutha et al. (2007) estabelecem que a inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase é considerada potente quando a inibição for maior que 50%, moderada quando for de 30-50% e baixa quando for menor que 30%.

A atividade anticolinesterásica do extrato hidroalcoólico de *E. maximiliani*, foi considerada baixa ou inativa para as concentrações abaixo de 1000 µg/ml; já para as amostras mais concentradas, acima de 1000 µg/mL, estas foram classificadas como moderada (1000 µg/mL) e potentes (2000 µg/mL até 10000 µg/mL) (Tabela 1). Porém, é importante destacar que foram necessárias altas concentrações do extrato para a atividade ser considerada significativa.

Tabela 1- Determinação da inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase frente ao extrato de *E. maximiliani*

CONCENTRAÇÃO DO EXTRATO (µg/mL)	INIBIÇÃO DA AChE (%)	CLASSIFICAÇÃO
0,25	0,01 ± 0,05	Inativo
0,50	0,02 ± 0,08	Inativo
1,0	0,00 ± 0,09	Inativo
10	0,00 ± 0,07	Inativo
50	0,01 ± 0,09	Inativo
100	0,00 ± 0,08	Inativo
250	0,00 ± 1,02	Inativo
1000	33,4 ± 3,21	Baixo
2000	90,98 ± 2,75	Potente
4000	94,56 ± 1,30	Potente
8000	98,09 ± 3,05	Potente
10000	91,52 ± 2,73	Potente

Souza (2007) investigou trinta e três espécies do gênero *Eupatorium*, distribuídas em oito seções, visando o estabelecimento da composição química e a avaliação das atividades antioxidante e anticolinesterásica. A ação antioxidante foi determinada por bioautografia frente ao radical DPPH e à ação anticolinesterásica também por ensaio qualitativo, por bioautografia, frente à enzima acetilcolinesterase. Em relação à atividade anticolinesterásica todas as espécies apresentaram atividade moderada, sendo esta mais pronunciada nas espécies cujo constituinte majoritário é o monoterpene, α -pineno, composto que comprovadamente apresenta atividade anticolinesterásica (Lu et al., 2002).

No mesmo estudo, Souza (2007) isolou a laevigatina dos óleos voláteis de populações de *Eupatorium laevigatum*, que se revelou fracamente ativa. Isso sugeriu que a atividade exercida pelo óleo volátil de *E. laevigatum* oriundo do Rio Grande do Sul não pode ser atribuída à presença desse composto isoladamente.

A atividade anticolinesterase apresentada pelos óleos essenciais das folhas e dos talos de *E. ballotifolium* foi avaliada em CCDA, frente à enzima AChE. O resultado deste bioensaio mostrou que tanto o óleo essencial das folhas como dos talos foram ativos. Foi utilizado como controle positivo a fisostigmina. Os resultados demonstram o potencial anticolinesterásico dos óleos essenciais de *E. ballotifolium* servindo como candidatos naturais que possam vir a auxiliar no tratamento do mal de Alzheimer (Albuquerque et al., 2010).

Sobre extratos vegetais, Borba (2012) analisou vinte e cinco espécies de plantas medicinais nativas da Caatinga, baseado na mesma metodologia proposta no presente trabalho, de todos os extratos testados, apenas 4% mostraram uma potente inibição da AChE (>50% inibição), 60% moderada (30–50% inibição) e 36% foram inativas. Dentre as amostras com potente e moderada inibição destacaram-se os extratos metanólicos das cascas do caule de *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir., *Schinopsis brasiliensis* Engl., *Tephrosia purpurea* (L.) Pers e *Cedrela odorata* L.

5.5- Atividade antinociceptiva

5.5.1- Avaliação da pressão crescente na pata

O teste de Von Frey é usado para verificar sensibilidade tecidual ao estímulo mecânico. De acordo com os resultados apresentados na Figura 8, o grupo de camundongos tratados com o extrato mais concentrado (0,8mg/Kg), apresentou efeito analgésico comparando ao grupo controle (Diazepam) e também aos demais grupos. Assim, em doses baixas, seu comportamento acompanha o padrão do controle, e em concentrações altas, a substância depende da distribuição e metabolização para que seus efeitos apareçam no organismo teste. O que se percebe é um comportamento bifásico da substância, ou seja, seu efeito clínico é dependente da dose.

Em relação ao fármaco utilizado como controle positivo, o diazepam, pertence ao grupo dos benzodiazepínicos. As drogas desse grupo apresentam propriedades ansiolíticas, miorrelaxante de ação central, anticonvulsivante e redutora da agressividade. Grande parte das ações dos benzodiazepínicos pode ser atribuída à sua capacidade de deprimir o Sistema Nervoso Central. O consenso atual é de que a maioria, se não todas elas, resultam da potencialização da inibição neural, que é mediada pelo ácido gama-aminobutírico (GABA).

Embora os benzodiazepínicos afetem a atividade em todos os níveis de neurônios, algumas estruturas são afetadas de modo muito mais amplo do que outras. O principal sítio de sua ação é o sistema límbico do cérebro, particularmente o hipocampo (reações emocionais), enquanto o relaxamento muscular deve-se a ações no cordão espinhal (inibição dos reflexos espinhais), bem como a atividade direta na junção neuromuscular pós-sináptica.

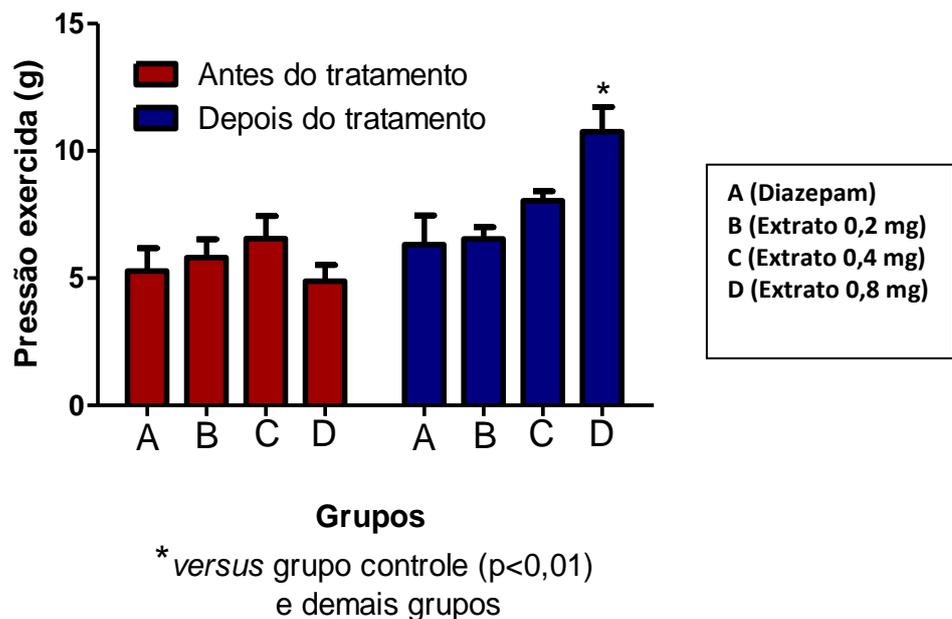


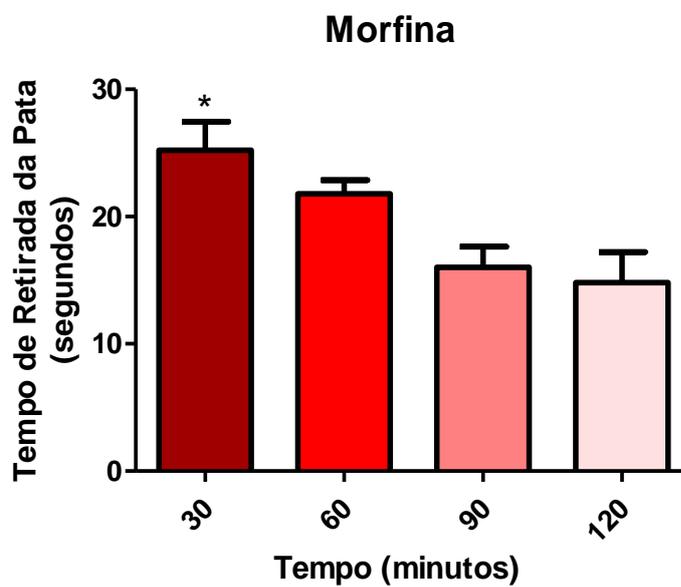
Figura 8 - Analgesímetro antes e após injeção intraperitoneal de diazepam e diferentes concentrações do extrato de *E. maximilianii* pela ANOVA com posterior teste de média.

5.5.2- Avaliação do teste da placa quente (hot plate)

A morfina, um opioide natural derivado do fenantreno, é a droga utilizada como medida central para comparação entre opioides. O termo opioide foi usado pela primeira vez para designar drogas derivadas do ópio como a morfina, codeína e vários congêneres semissintéticos da morfina. Com o desenvolvimento dos compostos totalmente sintéticos com ações semelhantes à morfina, o termo opioide é usado para referir-se em sentido genérico a todas as drogas, naturais ou sintéticas, com ações idênticas às da morfina.

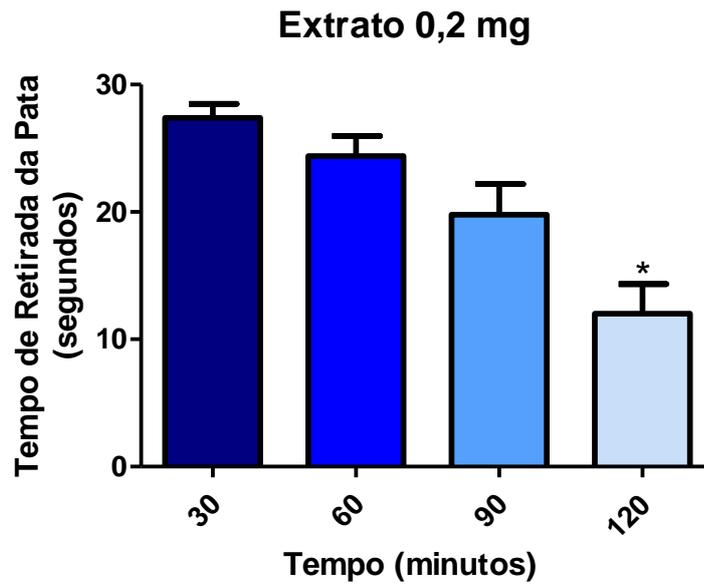
Os agonistas opioides produzem suas ações farmacológicas ligando-se a receptores específicos largamente e irregularmente dispersos por todo o sistema

nervoso (cérebro, medula espinhal, sistema nervoso autônomo e órgãos periféricos). Vários tipos e subtipos de receptores opioides foram identificados, e produzem efeitos diversos quando um único agonista opioide se liga a vários deles ao mesmo tempo. A morfina é um potente analgésico com boa ação sedativa e ansiolítica, efeitos mediados pelos receptores MOP (receptor peptídico opioide mu) (Bueno et al., 2006). A morfina no teste da placa quente (Figura 10) aumentou de forma evidente o tempo de latência ao calor, porém este efeito demonstra uma queda no decorrer do tempo devido à sua metabolização.



* *versus* 90 e 120 minutos ($p < 0,05$)

Figura 9 – Efeito da morfina no teste da placa quente em camundongos no tempo de 30, 60, 90 e 120 minutos.



* versus 30, 60 e 90 minutos ($p < 0,05$)

Figura 10 – Efeito do extrato de *E. maximiliani* na concentração de $0,2 \text{ mg.Kg}^{-1}$ no teste da placa quente em camundongos no tempo de 30, 60, 90 e 120 minutos.

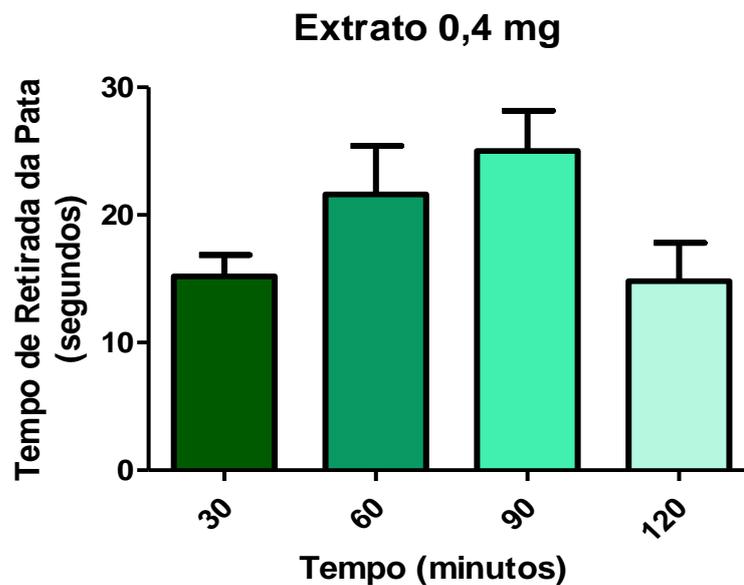


Figura 11 – Efeito do extrato de *E. maximiliani* na concentração de $0,4 \text{ mg.Kg}^{-1}$ no teste da placa quente em camundongos no tempo de 30, 60, 90 e 120 minutos.

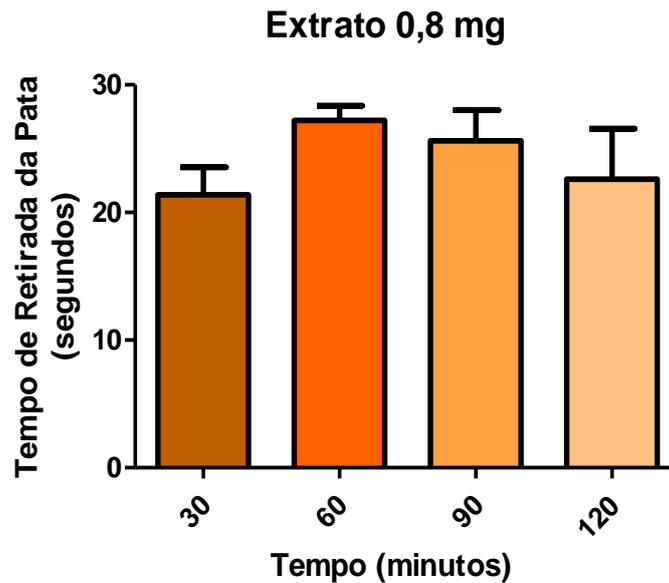


Figura 12 – Efeito do extrato de *E. maximiliani* na concentração de 0,8 mg.Kg⁻¹ no teste da placa quente em camundongos no tempo de 30, 60, 90 e 120 minutos.

No teste da placa quente em doses baixas, os resultados indicam que o comportamento dos animais acompanha o padrão do controle, a morfina. Em concentrações altas, a substância depende da distribuição e metabolização para que seus efeitos apareçam, e aumenta de acordo com o tempo após sua administração. Na concentração mais alta do extrato, foi verificado um aumento no tempo de permanência dos animais na placa quente em relação ao padrão morfina, principalmente no tempo de 120 minutos após sua administração.

O efeito analgésico, sugerido pelo uso popular da espécie *E. maximiliani*, pôde ser verificado por meio do teste de Von Frey, rota rod e da placa quente. O teste da placa quente é considerado um teste sensível a fármacos que atuam em nível supraespinal de modulação da resposta dolorosa (Yaksh; Rudy, 1977). Neste modelo de estudo, a eficácia do extrato hidroalcoólico da planta estudada sugere uma ação analgésica modulatória.

Segundo Melo (2012), o extrato hidroalcoólico da espécie *Eupatorium ayapana* apresenta baixa toxicidade aguda, em que o parâmetro mais evidente foi a letargia, que parece estar relacionada com a aparente ação sedativa em seu uso popular. Os resultados indicaram que no teste do Campo Aberto houve uma redução na locomoção total dos ratos, devido provavelmente à sua ação sedativa. Apresentou ação ansiolítica e também foi observada uma ação atinociceptiva do extrato.

O extrato etanólico de folhas da espécie *E. odoratum* apresentou significativa atividade analgésica, quando comparada ao padrão usado, a aspirina, avaliada pelo método das contorções abdominais (Jena e Chakraborty, 2010).

5.6- Avaliação da locomoção forçada em cilindro giratório (rota rod)

No teste do rota rod, o pré-tratamento dos animais com o extrato hidroalcoólico modificou de forma leve e gradual o número de quedas e consequentemente o tempo de permanência dos camundongos no equipamento. Analisando o desempenho dos animais ao longo do tempo, há uma ligeira queda no tempo de permanência dos camundongos na barra giratória, principalmente após 60 minutos de observação. Principalmente no grupo teste onde foi administrado o extrato na concentração de $0,8 \text{ mg.Kg}^{-1}$, este decaimento ficou mais evidente que o apresentado pelo grupo administrado com a droga diazepam (Figura 9). Verificou-se influência do extrato na atividade motora, capaz de levar a uma ação depressora central sugestiva de efeito ansiolítico.

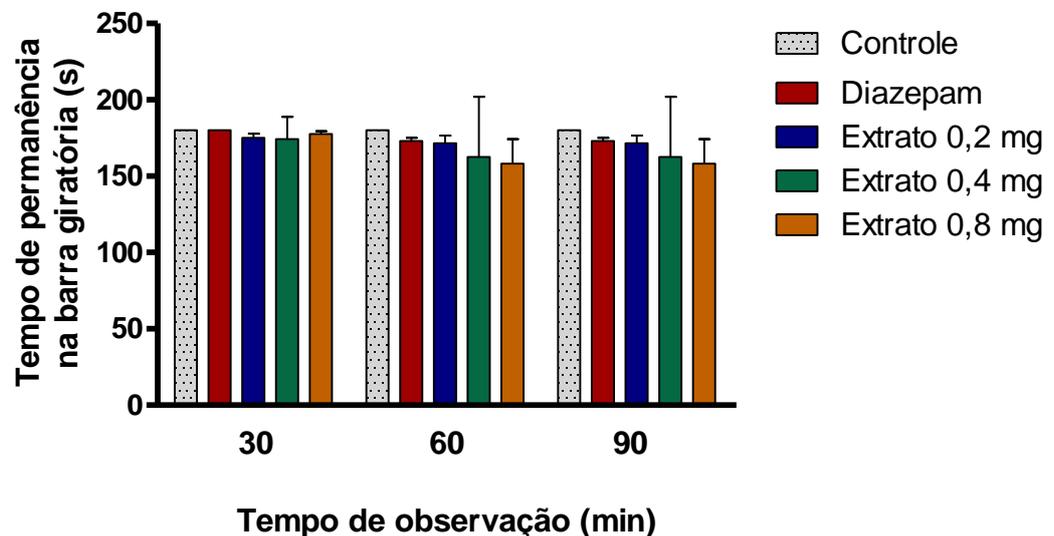


Figura 13 – Tempo de permanência dos camundongos na barra giratória, tratados com diazepam e diferentes concentrações do extrato *E. maximilianii*.

5.7- Toxicidade aguda com *Artemia salina* Leach

A fitotoxicidade frente às larvas de *A. salina*, pode ser visualizada na figura a seguir, em que a Dose Letal responsável por matar 50% da quantidade das larvas incubadas por um período de 24 horas, foi igual a 548,90 µg/mL. De acordo com Krishnaraju (2005), este resultado representa uma baixa toxicidade ou é atóxico, pois é necessária uma concentração considerada alta do extrato para alcançar uma DL₅₀. Porém, para a Organização Mundial de Saúde (OMS) são consideradas tóxicas substâncias que apresentam valores de DL₅₀ abaixo de 1.000 µg/mL em *Artemia salina* (Meyer et al., 1982). Assim, de acordo com a faixa de toxicidade indicada pela OMS, o extrato avaliado é considerado tóxico.

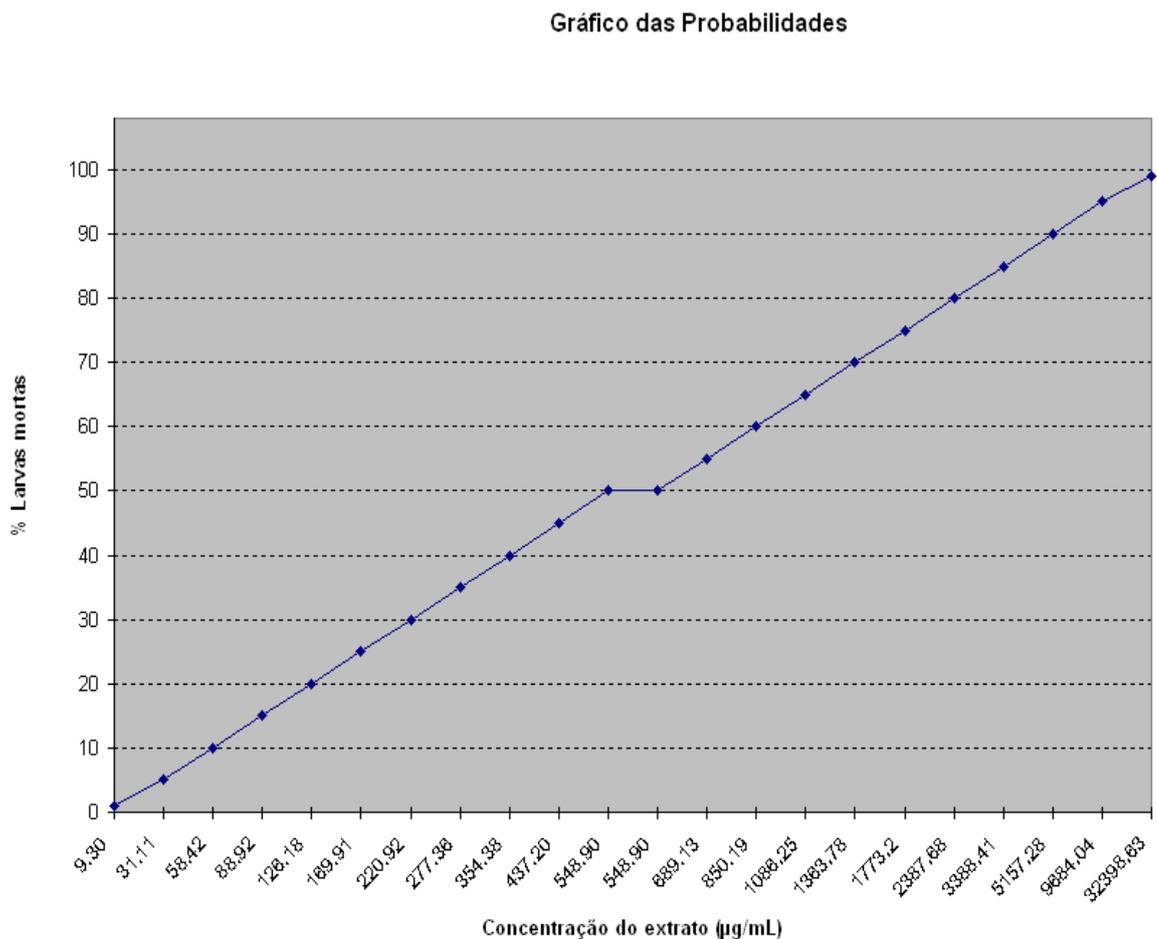


Figura 14 – Determinação da dose letal do extrato de *Eupatorium maximilianii* frente às larvas de *Artemia salina*.

É importante destacar que o bioensaio com *Artemia salina*, é realizado para toxicidade aguda, com o objetivo de determinar a toxicidade relativa de uma amostra sobre um organismo aquático selecionado, exposto a várias concentrações desta amostra, em um curto período de tempo. O tempo de exposição geralmente compreende 24 horas. Os testes de curta duração ou subletais são desenvolvidos focando os estágios mais sensíveis da vida do organismo, contudo não cobrem todo o ciclo ontogênico do mesmo.

A espécie *E. maximiliani* praticamente não possui estudos sobre sua toxicidade aguda, crônica e genotóxica, porém um teste realizado sobre este assunto foi realizado por Nunes et al (2008), onde foi avaliada a toxicidade da planta, visto seu uso indiscriminado pela população. As concentrações do extrato hidroalcoólico bruto, avaliadas em sua ação tóxica aguda e genotóxica foram de 10, 100, 500 e 1000 mg.Kg⁻¹ injetados em 6 camundongos machos para cada dose. Foi verificado que não houve óbito dos animais após 24 horas da injeção do extrato, significando que o mesmo não apresentou toxicidade aguda, porém a quantidade de micronúcleos em eritrócitos policromáticos apresentou diferença significativa com relação ao controle negativo, apresentando um alto potencial genotóxico em células animais.

Apesar do bioensaio com *A. salina* ser mais sensível, quando comparado ao teste realizado por Nunes et al. (2008), este resultado é importante e corrobora com os obtidos no ensaio com o microcrustáceo. Esse é um resultado importante, pois é uma planta bastante usada pela população, mas que necessita de critérios rigorosos quanto à sua administração oral, havendo, portanto, necessidade da continuidade e aprofundamento dos estudos para maiores esclarecimentos.

A ausência de citotoxicidade do extrato no teste de letalidade frente à *A. salina* é um indicador que a planta pode ser bem tolerada frente ao sistema biológico. Entretanto, estudos mais aprofundados são de grande importância até mesmo estudos sobre um possível efeito mutagênico da espécie.

5.8- Fenologia

Segundo a metodologia adotada, os resultados obtidos sobre o índice de velocidade de emergência da espécie vegetal avaliada foram iguais a 23, sendo considerado um valor adequado para plantas daninhas. Resultado semelhante foi verificado no trabalho onde foi avaliada a qualidade de sementes de mata pasto

em função do período, ambiente e tipo de embalagem, o índice de velocidade de germinação foi de 24 para a *E. maximiliani* (Rubim, Comunicação Verbal).

De acordo com Fernandes (2011), esta planta daninha, mata pasto, emerge quatorze dias após a sua semeadura, obtendo vantagens no aproveitamento dos recursos ambientais, em detrimento de outras espécies menos competitivas.

Em relação aos estudos fenológicos, estes são de grande importância para a compreensão da dinâmica das comunidades vegetais, contribuindo para o entendimento da regeneração e reprodução das espécies, da organização temporal dos recursos dentro das comunidades, das interações e da coevolução entre plantas e animais (Talora e Morellato, 2000).

O conceito estabelecido por McArthur e Wilson (1967) caracteriza a estratégia de reprodução das espécies, em que estas são classificadas como estrategista tipo r ou K. Em linhas gerais r é o crescimento populacional de uma dada população, e K é a capacidade de carga do seu meio ambiente. As espécies com estratégia demográfica do tipo seleção "r" exploram nichos ecológicos vazios e produzem um elevado número de descendentes a cada ciclo reprodutivo, ainda que cada um tenha poucas hipóteses individuais de sobreviver até a idade adulta. Por contraste, as espécies com estratégia demográfica de tipo seleção "K" são tipicamente competidoras com outras espécies, em nichos já bem preenchidos, investindo mais em uma descendência menos prolífica, no sentido de alocar grande proporção dos seus recursos para estruturas que conferem vantagens aos indivíduos na competição pela sobrevivência, embora ao custo de reduzida fecundidade (Sarukhán 1976). Esta definição é relevante para o estudo da fenologia, pois, as forças seletivas que agem sobre uma espécie que gasta a maior parte de sua vida como colonizadora são diferentes daquelas que agem sobre espécies que sofrem estresses de densidade em comunidades estáveis.

Características biológicas indicam que a espécie *E. maximiliani*, assim como a *E. vauthierianum* (Maluf e Wizenier, 1998), apresenta fases longas de florescimento e frutificação e produz grande quantidade de sementes, que aliadas à capacidade de colonizar áreas abertas e degradadas, permitem classificá-la como estrategista tipo r, isto é, são espécies colonizadoras, conforme conceito estabelecido por McArthur e Wilson (1967).

Os fatores climáticos podem ser considerados como determinantes no desenvolvimento das fenofases, de acordo com Monasterio e Sarmiento (1976), que definem uma fenofase como o estágio observável no desenvolvimento da planta, como a queda e o brotamento das folhas (padrões fenológicos vegetativos) e floração e frutificação (padrões fenológicos reprodutivos), sendo que estes eventos são claramente circunscritos no tempo.

No presente trabalho foi verificado que a precipitação influenciou as fases fenológicas da espécie, contudo é importante destacar que os fatores externos, ambientais, estão relacionados e não isolados, atuando de certo modo sobre as espécies. Segue a precipitação pluviométrica mensal dos anos de 2012, 2013 e 2014, expressas em milímetros, de acordo com observação do posto climatológico do Campus Doutor Leonel Miranda, Campos dos Goytacazes – Rio de Janeiro.

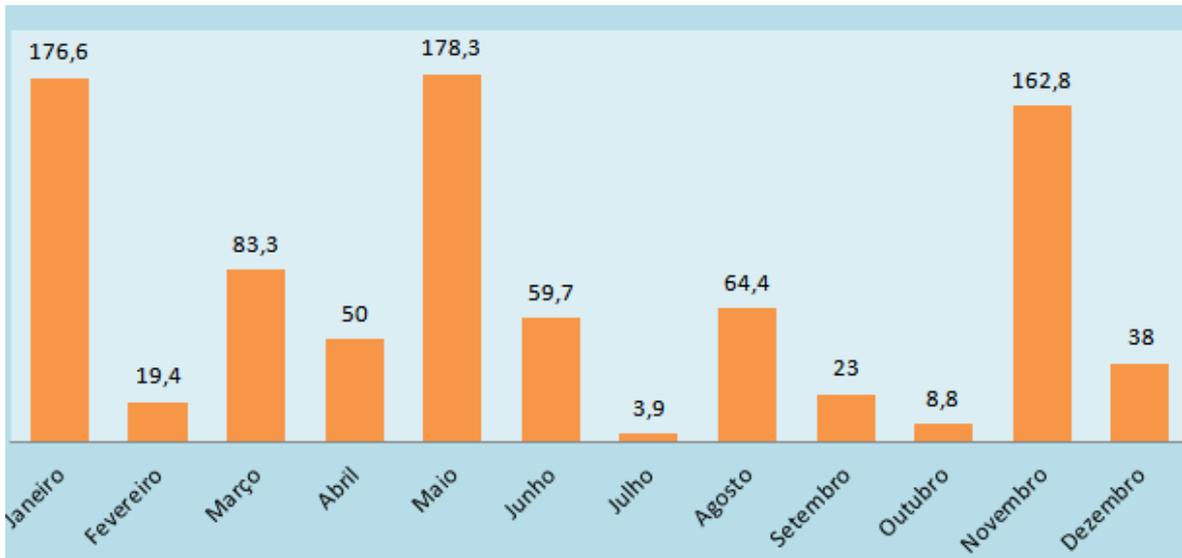


Figura 15 – Precipitação pluviométrica mensal em mm, referente ao ano de 2012, observada no posto climatológico do Campus Dr. Leonel Miranda, Campos dos Goytacazes- RJ.

MESES/2012	Jan	Fev	Mar	Abr	Maio	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
FASES												
Vegetativa	X	X	X							X	X	X
Floração				X	X							
Frutificação						X	X					
Abcisão das folhas								X	X			

Quadro 1 – Fases fenológicas da espécie *Eupatorium maximilianii*, referente ao ano de 2012.



Figura 16 – Precipitação pluviométrica mensal em mm, referente ao ano de 2013, observada no posto climatológico do Campus Dr. Leonel Miranda Campos dos Goytacazes- RJ.

MESES/2013	Jan	Fev	Mar	Abr	Maio	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
FASES												
Vegetativa	X	X	X							X	X	X
Floração				X	X							
Frutificação						X	X					
Absisão das folhas								X	X			

Quadro 2 – Fases fenológicas da espécie *Eupatorium maximilianii*, referente ao ano de 2013.



Figura 17 – Precipitação pluviométrica mensal em mm, referente ao ano de 2014, observada no posto climatológico do Campus Dr. Leonel Miranda Campos dos Goytacazes- RJ.

MESES	Jan	Fev	Mar	Abr	Maio	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
FASES												
Vegetativa	X	X									X	X
Floração			X	X	X							
Frutificação						X	X	X				
Abcisão das folhas									X	X		

Quadro 3 – Fases fenológicas da espécie *Eupatorium maximilianii*, referente ao ano de 2014.

De acordo com Castellani et al. (1999), as fases reprodutivas, ao contrário das fases vegetativas, parecem ser sempre estimuladas pela maior exposição solar e pelo aumento de temperatura. Este aspecto pôde ser observado em *E. maximilianii*, resultado semelhante foi encontrado por Karam et al. (2002), que, estudando a fenologia de quatro espécies de Senécio na região sul do Rio Grande do Sul, verificaram, em todas áreas de observação, que as fases reprodutivas foram mais expressivas quando a temperatura e o fotoperíodo foram maiores.

6. CONCLUSÕES

- As folhas de *E. maximilianii* coletadas no período de primavera/verão apresentaram um rendimento de óleo essencial obtido por hidrodestilação, em média igual a 0,24%;
- O rendimento do extrato hidroalcoólico bruto obtido a partir das folhas de *E. maximilianii*, apresentou um rendimento final de aproximadamente 3,0%;
- O extrato hidroalcoólico da arnica campista apresentou qualitativamente atividade antioxidante frente ao radical DPPH. A atividade antioxidante da amostra na concentração de 100 µg/mL foi 26% maior quando comparada ao padrão BHT na mesma concentração;
- A atividade anticolinesterásica do extrato hidroalcoólico de *E. maximilianii*, foi considerada baixa ou inativa para as concentrações abaixo de 1000 µg/mL; moderada para as concentrações de 1000 µg/mL, potentes para 2000 µg/mL até 10000 µg/mL;
- O efeito analgésico, sugerido pelo uso popular da espécie *E. maximilianii*, pôde ser verificado por meio do teste de Von Frey, e da metodologia

da placa quente, nestes modelos de estudo, a eficácia do extrato hidroalcoólico da espécie *E. maximilianii* sugere um comportamento bifásico, com ação analgésica modulatória;

- Verificou-se a influência do extrato na atividade motora, capaz de levar a uma ação depressora central sugestiva de efeito ansiolítico;
- No ensaio de toxicidade aguda frente à *Artemia salina*, a DL50 foi de 548,90 µg/mL sendo considerada uma baixa toxicidade aguda;
- Em relação ao estudo fenológico, a espécie apresenta maior crescimento vegetativo na primavera-verão, podendo estar relacionada aos meses com maiores índices pluviométricos.

REFERÊNCIAS

- Abad, M.J.; Bermejo, P.; Villar, A. (1995) An approach to the genus *Tanacetum* L. (Compositae): phytochemical and pharmacological review. *Phytother. Res.* London, 9:78-92.
- Adams, R.; P. (2007) Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/ Mass Spectroscopy. 4. ed. Carol Stream: Allured, 469p.
- Albertasse, P.D.; Thomaz, L.D.; Andrade, M.A. (2010) Plantas medicinais e seus usos na comunidade da Barra do Jucu, Vila Velha, ES. *Rev. Bras. Pl. Med.*, Botucatu, 12 (3):250-260.
- Albuquerque, M.R.J.R.; Santos, H.S.; Souza, E.B.; Silva, R.M.; Menezes, J.E.S.; Pessoa, O.D.L.; Braz-Filho, R.; Costa, S.M. (2010) Composição química volátil e não-volátil de *Eupatorium ballotifolium* Kunth, Asteraceae. *Rev. bras. farmacogn.* 20 (4):615-620.

- Almeida, W.V.F.; Silva, M.L.C.R.; Farias, E.B.; Athayde, A.C.R.; Silva, W.W. (2007) Avaliação de plantas medicinais em caprinos da região do semi-árido paraibano naturalmente infectados por nematóides gastrintestinais. *Revista Caatinga*, 20 (3):01-07.
- Anderson, D. (1996) Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *Mutation Research*, Amsterdam, v.350, n.1, p.103-108
- Antunes, N.B.; Ribeiro, J.F. (1999) Aspectos fenológicos de seis espécies vegetais em matas de galeria do Distrito Federal. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. Brasília, 34 (9):1517-1527.
- Aoyama, E.M. (2005) Estrutura foliar de *Eupatorium maximiliani* Schrad. (Asteraceae) e suas implicações na herbivoria *Revista de Biociências*, 11 (34): 126-132.
- Barreiros, A.L.B.S; David, M.(2006) Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, v. 29, n.1, p.113-123, 2006.
- Barreto, C.F.; Cavasin, G.M.; Silva, H.H.G.; Silva, I.G. (2006). Estudo das alterações morfo-histológicas em larvas de *Aedes aegypti* submetidas ao extrato bruto etanólico de *Sapindus saponaria* Lin (Sapindaceae). *Revista de Patologia Tropical* 35:37-57.
- Barroso, G.M. (1991) Sistemática de angiospermas do Brasil. Viçosa: UFV, p.326.
- Barroso, G.M. (1950) Considerações sobre o gênero *Eupatorium* L *Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro*, Rio de Janeiro, 10:13-137.
- Barosa, J.; Ferreira, A., Fonseca, B., Souza, I.(2003) Teste de toxicidade de cobre para *Artemia salina* – *Poluição e ecotoxicologia marinha*

- Bartosz, G. (1997) Oxidative stress in plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 19 , pp. 47–64
- Basbaum, A.I.; Jessel, T.M.(2000) The perception of pain.In: Kandel, E.R; Schwartz, J.H. *Principles of neural science*, McGraw-Hill, 472-491.
- Bencke, C.S.C.; Morellato, L.P.C. (2002) Estudo comparativo da fenologia de nove espécies arbóreas em três tipos de Floresta Atlântica no sudeste do Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*. 25:237-248.
- Benzie, I.F.F.; Strain, J.J. (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”. The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, San Diego, 239:70-76.
- Borba,V.F.C. (2012). Avaliação *in vitro* da atividade anticolinesterásica de plantas medicinais nativas da caatinga. Dissertação apresentada como requisito parcial a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco.63p.
- Borchert, R. (1998) Responses of tropical trees to rainfall seasonality and its long-term changes. *Climate Change* 39:381-393.
- Boscolo, O.H.; Valle, L.S. (2008) Plantas de uso medicinal em Quissamã, Rio de Janeiro, Brasil. *Iheringia, Sér. Bot.* 63:263-277.
- Botrel,P.P.; Pinto, J.E.B.P.; Figueiredo, F.C.; Sales, J.F.; Bertolucci, S.K.V. (2010) Teor e composição química do óleo essencial de *Hyptis marruboides* Epl., Lamiaceae em função da sazonalidade. *Acta. Sci. Agron.* 32 (3):533-538.
- Brand-Wiliams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, 28:25-30.

- Bremer, K. (1994) Asteraceae, cladistics & classification. *Portland: Timber Press*, 752p.
- Brufani, M.; Filocamo, L.; Lappa, S.; Maggi, A. (1997). New acetylcholinesterase inhibitors. *Drugs of the Future*, 22: 397
- Bueno, A.X.; Moreira, A.T.S.; Silva, F.T.; Estevam, C.S.; Marchioro, M. (2006) Effects of the aqueous extract from *Hyptis pectinata* leaves on rodent central nervous system. *Rev Bras Farmacogn* 16: 317-323.
- Burns, K.C. (2005) Is there limiting similarity in the phenology of fleshy fruits? *Journal of Vegetation Science* 16: 617-624.
- Cao, G.H.; Alessio, H.M.; Cutler, R.G. (1993) Oxygen-radical absorbency capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*, New York, 14 (3):303-311.
- Cavin, A.; Hostettmann, K.; Dyatmyko, W.; Potterat, O. (1998) Antioxidant and lipophilic constituents of *Tinospora crispa*. *Planta Medica*, 64:521-547.
- Cechinel Filho, V. (2000) Principais avanços e perspectivas na área de produtos naturais ativos: estudos desenvolvidos no NIQFAR/UNIVALI. *Química Nova*, 23 (5):968-685.
- Cerutti, P.A. (1994) Oxy-radicals and cancer. *Lancet, London*, v.344, n. 8926, p.862-863, 1994.
- Chaves, D.S.A.; Costa, S.S.; Almeida, A.P.; Frattani, F.; Assafim, M.; Zingali, R.B. (2010) Metabólitos secundários de origem vegetal: uma fonte potencial de fármacos antitrombóticos. *Quim. Nova*, 33 (1):172-180.
- Chen, FA.; Wu, A.B., Shied.; Kuo, D.H. (2006) Evaluation of the activity of *Rothelia tuberosa*. *Food Chemistry* v.4, p.14-18

- Chu, Y.H.; Chang, C.L.; Hsu, H.F. (2000). Flavonoid content of several vegetables and their antioxidant activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80, 5 p. 561-566
- Clavin, M.L.; Gorzalczany, S.; Nino, J.; Kadarian, C.; Martino, V.; Ferrado, G.; Acevedo, C. (2000) Antinoceptive effect some Argentine medicinal species of *Eupatorium*. *Phytoterapy Research*, 14 (4):275-277.
- Conforti, F.; Statti, G.A.; Tundis, R.; Loizzo, M. R.; Menichini, F. (2007) In vitro Activities of *Citrus medica* L. vc. Diamante (Diamante citron) relevant to treatment of diabetes and Alzheimer's disease. *Phytother. Res.*, v. 21: p. 427-433.
- Conforti, F.; Statti, G.A.; Tundis, R.; Menichini, F.; Houghton, P. (2002) Antioxidant activity of methanolic extract of *Hypericum triquetrifolium*, *Turra aerial part*. *Fitoterapia* 73:479-483.
- Corrêa-Junior, C.; Ming, L.C.; Scheffer, M.C. (1994) Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas. 2a. ed. Jaboticabal: FUNEP, 162p.
- Cummings, J.L. (2000). Cholinesterase inhibitors: A new class of psychotropic compounds. *The American Journal of Psychiatry* 157: 4-15.
- Cronquist, A. (1981) An integrated system of classification of flowering plants. *Columbia University Press*. New York, 1262p.
- Cunha, T.M.; Verri, W.A.; Vivancos, G.G.; Moreira, I.F, Reis, S.; Parada, C.A, Cunha, F.Q.,; Ferreira, S.H. (2004) An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. *Braz J Med Biol Res* 37(3): 401 – 407.
- Curti, M.; Czepak, M.P.; Martins, J.M. (2003) Estruturação do jardim didático de plantas aromáticas, medicinais e condimentares, ocorrentes em Marechal Cândido Rondon- PR. In: *Simpósio Brasileiro de Plantas Medicinais: Diagnósticos e Perspectivas*. Instituto Agrônomo. Campinas, 62p.

- Czepak, M.P. (1998) Produção de óleo bruto e mentol cristalizável em oito frequências de colheita de menta (*Mentha arvensis* L.). Plantas medicinais, aromáticas e condimentares: avanços na pesquisa agrônômica. Botucatu: UNESP. 2:53-78.
- Davies, S.J.; Ashton, P.S. (1999) Phenology and fecundity in 11 sympatric pioneer species of *Macaranga* (Euphorbiaceae) in Borneo. *American Journal of Botany* 86:1786-1795.
- D'agostino, F.D.; Simone, A.; Dine, E.; Ramundo, F.; Zollo, M. (1990) Flavonol Glycosides from *Eupatorium tinifolium*. *Phytochemistry*, v.1, p. 353–354.
- D'amour, F. E. and Smith, D. L. (1941) A method for determining loss of pain sensation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 72:74-79.
- Diniz, M. de F.F.; Oliveira, R.A.G. de; Medeiros, A.C.D. de; Malta Junior, A. (1997) Memento fitoterápico: as plantas como alternativa terapêutica: conhecimentos populares e científicos. João Pessoa: Editora Universitária / UFPB, 205p.
- Dillon, M. O. (1980) Family Asteraceae - Part II. Tribe *Anthemideae*, In: *J. Macbride*, ed., Flora of Peru. Fieldiana, Bot. 21p.
- Dröge, W. (2002) Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiological Reviews Published*, v.1, n.82, p. 47-95
- Elsayed, N. M. (2001) Antioxidant mobilization in response to oxidative stress: a dynamic environmental: nutritional interaction. *Nutrition*, v.17, p.828-834
- Ellman G. L., Courtney K. D., Andres V. Jr., and Featherstone R. M. (1961), A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88-95.

- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA (1999) Centro Nacional de Pesquisa de Solo. *Sistema brasileiro de classificação de solos*. Brasília – DF,412p.
- Esteves, R.L. (2001) O gênero *Eupatorium* s.l (Compositae-Eupatorieae) no Estado de São Paulo Campinas. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas,314p.
- Evans, W.C. (1996) Trease and Evans' Pharmacognosy. 14 ed. London: WB Saunders Company, 612p.
- Farmacopéia Brasileira. (1988) 4. ed. São Paulo: Atheneu.525p.
- Fenner M. (1998) The phenology of growth and reproduction in plants. *Perspectives in Plant ecology, Evolution and Systematics* 1(1):78 - 91.
- Fernandes,I.M. (2011) Caracteres botânicos da espécie *Chromolaena maximiliani* (Sharad.) R.M. King & H. Rob. Monografia em Agronomia. Campos dos Goytacazes. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 36p.
- Fernández, T.; Zolezzi, P.C.; Risco, E.; Martino, V.; López,P.; Clavin, M.; Hnatyszyn, O.; Canigual, S.; Hajos, S.; Ferraro, G.; Alavarez, E. (2002) Immunomodulating properties of Argentine plants with ethnomedicinal use. *Phytomedicine*, 9:546-552.
- Ferreira, A.L.A; Matsubara, L.S. (1997) Radicais Livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v.43, n.1, p.61-68
- Francis P.; Palmer A.M; Snape M.; Wilcock G.K.(1999) The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 66:137-147.

- Frankie, G.W.; Baker, H.G.; Opler, P.A. (1974) Comparative phenological studies of trees in tropical wet and dry forests in the lowlands of Costa Rica. *Journal of Ecology* 62:881-913.
- Frozza, C. O. S.; Garcia, C. S. C.; Gambato, G.; Souza, M. D. O.; Salvador, M.; Moura, S.; Padilha, F. F.; Seixas, F. K.; Collares, T.; Borsuk, S.; Dellagostin, O. A.; Henriques, J. A. P.; Roesch-Ely, M.(2013) Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red própolis. *Food and Chemical Toxicology*, v. 52 , p. 137-142.
- Fuck, S.B.; Athanázio, J.C.; Lima, C.B.; Ming, L.C. (2005) Plantas medicinais utilizadas na medicina popular por moradores da área urbana de Bandeirantes, PR, Brasil. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, 26 (3): 291-296.
- Garcia, C.C.; Costa, B.J.; Vechiatto, W.W.D.; Zagonel, G.F.; Suchek, E.M.; Filho, N.R.A.; Leles, M.I.G. (2006) Estudo comparativo da estabilidade oxidativa de diferentes biodiesel por gravimetria e teste Rancimat. *Biodiesel*, 12:263-267.
- Ghelardini, C.; Galeotti, N.; Mannelli, L.C.; Mazzanti, G.; Bartolini, A. (2001) Local anaesthetic activity of β -caryophylleno. *Il Fármaco*, 56 (6):387-389.
- Gobbo-Neto, L.; Lopes, N.P.(2007) Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, 30 (2):374-81.
- Góes, A.C.A.M.; Rodrigues, L.V.; Menezes, D.B.; Grangeiro, M.P.F.; Cavalcante, A.R.M.S. (2005) Análise histológica da cicatrização da anastomose colônica, em ratos, sob ação de enema de Aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva* fr. all.) a 10%. *Acta Cir. Bras.* São Paulo, 20 (2): 112-116.
- Goldman, R.S.; Villa, N.; Oga, S. (1983) Efeitos cicatrizante e analgésico de *Symphytum officinale* L (confrei) e *Sedum praeltum* ADC (balsamo), em ratos. In: Simpósio Nacional de Farmacologia e Química De Produtos Naturais, 2.,

1983, *Anais do II Simpósio nacional de farmacologia e química de produtos naturais*. João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba, 7p.

González A.G.; Barrera J.B.; Díaz J.G.; Pérez E.M.R.; Yanes A.C.; Rauter P.; Pozo J.(1990) Diterpenes and other constituents of *Eupatorium salvia*. *Phytochemistry*, v.29, p.321-323.

Gott, R.M.; Tavares, W.S.; Pereira, A.I.A.; Teodoro, R.B.; Petacci, S.; Freitas, S.S. (2010) Potencial químico de plantas daninhas Asteraceae de campos rupestres de Diamantina, Minas Gerais. XXVII Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas 19 a 23 de julho de 2010 - Centro de Convenções - Ribeirão Preto – SP.

Goulart, M.F.; Lemos Filho, J. P.; Lovato, M.B. (2005) Phenological Variation Within and Among Populations of *Plathymenia reticulata* in Brazilian Cerrado, the Atlantic Forest and Transitional Sites. *Annals of Botany* 96: 445-455.

Grace, S.C.; Logan, B.A. (2000) Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, 355:1499-1510.

Guo, G.; Yang, J.; Li, Y.; Xu, J.; Jiang, J. (2002) Antioxidant activities of peel, pulp and seed of common on fruits as determined by FRAP. *Nutrition Reseearch*, v.23, p.1719

Habtermarian, S.; MacPherson, A.M. (2000) Cytotoxicity and antibacterial activity of ethanol extract from leaves of a herbal drug boneset (*Eupatorium perfoliatum*). *Phytoterapy Research*, 14 (7): 575-577.

Hafez, G.A. (1958) Effects of Some Essential Oil Vapors on the Stomata of *Eupatorium* and *Mentha*. *Plant Physiology*, May, 33 (3):177-181.

Handelman, G.J. (2001) The evolving role of carotenoids in human biochemistry. *Nutrition*, New York, v.17, n.10, p.818-822

- Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. (1997) *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3.ed. *New York: Oxford University*, 936p.
- Harborne, J.B.; Williams, C.A. (2000) Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, Oxford, v. 52, p. 481-504
- Harper, J.L. (1977) *Population biology of plants*. Londres *Academic Press*, 892p.
- Herz, W.; Kulantaivel, P. (1982) Flavones from *Eupatorium leucolepis*. *Phytochemistry*, v.21, n.9, p.2363–2366
- Howe, H. F.; Smallwood, J. (1982) Ecology of seed dispersal. *Annual Review of Ecology and Systematic* 13:201-228.
- Irth, H.; de Jong, C. F.; Derks, R. J.E.; Bruyneel, B.; Niessen, W.(2006) Highperformance liquid chromatography–mass spectrometry-based acetylcholinesterase assay for the screening of inhibitors in natural extracts. *Journal of Chromatography A*, 1112 303–310
- Janssen, P. A.; Niemegeers, C. J. and Dony, J. G. (1963) The inhibitory effect of fentanyl and other morphine like analgesics on the warm water induced tail withdrawal refl ex in rats. *Arzneim. Forsch.* 13:502-507.
- Jena, P.K.; Chakraborty, A.K. (2010) Evaluation of analgesic activity studies of various extracts of leaves of *Eupatorium odoratum* Linn. *International Journal Of Pharmacy eTechnology*.v.2, n.3, p.612-616.
- Jensen, K.; Andersen, H.O.; Olesen, J.; Lindblom, U. (1986) Pressurepain threshold in human temporal region. Evaluation of a new pressure algometer. *Pain* 25(3): 313 – 323.
- Jeffrey, C. (1978) *Arterales: Flowering plants of the world*. Oxford: *Oxford University Press*.

- Joly, A. B.(1979) *Botânica: introdução à taxonomia vegetal*. 12 ed. São Paulo: Nacional, 777p.
- Jung, S. (2004) Effect of chlorophyll reduction in *Arabidopsis thaliana* by methyl jasmonate or norflurazon on antioxidant systems. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42:225- 231.
- Kasa, P.; Rakonczay, Z.; Gulya, K. (1997). The cholinergic system in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* 52:511-535.
- Kasabri, V.; Flatt, P.R.; Abdel-Wahab, Y. (2010) *Terminalia bellirica* estimula a secreção e ação da insulina e inibe digestão de amido e glicação de proteínas *in vitro*. *British Journal of Nutrition*, 103:212-217.
- King, R.M.; Robinson, H. (1987) The genera of the Eupatorieae (Asteraceae). *St. Luis: Missouri Botanical Garden*, 581p.
- Koster, R.; Anderson, M.; De Debeer, E.J. (1959) Acetic acid for analgesic screening. *Fed Proc* 18:412-418.
- krishnaraju, A.V.; Rao, T.V.N.; Sundararaju, D.; Vanisree, M.; Tsay, H.S.; Subbaraju, G.V.(2005) Assessment of bioactivity of indian edicinal plants using rine shrimp (*artemia salina*) lethality assay; *International Journal of Applied cience and Engineering*. 7p.
- Kuraishi, Y.; Harada, Y.; Aratani, S.; Satoh, M.; Takagi, H. (1983) Involvement of the spinal noradrenergic and serotonergic systems in morphine analgesia: the differences in mechanical and thermal algesic tests. *Brain Res* 273: 245-252.
- Lane, M.L.; Potikin, S.G.; Enz, A. (2005) Targenting acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in dementia. *International journal of Neuropsychopharmacology*, 9:1-24.

- Law, B.; Mackowski, C.; Schoer, L.; Tweedie, T. (2000) Flowering phenology of myrtaceous trees and their relation to climatic, environmental and disturbance variables in northern New South Wales. *Austral Ecology* 25:160-178.
- Leal, T.C.A.B; Freitas, S.P; Silva, J.F; Carvalho, A.J.C. (2003) Produção de biomassa e óleo essencial em plantas de capim cidreira *Cymbopogon citratus* (Dc.) Stapf. *Rev. Bras. Pl. Med. Botucato*, 5 (2): 61-64.
- Le Bars D.; Gozariu M.; Cadden S.W. (2001) Animal models of nociception. *Pharmacol Rev* 53(4): 597 – 652.
- Lemos Filho, J.P.; Menconça Filho, C.V. (2000) Seasonal changes in the water status of three woody legumes from the Atlantic Forest, Caratinga, Brazil. *Journal of Tropical Ecology* 16:21-32.
- Le Van,N.; Phan, T.V.C. (1979) Two new flavones from *Eupatorium coelestinum*. *Phytochemistry*, v.18, n.11, p. 1859–1861
- Levey, D.J. (1988) Spatial and temporal variation in Costa Rican fruit and fruit-eating bird abundance. *Ecological Monographs* 58:251-269.
- Li, Y. L; Craker, L. E; Potter, T. (1996) Effect of light level on essential oil production of sage (*Salvia officinalis*) and thyme (*Thymus vulgaris*). *Acta Horticulturae* v.426, p.419-42
- Lieth, H. (1974) Introduction to phenology and the modeling of seasonality. Phenology and seasonality modeling.(ed.). Ecological Studies 8. Springer-Verlag, Berlin.19p.
- Lima, N.M.F.; Santos, A.F.; Profírio, Z.; Goulart, M.O.F.; Sant'ana, A.E.G. (2002) Toxicity of lapachol and their potassium salts against *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni* cercariae, *Artemia salina* and *Tilapia nilotica*. *Acta Trop* 83: 43-47.

- Liu, R.H. (2007) Whole grain phytochemicals and health. *Journal of Cereal Science*, v.46, p.207-219
- Lobstein, A.; Jako, L.R.; Berrurier, M.H.; Anton, R. (1991) Seasonal variations of the flavonoid content from *Ginkgo biloba* leaves. *Plant Med.*, 57:430-433.
- Loeser, J.D.; Treede, R.D. (2008) The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. *Pain*, 137: 473-7.
- López,C.A.A. (2006) Considerações gerais sobre plantas medicinais. *Ambiente: Gestão e Desenvolvimento*, 1(1):19-27.
- Lorenzetti, B.B.; Souza, G.E.; Sarti, S.J.; Santos Filho, D.; Ferreira, S.H. (1991) Myrcene mimics the peripheral analgesic activity of lemongrass tea. *J. Ethnopharmacol*, 34:43-48.
- Lorenzi, H. (2008) *Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais*. Nova Odessa: Plantarum, 640p.
- Lorenzi, H.; Matos, F.J.A. (2002) *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas*. Nova Odesa. Instituto Plantarum. 512p.
- MacArthur, R.H.; Wilson, E.O. (1967) The theory of island biogeography. Princeton, New Jersey: *Princeton University Press*. 203p.
- Mcbride, J. M., Kraemer, W. J., Triplett-Mcbride, T. & Sebastianelli, W..(1998) Effect of Resistance Exercise on Free Radical Production. *Med. Sci. Sports Exerc Sci. Sports Exerc Sci. Sports Exerc.*, v.30, n.1, p.67-72..
- Machado, C.X. (2005) Tomate: o papel do licopeno na proteção antioxidante. (Monografia da disciplina Estresse Oxidativo em Sistemas Biológicos) - Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/LEO/monografiaTomateclaudio.pdf>> Acesso em: 28/04/12.

- Maciel, M.A.M.; Pinto, A.C.; Veiga Junior, V.F. (2002) Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Quim. Nova*, 25 (3):429-438.
- Maguire, J.D. (1962) Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science*, Madison, 2 (1):176-177.
- Marco, G. (1968) A rapid method for evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 45:594- 598.
- Martson,A.; Kissiling, J.; Hostettmann, K. (2002) A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in plants. *Phytochemical Analysis*. 13:51-54.
- Maluf, A.M.; Wizenier, B. (1998) Aspectos fenológicos e germinação de sementes de quatro populações de *Eupatorium vauthierianum* DC. (Asteraceae). *Revista Brasileira de Botânica*. 21(3):247-251.
- Martin-Gajardo, I.S.; Morellato, L.P. (2003) Inter and intraspecific variation on reproductive phenology of the Brazilian Atlantic forest Rubiaceae: ecology and phylogenetic constraints. *Revista de Biologia Tropical* 51(3):1-8.
- Martins ER; Castro DM; Castellani DC; Dias JE. (1995) *Plantas medicinais*. Viçosa: UFV, Imprensa universitária. 22p.
- Marston, A.; Kissling, J.; Hostettmann, K. (2002) A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in plants. *Phytochemical Analysis*, 13:51-54.
- Mclaughlin,J.L, Saizarbitori, T.C, Anderson, J.E. (1995) Tres bioensayos simples para quimicos de productos naturales. *Rev Soc Venez Quim* 18:13-18.
- Melo, A.S. (2012) *Avaliação neurocomportamental, antinociceptiva e antioxidante do extrato hidroalcoólico de Eupatorium ayapana Vent (Asteraceae)*

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúd. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas,108p.

Melo, M.T.P.; Ribeiro, J.M.; Meira, M.R.; Figueiredo, L.S.; Martins, E.R. (2011) Teor de óleo essencial de alecrim-pimenta em função do horário de colheita. *Ciência Rural*, 41 (70):1166-1169.

Mesquita, A.A.L.; Corrêa, D.B.; Pádua, A.P.; Guedes, M.L.O.; Gottlieb, O.R. (1996). Flavonoids from four compositae species *Phytochemistry*, v.25, n.5, p.1255-1256

Meyer, B.N.; Ferrigni, N.R.; Putnam, J.E. (1982) "Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents"; *Planta Medica*, 45:31- 34.

Metcalf, C.R., Chalk, L. (1988) *Anatomy of the dicotyledons: systematic anatomy of the leaf and stem*. ed. Oxford: Clarendon Press, 1: 269-276.

Michaelis, M.L. (2003). Drugs Targeting Alzheimer's Disease: Some Things Old and Some Things New. *J Pharm Exper Ther.*, 304: 897-904.

Miller, H.E. (1971) A simplified method for the evaluation of antioxidant. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 48:91.

Monasterio, M.; Sarmiento, G. (1976) Phenological strategies of plant species in the tropical savanna and semi-deciduous forest of the Venezuelan Llanos. *J. Biog.* 3:325-356.

Mongelli, E.; Martino, V.; Coussio, J.; Ciccía, G. (1996) Screening of Argentine medicinal plants using the brine shrimp microwel cytotoxicity assay. *Pharmaceutical Biology* (Formerly International Journal of Phamacognosy), 34 (4):249-254.

- Mongelli, E.; Pampurso, S.; Coussio, J.; Salomon, H.; Ciccía, G.(2000) Cytotoxic and DNA interaction activities of extracts from medicinal plants used in Argentina. *Journal of Ethnopharmacology*, 71:145-151.
- Morais, L.A.S. (2009) Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. *Horticultura Brasileira*. 27 (2):4050-4063.
- Moreira, H.J.C., Bragança, H.B.N. (2010) *Manual de Identificação de Plantas Infestantes Cultivos de Verão*. Campinas,São Paulo, 642p.
- Morellato, L.P.C.; Talora, D.C.; Takahasi, A.; Bencke, C.C.; Romera, E.C. & Ziparro, V.B. (2000) Phenology of Atlantic Rain Forest Trees: A Comparative Study. *Biotropica* 32:811-823.
- Muschietti L, Martino V, Ferraro G, Coussio J. (1994) 5,7,5'-Trihydroxy-3,6,2',4'-tetramethoxyflavone from *Eupatorium buniifolium*. *Phytochemistry* v.36, n.1085-1086, 1994
- Nascimento, F.G. (2008) Avaliação qualitativa e quantitativa por CLAE de iridóides na *Allamanda schottii*. Dissertação de mestrado. Universidade do Vale do Itajaí.89p.
- Nascimento, I.B.; Innecco, R.; Matos, S.H.; Borges, N.S.S.; Marco, C.A. (2006) Influência do horário de corte na produção de óleo essencial de capim santo (*Andropogum* sp.). *Revista Caatinga* 19:123-127.
- Negri, G. (2005) Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 41 (2):121-142.
- Nunes, C.R.; Marsiglia, J.D.C; Batitucci, M.C.P. (2008) Avaliação do efeito mutagênico do extrato hidroalcolico bruto de *Eupatoruim maximilianii*. *Resumos do 54º Congresso Brasileiro de Genética*, 16 a 19 de setembro de 2008 . Bahia Othon Palace Hotel - Salvador - BA. Brasil.

- OECD. (1995) Organisation for Economic Co-operation and Development. *Guideline 407: Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodent*. Acessado em 18 de dezembro 2008 em <<http://www.oecd.org/publications>>. Paris: Head of Publications Service.
- OECD. (2001) Guideline 423: Acute Oral Toxicity -Acute Toxic Class Method. Acessado em 18/04/2012 em <http://www.oecd.org/publications>. Paris: Head of Publications Service.
- Oliveira, R.B.; Costa, E.A.; Valadares, M.C.; Cunha, L.C. (2005) Avaliação das atividades anti-inflamatória e analgésica de extrato de *Synadenium umbellatum* *Revista Eletrônica de Farmácia Suplemento*, 2 (2):137-139.
- Oliveira, E.C. (1993) Morfologia de plântulas . In Sementes florestais tropicais. *Editora Abrates*. Brasília. 175-214p.
- Oliveira, A.R.M.F. (2011) Produção de óleo essencial de *mentha x piperita* var. *Citrata* sob diferentes condições de manejo. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Santa Cruz. Ilhéus- BA. Brasil.83p.
- Opler, P.A., Frankie, G.W.; Baker, H.G. (1976) Rainfall as a factor in the release, timing and synchronization of anthesis by tropical trees and shrubs. *Journal of Biogeography* 3:231-236.
- Palá-Paúl, J.; Pérez-Alonso, M. J.; Velasco-Negueruela, A.; Palá-Paúl, R.; Sanz, J.; Conejero, F.(2001) *Biochem. Syst. Ecol.*, 29:663-681.
- Paolini, J.; Costa, J.; Bernardini, A.F. (2005) Analylis of the essential oil from aerial parts of *Eupatorium cannabinum* subsp. *Corsicum* (L.) by gas chromatography with electron impact and chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1076:170-178.

- Paulus, D.; Medeiros, S.L.P.; Santos, O.S.; Paulus, E. (2008) Solução nutritiva para produção de menta em hidroponia. *Horticultura Brasileira* 26:61-67.
- Pereira, M.E.; Adams, A.I.H.; Silva, N.S. (2004) 2,5 hexadione inhibits rat brain acetylcholinesterase *in vitro*. *Toxicology Letters*. 146:269-274.
- Perez E.; Rodríguez-Mlaver A.; Padilla N.; Medina-Ramirez G.; Laenna E. (2003). Antioxidant capacity of seaweed extracts on superoxide anion, hydroxyl radical and radicals generated by UV-light. *Free Rad Biol Med* 35(Suppl. 1): 117
- Pietta, P.. (2000) Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, v.63, p.1035
- Pinto, J.E.B.P.; Bertolucci, S.K V. (2002) *Cultivo e processamento de plantas medicinais*. Lavras: UFLA/Faepe.169p.
- Pinto, W.B.V.R.; Ko, G.M. (2012) Teste de rota rod: contribuições no estudo das doenças neuromusculares, das síndromes extrapiramidais e das ataxias cerebelares. *RESBCAL*, São Paulo, v.1 n.2, p. 202-212.
- Pio-Corrêa, M. (1984). *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas*. Rio de Janeiro: IBDF.4330p.
- Pires P.A.; Malvar, D. do C.; Blanco, I. Das C.; Vignoli, T.; Cunha, A.F. da; Vieira, E.; Dantas, T.N. de C.; Maciel, M.A.M.; Côrtes, W. da S. e Vanderlinde, F.A. (2004) Estudo das atividades analgésicas do extrato metanólico da *Capsicum frutescens* – Solanaceae (Pimenta malagueta). *Revista Universidade Rural: Série Ciências da Vida*, Seropédica, RJ: EDUR, 24 (2):129-134.
- Pompella, A. (1997) Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation. *International Journal of Vitamin and Nutrition Research*, Bern, v.67, n.5, p.289-297

- Poulsen, H.E., Prieme, H., Loft, S. (1998) Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion. *European Journal of Cancer Prevention*, Oxford, v.7, n.1, p.9-16
- Posse, J.C. (2007) Plantas medicinais utilizadas pelos usuários do SUS nos bairros de Paquetá e Santa Teresa: uma abordagem etnobotânica. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Rio de Janeiro/UFRJ.
- Ramírez, N. (2002) Reproductive phenology, life-forms, and habitats of the Venezuelan Central Plain. *American Journal of Botany* 89 (5):836-842.
- Rathcke, B. (1983) Competition and facilitation among plants for pollination. In: Real, L. (ed.). *Pollination biology*. Academic Press, Orlando, Florida, USA. p.305-329 .
- Rathcke, B.; Lacey, E.P. (1985) Phenological patterns of terrestrial plants. |*Annual Review of Ecology and Systematics*, 16:179-214.
- Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. (1999) Antioxidant activity applying and improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biological Medicine*, 26 (9):1231-1237.
- Reist, M.; Di Giovanni, S.; Borloz, A.; Urbain, A.; Marston, A.; Hostettmann, K.; Carrupt, P. A.(2008) In vitro screening assays to identify natural or synthetic acetylcholinesterase inhibitors: Thin layer chromatography versus microplate methods. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. n. 33, p.109–119.
- Rhee, I. K.; Van De Meent, M.; Ingkaninan, K.; Verpoorte, R. (2001) Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. *Journal of Chromatography A*, 915 217–223

- Rhee, I. K.; Van Rijn, R. M.; Verpoorte, R. (2003) Qualitative Determination of Falsepositive Effects in the Acetylcholinesterase Assay using Thin Layer Chromatography. *Phytochem. Anal.* 14, 127–131.
- Resende, M.L.V.; Costa, J.C.B.; Cavalcanti, F.R.; Ribeiro Júnior, P.M.; Camilo, F.R. (2007) Seleção de extratos vegetais para indução de resistência e ativação de respostas de defesa em cacaueteiro contra a vassoura-de-bruxa. *Fitopatol. Bras.* 32(3).213-221.
- Ribeiro, J.F.; Castro, L.H.R. (1986) Método quantitativo para avaliar características fenológicas em árvores. *Revta brasil. Bot.* 9:7-11.
- Rigotti, M. (2009) Plantas medicinais invasoras. Disponível em <<http://www.artigonal.com/medicina-alternativa-artigos/plantas-medicinais-invasoras-4555243.html>>, acessado em 20/04/2012.
- Rios, J.B.; Trevisan, M.T.S. (2009) Dinâmica Circadiana no Teor de Terpinen-4-ol de Óleo Essencial de *Alpinia zerumbet*. *32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*. Fortaleza-CE.
- Roca-Pérez, L.; Boluda R.; Gavidia I; Pérez-Bermúdez P. (2004) Seasonal cardenolide production and Dop5 β r gene expression in natural populations of *Digitalis obscura*. *Phytochemistry*, Leiden, 65:1869-1878.
- Rocha, A.A. (2006) Obtenção e avaliação das atividades analgésica e antiinflamatória do extrato hidroalcoólico bruto da arnica brasileira (*Solidago microglossa*, DC). Dissertação de mestrado em promoção de saúde. Universidade de Franca.
- Roginsky, V.; Lissi, E. A. (2005) Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*. 92: 235-254.
- Rosemann, D.; Heller, W.; Sandermanann, H. (1991) Biochemical plant responses to ozone. *Plant. Physiol.* 97:1280-1286.

- Rueda, S.D.; Melgarejo, C.Y.C.; Morales, J.M.; Stashenko, E.E. (2007) Estudio de la variación circadiana de los metabolitos secundarios volátiles obtenidos por destilación – extracción con solvente simultánea, de hojas de *lippia alba* (fam. verbenaceae). *Scientia et Technica* Año XIII, n. 33
- Santos, M.V., Freitas, F.C.L., Ferreire, F.A., Viana, R.G., Tuffi Santos, L.D., Fonseca, D.M. (2006) Eficácia e persistência no solo de herbicidas utilizados em pastagem. *Planta Daninha*, 24:5-10.
- Sato, M.E.; Moreira, E.A.(1985) Flavonóides em *Eupatorium littorale* Cabrera. *Curitiba: Tribuna Farmacêutica*, v. 53, n. 1, p. 13-27.
- Scheffer, M.C. (1989) Recomendações técnicas para o cultivo das plantas medicinais selecionadas pelo projeto de fitoterapia do SUDS/PR. Curitiba: Secretaria do Estado de Saúde. Fundação Caetano Munhoz da Rocha. Projeto de Fitoterapia. 8p.
- Schmidt, T.T.; Bomme, U.; Alfermann, A.W. (1998) Sesquiterpene lactone content in leaves of in vitro and field cultivated *Arnica Montana*. *Planta. Med.* 64 (3):268-270.
- Schneider, G.L. (2005) Caracterização dos óleos voláteis de *Eupatorium laevigatum* e *Baccharis punctulata* juntamente com a investigação de sua atividade antioxidante. Disponível em <http://hdl.handle.net/10183/38906> : Acessado em 12 de abril de 2012.
- Seidl, C. (2010) Pesquisa de substâncias naturais inibidoras da acetilcolinesterase. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná/PR.
- Shami, N.J.I.E.; Moreira, E.A.M. (2004) Licopeno como agente antioxidante. *Rev. Nutr.*, 17 (2):227-236.

- Sharma, O.P.; Dawra, R.K.; Kurade, N.P.; Sharma, P.D. (1998) A review of the toxicosis and biological properties of the genus *Eupatorium*. *Natural Toxins*, 6 (1):1-14.
- Silva, K.L.; Filho, V.C. (2002) Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico. *Quim. Nova*, 25 (3):449-454.
- Silva, A.F. (2000) Teor de óleo essencial de manjeriço (*Ocimum basilicum*) em diferentes épocas e horários de colheita. In: Simpósio de plantas medicinais no Brasil, 16. Recife, Resumos76p.
- Silva, F. da.; Santos, R. H. S.; Dinez, E. R.; Barbosa, L. C. A.; Casali, W. V. D.; Lima, R. R. de. (2003) Teor e composição do óleo essencial de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) em dois horários e duas épocas de colheita. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Botucatu, 6 (1):33-38.
- Simões, C.M.O. Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.A.; Petrovick, P.R. (2003) Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. ed. Porto
- Soares, K.C.N. (2008) Estudo do efeito vasorrelaxante e hipotensor do extrato hidroalcoólico da *polygala paniculata* L. em ratos. Dissertação de mestrado em farmacologia. Universidade Federal do Paraná-UFPR, 81p.
- Sokal, R.; Rohlf, F.J. (1995) *Biometry*. 3 ed. New York: WH Freeman and Co.
- Southwell IA; Bourke CA. (2001) Seasonal variation in hypericin content of *Hypericum perforatum*. L. *Biochemical Systematics and Ecology* 56:437-441.
- Souza, C.D.; Felfili, J.M. (2006) Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. *Acta bot. bras.* 20 (1):135-142.
- Souza, T.J.T.; Apel, M.A.; Bordignon, S.; Matzenbacher, N.I.; Zuanazzi, J.A.S.; Henriques, A.T. (2007). Composição química e atividade antioxidante do óleo volátil de *Eupatorium polystachyum* DC. *Rev Bras Farmacogn* 17:368-372.

- Souza, T.J.T. (2007) Determinação da composição química e avaliação preliminar das atividades antioxidante e anticolinesterásica dos óleos voláteis de espécies de *Eupatorium* L. (Asteraceae). Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 258p.
- Stefanini, M.B.; Rodrigues, S.D.; Ming, L.C. (2002) Ação de fitorreguladores no crescimento da erva-cidreira-brasileira. *Horticultura Brasileira*, Brasília, 20 (1): 18-23.
- Stone, J.L. (1996) Components of pollination effectiveness in *Psychotria suerrensis*, a tropical distylous shrub. *Oecologia* 107:504-512.
- Stevens J. F., Elema E. T. and Wollenweber E. (1995), Exudate flavonoids of *Eupatorium cannabinum*. *Biochem.Syst. Ecol.* 23, 451-452.
- Stratil, P.; Klejdus, B.; Kuban, V. (2006) Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables evaluation of spectrophotometric methods. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, Washington, 54 (3):607-616.
- Suzuki, S. (1998) Leaf phenology, seasonal changes in leaf quality and herbivory pattern of *Sanguisorba tenuifolia* at different altitudes. *Oecologia* 117:169-176.
- Talapatra, S.K.; Pal, M.K.; Mallik, A.K.; Talapatra, B. (1982) Chemical Constituents of *Eupatorium erythropappum* : Eupathronoside – A New Flavanone Glucoside and (-)- 1S,2R,4S,5R-2,5-Dihydroxy-p-menthane – A New Monoterpene Diol«. *Journal of the Indian Chemical Society*, 62 (12), 999-1002
- Talora, D.C.; Morellato, L.P.C. (2000) Fenologia de espécies arbóreas em floresta de planície litorânea do sudeste do Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 23 (1):13- 26.
- Tori, M.; Ohara, Y.; Nakashima, K.; Sono, M. Thymol (2001) Derivaties from *Eupatorium fortunei*. *Journal of Natural Products*, 64:1048-1051.

- Toy, R.J.; Marshall, A.G.; Pong, T.Y. (1992) Fruiting phenology and the survival of insect fruit predators: a case study from the South-east Asian Dipteroocarpaceae. *Philosophical Transactions of the Royal Society* 335:417-423.
- Trevisan, M.T.S.; Bezerra, M.Z.B.; Santiago, G.M.P.; Feitosa, C.M. (2006) Atividades larvicida e anticolinesterásica de plantas do gênero *kalanchoe*. *Quim. Nova*, 29 (3):415-418.
- Trindade, M.P.; Fonseca, L.; Juiz, P.J.L. (2009) Atividade antimicrobiana da tintura da casca de romã (*Punica granatum*) sobre cepas de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*: estudo *in vitro*. *Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde*. 11 (4):49-54.
- Van Schaik, C.P.; Terborgh, J.W.; Wright, S.J. (1993) The phenology of tropical forests: adaptive significance and consequences for primary consumers. *Annual Review of Ecology and Systematics* 24:353-377.
- Vasqu ez-Flota, F.; Carrilo-Pech, M.; Minero-Garcia, Y.; Miranda-Ham, M.L. (2004) Alkaloid metabolism in wounded *Catharanthus roseus* seedlings. *Plant Physiol. Biochem.* 42:263-628.
- Vega, M.R.G. (2007) Constituintes químicos e atividade biológica de *Eupatorium macrocephalum* Less (Asteraceae) e *Annona dióica* St. Hill (Annonaceae): Uma contribui o ao estudo de plantas medicinais no Paraguai. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Instituto de Ciências Exatas. Programa de Pós Gradua o em Química Orgânica. Seropédica, Rio de Janeiro, 109p.
- Vinutha, B. et al. (2007) Screening of selected Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v.109, p.359-63.
- Voirin, B.; Brun, N.; Bayet, C. (1990) Effects of daylength on the monoterpene composition of leaves of *Mentha x piperita*. *Phytochemistry*, 29 (3):749-755.

- Wallaart, T.E.; Pras, N.; Beekman, A.C.; Quax, W.J. (2000) Seasonal variation of artemisinin and its biosynthetic precursors in plants of *Artemisia annua* of different geographical origin: proof for the existence chemotypes. *Planta Med.*, 66:57-62.
- Wallace, R.B.; Painter, R.L. (2002) Phenological patterns in a southern Amazonian tropical forest: implications for sustainable management. *Forest Ecology and Management* 160:19-33.
- Wienecke, T.; Olesen J.; Peter S.; Oturai B. & Ashina; M. (2008) Prostacyclin (epoprostenol) induces headache in healthy subjects. *Pain*, 139:106-116.
- Woolfe, G.; Macdonald, A. D. (1944) The evaluation action of pethidine hydrochloride. *J. Pharmacol. Ther.* 80:300-307.
- Yaksh TL, Rudy TA (1977). Studies on direct spinal action of narcotics in production of analgesia in rat. *J Pharmacol Exp Ther* 202: 411-428
- Yu, T.W., Anderson, D. (1997) Reactive oxygen species-induced DNA damage and its modification: a chemical investigation. *Mutation Research*, Amsterdam, v.379, n.2, p.201-210.
- Yunjong L.; Chang-Hun L.; Uhtaek H. (2005) Painful channels in sensory neurons. *Molecular and Cells*, vol. 20, N° 3, p. 315-324.
- Zamith, L.R.; Scarano, F.R. (2004) Produção de mudas de espécies das Restingas do município do Rio de Janeiro, RJ, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*. 18 (1):161-176.
- Zhang ML, Wu M, Zhang JJ, Irwin D, Gu YC, Shi QW (2008) Chemical constituents of plants from the genus *Eupatorium*. *Chem Biodivers* 5: 40-55

