

Larissa Gabriela Faqueti

**QUANTIFICAÇÃO POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE
ULTRA EFICIÊNCIA DE MARCADORES PRESENTES NO
EXTRATO AQUOSO DE *Ageratum conyzoides* L.
(ASTERACEAE).**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Farmácia, sob orientação da Profa. Dra. Maique Weber Biavatti.

Florianópolis
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Faqueti, Larissa Gabriela
QUANTIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA
EFICIÊNCIA DE MARCADORES PRESENTES NO EXTRATO AQUOSO DE
Ageratum conyzoides L. (ASTERACEAE). / Larissa Gabriela
Faqueti ; orientadora, Maique Weber Biavatti -
Florianópolis, SC, 2016.
143 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-
Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Farmácia. 3. Ageratum conyzoides. 4.
Asteraceae. I. , Maique Weber Biavatti. II. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Farmácia. III. Título.

Aos meus pais *João Calixto Faqueti* e *Açoely Benevenuti Faqueti*,

Meus melhores e mais brilhantes mestres.
Ensinaram-me que como ser humano inacabado, posso ir sempre além.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof.^a Dra. Maique Weber Biavatti que prestou todo o suporte necessário para a realização deste trabalho, além de toda a sua dedicação e amizade.

À UFSC, ao Programa de Pós-graduação em Farmácia e à todos os professores pelos valores e ensinamentos compartilhados durante esta trajetória.

À CAPES por conceder a bolsa de estudos para a realização do mestrado.

Aos professores Dr. Alexios Skaltsounis e Dra. Maria Halabalaki pela oportunidade de intercâmbio à Universidade de Atenas e ao Dr. Vincent Briudes por toda a confiança, atenção e receptividade durante o período que trabalhamos juntos nesta universidade.

Ao professor Dr. Andersson Barison e ao Alan Diego Conceição dos Santos, da Universidade Federal do Paraná, que colaboraram na realização das análises de RMN.

Ao professor Dr. Louis Pergaud Sandjo que gentilmente auxiliou na realização e no processamento das análises de EM.

Aos colegas e amigos de laboratório pelos bons momentos que partilhamos durante esses dois anos de convívio diário.

Ao Layzon Antonio Lemos da Silva pelo carinho e colaboração em todos os momentos.

À minha família por todo o incentivo, amor e por acreditarem no meu potencial, muito obrigada.

Agradeço acima de tudo à Deus pelo dom da vida e à todos os anjos que me guiaram por esta importante jornada.

“Se, na verdade, não estou no mundo para simplesmente a ele me adaptar, mas para transformá-lo; se não é possível mudá-lo sem um certo sonho ou projeto de mundo, devo usar toda possibilidade que tenha para não apenas falar de minha utopia, mas participar de práticas com ela coerentes.”

Paulo Freire

RESUMO

A espécie *Ageratum conyzoides* L., conhecida popularmente como mentrasto, é amplamente utilizada na medicina popular de regiões tropicais e subtropicais do mundo devido as suas propriedades anti-inflamatória, antinociceptiva e antibacteriana. Entre os metabólitos secundários identificados nesta espécie estão flavonoides, cumarinas, cromenos, alcaloides e ácidos fenólicos. Com a finalidade de avaliar a composição qualitativa e quantitativa da preparação de uso medicinal (chá) de *A. conyzoides*, o presente trabalho teve por objetivo desenvolver e validar um método analítico por CLUE-DAD para quantificação das principais classes de substâncias presentes no extrato aquoso desta espécie. As análises qualitativas permitiram a identificação de dezessete substâncias no extrato aquoso: alcaloides pirrolizidínicos, ácidos fenólicos, cumarinas e metoxiflavonas. O método analítico foi desenvolvido utilizando coluna Acquity UPLC BEH C₁₈ (150 mm x 2,1 mm i.d.; 1,7 µm), 25 °C, fluxo de 0,25 ml/min com detecção DAD monitorada em 275 e 330 nm. A fase móvel foi composta por água acidificada (0,1% de ácido fórmico) e acetonitrila em sistema gradiente com tempo de análise de 25 minutos. O método foi validado segundo normas oficiais, demonstrando ser específico, linear, preciso, exato e sensível para a quantificação de ácido clorogênico, ácido cumárico, cumarina (1,2-benzopiranona), 5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavona, nobiletina, 5'-metoxinobiletina e eupalestina no extrato aquoso de *A. conyzoides*. Além disso, o método apresentou-se indicativo de estabilidade para os marcadores testados nas condições do estudo de degradação forçada. Por conseguinte, foi possível desenvolver e validar um simples e rápido método analítico para quantificação dos principais marcadores do extrato aquoso de *A. conyzoides*, podendo ser aplicado no controle de qualidade de preparações desta espécie.

Palavras-chave: *Ageratum conyzoides*, CLUE, ácidos fenólicos, cumarina, metoxiflavonas.

ABSTRACT

Quantification by ultra performance liquid chromatography of markers contained in the aqueous extract of *Ageratum conyzoides* (ASTERACEAE)

Ageratum conyzoides L. is a plant widely used in traditional medicine in tropical and subtropical regions of the world due to its anti-inflammatory, antinociceptive and antibacterial properties. Among the secondary metabolites identified in this specie are flavonoids, coumarins, chromenes, alkaloids and phenolic acids. In order to evaluate the qualitative and quantitative composition of the preparation for medicinal use (tea) from *A. conyzoides*, the present work had the aim of develop and validate an analytical method by UPLC-PDA for quantification of the mains classes of compounds found in the aqueous extract of this specie. The qualitative analyses allow the identification of seventeen compounds in the aqueous extract: pyrrolizidine alkaloids, phenolic acids, coumarins and methoxyflavones. The analytical method was developed using an Acquity UPLC BEH C₁₈ column (150 mm x 2.1 mm i.d.; 1.7 µm), 25 °C, at a flow rate of 0.25 ml/min with PDA detection on 275 and 330 nm. The mobile phase consisted of 0.1% formic acid aqueous solution and acetonitrile in a gradient system, with 25 minutes analysis. The method was validated according to official guidelines, demonstrating to be specific, linear, precise, accurate and sensitive for the quantification of chlorogenic acid, coumaric acid, coumarin (1,2-benzopyranone), 5,6,7,3',4',5'-hexamethoxyflavone, nobiletin, 5'-methoxynobiletin and eupalestin in the aqueous extract of *A. conyzoides*. Furthermore, the method proved to be stability-indicating for the tested markers at the forced degradation study conditions. Therefore, it was possible to develop and validate a simple and rapid analytical method to quantify the mains markers in *A. conyzoides* aqueous extract, which can be applied at the quality control of these specie preparations.

Keywords: *Ageratum conyzoides*, UPLC, phenolic acids, coumarin, methoxyflavones.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Partes aéreas de <i>Ageratum conyzoides</i> L. (Asteraceae)	32
Figura 2 – <i>Ageratum conyzoides</i> L. (Asteraceae)	33
Figura 3 – Cromenos, benzofurano, cromona e cromonona isolados do óleo essencial de <i>A. conyzoides</i> .	34
Figura 4 – Cromenos isolados do extrato de <i>n</i> -hexano das partes aéreas de <i>A. conyzoides</i>	35
Figura 5 – Metoxiflavonas isoladas de <i>A. conyzoides</i>	36
Figura 6 – Flavonoides hidroxilados isolados de <i>A. conyzoides</i>	37
Figura 7 – Outras substâncias isoladas de <i>A. conyzoides</i>	38
Figura 8 – Cromatograma de picos base obtido por <i>ESI(+)</i> do extrato aquoso de <i>A. conyzoides</i> injetado conforme as condições descritas no item 4.3.	59
Figura 9 – Cromatograma de picos base obtido por <i>ESI(-)</i> do extrato aquoso de <i>A. conyzoides</i> injetado conforme as condições descritas no item 4.3..	60
Figura 10 – Mecanismo de fragmentação da substância licopsamina	64
Figura 11 – Mecanismo de fragmentação da substância licopsamina <i>N</i> -óxido	65
Figura 12 – Mecanismo de fragmentação em modo positivo da substância ácido cumárico <i>O</i> -glicosídeo	65
Figura 13 – Mecanismo de fragmentação em modo negativo da substância ácido cumárico <i>O</i> -glicosídeo	66
Figura 14 – Mecanismo de fragmentação em modo negativo da substância ácido cumárico	67
Figura 15 – Mecanismo de fragmentação em modo positivo da substância ácido cumárico	67
Figura 16 – Mecanismo de fragmentação em modo positivo da substância cumarina	68
Figura 17 – Mecanismo de fragmentação em modo negativo da substância ácido clorogênico	69
Figura 18 – Mecanismo de fragmentação em modo negativo da substância ageconiflavona C	70
Figura 19 – Mecanismo de fragmentação em modo positivo da substância ageconiflavona C	70

Figura 20 – Mecanismo de fragmentação em modo negativo da substância 3'-hidroxi-5,6,7,8,4',5'-hexametoxiflavona	71
Figura 21 – Mecanismo de fragmentação em modo positivo da substância 3'-hidroxi-5,6,7,8,4',5'-hexametoxiflavona	72
Figura 22 – Mecanismo de fragmentação em modo positivo da substância sinensetina	73
Figura 23 – Mecanismo de fragmentação em modo positivo da substância 3,5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavona	74
Figura 24 – Mecanismo de fragmentação em modo positivo da substância nobiletina	75
Figura 25 – Mecanismo de fragmentação em modo positivo da substância linderoflavona B	76
Figura 26 – Mecanismo de fragmentação em modo positivo da substância 5'-metoxinobiletina	77
Figura 27 – Mecanismo de fragmentação em modo positivo da substância eupalestina	78
Figura 28 – Espectro de RMN ¹ H (600 MHz, TMS, CDCl ₃) para a substância AC1 (5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavona) de <i>A. conyzoides</i>	79
Figura 29 – Espectro de RMN ¹ H (600 MHz, TMS, CDCl ₃) para a substância AC1 (5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavona) de <i>A. conyzoides</i> , ampliado na região entre δ 7,20 e δ 6,50	80
Figura 30 – Espectro de massa <i>FTMS full scan ESI(+)</i> da substância AC1 (5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavona) de <i>A. conyzoides</i>	81
Figura 31 – Estrutura molecular da substância AC1 (5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavona) de <i>A. conyzoides</i>	81
Figura 32 – Espectro de RMN ¹ H (600 MHz, TMS, CDCl ₃) para a substância AC2 (nobiletina) de <i>A. conyzoides</i>	82
Figura 33 – Espectro de RMN ¹ H (600 MHz, TMS, CDCl ₃) para a substância AC2 (nobiletina) de <i>A. conyzoides</i> , ampliado na região entre δ 7,60 e δ 6,95	83
Figura 34 – Espectro de massa <i>FTMS full scan ESI(+)</i> da substância AC2 (nobiletina) de <i>A. conyzoides</i>	84
Figura 35 – Estrutura molecular da substância AC2 (nobiletina) de <i>A. conyzoides</i>	84
Figura 36 – Espectro de RMN ¹ H (600 MHz, TMS, CDCl ₃) para a substância AC3 (5'-metoxinobiletina) de <i>A. conyzoides</i>	85

Figura 37 – Espectro de RMN ¹ H (600 MHz, TMS, CDCl ₃) para a substância AC3 (5'-metoxinobiletina) de <i>A. conyzoides</i> , ampliado na região entre δ 7,20 e δ 6,55	86
Figura 38 – Espectro de massa <i>FTMS full scan ESI(+)</i> da substância AC3 (5'-metoxinobiletina) de <i>A. conyzoides</i>	87
Figura 39 – Estrutura molecular da substância AC3 (5'-metoxinobiletina) de <i>A. conyzoides</i>	87
Figura 40 – Espectro de RMN ¹ H (600 MHz, TMS, CDCl ₃) para a substância AC4 (eupalestina) de <i>A. conyzoides</i>	88
Figura 41 – Espectro de RMN ¹ H (600 MHz, TMS, CDCl ₃) para a substância AC4 (eupalestina) de <i>A. conyzoides</i> , ampliado na região entre δ 7,19 e δ 7,125	89
Figura 42 – Espectro de RMN ¹ H (600 MHz, TMS, CDCl ₃) para a substância AC4 (eupalestina) de <i>A. conyzoides</i> , ampliado na região entre δ 6,60 e δ 6,10	90
Figura 43 – Espectro de massa <i>FTMS full scan ESI(+)</i> da substância AC4 (eupalestina) de <i>A. conyzoides</i>	91
Figura 44 – Estrutura molecular da substância AC4 (eupalestina) de <i>A. conyzoides</i>	91
Figura 45 – Cromatograma do extrato aquoso das folhas de <i>A. conyzoides</i> injetada nas condições descritas, com fases móveis acetonitrila e água (acidificada com 0,1% de ácido fórmico v/v); fluxo 0,25 ml/min; volume de injeção 10 µl; λ 330 nm	93
Figura 46 – Cromatograma do extrato aquoso das folhas de <i>A. conyzoides</i> injetada nas condições descritas, com fases móveis acetonitrila e água (acidificada com 0,1% de ácido fórmico v/v); fluxo 0,25 ml/min; volume de injeção 10 µl; λ 330 nm	93
Figura 47 – Cromatograma do extrato aquoso das folhas de <i>A. conyzoides</i> injetado nas condições descritas, com fases móveis acetonitrila e água (acidificada com 0,1% de ácido fórmico v/v); fluxo 0,25 ml/min; volume de injeção 10 µl; forno de coluna 25 °C; (A): λ 330 nm; (B): λ 275 nm	94
Figura 48 – Curva de calibração do ácido clorogênico (Área x Concentração em µg/g)	96
Figura 49 – Curva de calibração do ácido cumárico (Área x Concentração em µg/g)	96

Figura 50 – Curva de calibração da cumarina (Área x Concentração em $\mu\text{g/g}$)	97
Figura 51 – Curva de calibração da 5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavona (Área x Concentração em $\mu\text{g/g}$)	97
Figura 52 – Curva de calibração da nobiletina (Área x Concentração em $\mu\text{g/g}$)	98
Figura 53 – Curva de calibração da 5'-metoxinobiletina (Área x Concentração em $\mu\text{g/g}$)	99
Figura 54 – Curva de calibração da eupalestina (Área x Concentração em $\mu\text{g/g}$)	99
Figura 55 – Parâmetros cromatográficos avaliados na robustez do método para análise de ácido clorogênico no extrato aquoso de <i>A. conyzoides</i> , segundo as condições experimentais estabelecidas	108
Figura 56 – Parâmetros cromatográficos avaliados na robustez do método para análise de ácido cumárico no extrato aquoso de <i>A. conyzoides</i> , segundo as condições experimentais estabelecidas	109
Figura 57 – Parâmetros cromatográficos avaliados na robustez do método para análise de cumarina no extrato aquoso de <i>A. conyzoides</i> , segundo as condições experimentais estabelecidas	110
Figura 58 – Parâmetros cromatográficos avaliados na robustez do método para análise de 5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavona no extrato aquoso de <i>A. conyzoides</i> , segundo as condições experimentais estabelecidas	111
Figura 59 – Parâmetros cromatográficos avaliados na robustez do método para análise de nobiletina no extrato aquoso de <i>A. conyzoides</i> , segundo as condições experimentais estabelecidas	112
Figura 60 – Parâmetros cromatográficos avaliados na robustez do método para análise de 5'-metoxinobiletina no extrato aquoso de <i>A. conyzoides</i> , segundo as condições experimentais estabelecidas	113
Figura 61 – Parâmetros cromatográficos avaliados na robustez do método para análise de eupalestina no extrato aquoso de <i>A. conyzoides</i> , segundo as condições experimentais estabelecidas	114
Figura 62 – Cromatogramas do extrato aquoso das folhas de <i>A. conyzoides</i> : a) não submetido à degradação (controle); b) submetido à degradação sob refluxo neutro durante 6 horas; c) sob refluxo alcalino (NaOH 1M) durante 6 horas; d) sob refluxo ácido (HCl 1M) durante 6 horas. λ 330 nm. Em destaque os produtos de degradação formados	117

Figura 63 – Cromatograma do extrato aquoso das folhas de *A. conyzoides* submetido à degradação por oxidação (H_2O_2 3%) durante 6 horas; λ 330 nm 121

Figura 64 – Cromatograma do extrato aquoso das folhas de *A. conyzoides* submetido à degradação térmica em estufa (60 °C) durante 7 dias; λ 330 nm 122

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Substâncias identificadas no extrato aquoso de <i>A. conyzoides</i> por CLUE-EM/DAD em <i>ESI(+)</i>	61
Tabela 2 – Substâncias identificadas no extrato aquoso de <i>A. conyzoides</i> por CLUE-EM/DAD em <i>ESI(-)</i>	63
Tabela 3 – Dados de RMN ¹ H para a substância AC1 (5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavona) de <i>A. conyzoides</i> e dados comparativos da literatura	80
Tabela 4 – Dados de RMN ¹ H para a substância AC2 (nobiletina) de <i>A. conyzoides</i> , e dados comparativos da literatura	83
Tabela 5 – Dados de RMN ¹ H para a substância AC3 (5'-metoxinobiletina) de <i>A. conyzoides</i> , e dados comparativos da literatura	86
Tabela 6 – Dados de RMN ¹ H para a substância AC4 (eupalestina) de <i>A. conyzoides</i> , e dados comparativos da literatura	90
Tabela 7 – Parâmetros de LQ e LD, segundo as condições experimentais estabelecidas, dos marcadores presentes no extrato aquoso de <i>A. conyzoides</i>	100
Tabela 8 – Valores de resolução entre os picos dos marcadores e picos próximos, segundo as condições experimentais estabelecidas	101
Tabela 9 – Parâmetros de repetibilidade e precisão intermediária do ácido clorogênico, segundo as condições experimentais estabelecidas	102
Tabela 10 – Parâmetros de repetibilidade e precisão intermediária do ácido cumárico, segundo as condições experimentais estabelecidas	103
Tabela 11 – Parâmetros de repetibilidade e precisão intermediária da cumarina, segundo as condições experimentais estabelecidas	103
Tabela 12 – Parâmetros de repetibilidade e precisão intermediária da 5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavona, segundo as condições experimentais estabelecidas	103
Tabela 13 – Parâmetros de repetibilidade e precisão intermediária da nobiletina, segundo as condições experimentais estabelecidas	104
Tabela 14 – Parâmetros de repetibilidade e precisão intermediária da 5'-metoxinobiletina, segundo as condições experimentais estabelecidas	104
Tabela 15 – Parâmetros de repetibilidade e precisão intermediária da eupalestina, segundo as condições experimentais estabelecidas	104

Tabela 16 – Parâmetro de exatidão do ácido clorogênico determinado a partir do ensaio de adição de padrão, segundo as condições experimentais estabelecidas	105
Tabela 17 – Parâmetro de exatidão do ácido cumárico determinado a partir do ensaio de adição de padrão, segundo as condições experimentais estabelecidas	105
Tabela 18 – Parâmetro de exatidão da cumarina determinado a partir do ensaio de adição de padrão, segundo as condições experimentais estabelecidas	106
Tabela 19 – Parâmetro de exatidão da 5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavona determinado a partir do ensaio de adição de padrão, segundo as condições experimentais estabelecidas	106
Tabela 20 – Parâmetro de exatidão da nobiletina determinado a partir do ensaio de adição de padrão, segundo as condições experimentais estabelecidas	106
Tabela 21 – Parâmetro de exatidão da 5'-metoxinobiletina determinado a partir do ensaio de adição de padrão, segundo as condições experimentais estabelecidas	106
Tabela 22 – Parâmetro de exatidão da eupalestina determinado a partir do ensaio de adição de padrão, segundo as condições experimentais estabelecidas	107
Tabela 23 – Parâmetros cromatográficos avaliados na robustez do método para análise de ácido clorogênico no extrato aquoso de <i>A. conyzoides</i> , segundo as condições experimentais estabelecidas	108
Tabela 24 – Parâmetros cromatográficos avaliados na robustez do método para análise de ácido cumárico no extrato aquoso de <i>A. conyzoides</i> , segundo as condições experimentais estabelecidas	109
Tabela 25 – Parâmetros cromatográficos avaliados na robustez do método para análise de cumarina no extrato aquoso de <i>A. conyzoides</i> , segundo as condições experimentais estabelecidas	110
Tabela 26 – Parâmetros cromatográficos avaliados na robustez do método para análise de 5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavona no extrato aquoso de <i>A. conyzoides</i> , segundo as condições experimentais estabelecidas	111
Tabela 27 – Parâmetros cromatográficos avaliados na robustez do método para análise de nobiletina no extrato aquoso de <i>A. conyzoides</i> , segundo as condições experimentais estabelecidas	112

Tabela 28 – Parâmetros cromatográficos avaliados na robustez do método para análise de 5'-metoxinobiletina no extrato aquoso de <i>A. conyzoides</i> , segundo as condições experimentais estabelecidas	113
Tabela 29 – Parâmetros cromatográficos avaliados na robustez do método para análise de eupalestina no extrato aquoso de <i>A. conyzoides</i> , segundo as condições experimentais estabelecidas	114
Tabela 30 – Degradação dos marcadores presentes no extrato aquoso de <i>A. conyzoides</i> frente à hidrólise neutra sob refluxo por 6 horas	117
Tabela 31 – Degradação dos marcadores presentes no extrato aquoso de <i>A. conyzoides</i> frente à hidrólise alcalina (NaOH 1M) sob refluxo por 6 horas	119
Tabela 32 – Degradação dos marcadores presentes no extrato aquoso de <i>A. conyzoides</i> frente à degradação oxidativa (H ₂ O ₂ 3%) por 6 horas	121
Tabela 33 – Degradação dos marcadores presentes no extrato aquoso de <i>A. conyzoides</i> frente à degradação térmica (60 °C) por 7 dias	122

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, FÓRMULAS E UNIDADES

ACG	<i>Ácido clorogênico</i>
ACM	<i>Ácido cumárico</i>
ASC	<i>Área sob a Curva</i>
BDE	<i>Equivalência de Duplas Ligações (do inglês, Double Bond Equivalents)</i>
CCD	<i>Cromatografia em Camada Delgada</i>
CDCl ₃	<i>Clorofórmio deuterado</i>
CLAE	<i>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência</i>
CLUE	<i>Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência</i>
CMR	<i>Cumarina</i>
<i>d</i>	<i>Dupleto</i>
Da	<i>Dalton</i>
DAD	<i>Detector de Arranjo de Diodos (do inglês, diode array detector)</i>
<i>dd</i>	<i>Dupleto de dupleto</i>
DL ₅₀	<i>Dose Letal para 50% dos insetos</i>
DPR	<i>Desvio Padrão Relativo</i>
EM	<i>Espectrometria de Massas</i>
EPT	<i>Eupalestina</i>
ESI	<i>Ionização por eletronebulização (do inglês, Electrospray Ionization)</i>
FTMS	<i>Espectrometria de Massas com Transformada de Fourier (do inglês, Fourier Transform Mass Spectrometry)</i>
HMF	<i>5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavona</i>
<i>J</i>	<i>Constante de acoplamento (expresso em Hertz, Hz)</i>
LD	<i>Limite de Detecção</i>
LQ	<i>Limite de Quantificação</i>
MNB	<i>5'-metoxinobiletina</i>
M + H	<i>Massa da substância acrescida de um hidrogênio</i>
M – H	<i>Massa da substância sem um átomo de hidrogênio</i>
<i>m/z</i>	<i>Razão massa/carga</i>
NBT	<i>Nobiletina</i>
ppm	<i>Partes Por Milhão</i>
QToF	<i>Quadrupolo acoplado a tempo de voo (do inglês, quadrupole-time of flight)</i>
Rf	<i>Fator de Retenção (do inglês, Retention factor)</i>
RMN	<i>Ressonância Magnética Nuclear</i>

RMN ¹ H	<i>Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio</i>
s	<i>Simpleto</i>
TMS	<i>Tetrametilsilano</i>
TR	<i>Tempo de Retenção</i>
UV	<i>Ultravioleta</i>
δ (delta)	<i>Deslocamento químico (expresso em partes por milhão – ppm, em relação ao padrão interno - TMS)</i>

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	29
2.1 <i>Ageratum conyzoides</i> L. ASTERACEAE	31
2.1.1 Aspectos botânicos e etnofarmacológicos	31
2.1.2 Aspectos fitoquímicos	34
2.1.3 Aspectos farmacológicos	38
2.1.3.1 Atividades anti-inflamatória e antinociceptiva	38
2.1.3.2 <i>Atividade inseticida</i>	40
2.1.3.3 <i>Atividade antimicrobiana</i>	41
2.1.3.4 Demais atividades farmacológicas	42
2.1.4 <i>Aspectos toxicológicos</i>	43
2.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA	43
3 OBJETIVOS	47
3.1 OBJETIVO GERAL	47
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
4 MATERIAIS E MÉTODOS	49
4.1 MATERIAL VEGETAL	49
4.1.1 Coleta da planta e identificação da espécie	49
4.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO	49
4.3 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO AQUOSO POR CLUE- EM/DAD	49
4.4 OBTENÇÃO DOS PADRÕES ANALÍTICOS	50
4.4.1 Purificação das metoxiflavonas	51
4.4.1.1 Isolamento e identificação das metoxiflavonas	51
4.4.1.2 Determinação da pureza das metoxiflavonas	52
4.5 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO POR CLUE- DAD	52
4.6 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO	53
4.6.1 Linearidade	53
4.6.2 Limite de Detecção (LD) e Quantificação (LQ)	54
4.6.3 Especificidade	54
4.6.4 Precisão	54
4.6.5 Exatidão	54
4.6.6 Robustez	55
4.7 ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA	55
4.7.1 Degradação por Refluxo Ácido	55
4.7.2 Degradação por Refluxo Alcalino	56
4.7.3 Degradação por Refluxo Neutro	56
4.7.4 Degradação por Oxidação	56
4.7.5 Degradação Térmica	56

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5.1 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO AQUOSO POR CLUE- EM/DAD	59
5.2 PURIFICAÇÃO DAS METOXIFLAVONAS	79
5.2.1 Elucidação estrutural e pureza da substância AC1	79
5.2.2 Elucidação estrutural e pureza da substância AC2	82
5.2.3 Elucidação estrutural e pureza da substância AC3	85
5.3 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO POR CLUE- DAD	92
5.4 VALIDAÇÃO ANALÍTICA	95
5.4.1 Linearidade	95
5.4.2 Limite de Quantificação (LQ) e Limite de Detecção (LD)	100
5.4.3 Especificidade	100
5.4.4 Precisão	101
5.4.5 Exatidão	105
5.4.6 Robustez	107
5.5 QUANTIFICAÇÃO DOS MARCADORES NO EXTRATO AQUOSO	116
5.6 ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA	116
5.6.1 Degradação por hidrólise	116
5.6.2 Degradação por oxidação	120
5.6.3 Degradação térmica	121
6 CONCLUSÕES	125
REFERÊNCIAS	127

INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos o homem tem contado com a natureza para prover suas necessidades básicas, dentro dessas está o uso de produtos naturais para o tratamento de uma variedade de doenças (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002; SAINT-HILAIRE, 2009). Baseado em observações empíricas e no folclore, extratos de produtos naturais foram primeiramente e por um longo período de tempo o único recurso terapêutico disponível para a humanidade, constituindo a base da medicina tradicional (NEWMAN; CRAGG, 2016).

Apesar da evolução da sociedade a medicina tradicional continua a ser fortemente empregada em países em desenvolvimento e é crescente a utilização das chamadas terapias alternativas complementares (TAC) em países desenvolvidos. Em países da Europa, América do Norte e Oceania, a porcentagem da população que já fez uso de alguma terapia alternativa é tão significativa quanto em países em desenvolvimento (ANDREWS; BOON, 2005; BARNES; BLOOM; NAHIN, 2008; BRAUN et al., 2010; ROBINSON; ZHANG, 2011). Dados da Organização Mundial da Saúde (2013) revelam que mais de 100 milhões de europeus utilizam TAC, sendo 20% usuários regulares de TAC.

O crescente aumento do consumo de plantas medicinais e a rápida expansão deste mercado, evidenciou a preocupação de autoridades sanitárias, indústrias farmacêuticas e o próprio mercado consumidor quanto a segurança e qualidade dos materiais vegetais e produtos relacionados (WHO, 2007; FAN et al., 2012; EKOR, 2014). Entretanto poucas plantas tiveram sua qualidade, segurança e eficácia testadas, pois estima-se que apenas 6% de um total de 300.000 espécies de plantas superiores que compõem a biodiversidade mundial foram objetos de estudos farmacológicos e 15% de estudos fitoquímicos (CRAGG; NEWMAN, 2013).

Entre as técnicas que podem ser utilizadas para o estudo da qualidade dos materiais vegetais está a cromatografia líquida de alta eficiência (CLUE). Esta técnica possui alta sensibilidade e resolução aliada a curtos períodos de análise, vantagens que propiciaram sua aplicação em recentes estudos com plantas medicinais e seus constituintes (LIU et al., 2007; PROKUDINA et al., 2012; DE MELO; SAWAYA, 2015).

Entre as plantas de interesse popular, medicinal e científico encontra-se a espécie *Ageratum conyzoides* L. Pertencente a família Asteraceae, esta espécie é considerada uma erva daninha de regiões

tropicais, incluindo o Brasil (OKUNADE, 2002), onde possui diversos nomes populares, entre eles: “mentrasto”, “maria-preta”, “picão-branco”, “picão-roxo”, “erva-de-são-joão”, “erva-de-são-josé” e “erva-de-santa-lúcia” (BOSI et al., 2013). É utilizada na medicina popular, principalmente, como analgésica, anti-inflamatória, antireumática, bactericida e cicatrizante (GUPTA, 1995; LORENZI; MATOS, 2008).

O extrato das folhas desta planta demonstrou diversas propriedades em ensaios pré-clínicos, como atividade anti-inflamatória e analgésica (MOURA et al., 2005; RAHMAN et al., 2012); antimalária (UKWE et al., 2010); antiprotozoária (NOUR et al., 2010); antiproliferativa (DA SILVA MOMESSO; DE MOURA; JARDIM, 2009); cicatrizante (DASH; MURTHY, 2011), entre outras atividades.

Estudos fitoquímicos identificaram a presença de cromenos, cromonas, benzofuranos (PARI et al., 1998), cumarinas, monoterpenos (VERA, 1993), alcalóides (WIEDENFELD; RODER, 1991), esteróides (KAMBOJ; SALUJA, 2011) e flavonoides (GONZÁLEZ et al., 1991b) nesta espécie. Em relação aos flavonoides, são relatadas para esta espécie a existência de metoxiflavonas (SHARMA; SHARMA, 1995).

Metoxiflavonas são um subtipo de flavonoides que contêm dois ou mais substituintes metoxi no esqueleto base dos flavonoides (LI et al., 2009). Foram isolados e identificados apenas cerca de trinta metoxiflavonas de ocorrência no reino vegetal, das quais descata-se pelo amplo espectro de atividades biológicas, incluindo as atividades anti-inflamatória (HO et al., 2012); antiproliferativa (LI et al., 2007) e antinociceptiva (QUEIROZ et al., 2014).

Poucos estudos publicados avaliaram quantitativamente a composição química de *A. conyzoides*, avaliando apenas a presença de determinadas classes de substâncias, sem realizar estudos mais aprofundados (SULTANA et al., 2012; MISHRA et al., 2014). Em virtude do exposto, revela-se a necessidade de métodos mais sensíveis e específicos para determinação quantitativa simultânea de várias substâncias presentes nas preparações de *A. conyzoides*, visto a importância medicinal desta espécie.

Neste contexto, este trabalho propôs-se a desenvolver e validar um método analítico por CLUE-DAD para quantificação simultânea das substâncias majoritárias presentes no extrato aquoso de *A. conyzoides*. Com este estudo foi possível identificar e quantificar grande parte das substâncias que estão presentes na preparação de uso popular e possibilitar a correlação dos efeitos destas substâncias com as atividades farmacológicas descritas para esta espécie.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Ageratum conyzoides* L. ASTERACEAE

2.1.1 Aspectos botânicos e etnofarmacológicos

O gênero *Ageratum* (Asteraceae) compreende aproximadamente 30 espécies amplamente distribuídas em regiões áridas e lugares desertos da América (SHARMA; SHARMA, 1995). O termo *Ageratum* é derivado da palavra grega “*a gera*”, que significa não envelhece, referindo-se a longevidade da planta e o termo *conyzoides* é relacionado a “*konyz*”, a denominação grega da espécie *Inula helenium* na qual a planta se assemelha (OKUNADE, 2002).

A espécie foi descrita por Linnaeus em 1753, entretanto diversas sinônimas botânicas são referidas para esta espécie, como *Ageratum album* Willd. ex Steud.; *Ageratum arsenei* B.L. Rob.; *Ageratum ciliare* L.; *Ageratum hirsutum* Poir.; *Ageratum hirtum* Lam.; *Ageratum humile* Salisb.; *Ageratum latifolium* Cav.; *Ageratum latifolium* var. *galapageium* B.L. Rob.; *Ageratum microcarpum* (Benth.) Hemsl.; *Ageratum suffruticosum* Regel; *Alomia microcarpa* (Benth.); *Alomia pinetorum* L.O. Williams; *Carelia conyzoides* (L.) Kuntze; *Caelestina microcarpa* Benth.; *Coelestina microcarpa* Benth. e *Eupatorium conyzoides* (L.) E.H.L. Krause (LORENZI; MATOS, 2008; TROPICOS.ORG, 2015).

No Brasil, esta planta é conhecida popularmente por “mentrasto”, “catinga-de-bode”, “catinga-de-barão”, “erva-de-são-joão”, “maria-preta”, “picão-branco”, “picão-roxo”, “erva-de-santa-luzia”, “camará-opela”, entre outras denominações (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002).

A planta é uma erva anual, com até um metro de altura, pilosa e pouco ramosa, com caules cilíndricos de onde partem ramos ascendentes, com folhas opostas, pecioladas e ovadas, as flores são reunidas em pequenos capítulos de coloração branca a lilás (Figuras 1 e 2) (CABRERA; KLEIN, 1989). Apesar do gênero ter-se originado no continente americano, esta espécie adapta-se as diversas condições ambientais e dessa forma, distribuiu-se com êxito por regiões tropicais e subtropicais do mundo, sendo comum encontrá-la no oeste da África, Ásia, América Central e do Sul (OKUNADE, 2002).

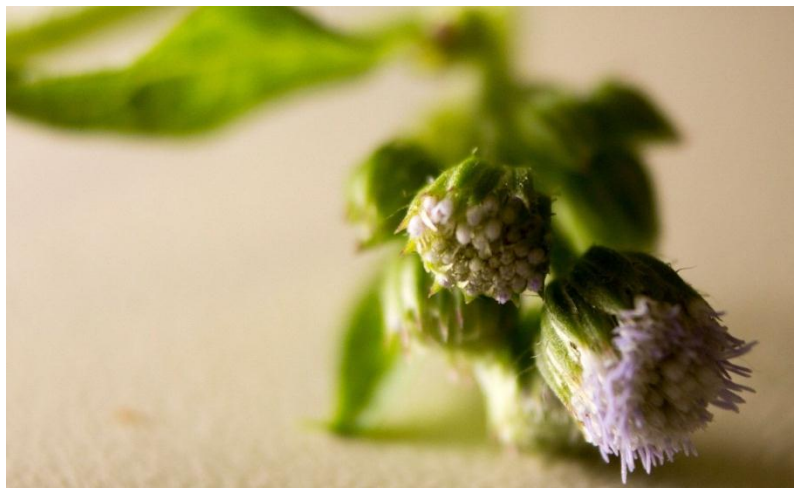
Desenvolve-se como planta daninha, principalmente em plantações, terrenos abandonados e nas proximidades das construções rurais. Distribuiu-se largamente nas regiões agrícolas de todos os estados do Brasil, infestando principalmente as lavouras anuais de soja,

feijão, milho, tabaco, cana-de-açúcar, café e entre outras (CABRERA; KLEIN, 1989).

Devido a sua ampla distribuição geográfica a espécie é utilizada em regiões da África, Ásia e América do Sul no tratamento de diversas enfermidades. Em países africanos costuma ser indicada no tratamento de doenças mentais, infectantes e dermatológicas, além disso esta espécie é utilizada como antiespasmódica, antiasmática e cicatrizante. Na Índia e Vietnã é empregada para tratar leptospirose, doenças ginecológicas e caspa. No Brasil a infusão da planta é usada internamente como anti-inflamatória, analgésica, antirreumática e no alívio de cólicas menstruais e intestinais (CRUZ, 1995; GUPTA, 1995; OKUNADE, 2002). O valor medicinal desta planta no tratamento de diversas doenças é citado na *Ayurveda*, *Charaka Samhita* e *Sushruta Samhita*, livros da medicina tradicional indiana (SHEKHAR; ANJU, 2012).

Outras indicações populares incluem: antipruriginoso; desinfetante bucal; antitussígeno; vermífugo; tônico; no combate a pediculose; dores de cabeça; micoses; febre tifoide; antiofídico; antimalária; antitétano; prolapso do ânus; infecção de garganta; abscesso e leucorreia. Além disso, as folhas são aplicadas em cortes e feridas como agente anti-inflamatório, hemostático e bactericida (KAMBOJ; SALUJA, 2008).

Figura 1 – Partes aéreas de *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae).



Fonte: A autora

Figura 2 – *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae).

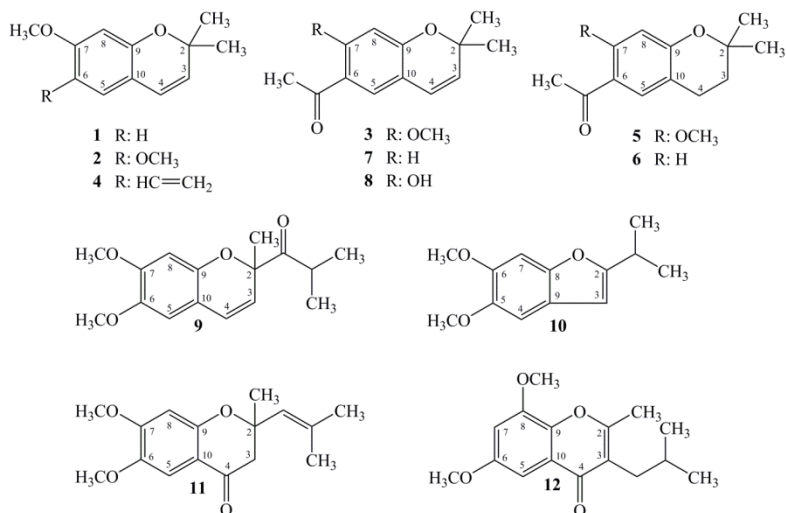


Fonte: TROPICOS.ORG, 2015

2.1.2 Aspectos fitoquímicos

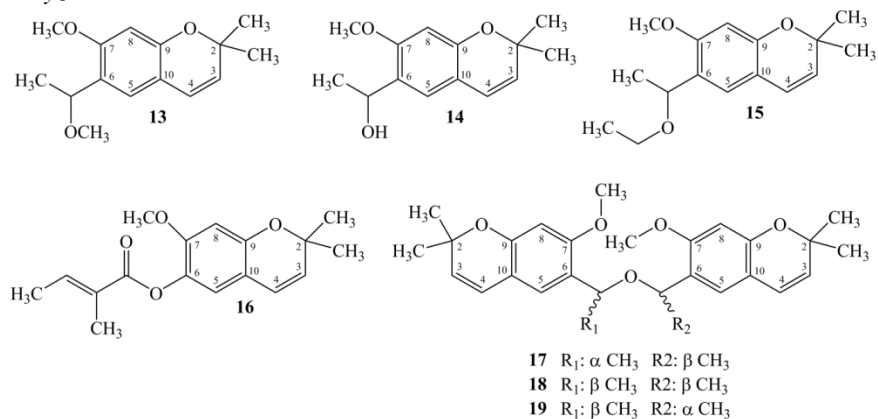
Análises fitoquímicas do óleo essencial de *A. conyzoides* coletado na Nigéria revelaram a presença de 51 substâncias, sendo estas vinte monoterpenos (6,40%); vinte sesquiterpenos (5,10%); três fenilpropanoides (2,40%); seis cromenos (85,20%) e dois cromanos (0,90%) (EKUNDAYO; LAAKSO; HILTUNEN, 1988). Entre as substâncias encontradas no óleo essencial, precoceno I (**1**) e precoceno II (**2**) são as majortitárias (DÛNG et al., 1989), entretanto outros cromenos identificadas no óleo essencial incluem encecalina (**3**); 6-vinil-7-metoxi-2,2-dimetilcromeno (**4**); dihidroencecalina (**5**); dihidrodemetoxi-encecalina (**6**); demetoxi-encecalina (**7**); demetilencecalina (**8**) e 2-(1'-oxo-2'-metilpropil-2-metil-6,7-dimetoxicromeno (**9**) (EKUNDAYO; LAAKSO; HILTUNEN, 1988; PARI et al., 1998; PATIL et al., 2010). Também foram isolados um benzofurano, uma cromona e uma cromanona, identificados como 2-(2'-metiletil)-5,6-dimetoxibenzofurano (**10**), 3-(2'-metilpropil)-2-metil-6,8-dimetoxi-crom-4-ona (**11**) e 2-(2'-metilprop-2'-enil)-2-metil-6,7-dimetoxi-croman-4-ona (**12**), respectivamente (PARI et al., 1998) (Figura 3).

Figura 3 – Cromenos, benzofurano, cromona e cromonona isolados do óleo essencial de *A. conyzoides*.



Adicionalmente às substâncias relacionadas no óleo essencial, foram identificados outros oito cromenos, 6-(1'-metoxietil)-7-metoxi-2,2-dimetilcromeno (**13**); 6-(1'-hidroxietil)-7-metoxi-2,2-dimetilcromeno (encecalol) (**14**); 6-(1'-etoxietil)-7-metoxi-2,2-dimetilcromeno (**15**); 6-angeloiloxi-7-metoxi-2,2-dimetilcromeno (**16**) e a mistura de encecanescinas (**17-19**) no extrato de *n*-hexano obtidos das partes aéreas desta espécie (GONZÁLEZ et al., 1991a) (Figura 4).

Figura 4 – Cromenos isolados do extrato de *n*-hexano das partes aéreas de *A. conyzoides*.



Diversos estudos apontam a presença de flavonoides nesta espécie, incluindo um raro grupo de produtos naturais conhecido como metoxiflavonoides. São estas: 8-hidroxi-5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavona (**20**); 5,6,7,5'-tetrametoxi-3',4'-metilenodioxiflavona (**21**); 5,6,7,8-tetrametoxi-3',4'-metilenodioxiflavona (linderoflavona B) (**22**); 5,6,7,8,5'-pentametoxi-3',4'-metilenodioxiflavona (eupalestina) (**23**); 5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavona (**24**); 5,6,7,8,3',4',5'-heptametoxiflavona (5'-metoxinobiletina) (**25**); 5,6,7,8,3',4'-hexametoxiflavona (nobiletina) (**26**); 5,6,7,3',4'-pentametoxiflavona (sinensetina) (**27**) (GONZÁLEZ et al., 1991b); 5,6,7-trimetoxi-3',4'-metilenodioxiflavona (ageconiflavona A) (**28**); 4'-hidroxi-5,6,7,3'-tetrametoxiflavona (ageconiflavona B) (**29**); 4'-hidroxi-5,6,7,3',5'-pentametoxiflavona (ageconiflavona C) (**30**); 4'-hidroxi-5,6,7,8,3'-pentametoxiflavona (**31**) (VYAS; MULCHANDANI, 1986); 3'-hidroxi-5,6,7,8,4',5'-hexametoxiflavona (**32**) (BOSI et al., 2013); 5,4'-dihidroxi-

7,3',5'-trimetoxiflavona (**33**) (HUSSIEN et al., 2010); (2*S*)-7-metoxi-3,4'-metilenodioxiflavona (**34**) e (2*S*)-7,3',4'-trimetoxiflavonona (**35**) (MUNIKISHORE et al., 2013) (Figura 5).

Entre os flavonoides hidroxilados identificados em *A. conyzoides* estão escutelareina (**36**); quercetina (**37**); quercetina-3-ramnopiranosídeo (**38**); canferol (**39**), canferol-3-ramnopiranosídeo (**40**); canferol 3,7-diglucopiranosídeo (**41**) e 5,7,2',4'-tetrahidroxi-6,3'-di-(3,3-dimetilalil)-isoflavona 5-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)- α -L-ramnopiranosídeo (**42**) (YADAVA; KUMAR, 1999; OKUNADE, 2002) (Figura 6).

Figura 5 – Metoxiflavonas isoladas de *A. conyzoides*.

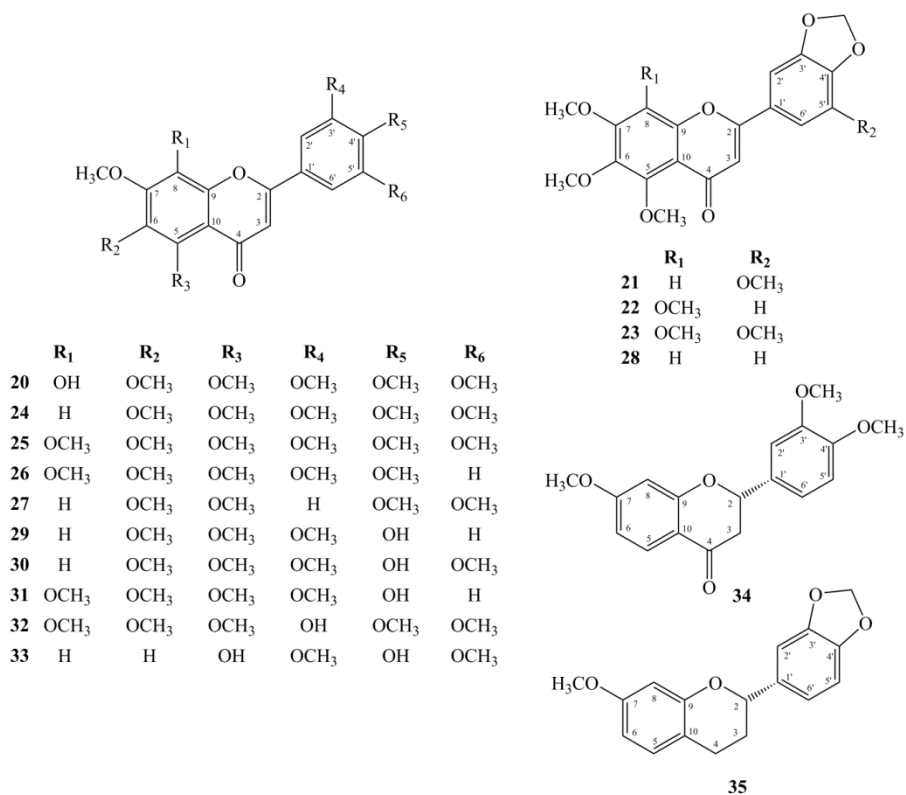
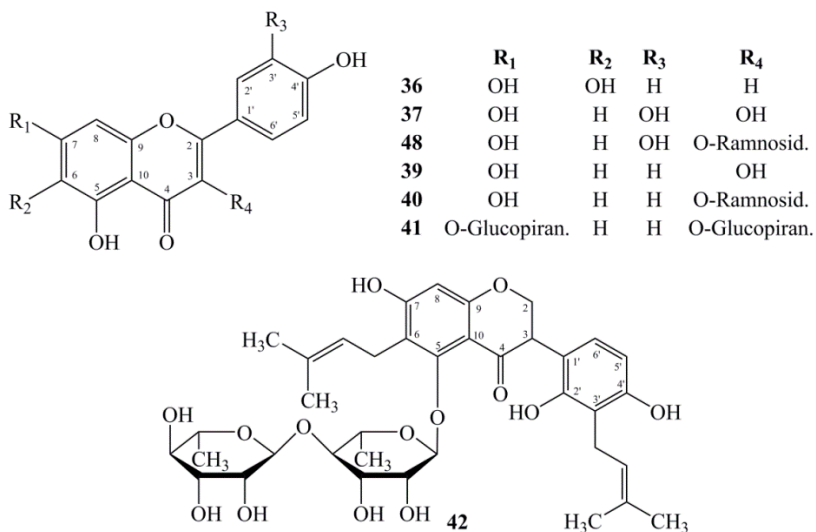
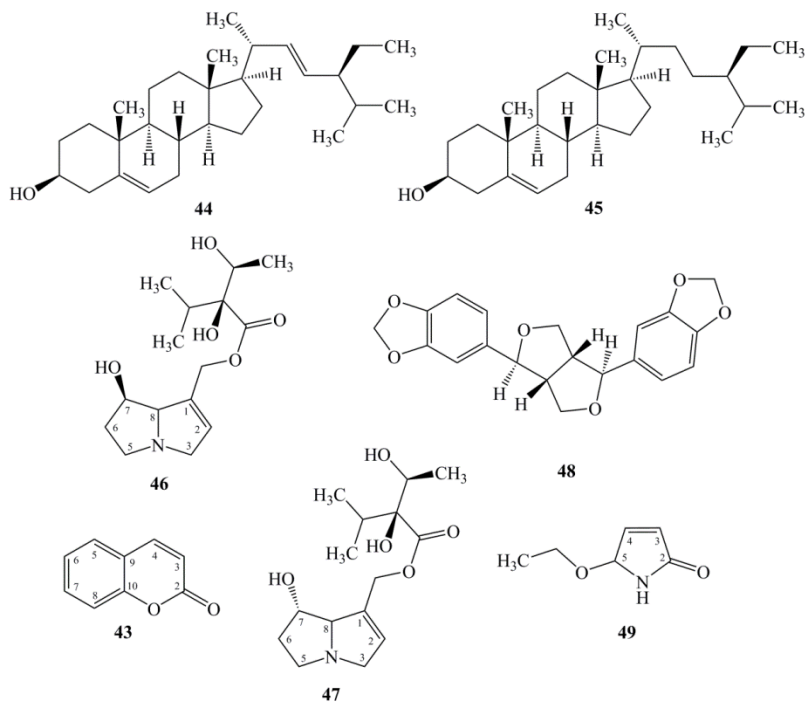


Figura 6 – Flavonoides hidroxilados isolados de *A. conyzoides*.

Outras substâncias identificadas nesta espécie incluem a cumarina 1,2-benzopirano (43) (VERA, 1993); os esteroides stigmasterol (44) e β -sitosterol (45) (KAMBOJ; SALUJA, 2011); os alcaloides pirrolizidínicos licopsamina (46) e equinatina (47) (WIEDENFELD; RODER, 1991); a lignana (+)-sesamina (48) (GONZÁLEZ et al., 1991a); a pirrolona 5-etoxi-1H-pirrol-2(5H)-ona (49) (Figura 7) (HUSSIEN et al., 2010) e diversos ácidos fenólicos (XUAN et al., 2004).

Figura 7 – Outras substâncias isoladas de *A. conyzoides*.

2.1.3 Aspectos farmacológicos

2.1.3.1 Atividades anti-inflamatória e antinociceptiva

Para avaliação da atividade anti-inflamatória de extratos obtidos das folhas de *A. conyzoides* diversos estudos utilizaram o modelo de edema de pata induzido pela aplicação de carragenina em ratos. O desenvolvimento do edema de pata após a aplicação de carragenina é um modelo bifásico, pois na fase inicial observada nas primeiras horas é atribuída a liberação de bradicinina, histamina e serotonina, enquanto que a segunda fase é relacionada à liberação de prostaglandinas (VINEGAR; SCHREIBER; HUGO, 1969; POSADAS et al., 2004). Os estudos demonstraram redução entre 40-100% do edema da pata induzido por carragenina quando comparadas ao controle negativo dos estudos. A porcentagem de inibição do edema demonstrou ser dose dependente e tempo dependente em todos os extratos avaliados, sendo

observada uma diminuição maior do edema após quatro horas da aplicação de carragenina (GALATI et al., 2001; HASSAN et al., 2012; RAHMAN et al., 2012; AWAD et al., 2013).

Moura e colaboradores (2005) avaliaram a atividade anti-inflamatória do extrato etanólico obtido das folhas de *A. conyzoides* na dose de 250 mg/kg, via oral, em modelos de artrite induzida por formaldeído e granuloma induzido por *pellets* de algodão em ratos por dez e sete dias consecutivos, respectivamente. Os resultados demonstraram redução do volume da inflamação na pata após o terceiro dia de administração do extrato e redução de 38,8% do volume do granuloma, sem dano às mucosas gástricas relacionados ao tratamento.

A aplicação tópica do extrato aquoso das folhas de *A. conyzoides* em doses entre 2-8 g/kg, utilizando como veículo vaselina, demonstrou atividade anti-inflamatória quando avaliada em modelo de edema de pata de ratos induzido por carragenina e granuloma induzido por *pellets* de algodão após a aplicação única e durante sete dias, respectivamente (OKEMY et al., 2015).

Magalhães e colaboradores (1997) constataram a atividade antinociceptiva e redução da incapacidade articular para a fração aquosa, obtida a partir do extrato de etanol das folhas de *A. conyzoides*, em doses de 30 mg/kg e 50 mg/kg por via intraperitoneal e 90 mg/kg e 150 mg/kg por via oral no modelo de incapacidade articular induzida por aplicação de carragenina no joelho de ratos, efeito que não foi revertido por antagonistas opioides sugerindo atividade periférica da fração. Este estudo também apresentou diminuição do edema de pata no modelo induzido por carragenina, efeito não observado no modelo de edema de pata induzido por dextrano, sugerindo que a atividade anti-inflamatória exibida seja dependente de leucócitos polimorfonucleares.

A atividade antinociceptiva do extrato etanólico, obtido das folhas desta espécie, foi testada utilizando o modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético (ABENA et al., 1993; RAHMAN et al., 2012; HOSSAIN et al., 2013), o qual consiste um eficiente método para avaliação da atividade antinociceptiva periférica de fármacos, segundo Koster e colaboradores (1959). Os extratos etanólicos testados nos diferentes trabalhos exibiram uma atividade antinociceptiva dose dependente com inibição das contorções entre 25,10% a 45,18%, entretanto os valores de inibição não foram superiores ao fármaco diclofenaco de sódio na dose de 40 mg/kg, utilizado como controle positivo neste ensaio.

A administração por via oral de 500 mg/kg e 750 mg/kg do extrato etanólico desta espécie, durante 10 dias, foi avaliado no

tratamento da doença inflamatória de Bowel em modelo de indução da doença por indometacina e ácido acético. Os resultados demonstram diminuição da largura das úlceras, diminuição da atividade das mieloperoxidases e lipoperoxidase e redução da inflamação, infiltração celular, descamação e danos nas vilosidades intestinais nos achados histológicos (BIRADAR et al., 2011).

Salim e colaboradores (2014) demonstraram que o extrato metanólico das folhas de *A. conyzoides* foi capaz de inibir a liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 α , IL-1 β e IL-6 de células mononucleares. Outro estudo sugere seletividade ao receptor de bradicinina II, implicado na mediação de dor, porém, esta seletividade foi perdida após a adição de polivinilpirrolidona (PVP) indicando que substâncias fenólicas podem ser responsáveis pela atividade inicial observada (SAMPSON et al., 2000).

Além dos estudos pré-clínicos desenvolvidos, um estudo clínico desenvolvido por Marques Neto e colaboradores (1988) objetivou avaliar o efeito do extrato aquoso, vulgo chá, de *A. conyzoides* no alívio da dor em pacientes com diagnóstico de artrose. Os resultados obtidos no estudo clínico demonstraram diminuição da intensidade da dor em 66% dos pacientes e consequente melhora a mobilidade articular em 24% destes. O efeito analgésico foi observado após a segunda semana do estudo e perdurou após a suspensão da administração do extrato aquoso.

2.1.3.2 Atividade inseticida

O efeito inseticida do óleo essencial extraído das folhas de *A. conyzoides* foi demonstrado frente a diversas espécies de insetos e parasitas, incluindo *Sitophilus zeamais* (DL₅₀= 0,9 mg/ml) (BOUDA et al., 2001); *Aedes aegypti* (DL₅₀= 148 mg/ml) (DE MENDONÇA et al., 2005); *Tribolium castaneum* Herbst (DL₅₀= 0,213 mg/ml) (SINGH; PRAKASH; DUBEY, 2014); *Callosobruchus maculatus* F. (DL₅₀= 0,003 mg) (GBOLADE; ONAYADE; AYINDE, 1999); *Spodeptera frugiperda* (DL₉₀= 10 mg) (LIMA et al., 2010); *Aedes albopictus* (DL₅₀= 0,006 mg/ml) (LIU; LIU, 2014) e *Schistosoma mansoni* (DL₉₀= 0,1 mg/ml) (DE MELO et al., 2011).

O extrato metanólico desta espécie exibiu o efeito inseticida contra as espécies de mosquito *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus* e *Anopheles maculatus* (MASSUOD et al., 2014). O extrato acetônico demonstrou, na dose de 10 mg/ml, a habilidade de inibir fortemente o crescimento, alimentação e reprodução da espécie de lagarta *Spilarctia*

obliqua Walker (PRAJAPATI et al., 2003), assim como inibição da produção do hormônio juvenil em larvas de *Culex quinquefasciatus* (SAXENA; DIXIT; SUKUMARAN, 1992). O extrato etanólico apresentou efeito inseticida sobre a espécie de piolho *Pediculus humanus capitis* De Geer, com DL₅₀ equivalente a 6,33% do extrato incorporado em formulação com óleo de coco após 60 minutos de exposição (SHAILAJAN et al., 2013).

Moreira e colaboradores (2007) demonstraram que a cumarina (1,2-benzopiranonona) isolada do extrato hexânico desta espécie apresenta efeito inseticida sobre as espécies *Rhyzopertha dominica* F. (DL₅₀= 11,82 mg/g); *Diaphania hyalinata* L. (DL₅₀= 2,21 mg/g); *Musca domestica* L. (DL₅₀= 1,18 mg/g) e *Periplaneta americana* L. (DL₅₀= 2,49 mg/g) após 24 horas de exposição.

2.1.3.3 Atividade antimicrobiana

O atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas de *A. conyzoides* foi objeto de investigação em diferentes estudos. Adjou e colaboradores (2012) obtiveram inibição total do crescimento de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* em concentrações de 2,0 e 2,5 µl/ml do óleo essencial, respectivamente. Demonstrou-se também que o óleo essencial é capaz de inibir totalmente a produção da aflotoxina B1 destes patógenos (NOGUEIRA et al., 2010; PATIL et al., 2010).

O óleo essencial das folhas também exibiu atividade antimicrobiana frente a cepas de *Staphylococcus aureus* (MTCC 96 e 2940); *Bacillus subtilis* (MTCC 2250); *Bacillus cereus* (MTCC 2156); *Escherichia coli* (MTCC 739); *Pseudomonas aeruginosa* (NCIM 2036); *Pseudomonas putida* (NCIM 2650); *Pseudomonas desmolyticam* (NCIM 2028); *Streptococcus mitis* (MTCC 2695); *Streptococcus mutans* (MTCC 1943) e *Candida albicans* (MTCC 227) em ensaio de difusão em disco utilizando 15 µl de óleo essencial por disco (PATIL et al., 2010).

O extrato metanólico desta espécie exibiu sensibilidade frente a quinze cepas clínicas de *Helicobacter pylori*, com halos de inibição entre 06 e 20 mm (NDIP et al., 2007). Outro estudo também demonstrou a sensibilidade deste extrato frente a cepas de *Staphylococcus aureus*; *S. aureus* resistente a metilicina; *S. aureus* resistente a oxacilina; *S. aureus* resistente a tetraciclina e ampicilina e *S. aureus* resistente a cotrimoxazol, penicilina e gentamicina, com halos de inibição entre 26 e 28 mm (DAYIE; NEWMAN; AYITEY-SMITH, 2008).

Cimanga e colaboradores (2014) avaliaram a atividade antibacteriana dos extratos aquoso e etanólico das folhas de *A. conyzoides* sobre as bactérias *Escherichia coli*; *Enterobacter cloacae*; *Klebsiella pneumoniae*; *Klebsiella oxytoca*; *Proteus mirabilis*; *Schigella flexneri*; *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus thymurium* isoladas de pacientes diagnosticados com infecções. Os extratos apresentaram sensibilidade sobre as bactérias avaliadas, exibindo valores de concentração inibitória mínima entre 31,5 µg/ml e 250 µg/ml do extrato.

Em triagens no método de difusão em disco os extratos aquoso e de *n*-hexano das folhas desta espécie apresentaram sensibilidade frente a cepas de *Alkaligenes viscolactis*; *Klebsiella aerogenes* e *Streptococcus pyogenes* e *Yersinia enterocolitica* e *Salmonella gallinarum*, respectivamente (SAMY; IGNACIMUTHU; RAJA, 1999; OKWORI et al., 2007).

2.1.3.4 Demais atividades farmacológicas

A fração aquosa obtido do extrato hidroalcoólico de *A. conyzoides* demonstrou atividade antiespasmódica, provocando relaxamento da musculatura lisa em úteros e duodeno de ratos e inibindo a contração muscular induzida por agonistas através do bloqueio da entrada de cálcio intracelular e da enzima adenosina 3',5' monofosfato cíclico fosfodiesterase (SILVA; CAPAZ; VALE, 2000). Estes resultados corroboram para a indicação popular de *A. conyzoides* no alívio de cólicas intestinais e menstruais.

Achola e Munenge (1997) revelaram que o extrato metanólico das folhas e raízes desta espécie foram capazes de bloquear a atividade neuromuscular em nervos frênicos isolados de diafragma de rato, efeito não revertido após a administração de fisostigmina, indicando que o bloqueio neuromuscular pode ocorrer através de outro mecanismo além dos receptores de acetilcolina. Também neste estudo demonstrou-se a inibição da contração de jejuno isolado de coelhos dependente do bloqueio dos canais de cálcios.

Estudos demonstram a atividade gastroprotetora do extrato de etanol e hepatoprotetora dos extratos *n*-hexano e acetona das folhas de *A. conyzoides*, efeitos relacionados a capacidade antioxidante e bloqueadora dos canais de cálcio desta planta (SHIRWAIKAR et al., 2003; VERMA et al., 2013).

Também foram encontrados estudos exibindo a atividade cicatrizante (CHAH et al., 2006); antiproliferativa (ADEBAYO et al., 2010); antiprotozoária (NOUR et al., 2010) e hipoglicemiante

(EGUNYOMI; GBADAMOSI; ANIMASHAHUN, 2011) de *A. conyzoides*.

2.1.4 Aspectos toxicológicos

O estudo da toxicidade do extrato de etanol das folhas de *A. conyzoides* desenvolvido por Moura e colaboradores (2005), durante 90 dias, não revelou nenhuma diferença estatística entre os grupos de animais controle e tratado com 250 mg/kg e 500 mg/kg de extrato da planta e nenhuma mortalidade foi vista, exceto no tratamento crônico com 500 mg/kg de extrato sendo observada redução significativa da concentração sérica de alanina transaminase.

Entretanto, no estudo de toxicidade do extrato hidroalcoólico elaborado por Diallo e colaboradores (2014) após 90 dias de ensaio foi possível detectar, no grupo de animais tratado com 1000 mg/kg de extrato, o aumento significativo do peso do fígado, baço e rins, assim como diminuição da concentrações sérica de hemoglobina, hematócrito e contagem total de hemácias; aumento do número de plaquetas; aumento da concentração sérica de alanina transaminase, aspartato transaminase e fosfatase alcalina e aumento da glicemia. No grupo de animais tratados por 90 dias com 500 mg/kg de extrato foi observado aumento das concentrações séricas de alanina transaminase e glicemia. Não foram encontrados danos nos órgãos dos animais tratados quando comparados ao grupo controle.

Embora os resultados dos estudos de toxicidade sejam conflitantes, a presença de alcaloides pirrolizidínicos nesta espécie, conhecidos pelas propriedades hepatóxicas, carcinogênicas, genotóxicas, teratogênicas e em alguns casos pneumotóxicas (CHEN; MEI; FU, 2010; LI et al., 2011; WIEDENFELD, 2011), corrobora com os resultados exibidos no estudo de Diallo e colaboradores (2014).

2.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA

Atribuída a um botânico russo, a descoberta da cromatografia como técnica analítica ocorreu em 1906. O experimento de Mikhail Semyonovich Tswet consistia na separação de diferentes pigmentos de plantas através de uma coluna de vidro preenchida com carbonato de cálcio impulsionado pela passagem de éter de petróleo pelo interior da coluna, fenômeno que ocasionava a formação de faixas coloridas. Por esta razão esta técnica é conhecida por cromatografia (“*chrom*” – cor e “*graphe*” – escrever) (COLLINS, 2009).

A separação cromatográfica baseia-se na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido às diferentes interações entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária (CASS; DEGANI, 2001). Durante a passagem da fase móvel pela fase estacionária, os componentes são distribuídos pelas duas fases de tal forma que cada um deles é seletivamente retido pela fase estacionária. A eficiência de uma fase estacionária é medida em termos de números de pratos, onde um prato corresponde a uma etapa de equilíbrio da substância entre a fase estacionária e a fase móvel, portanto, quanto maior o número de pratos, maior será a eficiência de separação (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

De acordo com a equação de Van Deemter, que descreve a relação entre a altura equivalente a um prato e a velocidade linear da fase móvel, partículas com diâmetros menores tendem a reduzir a altura do prato resultando em aumento da eficiência de separação entre dois analitos. Consequentemente, o aumento do fluxo da fase móvel influencia positivamente a eficiência da coluna (NOVAKOVA; MATYSOVA; SOLICH, 2006). Baseando-se nesta teoria, surgiu, na década de sessenta, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (CASS; DEGANI, 2001).

A vasta aplicabilidade associada a alta sensibilidade e seletividade permitiram a consolidação da CLAE como importante técnica analítica. Porém, nos últimos dez anos o desenvolvimento de fases estacionárias com diâmetro de partícula menor que 2 μm e equipamentos capazes de trabalhar com altas pressões (até 15000 psi) permitiram a evolução da CLAE para a Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE) (MALDANER; JARDIM, 2009).

Entre as vantagens da utilização de colunas com diâmetro de partícula menor que 2 μm está a diminuição do comprimento da coluna, sem a perda da eficiência. Colunas menores permitem separações mais rápidas, uma vez que o tempo de separação é proporcional ao comprimento da coluna, além de economia do consumo de fase móvel (MALDANER; JARDIM, 2009).

De modo geral, a substituição de colunas regulares de CLAE, com diâmetro de partícula de 5 μm , por colunas de CLUE, com diâmetro de partícula de 1,7 μm , tendem a reduzir de três a dez vezes o tempo de análise, mantendo a resolução, sensibilidade e precisão do método analítico (DONG; ZHANG, 2014).

Como resultado de todas as vantagens apresentadas obtém-se cromatogramas com picos mais eficientes, melhor separação entre as

substâncias presentes na amostra, redução do tempo de análise e redução do volume de fase móvel consumido em comparação com a CLAE.

A avaliação da qualidade de produtos vegetais constitui uma tarefa desafiadora devido a diversidade de substâncias presentes em uma matriz complexa. Entre as técnicas analíticas para o controle de qualidade de produtos vegetais, a CLUE é uma das técnicas mais utilizadas devido a sua facilidade de operação, ampla aplicabilidade e alta exatidão e precisão em análises quantitativas (JIANG et al., 2010).

A literatura demonstra a versatilidade desta técnica na separação e quantificação de substâncias presentes em produtos naturais. Zang e colaboradores (2012) obtiveram a separação de dezesseis metoxiflavonas do extrato de *Murraya paniculata* (L.) Jack utilizando uma coluna Agilent Eclipse Plus C₁₈ (100 x 2.1 mm) com diâmetro de partícula de 1,8 µm e método analítico de trinta minutos, utilizando detecção de arranjo de fotodiodos (DAD).

Svoboda e colaboradores (2015) desenvolveram um método analítico de quatro minutos por CLUE, com detecção por espectrometria de massas, que permitiu a quantificação de oito catequinas utilizando uma coluna CSH C₁₈ (100 mm x 2,1 mm) com 1,7 µm de diâmetro de partícula.

Zhou e colaboradores (2009) conseguiram separar e identificar 44 metoxiflavonas através de um método analítico de 105 minutos por CLUE, com detecção por espectrometria de massas, utilizando uma coluna Acquity BEH C₁₈ (100 mm x 2,1 mm) com 1,7 µm de diâmetro de partícula.

Wang e colaboradores (2013) identificaram e confirmaram a identidade química de 66 substâncias naturais presentes na preparação medicinal chinesa conhecida por SiJunZiTang por meio de um método analítico por CLUE com duração de 35 minutos, com detecção por espectrometria de massas, utilizando uma coluna HSS T3 C₁₈ (100 mm x 2,1 mm) com 1,8 µm de diâmetro de partícula.

Nenhum método analítico por CLUE e CLUE foi encontrado na literatura para quantificação dos marcadores presentes no extrato aquoso de *A. conyzoides*.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Quantificar por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE) os marcadores presentes no extrato aquoso de *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Isolar de *A. conyzoides* os padrões analíticos de metoxiflavonas a partir de frações obtidas de trabalhos anteriores;

Identificar as metoxiflavonas isoladas através de técnicas espectroscópicas de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (¹H-RMN) e Espectrometria de Massas (EM);

Caracterizar as substâncias presentes no extrato aquoso por Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas de Alta Resolução (CL-EM);

Desenvolver a validar o método analítico por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE) para quantificação simultânea dos marcadores presentes no extrato aquoso de *A.conyzoides*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAL VEGETAL

4.1.1 Coleta da planta e identificação da espécie

Folhas de *Ageratum conyzoides* L. foram coletadas no Horto Medicinal da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), município de Florianópolis, estado de Santa Catarina (27°59'78.77"S 48°51'70.00"O). A identidade botânica foi confirmada por meio da comparação com exsicata da espécie (No. SMDB 13.138) depositada no Herbário da Universidade Federal de Santa Maria.

4.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO

Para a preparação das soluções extrativas utilizou-se as recomendações contidas na RDC n°. 10, de 09 de março de 2010 (BRASIL, 2010), já revogada, que orientava o preparo da infusão de *A. conyzoides* para uso na medicina tradicional.

As folhas frescas coletadas (30 g) foram submetidas a infusão utilizando como líquido extrator água purificada fervente (500 ml), durante 15 minutos. O extrato foi filtrado por papel filtro e concentrado em concentrador de frações à vácuo (SPD1010 e SPD2010 Integrated SpeedVac Systems, Thermo Scientific®) obtendo-se um rendimento de 670 mg de extrato aquoso seco.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO AQUOSO POR CLUE-EM/DAD

A análise qualitativa para identificação das substâncias presentes no extrato aquoso de *A. conyzoides* foi desenvolvida em espectrômetro de massas híbrido Xevo G2-S QToF com fonte de ionização eletronebulização (ESI) acoplado a um cromatógrafo modelo Acquity UPLC, da marca Waters® equipado com bomba quaternária, injetor automático e detector de arranjo de foto diodo.

A separação dos constituintes foi obtida utilizando-se coluna Acquity UPLC BEH C₁₈ (150 mm x 2,1 mm; 1,7 µm) mantida a 40 °C e como fase móvel um sistema gradiente de água acidificada com ácido fórmico 0,1% (pH: 3,0) (A) e acetonitrila (B) em um fluxo constante de 0,35 ml/min, nas seguintes condições: 0-1 minuto gradiente linear de A-B (90:10 v/v) para A-B (78:22 v/v); 1-2 minutos gradiente linear de A-B

(78:22 v/v) para A-B (65:35 v/v); 2-8 minutos gradiente linear de A-B (65:35 v/v) para A-B (15:85 v/v); 8-9 minutos gradiente linear de A-B (15:85 v/v) para A-B (2:98 v/v); 9-9,5 minutos isocrático de A-B (2:98 v/v); 9,5-9,6 minutos gradiente linear de A-B (2:98 v/v) para A-B (90:10 v/v); 9,6-11 minutos isocrático de A-B (90:10 v/v). O volume de injeção correspondeu a 10 µl.

A ionização por eletronebulização foi aplicada em modo positivo nas seguintes condições: fluxo do gás de dessolvatação: 1000 L/h; temperatura de dessolvatação: 150 °C; fluxo de gás do cone: 100 L/h; temperatura da fonte: 80 °C; voltagem do capilar: 3 kv; voltagem do cone: 40 kv e energia de colisão: 10 V. E em modo negativo nas seguintes condições: fluxo do gás de dessolvatação: 600 L/h; temperatura de dessolvatação: 150 °C; fluxo de gás do cone: 0 L/h; temperatura da fonte: 80 °C; voltagem do capilar: 2,5 kv; voltagem do cone: 40 kv e energia de colisão: 10 V.

As análises foram desenvolvidas em *full scan*, na faixa de 100-1500 *m/z*. Para aquisição e interpretação dos dados utilizou-se o software *MassLynx 4.1* (Waters®).

Foram injetadas amostras do extrato aquoso na concentração de 100 µg/g em solução de metanol:água 10:90 (v/v) e dos padrões analíticos disponíveis na concentração de 10 µg/g em solução de metanol:água 10:90. Os picos foram identificados por comparação dos tempos de retenção, valores de *m/z*, fragmentação e espectro de UV.

4.4 OBTENÇÃO DOS PADRÕES ANALÍTICOS

Considerando os resultados das análises qualitativas realizadas, optou-se por desenvolver um método analítico para quantificação dos ácidos fenólicos, cumarina e metoxiflavonas presentes no extrato aquoso. Ácido clorogênico hemidratado e cumarina (1,2-benzopirano) foram obtidos da Sigma-Aldrich. Ácido cumárico foi obtido da Spectrum.

Visto que não são disponíveis comercialmente padrões analíticos das metoxiflavonas identificadas no extrato aquoso, buscou-se purificar essas substâncias a partir do extrato de *A. conyzoides*.

4.4.1 Purificação das metoxiflavonas

4.4.1.1 Isolamento e identificação das metoxiflavonas

Trabalhos anteriores desenvolvidos com o extrato etanólico de *A. conyzoides* permitiram o particionamento deste extrato e, conseqüentemente, a obtenção de frações contendo as substâncias de interesse (BOSI, 2012).

Tais frações foram avaliadas por cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando cromatofolhas de sílica gel 60 com indicador de fluorescência (F₂₅₄) em suporte de alumínio (SiliCycle[®]), o sistema eluente foi definido conforme a polaridade das amostras e o perfil cromatográfico visualizado sob câmara de radiação ultravioleta (UV), nos comprimentos de onda de 254 (extinção) e 366 nm (fluorescência), antes da revelação química com anisaldeído sulfúrico. As frações que após a revelação com anisaldeído sulfúrico demonstravam a presença de manchas amarelas, característico de flavonoides, foram selecionadas para purificação.

As frações selecionadas foram submetidas a purificação por CLAE-UV utilizando sistema cromatográfico modelo LC-10ADVP, da marca Shimadzu[®], equipado com injetor manual, bomba binária e detector de UV. Para separação cromatográfica empregou-se uma coluna preparativa Waters Nova-Pak[®] HR C18 (300 mm x 7,8 mm; 6µm) e fase móvel isocrática combinando água ultra pura e metanol 30:70 (v/v) em fluxo constante de 2,0 ml/min durante 30 minutos. Com volume de injeção de 1,0 ml e detecção em 254 nm. As amostras foram injetadas na concentração de 20 mg/ml em solução de metanol.

Os picos de interesse foram coletados em tubo de ensaio e a separação avaliada por CCD com revelação em câmara de luz UV e anisaldeído sulfúrico. A avaliação das frações coletadas permitiu a identificação de quatro substâncias isoladas com diferentes valores de R_f nas cromatoplacas, denominadas AC1, AC2, AC3 e AC4, sendo estas submetidas a análise espectroscópicas de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹H) e Espectrometria de Massas (EM) para sua elucidação estrutural.

Os experimentos de RMN ¹H foram desenvolvidos em equipamento Bruker[®] modelo *Ascend600* (600 MHz para ¹H e 150 MHz para ¹³C), vinculado ao Departamento de Química da UFPR, Curitiba/PR. Os dados adquiridos foram processados em software *TopSpin 3.1* (Bruker[®]), e os resultados comparados com dados disponíveis na literatura.

Os experimentos de EM foram desenvolvidos por infusão direta em espectrômetro de massas modelo LQT-Orbitrap Discovery XL (Thermo Scientific®), vinculado ao Departamento de Farmacognosia da Universidade de Atenas (Grécia). As análises foram desenvolvidas com fonte *ESI* operando em modo positivo em *FTMS full scan*, com resolução de 30,000 na faixa de 100 - 1000 *m/z*.

4.4.1.2 Determinação da pureza das metoxiflavonas

A pureza das substâncias AC1, AC2, AC3 e AC4 isoladas foi avaliada em sistema cromatográfico modelo Acquity UPLC, da marca Waters® equipado com bomba binária, injetor automático e detector de arranjo de fotodiodo, empregando-se uma coluna Acquity UPLC BEH C18 (150 mm x 2,1 mm i.d.; 1,7 µm), com volume de injeção de 10 µl. A fase móvel consistiu em um sistema gradiente de água acidificada com ácido fórmico 0,1% (A) e acetonitrila (B) em um fluxo constante de 0,3 ml/min, nas seguintes condições: 0-2 minutos isocrático de A-B (60:40 v/v); 2-5 minutos gradiente linear de A-B (60:40 v/v) para A-B (55:45 v/v); 5-7 minutos gradiente linear de A-B (55:45 v/v) para A-B (40:60 v/v); 7-8 minutos gradiente linear de A-B (40:60 v/v) para A-B (10:90 v/v); 8-10 minutos isocrático de A-B (10:90 v/v); 10-11 minutos gradiente linear de A-B (10:90 v/v) para A-B (60:40 v/v). Os cromatogramas foram adquiridos no comprimento de onda 330 nm e os espectros de UV foram monitorados na faixa de 190-500 nm.

Foram preparadas soluções a 10 µg/ml das quatro substâncias identificadas, em seguida as soluções foram filtradas em membrana de polivinilideno difluorido (PVDF) modificada de 0,22 µm e acondicionadas em vials para análise de pureza por CLUE-DAD.

A pureza das amostras foi determinada com base na área relativa do pico principal e dos seus contaminantes. O controle do sistema cromatográfico e processamento dos dados obtidos foi executado utilizando-se o software *Empower 3* (Waters®).

4.5 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO POR CLUE-DAD

Para quantificação dos marcadores presentes no extrato aquoso de *A. conyzoides* utilizou-se um cromatógrafo líquido modelo Acquity UPLC, da marca Waters® equipado com bomba quaternária, injetor automático e detector de arranjo de fotodiodo.

A separação dos marcadores foi obtida utilizando-se coluna Acquity UPLC BEH C18 (150 mm x 2.1 mm i.d.; 1.7 μ m) mantida a 25 °C, com volume de injeção de 10 μ l. A fase móvel consistiu um sistema gradiente de água acidificada com ácido fórmico 0,1% (pH: 3,0) (A) e acetonitrila (B) em um fluxo constante de 0,25 ml/min, nas seguintes condições: 0-4 minutos isocrático de A-B (90:10 v/v); 4-13 minutos gradiente linear de A-B (90:10 v/v) para A-B (70:30 v/v); 13-15 minutos isocrático de A-B (70:30 v/v); 15-17 minutos gradiente linear de A-B (70:30 v/v) para A-B (50:50 v/v); 17-24 minutos gradiente linear de A-B (50:50 v/v) para A-B (44:56 v/v); 24-24,1 minutos gradiente linear de A-B (44:56 v/v) para A-B (10:90 v/v); 24,1-25 minutos isocrático de A-B (10:90 v/v); 25-25,1 minutos gradiente linear de A-B (10:90 v/v) para A-B (90:10 v/v); com reequilíbrio da coluna durante 5 minutos. Os cromatogramas foram adquiridos no comprimento de onda de 275 nm para cumarina e 330 nm para o restante dos marcadores e os espectros de UV foram monitorados na faixa de 190-500 nm.

O controle do sistema cromatográfico e processamento dos dados obtidos foi executado utilizando-se o software *Empower 3* (Waters®).

4.6 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

O método analítico desenvolvido para quantificação dos marcadores foi validado segundo os parâmetros definidos pela ICH (2005) e agência de regulamentação europeia (EMA, 2011) que inclui a determinação de especificidade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão e robustez do método.

4.6.1 Linearidade

Para verificação da linearidade do método foram construídas, em triplicata, curvas de calibração dos marcadores. Preparou-se uma solução-mãe contendo todos os marcadores na concentração de 1000 μ g/g diluídos em metanol:água 10:90 (v/v) e a partir desta foram realizadas diluições sucessivas no intervalo de 0,05 a 5,0 μ g/g, em nove níveis (0,05; 0,10; 0,20; 0,50; 0,75; 1,0; 1,5; 2,0 e 5,0 μ g/g).

A partir dos resultados obtidos determinou-se a equação da reta e coeficiente de correlação das curvas analíticas utilizando software Microsoft Excel 2010 (Windows®). Os cromatogramas foram extraídos no comprimento de onda de 275 nm para quantificação da cumarina e 330 nm para quantificação do restante dos marcadores.

4.6.2 Limite de Detecção (LD) e Quantificação (LQ)

Os limites de detecção e quantificação foram obtidos por meio do método da relação sinal-ruído. Foram realizadas diluições sucessivas a partir da menor concentração da curva de calibração de cada marcador, obtendo-se soluções de baixa concentração, as quais foram injetadas, sendo os limites estabelecidos quando a relação sinal-ruído fosse de 3:1 para LD e 10:1 para LQ.

4.6.3 Especificidade

A especificidade do método foi avaliada por meio do cálculo da resolução entre os picos dos marcadores em relação aos picos próximos presentes no extrato e pela coinjeção com as substâncias referências. Também realizou-se o teste de pureza dos picos dos marcadores utilizando o software *Empower 3* (Waters[®]).

4.6.4 Precisão

A precisão do método foi verificada por meio da determinação da repetibilidade (intradia) e precisão intermediária (interdia). As variações intradia e interdia foram determinadas pela injeção em sextuplicata do extrato aquoso a 200 µg/g no mesmo dia e após três dias, respectivamente. Os valores de repetibilidade e precisão intermediária foram expressos pelo desvio padrão relativo entre as injeções (DPR%).

4.6.5 Exatidão

A exatidão do método foi obtida por meio do ensaio de adição do padrão. Quantidades conhecidas dos marcadores, em três níveis de concentração, foram adicionadas em soluções do extrato a 200 µg/g, em triplicata. Em seguida, as mesmas foram injetadas, assim como as soluções contendo apenas o extrato e as soluções contendo apenas os marcadores em concentração correspondente à quantidade adicionada nas soluções do extrato.

Os resultados foram expressos pela razão entre a concentração dos marcadores no extrato contaminado e a concentração teórica (estabelecida pela soma das concentrações medidas dos marcadores nas soluções contendo apenas o extrato e nas soluções contendo apenas os marcadores).

4.6.6 Robustez

A robustez do método foi verificada a partir de variações pequenas e deliberativas no fluxo da fase móvel (0,20 ml/min e 0,30 ml/min), na temperatura do forno da coluna (30 °C e forno desligado) e concentração de ácido fórmico (0,05% e 0,15% (v/v)). Para avaliação da robustez determinou-se, em triplicata, a influência dessas variações no teor, tempo de retenção, resolução dos marcadores entre os picos próximos.

Os resultados obtidos foram comparadas por meio de análise da variância (ANOVA) e teste Bonferroni, com nível de significância de 95%, utilizando software GraphPad Prism[®] versão 6.03.

4.7 ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA

O estudo de degradação forçada do extrato aquoso de *A. conyzoides* foi desenvolvido segundo os critérios definidos pela diretriz Q1A(R2) do ICH (2003), que incluem a determinação da estabilidade da amostra frente a condições extremas de temperatura, oxidação e susceptibilidade a hidrólise em contato com amplas faixas de pH.

O percentual de degradação dos marcadores foi calculado comparando-se os teores dos mesmos na amostra não submetida ao estudo de degradação.

4.7.1 Degradação por Refluxo Ácido

A hidrólise ácida do extrato de *A. conyzoides* foi avaliada, em triplicata, preparando-se em balão volumétrico de 10 ml uma solução a 500 µg/ml do extrato diluída em 5 ml de ácido clorídrico 1M. A solução foi mantida em refluxo por seis horas, sendo transferidos 300 µl desta solução para frasco de 1 ml. Adicionou-se hidróxido de sódio 1M em quantidade equimolar para neutralizar o pH e água purificada em quantidade suficiente para obter-se uma solução a 150 µg/g de extrato. A solução foi filtrada em membrana de PVDF modificada de 0,22 µm e acondicionada em vial para análise por CLUE-DAD utilizando o método analítico desenvolvido.

4.7.2 Degradação por Refluxo Alcalino

A hidrólise alcalina do extrato de *A. conyzoides* foi avaliada, em triplicata, preparando-se em balão volumétrico de 10 ml uma solução a 500 µg/ml do extrato diluída em 5 ml de hidróxido de sódio 1M, sendo mantida em refluxo por seis horas. Transcorrido o período estabelecido transferiu-se 300 µl desta solução para frasco de 1 ml. Adicionou-se ácido clorídrico 1M em quantidade equimolar para neutralizar o pH e água purificada em quantidade suficiente para obter-se uma solução a 150 µg/g de extrato. A solução foi filtrada em membrana de PVDF modificada de 0,22 µm e acondicionada em vial para análise por CLUE-DAD utilizando o método analítico desenvolvido.

4.7.3 Degradação por Refluxo Neutro

A hidrólise neutra do extrato de *A. conyzoides* foi avaliada em triplicata preparando-se em balão volumétrico de 10 ml uma solução a 500 µg/ml do extrato diluída em água purificada, sendo mantida em refluxo por seis horas. Transcorrido o período estabelecido transferiu-se 300 µl desta solução para frasco de 1 ml e adicionou-se água purificada em quantidade suficiente para obter-se uma solução a 150 µg/g de extrato. A solução foi filtrada em membrana de PVDF modificada de 0,22 µm e acondicionada em vial para análise por CLUE-DAD utilizando o método analítico desenvolvido.

4.7.4 Degradação por Oxidação

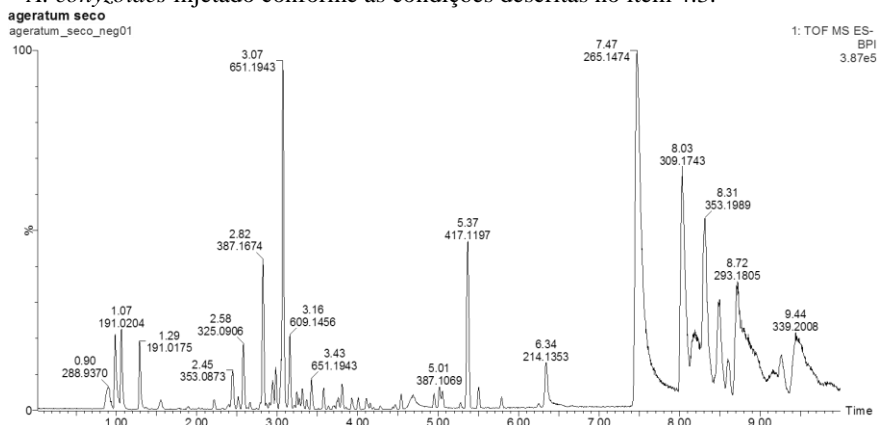
A oxidação do extrato de *A. conyzoides* foi avaliada, em triplicata, preparando-se em balão volumétrico de 10 ml uma solução a 500 µg/ml do extrato diluída com peróxido de hidrogênio 3% (v/v), sendo mantida em repouso por seis horas. Transcorrido o período estabelecido transferiu-se 300 µl desta solução para frasco de 1 ml e adicionou-se água purificada em quantidade suficiente para obter-se uma solução a 150 µg/g de extrato. A solução foi filtrada em membrana de PVDF modificada de 0,22 µm e acondicionada em vial para análise por CLUE-DAD utilizando o método analítico desenvolvido.

4.7.5 Degradação Térmica

A degradação térmica do extrato de *A. conyzoides* foi avaliada, em triplicata, preparando-se em balão volumétrico de 10 ml uma

solução a 500 $\mu\text{g/ml}$ do extrato diluída em água purificada, sendo mantida em estufa a 60 °C por sete dias. Transcorrido o período estabelecido ressuspendeu-se as amostras ao seu volume inicial, sendo transferidos 300 μl desta solução para frasco de 1 ml e adicionado água purificada em quantidade suficiente para obter-se uma solução a 150 $\mu\text{g/g}$ de extrato. A solução foi filtrada em membrana de PVDF modificada de 0,22 μm e acondicionada em vial para análise por CLUEDAD utilizando o método analítico desenvolvido.

Figura 9 – Cromatograma de picos base obtido por *ESI(-)* do extrato aquoso de *A. conyzoides* injetado conforme as condições descritas no item 4.3.



Comparando-se os dados de EM e tempos de retenção obtidos do extrato com dados obtidos a partir da injeção dos padrões e informações disponíveis na literatura foi possível identificar 17 substâncias presentes no extrato aquoso. Os tempos de retenção, valores de EM e UV máximo correspondentes às 17 substâncias estão dispostos nas Tabela 1 e 2, conforme aos dados obtidos em *ESI(+)* e *ESI(-)*, respectivamente.

Tabela 1 – Substâncias identificadas no extrato aquoso de *A. conyzoides* por CLUE-EM/DAD em ESI(+).

Tempo de retenção	m/z [M + H] ⁺ experimental	Fragmento MS/MS	BDE	Delta (ppm)	Fórmula molecular	UV máx. (nm)	Provável substância
2,24	300,1819	120,0666; 138,0797; 156,0891	3,5	2,7	C ₁₅ H ₂₅ O ₅ N	Sem absorção	Licopsamina
2,38	316,1806	94,0394; 138,0797; 155,0688; 172,0736	3,5	14,5	C ₁₅ H ₂₆ O ₆ N	Sem absorção	Licopsamina <i>N</i> -óxido
2,49	316,1770	94,0394; 138,0797; 155,0688; 172,0736	3,5	3,2	C ₁₅ H ₂₆ O ₆ N	Sem absorção	Isômero <i>N</i> -óxido
3,06	327,1092	147,0460; 165,0555	6,5	3,7	C ₁₅ H ₁₉ O ₈	218; 243; 322	Ácido cumárico <i>O</i> -glicopiranosídeo
3,93	165,0555	65,0210; 77,0219; 91,0316; 103,0292; 147,0181	5,5	1,8	C ₉ H ₉ O ₃	275; 324	Ácido cumárico
4,44	147,0460	77,0226; 91,0382; 103,0387	6,5	9,5	C ₉ H ₇ O ₂	275	Cumarina
5,01	389,1224	328,0800; 359,0628; 374,0860	10,5	-3,3	C ₂₀ H ₂₁ O ₈	338	Ageconiflavona C
5,5	403,1019	342,0733; 355,0435; 373,0823; 388,0823;	11,5	-2,5	C ₂₀ H ₁₉ O ₉	278; 337	7-hidroxi-5,6,8,5'-tetrametoxi-3',4'-metilenedioxiflavona

Tabela 1 – Substâncias identificadas no extrato aquoso de *A. conyzoides* por CLUE-EM/DAD em ESI(+) (continuação).

Tempo de retenção	<i>m/z</i> [M + H] ⁺ experimental	Fragmento MS/MS	BDE	Delta (ppm)	Fórmula molecular	UV máx. (nm)	Provável substância
5,77	373,1266	312,1089; 329,1129; 343,0981	10,5	-5,6	C ₂₀ H ₂₁ O ₇	241; 329	Sinensetina
6,08	403,1430	342,1117; 359,1139; 373,0986; 388,1134	10,5	9,2	C ₂₁ H ₂₃ O ₈	268; 318	5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavona
6,26	403,1389	342,1126; 355,0854; 373,0915; 388,1183	10,5	-1	C ₂₁ H ₂₃ O ₈	249; 268; 334	Nobiletina
6,29	387,1080	326,0564; 343,0650; 357,0368; 371,0576	11,5	0	C ₂₀ H ₁₉ O ₈	333	Linderoflavona B
6,38	345,0989	284,0763; 301,0714; 329,0647	10,5	4,3	C ₁₈ H ₁₇ O ₇	243; 337	Dihidroxi-trimetoxiflavona
6,60	433,1621	372,1268; 385,0976; 403,1055; 418,1346	10,5	28,2	C ₂₂ H ₂₅ O ₉	274; 322	5'-metoxinobiletina
6,72	417,1194	356,1020; 369,0794; 387,0915; 402,1208	11,5	1,9	C ₂₁ H ₂₁ O ₉	246; 338	Eupalestina

Tabela 2 – Substâncias identificadas no extrato aquoso de *A. conyzoides* por CLUE-EM/DAD em ESI(-).

Tempo de retenção	m/z [M - H] ⁻ experimental	Fragmento MS/MS	BDE	Delta (ppm)	Fórmula molecular	UV máx. (nm)	Provável substância
2,45	353,0873	179,0353; 191,0560	8,5	0	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	220; 243; 325	Ácido clorogênico
3,07	325,0943	119,0502; 163,0392	7,5	6,2	C ₁₅ H ₁₇ O ₈	192; 210; 275	Ácido cumárico <i>O</i> -glicopiranosídeo
3,93	163,0403	119,0502	4,9	6,5	C ₉ H ₇ O ₃	235; 275; 324	Ácido cumárico
5,05	387,1109	329,0708; 357,0606; 342,0380; 372,0893	11,5	7,5	C ₂₀ H ₁₉ O ₈	338	Ageconiflavona C
5,37	417,1197	389,0877; 402,0957	11,5	2,6	C ₂₁ H ₂₁ O ₉	279; 321	3'-hidroxi-5,6,7,8,4',5'-hexametoxiflavona
5,50	401,0871	371,0468; 386,0652	12,5	-0,5	C ₂₀ H ₁₇ O ₉	278; 337	7-hidroxi-5,6,8,5'-tetrametoxi-3',4'-metilenedioxiflavona

Os primeiros picos identificados no cromatograma obtido por *ESI(+)*, sugere tratar-se das substâncias licopsamina e seu derivado *N*-óxido, com tempos de retenção (TR) de 2,24 e 2,38 minutos, respectivamente. A elucidação do mecanismo de fragmentação da licopsamina (Figura 10) e seu derivado *N*-óxido (Figura 11) obtidos a partir da fragmentação dos íons *m/z* 300,1819 e 316,1806, aplicando-se uma energia de colisão de 20 V, confirmam a identidade destas substâncias.

Dados da literatura demonstram a presença deste e outros alcaloides pirrolizidínicos em ambas as partes desta planta (flores e folhas), em períodos de florescência (WIEDENFELD; RODER, 1991; AVULA et al., 2015). Resultado semelhante ao encontrado neste trabalho é relatado em estudo desenvolvido por Bosi e colaboradores (2013) que confirmou a presença do alcaloide licopsamina e seus derivados licopsamina *n*-óxido; dihidro-licopsamina; dihidro-licopsamina *N*-óxido; acetil-licopsamina e acetil-licopsamina *N*-óxido na preparação de uso medicinal de *A. conyzoides*.

Figura 10 – Mecanismo de fragmentação da substância licopsamina.

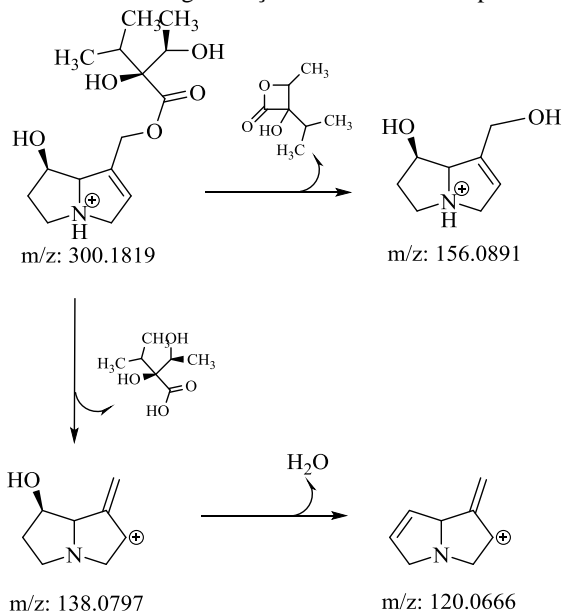
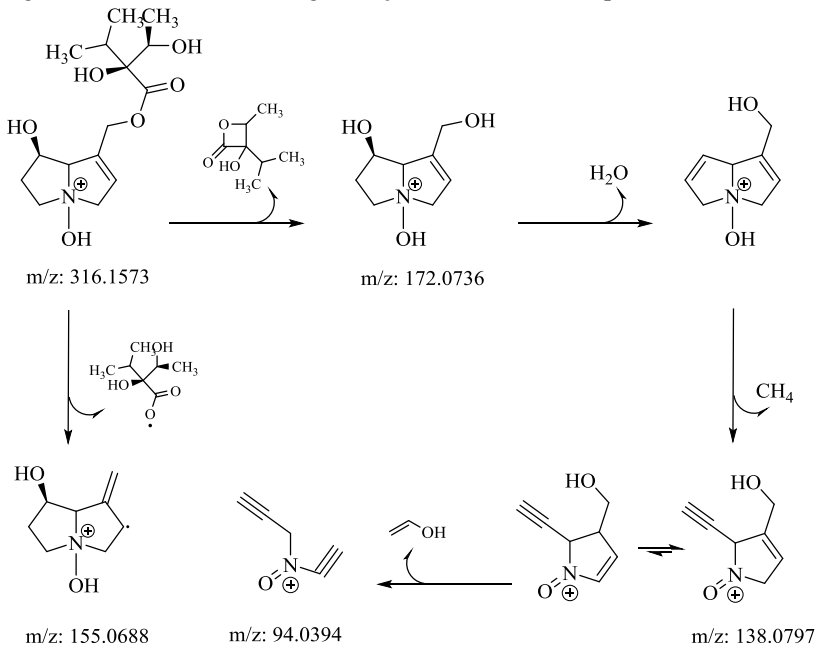
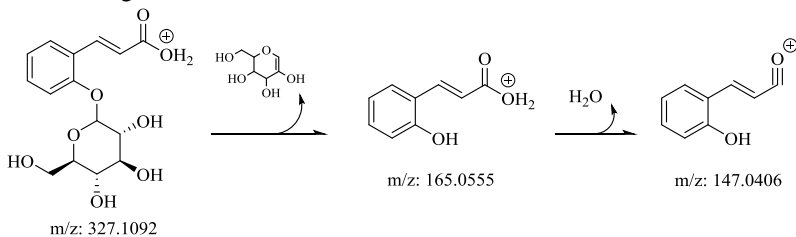


Figura 11 – Mecanismo de fragmentação da substância licopsamina *N*-óxido.



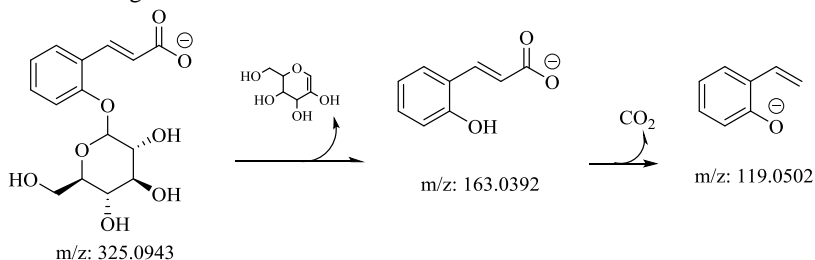
No cromatograma obtido por *ESI(+)* observa-se o pico com m/z 327,1092, com TR de 3,06 minutos, sugerindo tratar-se da substância ácido cumárico *O*-glicosídeo, uma vez que são observados no espectro de massa deste íon os fragmentos 165,0555 e 147,0460, correspondentes à perda do glicosídeo e de uma molécula de água, respectivamente, conforme demonstrado no mecanismo de fragmentação exposto na Figura 12. Esta substância é reportada pela primeira vez na espécie.

Figura 12 – Mecanismo de fragmentação em modo positivo da substância ácido cumárico *O*-glicosídeo.



A mesma substância é identificada no cromatograma obtido por *ESI(-)*, com TR de 3,07 minutos e m/z de 325,0943 $[M - H]^-$. No espectro de massa obtido a partir da fragmentação deste íon foram observados os fragmentos 163,0392 e 119,0502, provenientes da perda do glicosídeo e uma molécula de CO_2 (Figura 13), reforçando que o pico identificado trata-se da substância ácido cumárico *O*-glicosídeo.

Figura 13 – Mecanismo de fragmentação em modo negativo da substância ácido cumárico *O*-glicosídeo.



Posteriormente a identificação do ácido cumárico *O*-glicosídeo, também foi identificado no extrato a presença da substância conhecida como ácido cumárico, observada nos cromatogramas obtidos por *ESI(+)* e *ESI(-)* com valores de m/z equivalentes a 165,0555 $[M + H]^+$ e 163,0403 $[M - H]^-$, respectivamente e TR de 3,93 minutos. A identidade desta substância foi confirmada por comparação entre os dados obtidos a partir da fragmentação desta substância no extrato e a fragmentação de uma padrão analítico de ácido *o*-cumárico.

A fragmentação do íon m/z 163,0403, aplicando-se uma energia de colisão de 25 V, resultou no aparecimento de um único fragmento com m/z 119,0502, correspondente a perda de uma molécula de CO_2 do ácido cumárico (Figura 14). Entretanto, a partir da fragmentação do íon m/z 165,0555, aplicando-se uma energia de colisão de 25 V, foram observados diversos fragmentos característicos da substância, cujo mecanismo é apresentado na Figura 15.

O estudo desenvolvido por Xuan e colaboradores (2004) reporta a identificação de ácido cumárico nas folhas de *A. conyzoides*, não sendo identificado no caule e raízes desta espécie. Em contrapartida, Batish e colaboradores (2009) identificaram esta substância nas raízes de *A. conyzoides*.

Figura 14 – Mecanismo de fragmentação em modo negativo da substância ácido cumárico.

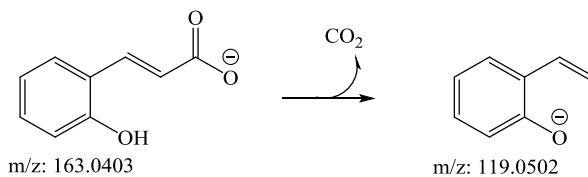
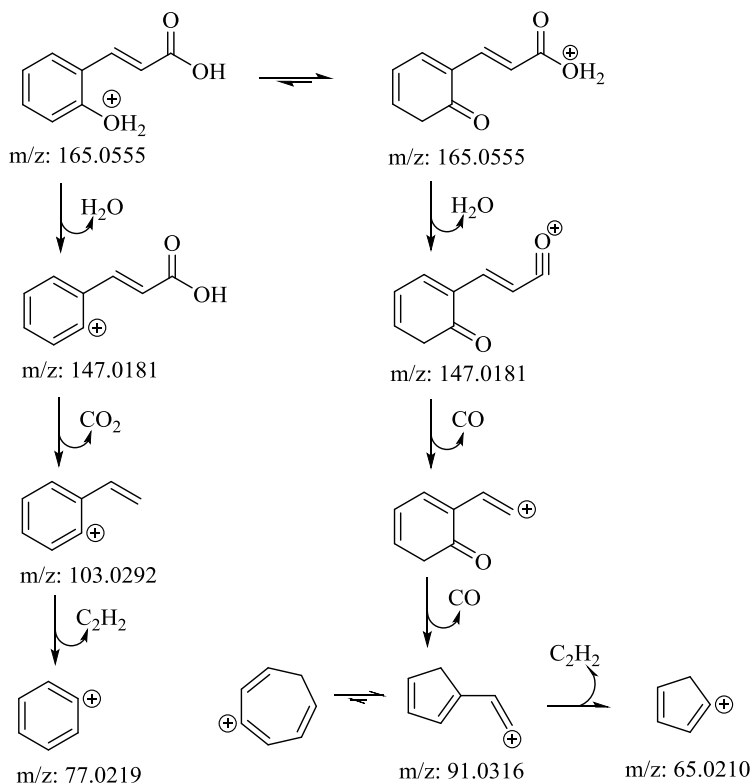


Figura 15 – Mecanismo de fragmentação em modo positivo da substância ácido cumárico.



Outra substância identificada no cromatograma obtido por *ESI(+)* é a substância 1,2-benzopiranona, conhecida como cumarina, com valor de m/z equivalente a 147,0460 $[M + H]^+$ e TR de 4,44 minutos. Dados da literatura demonstram que esta substância está presente no óleo essencial das folhas e caules (VERA, 1993), extrato hidroalcoólico

(WIDODO et al., 2008) e extrato aquoso de *A. conyzoides* (BOSI et al., 2013).

A identidade desta substância foi confirmada por comparação entre os dados obtidos a partir da fragmentação desta substância no extrato e a fragmentação de uma padrão analítico de cumarina. Foram observados fragmentos característicos desta substância em ambas amostras que permitiram a elucidação do seu mecanismo de fragmentação, exposto na Figura 16.

No cromatograma obtido por *ESI(-)* também observa-se a presença de um pico com m/z de 353,0873 $[M - H]^-$ e TR de 2,45 minutos. Avaliando-se os fragmentos obtidos a partir da fragmentação deste íon e em comparação com os dados obtidos através da injeção de um padrão analítico, identificou-se esse pico como sendo a substância ácido 5-cafeoilquínico, conhecida como ácido clorogênico.

A fragmentação do íon m/z 353,0873, aplicando-se uma energia de colisão de 15 V, ocasionou o aparecimento dos fragmentos m/z 191,0560 e 179,0353, resultantes da hidrólise do ácido clorogênico e consequente liberação das moléculas de ácido cafeico e ácido quínico, respectivamente. O mecanismo de fragmentação do ácido clorogênico é apresentado na Figura 17. Esta substância é reportada pela primeira vez na espécie.

Figura 16 – Mecanismo de fragmentação em modo positivo da substância cumarina.

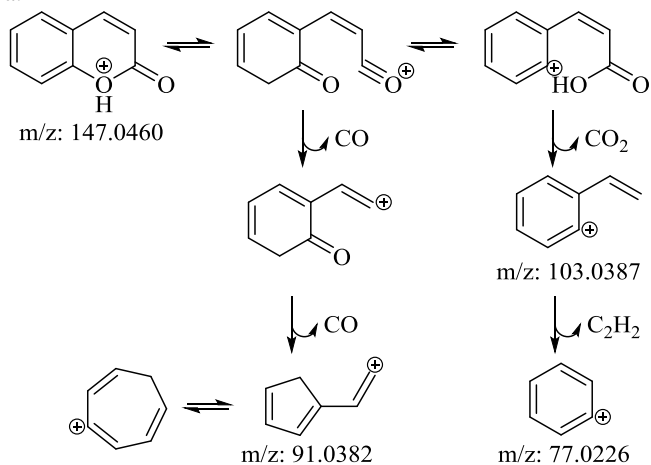
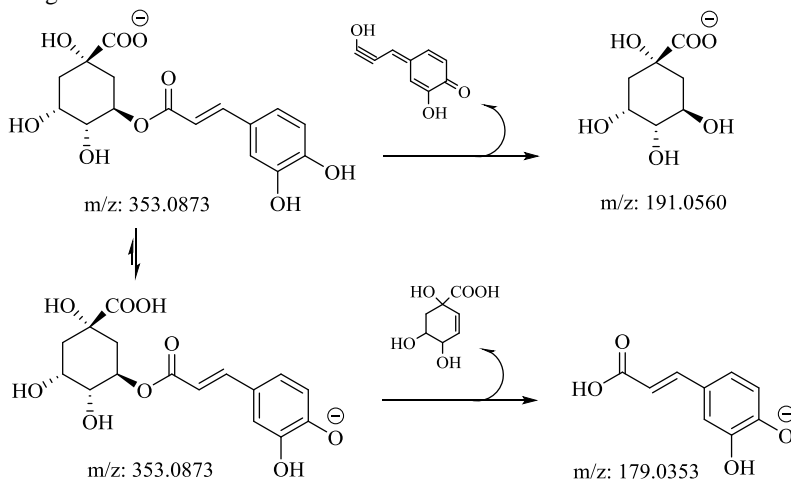


Figura 17 – Mecanismo de fragmentação em modo negativo da substância ácido clorogênico.



Foram identificadas dez metoxiflavonas no cromatograma obtido por *ESI(+)* do extrato de *A. conyzoides*, sendo três dessas presentes também no cromatograma obtido por *ESI(-)* deste extrato.

Avaliando-se os dados de EM dos íons m/z 389,1224 $[\text{M} + \text{H}]^+$ e 387,1109 $[\text{M} - \text{H}]^-$, correspondentes a mesma substância, sugere-se que esta trata-se da substância ageconiflavona C, isolada anteriormente do extrato etanólico de *A. conyzoides* (VYAS; MULCHANDANI, 1986).

O mecanismo de fragmentação da ageconiflavona C em modo negativo (Figura 18) e positivo (Figura 19) assemelha-se com o perfil de fragmentação de metoxiflavonas, que envolve o rompimento das ligações dos grupos metoxila e metila do flavonoide. Pelo fato de não ser possível confirmar a posição onde há a fragmentação, esta pode ocorrer em outras posições das metoxilas além destas propostas nas Figuras 18 e 19.

Figura 18 – Mecanismo de fragmentação em modo negativo da substância ageconiflavona C.

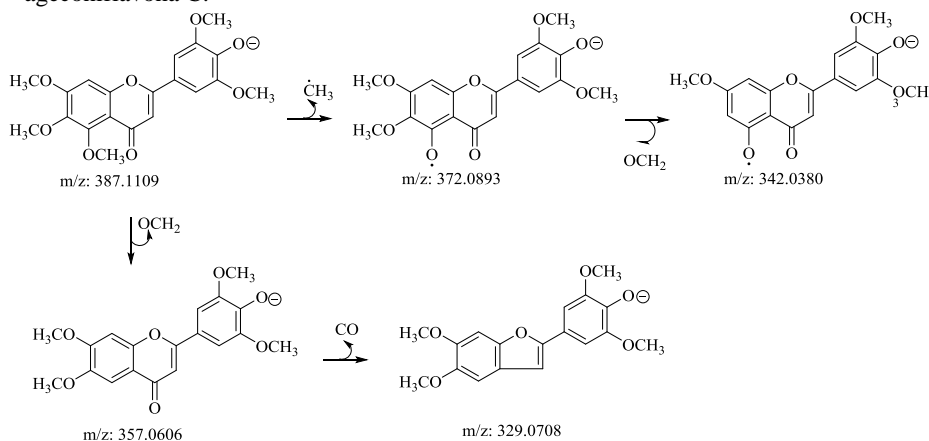
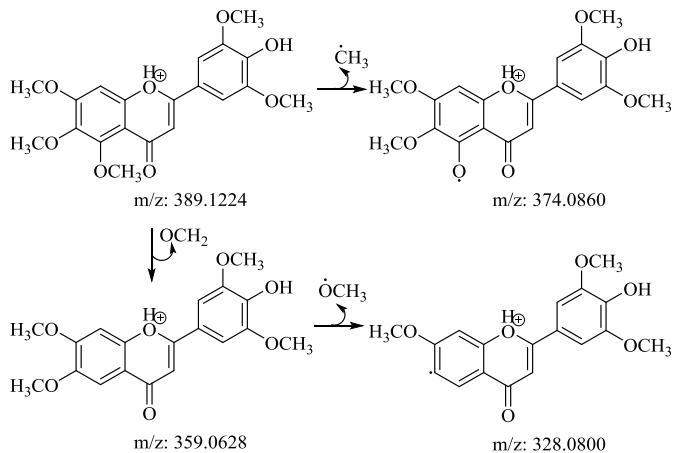


Figura 19 – Mecanismo de fragmentação em modo positivo da substância ageconiflavona C.



O mesmo repete-se para os íons m/z 419,1390 $[\text{M} + \text{H}]^+$ e 417,1197 $[\text{M} - \text{H}]^-$, correspondentes a substância 3'-hidroxi-5,6,7,8,4',5'-hexametoxiflavona. O mecanismo de fragmentação desta substância em modo negativo (Figura 20) e positivo (Figura 21) obtidos a partir da fragmentação dos íons, aplicando-se uma energia de colisão de 25 V, conferem com o perfil de fragmentação das metoxiflavonas. Avaliando-se os dados obtidos sugere-se que esta trata-se da substância 3'-hidroxi-

5,6,7,8,4',5'-hexametoxiflavona, isolada anteriormente do extrato de *n*-hexano de *A. conyzoides* (BOSI et al., 2013).

Observa-se em ambos os cromatogramas do extrato de *A. conyzoides* a presença de um pico de baixa intensidade, cujos valores de m/z correspondem a 403,1019 $[M + H]^+$ e 401,0871 $[M - H]^-$ quando avaliado em *ESI(+)* e *ESI(-)*, respectivamente. Aplicando-se uma energia de colisão de 25 V sobre estes íons foram observados fragmentos correspondentes as moléculas de metanol, formaldeído e metano, semelhante aos fragmentos detectados no perfil de fragmentação das metoxiflavonas.

Avaliando-se a composição elementar dos íons m/z 403.1019 e 401.0871 chegou-se a fórmula molecular de $C_{20}H_{19}O_9$ $[M + H]^+$ e $C_{20}H_{17}O_9$ $[M - H]^-$, respectivamente. Não foram encontradas na literatura substâncias isoladas de *A. conyzoides* com fórmula molecular correspondente à estes adutos, entretanto, o valor é equivalente a substância 7-hidroxi-5,6,8,5'-tetrametoxi-3',4'-metilenedioxiflavona, isolada anteriormente da espécie *Ageratum tomentosum* var. *bracteatum* (VÁZQUEZ; AMARO; JOSEPH-NATHAN, 1988). Portanto, sugere-se que esta seja a substância correspondente ao pico observado no extrato, contudo é necessário sua purificação a partir do extrato para a confirmação desta hipótese.

Figura 20 – Mecanismo de fragmentação em modo negativo da substância 3'-hidroxi-5,6,7,8,4',5'-hexametoxiflavona.

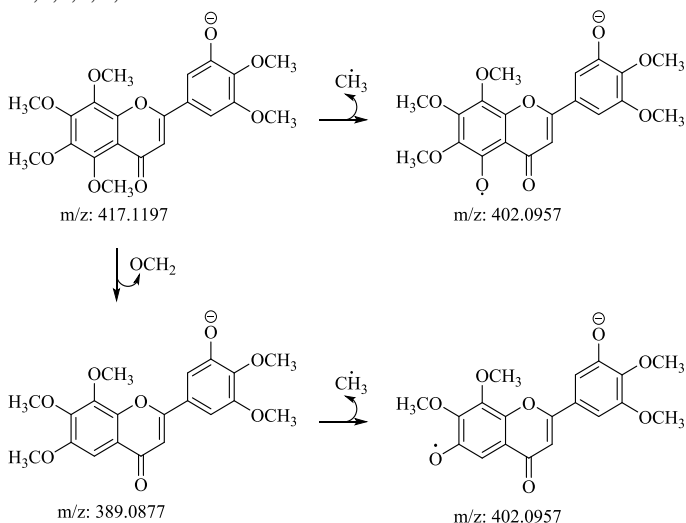
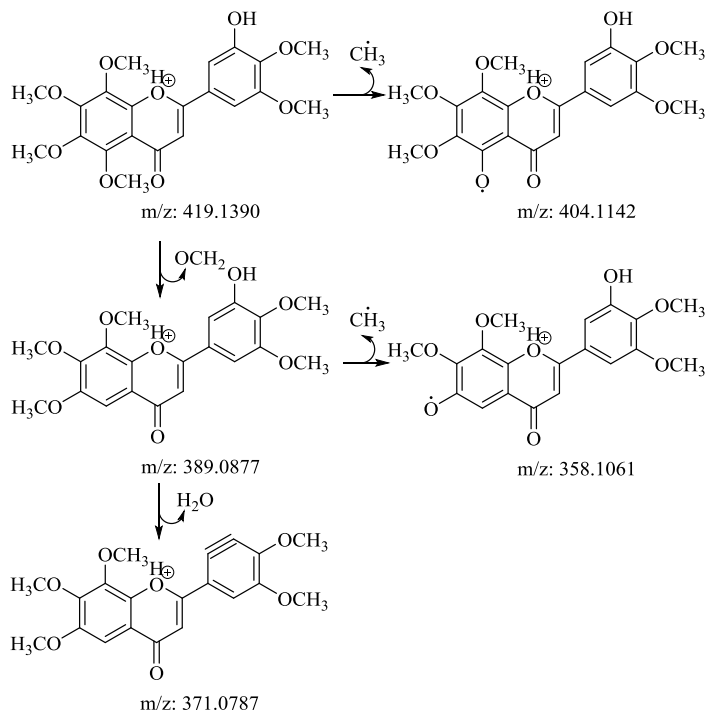


Figura 21 – Mecanismo de fragmentação em modo positivo da substância 3'-hidroxi-5,6,7,8,4',5'-hexametoxiflavona.



Foi identificado no cromatograma do extrato obtido por *ESI(+)* o pico com m/z de 373,1266 $[\text{M} + \text{H}]^+$, com TR de 5,77 minutos, cujo perfil de fragmentação assemelha-se ao das metoxiflavonas, uma vez que são encontrados fragmentos correspondentes a perda de moléculas de metanol, formaldeído e metano.

Comparando-se os dados de EM obtidos sugere-se que o pico identificado no extrato equivale a substância 5,6,7,3',4'-pentametoxiflavona, conhecida por sinensetina, isolada anteriormente do extrato de *n*-hexano de *A. conyzoides* (GONZÁLEZ et al., 1991b). O mecanismo de fragmentação desta substância é apresentado na Figura 22.

Foram observados no cromatograma do extrato obtido por *ESI(+)* dois picos com TR e valores de m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ muito semelhantes (6,08 e

6,26 minutos; 403,1430 e 403,1389, respectivamente), sugerindo tratarem-se das substâncias isômeras.

São reportadas na espécie os isômeros 5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavona e nobiletina isolados anteriormente do extrato de *n*-hexano de *A. conyzoides* (GONZÁLEZ et al., 1991b). A identidade dos picos foi confirmada por comparação entre os tempos de retenção destas substâncias no extrato e dos padrões analíticos 5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavona e nobiletina, que possibilitaram inferir que os picos com tempos de retenção de 6,08 de 6,26 minutos, referem-se a substância 5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavona e nobiletina, respectivamente. O mecanismo de fragmentação destas substâncias é apresentado na Figura 23 e 24.

Figura 22 – Mecanismo de fragmentação em modo positivo da substância sinensetina.

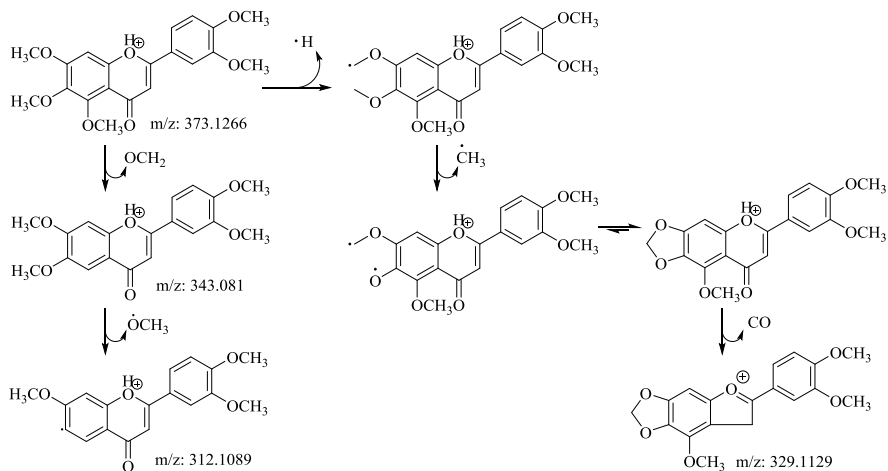


Figura 23 – Mecanismo de fragmentação em modo positivo da substância 5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavona.

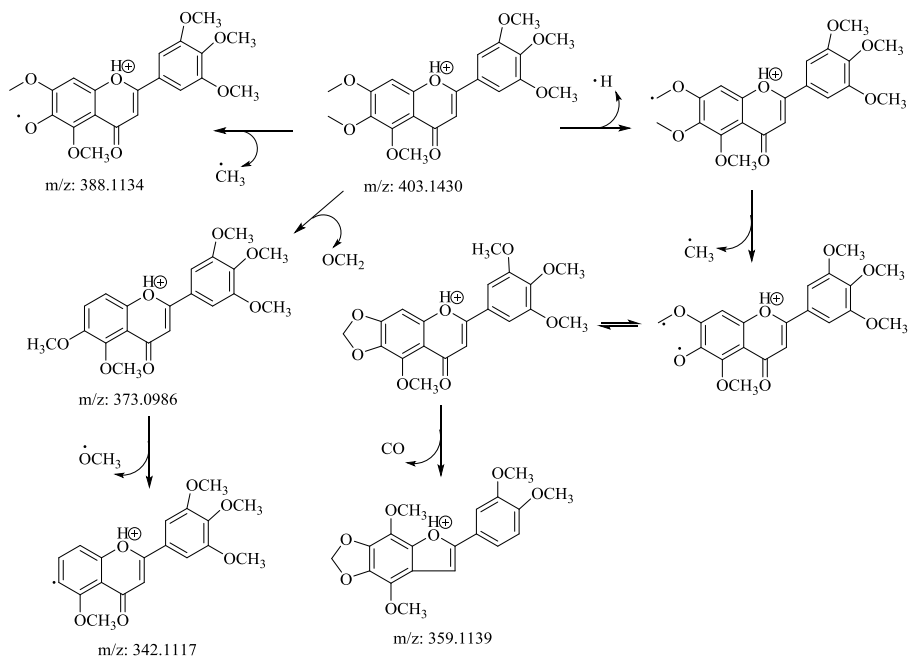
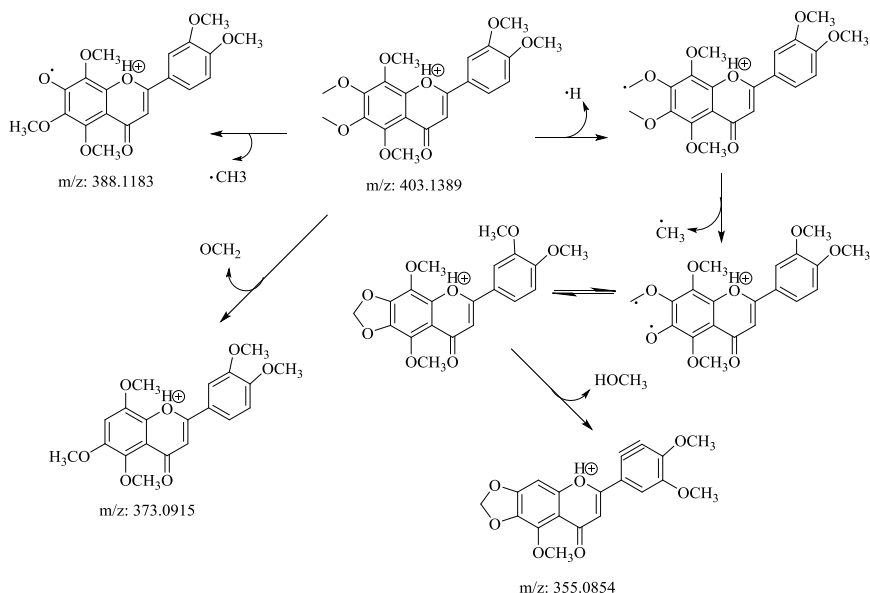


Figura 24 – Mecanismo de fragmentação em modo positivo da substância nobiletina.



Identificou-se no cromatograma obtido por *ESI(+)* o pico com m/z de 387,1080 $[\text{M} + \text{H}]^+$, com TR de 6,29 minutos, cujo perfil de fragmentação obtido também assemelha-se ao das metoxiflavonas, conforme demonstrado no mecanismo de fragmentação apresentado na Figura 25.

Comparando-se os dados de EM obtidos sugere-se que o pico identificado no extrato equivale a substância 5,6,7,8-tetrametoxi-3',4'-metilenodioxiflavona, conhecida por linderoflavona B, isolada anteriormente do extrato de *n*-hexano de *A. conyzoides* (GONZÁLEZ et al., 1991b).

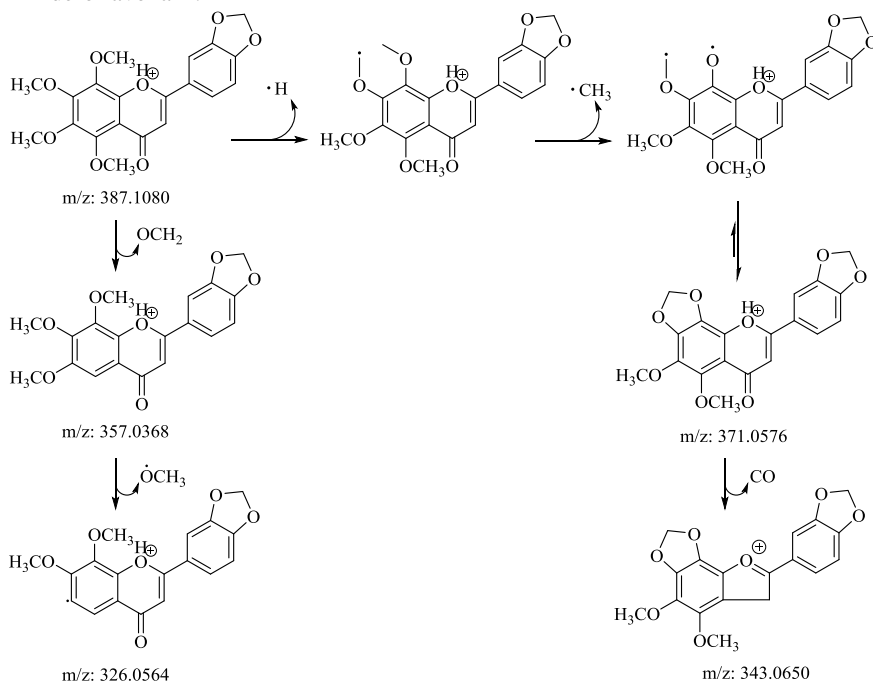
No cromatograma do extrato obtido por *ESI(+)* é possível identificar a presença de um pico de baixa intensidade com m/z de 345,0989 $[\text{M} + \text{H}]^+$ e TR de 6,38 minutos. A partir da fragmentação deste íon, aplicando-se uma energia de colisão de 25 V, observam-se fragmentos correspondentes às perdas na estrutura de moléculas de metano, formaldeído e metanol, condizentes com o perfil de fragmentação das metoxiflavonas.

Avaliando-se a composição elementar do íon m/z 345,0989 chegou-se a fórmula molecular de $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{O}_7$ $[\text{M} + \text{H}]^+$, entretanto não

foram encontradas na literatura substâncias isoladas de *A. conyzoides* com fórmula molecular correspondente à este aduto.

Existem diversas metoxiflavonas oriundas de produtos naturais cuja fórmula molecular é $C_{18}H_{17}O_7$ $[M + H]^+$. Entretanto, as metoxiflavonas descritas com esta fórmula molecular apresentam um perfil de substituição de dihidroxi-trimetoxiflavona, sugerindo que a substância correspondente ao pico m/z 345,0989 observado no extrato apresenta este tipo de estrutura. Contudo é necessário sua purificação a partir do extrato para a confirmação desta hipótese.

Figura 25 – Mecanismo de fragmentação em modo positivo da substância linderoflavona B.



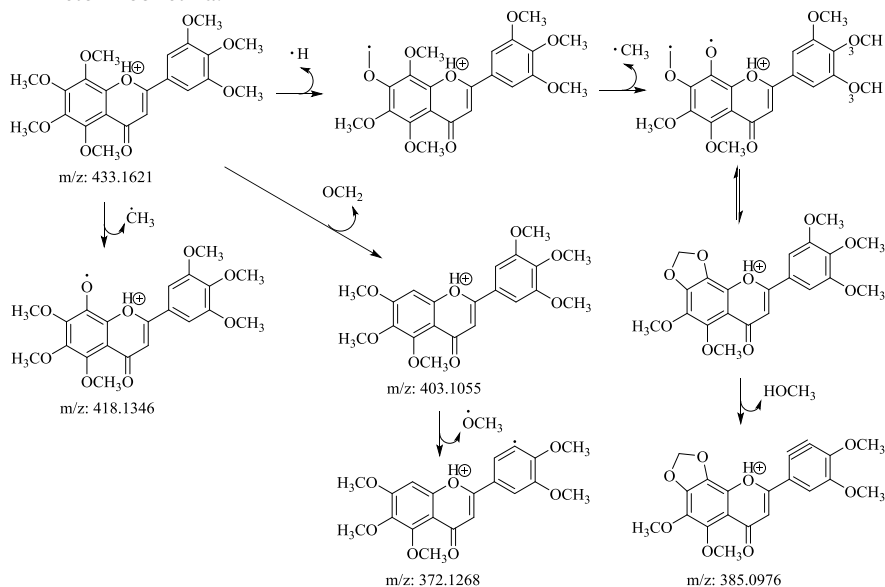
Entre as substâncias identificadas no extrato de *A. conyzoides* a mais abundante no cromatograma obtido por *ESI(+)* é a substância correspondente ao pico com TR de 6,60 minutos e m/z equivalente a 433,1621 $[M + H]^+$. A partir da fragmentação deste íon, aplicando-se uma energia de colisão de 25 V, observa-se fragmentos correspondentes

às perdas na estrutura de moléculas de metano, formaldeído e metanol, semelhante ao perfil de fragmentação das metoxiflavonas.

A comparação entre os dados de EM e tempo de retenção obtidos desta substância no extrato e do padrão analítico disponível, possibilitou a identificação deste pico como sendo correspondente a substância 5'-metoxinobiletina. O mecanismo de fragmentação desta substância é apresentado na Figura 26.

Estudos anteriores reportam o isolamento desta substância no extrato de *n*-hexano (GONZÁLEZ et al., 1991b) e no extrato aquoso de *A. conyzoides* (BOSI et al., 2013).

Figura 26 – Mecanismo de fragmentação em modo positivo da substância 5'-metoxinobiletina.

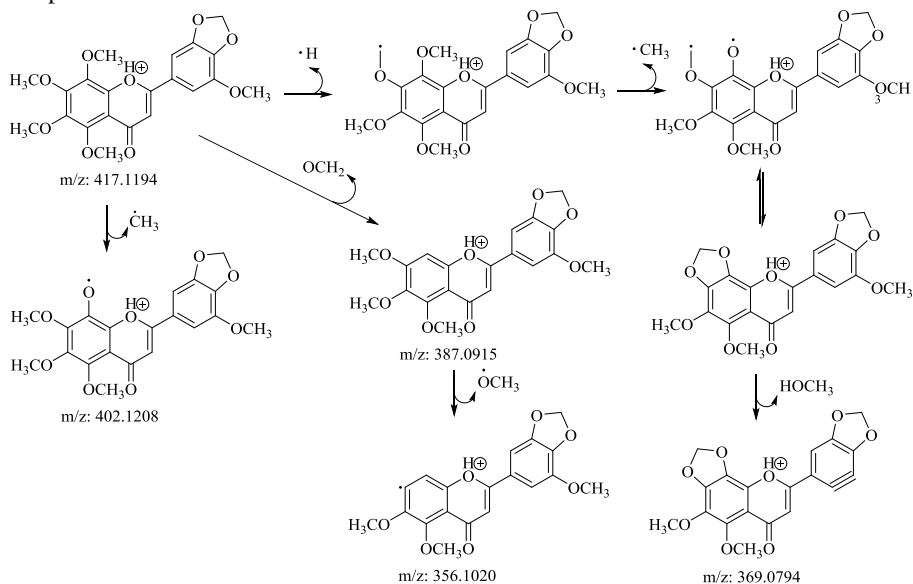


A substância com maior de tempo de retenção no cromatograma obtido por *ESI*(+) do extrato de *A. conyzoides* apresentou m/z de 417,1194 $[M + H]^+$ e TR de 6,72 minutos. O mecanismo de fragmentação desta substância em modo positivo (Figura 27) obtido a partir da fragmentação deste íon, aplicando-se uma energia de colisão de 25 V, confere com o perfil de fragmentação das metoxiflavonas.

Avaliando-se os dados de EM e tempo de retenção obtidos desta substância no extrato e comparando-se com os resultados obtidos a partir da injeção de um padrão analítico, pode-se determinar que a

substância presente no extrato corresponde a metoxiflavona 5,6,7,8,5'-pentametoxy-3',4'-metilenodioxiflavona, conhecida como eupalestina, isolada anteriormente no extrato de *n*-hexano (GONZÁLEZ et al., 1991b) e no extrato aquoso de *A. conyzoides* (BOSI et al., 2013).

Figura 27 – Mecanismo de fragmentação em modo positivo da substância eupalestina.



Com o objetivo de identificar a presença de outras classes de substâncias no extrato aquoso de *A. conyzoides*, foram injetados padrões analíticos de encocalinol, eupatório cromeno, precoceno I e II, sesamina e quercetina durante os experimentos de caracterização do extrato, visto que estas substâncias são reportadas para a espécie. Contudo, a comparação dos dados de EM e tempo de retenção obtidos a partir da injeção dos padrões com aqueles observados nos cromatogramas do extrato permitiu concluir que estas substâncias não estão presentes na matriz vegetal preparada.

5.2 PURIFICAÇÃO DAS METOXIFLAVONAS

5.2.1 Elucidação estrutural e pureza da substância AC1

A substância AC1 (77,9 mg) apresentou-se como uma precipitado branco solúvel em clorofórmio e metanol. A partir dos dados obtidos de RMN ^1H e EM para a substância AC1, identificou-se esta como sendo a substância conhecida por 5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavona. Com pureza de 97,07%, conforme a análise de CLUE-DAD.

A análise espectro de RMN ^1H desta substância (Figura 28) mostra um simpleto em 7,08 ppm (2H, H-2' e H-6') demonstrando tratar-se de hidrogênios simétricos e outro simpleto em 6,80 ppm (1H, H-8), sugestivos de hidrogênios de anel aromático. Também observa-se outro simpleto em 6,60 ppm (1H, H-3) cujo valor mais desblindado sugere hidrogênio olefínico (Figura 29).

Figura 28 – Espectro de RMN ^1H (600 MHz, TMS, CDCl_3) para a substância AC1 (5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavona) de *A. conyzoides*.

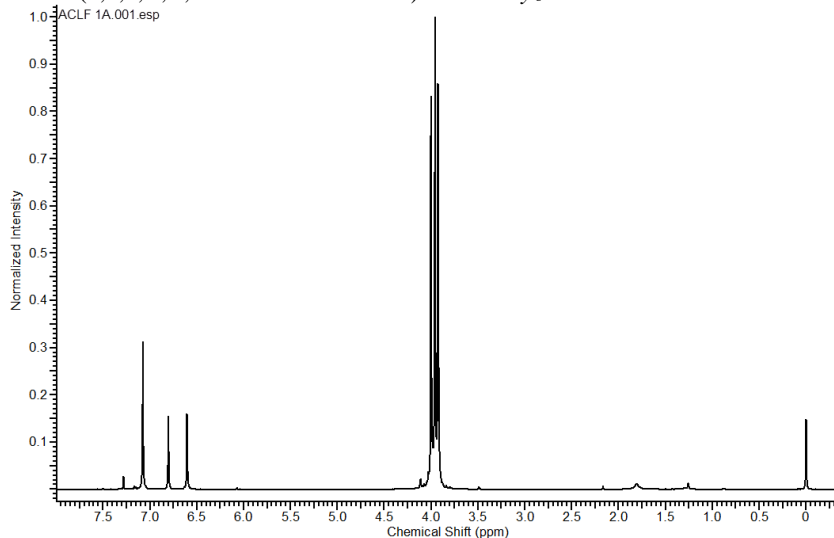
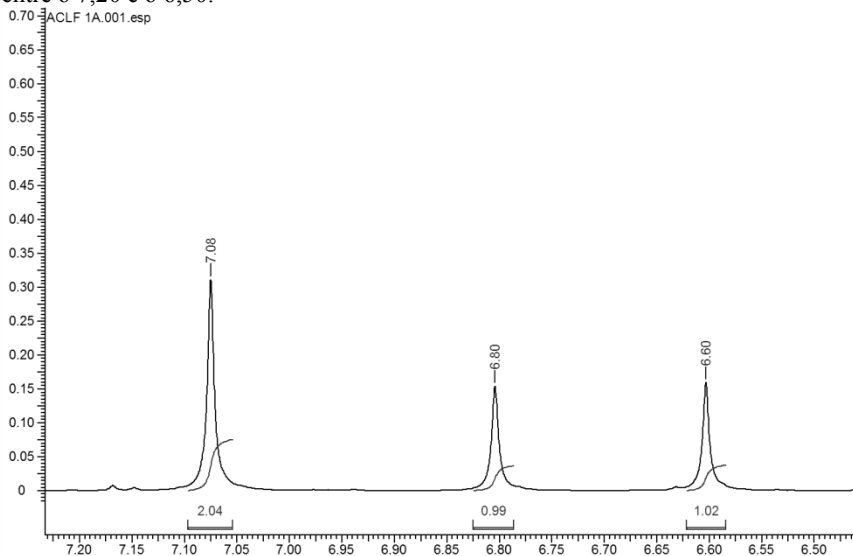


Figura 29 – Espectro de RMN ^1H (600 MHz, TMS, CDCl_3) para a substância AC1 (5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavona) de *A. conyzoides*, ampliado na região entre δ 7,20 e δ 6,50.



Os dados de RMN ^1H obtidos para a substância AC1 foram comparados com a literatura (CHEN et al., 1984; GONZÁLEZ et al., 1991b; HORIE; TOMINAGA; KAWAMURA, 1993; PASSADOR et al., 1997) e estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Dados de RMN ^1H para a substância AC1 (5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavona) de *A. conyzoides* e dados comparativos da literatura.

Posição	AC1	(GONZÁLEZ et al.,	(PASSADOR et al.,
	δ $^1\text{H mult. (J Hz)$ (CD_3Cl , 600 MHz)	1991b) δ $^1\text{H mult. (J Hz)$ (CD_3Cl , 60 MHz)	1997) δ $^1\text{H mult. (J Hz)$ (CD_3Cl , 400 MHz)
H-3	6,60s	6,61s	6,62s
H-7	-	6,80s	-
H-8	6,80s	-	6,81s
H-2'	7,08s	7,07s	7,08s
H-6'	7,08s	7,07s	7,08s
OCH ₃	4,00s	4,00s	4,00s
	4,00s	4,00s	4,04s
	3,96s	3,96s	3,96s
	3,96s	3,96s	3,96s
	3,93s	3,92s	3,93s
	3,93s	3,92s	3,93s

O espectro de massa obtido por *ESI(+)* da substância AC1 (Figura 30) apresenta um valor de m/z equivalente a 403,1384 Da $[M + H]^+$. A diferença entre o valor experimental obtido e o valor teórico calculado para a estrutura proposta (403,1387 Da) é de $-0,854$ ppm, confirmando que a amostra AC1 trata-se da substância 5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavona (Figura 31).

Figura 30 - Espectro de massa *FTMS full scan ESI(+)* da substância AC1 (5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavona) de *A. conyzoides*.

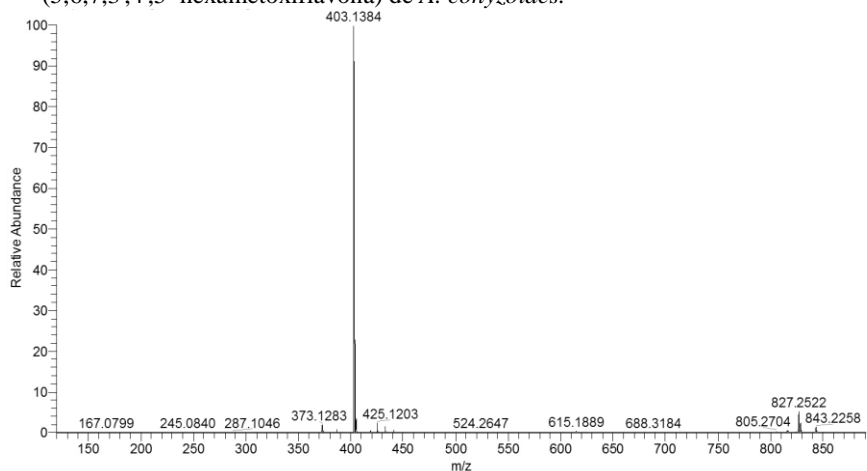
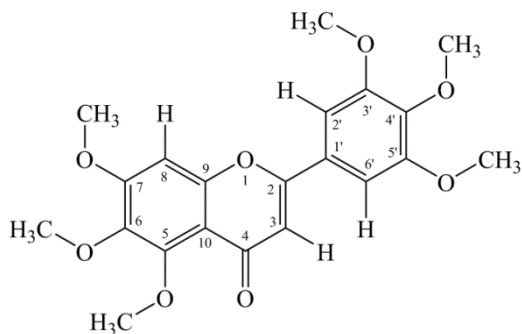


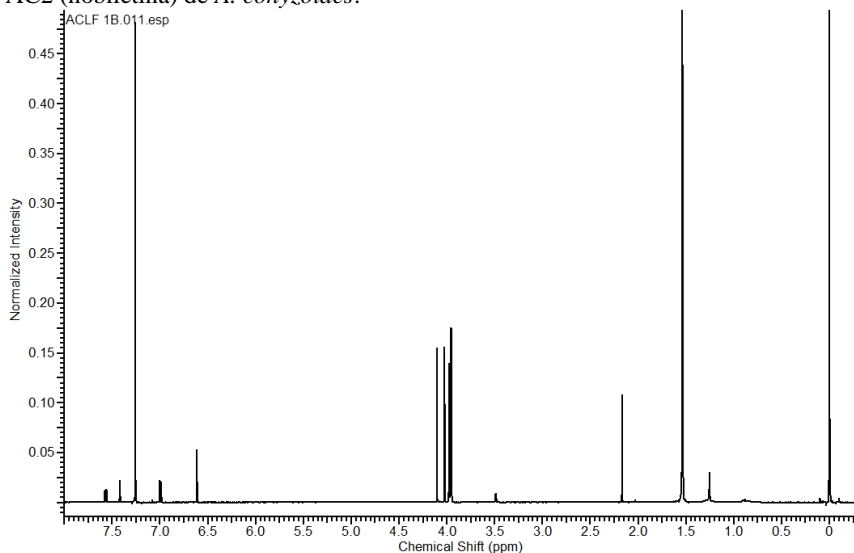
Figura 31 - Estrutura molecular da substância AC1 (5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavona) de *A. conyzoides*.



5.2.2 Elucidação estrutural e pureza da substância AC2

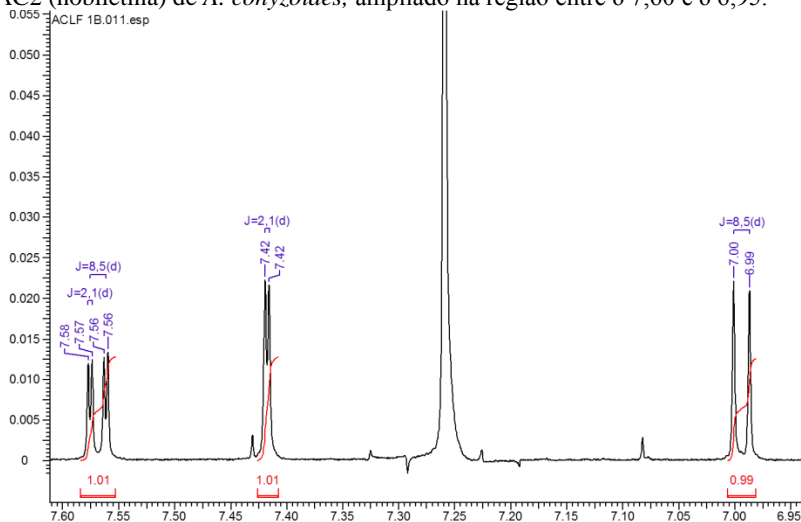
A substância AC2 (17 mg) apresentou-se como um precipitado branco, solúvel em clorofórmio e metanol. A partir dos dados obtidos de RMN ^1H (Figura 32) e EM para a substância AC2, identificou-se esta como sendo a substância conhecida por nobiletina. Com pureza de 99,60%, conforme a análise de CLUE-DAD.

Figura 32 – Espectro de RMN ^1H (600 MHz, TMS, CDCl_3) para a substância AC2 (nobiletina) de *A. conyzoides*.



A ampliação do espectro de RMN ^1H da substância AC2 (Figura 33) mostra um conjunto de hidrogênios típicos de anel aromático formando por dois sinais de duplete em 7,42 ppm (1H, $J=2,1$, H-2') e em 6,99 ppm (1H, $J=8,5$, H-5') e um sinal de duplete de duplete em 7,57 ppm (1H, $J=8,5;2,1$, H-6'). As constantes de acoplamento sugerem anel aromático com três hidrogênios, sendo o hidrogênio δ 7,57 *dd* em posição *orto* referente ao hidrogênio em δ 6,99 *d*, e em *meta* em relação ao hidrogênio em δ 7,42 *d*. Observa-se um simpleto em 6,61 ppm (1H, H-3) cujo valor mais desblindado sugere hidrogênio olefínico.

Figura 33 – Espectro de RMN ^1H (600 MHz, TMS, CDCl_3) para a substância AC2 (nobiletina) de *A. conyzoides*, ampliado na região entre δ 7,60 e δ 6,95.



Os dados de RMN ^1H obtidos para a substância AC2 foram comparados com a literatura (MIYAZAWA et al., 1999; WANG et al., 2005; WANG et al., 2007) e estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Dados de RMN ^1H para a substância AC2 (nobiletina) de *A. conyzoides*, e dados comparativos da literatura.

Posição	AC2	(WANG et al.,	(MIYAZAWA et al.,
	δ $^1\text{H mult. (J Hz)$ (CD_3Cl , 600 MHz)	2005) δ $^1\text{H mult. (J Hz)$ (CD_3Cl , 600 MHz)	1999) δ $^1\text{H mult. (J Hz)$ (CD_3Cl , 270 MHz)
H-3	6,61s	6,65s	6,63s
H-2'	7,42d (2,1)	7,42d (2,4)	7,41d (2)
H-5'	6,99 d (8,5)	6,99d (8,4)	6,99d (9)
H-6'	7,57dd (8,5; 2,1)	7,58dd (9,6; 2,4)	7,57dd (9;2)
OCH ₃	4,10s	4,11s	4,11s
	4,03s	4,03s	4,03s
	3,99s	3,98s	3,98s
	3,96s	3,97s	3,96s
	3,955s	3,97s	3,95s
	3,953s	3,96s	3,95s

A análise de EM (Figura 34) obtido por *ESI(+)* da substância AC2 exibe o valor de *m/z* equivalente a 403,1383 Da $[\text{M} + \text{H}]^+$.

Comparando-se o peso molecular obtido do ensaio com o valor teórico calculado para a estrutura proposta (403,1387 Da) obtém-se uma diferença de $-1,102$ ppm, confirmando que a amostra AC2 trata-se da substância nobiletina (Figura 35).

Figura 34 – Espectro de massa *FTMS full scan ESI(+)* da substância AC2 (nobiletina) de *A. conyzoides*.

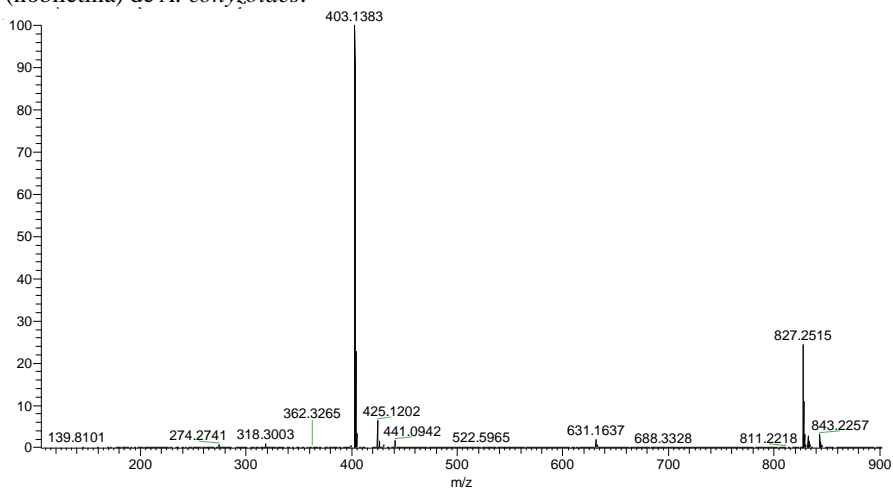
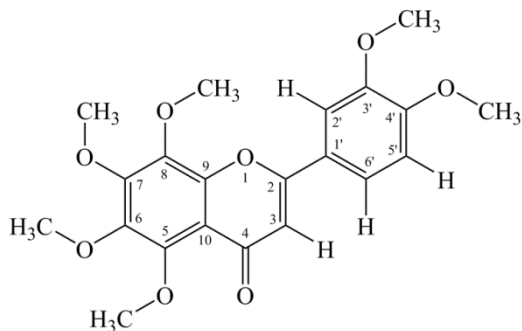


Figura 35 – Estrutura molecular da substância AC2 (nobiletina) de *A. conyzoides*.



5.2.3 Elucidação estrutural e pureza da substância AC3

A substância AC3 (97,3 mg) foi isolada na forma de um precipitado branco, solúvel em clorofórmio e metanol. A partir dos dados obtidos de RMN ^1H e EM para a substância AC3, identificou-se esta como sendo a substância conhecida por 5'-metoxinobiletina, com pureza de 98,62%, conforme a análise de CLUE-DAD.

O espectro de RMN ^1H desta substância é apresentado na Figura 36. Na ampliação do espectro de RMN ^1H da substância AC3 (Figura 37) observa-se um simpleto em 7,17 ppm (2H, H-2' e H-6') demonstrando tratar-se de hidrogênios simétricos sugestivos de hidrogênios de anel aromático. Observa-se também, outro simpleto em 6,63 ppm (1H, H-3) cujo valor mais desblindado sugere hidrogênio olefínico.

Figura 36 – Espectro de RMN ^1H (600 MHz, TMS, CDCl_3) para a substância AC3 (5'-metoxinobiletina) de *A. conyzoides*.

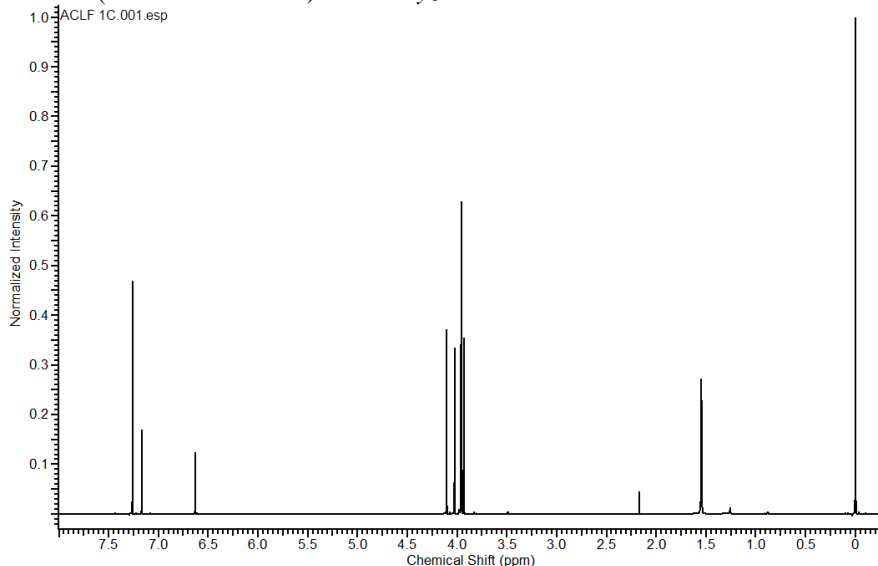
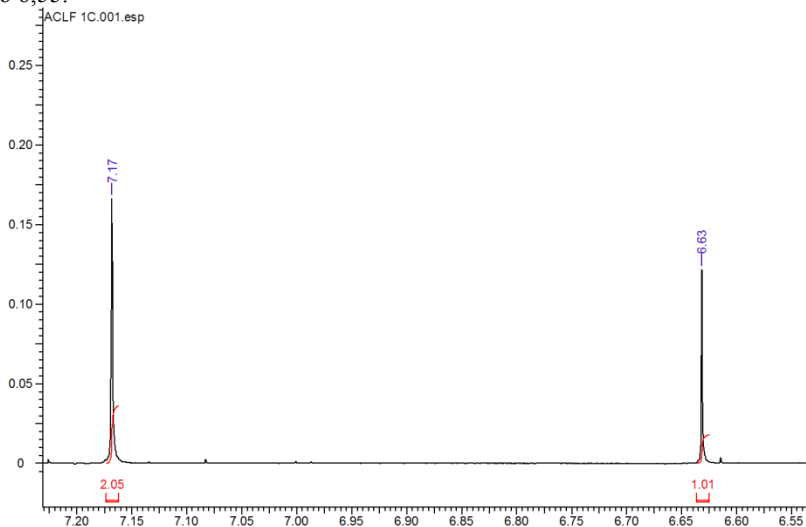


Figura 37 – Espectro de RMN ^1H (600 MHz, TMS, CDCl_3) para a substância AC3 (5'-metoxinobiletina) de *A. conyzoides*, ampliado na região entre δ 7,20 e δ 6,55.



Os dados de RMN ^1H obtidos para a substância AC3 foram comparados com a literatura (ADESOGAN; OKUNADE, 1979; LE-VAN; PHAM, 1979; MOREIRA et al., 2007) e estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Dados de RMN ^1H para a substância AC3 (5'-metoxinobiletina) de *A. conyzoides*, e dados comparativos da literatura.

Posição	AC3	(MOREIRA et al.,	(LE-VAN; PHAM,
	δ $^1\text{H mult.}$ (J Hz) (CD_3Cl , 600 MHz)	2007) δ $^1\text{H mult.}$ (J Hz) (CD_3Cl , 400 MHz)	1979) δ $^1\text{H mult.}$ (J Hz) (CD_3Cl , 100 MHz)
H-3	6,63s	6,63s	6,62s
H-2'	7,17s	7,15s	7,16s
H-6'	7,17s	7,15s	7,16s
OCH ₃	4,11s	4,10s	4,09s
	4,02s	4,01s	4,02s
	3,96s	3,94s	3,95s
	3,95s	3,94s	3,95s
	3,95s	3,94s	3,95s
	3,95s	3,94s	3,95s
	3,93s	3,92s	3,92s

No espectro de massa obtido por *ESI(+)* da substância AC3 (Figura 38) é possível observar o valor de m/z equivalente a 433,1486 Da $[M + H]^+$. A diferença entre o valor experimental obtido e o valor teórico calculado para esta substância (433,1493 Da) é de - 1,624 ppm, confirmando que a amostra AC3 trata-se da substância 5'-metoxinobiletina (Figura 39).

Figura 38 – Espectro de massa *FTMS full scan ESI(+)* da substância AC3 (5'-metoxinobiletina) de *A. conyzoides*.

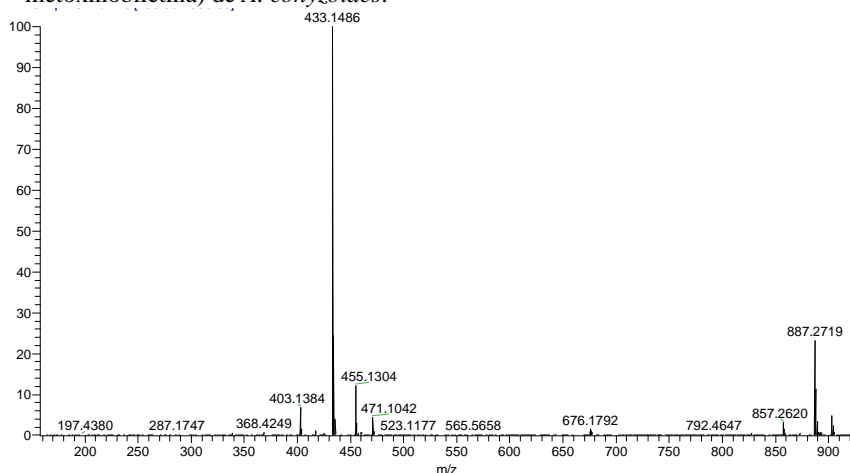
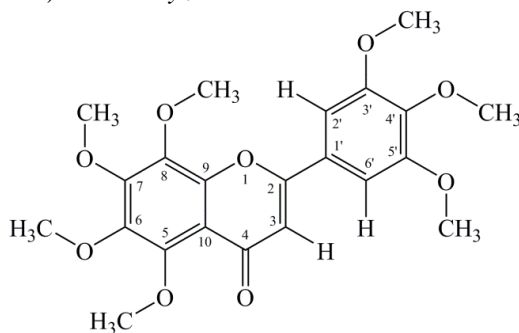


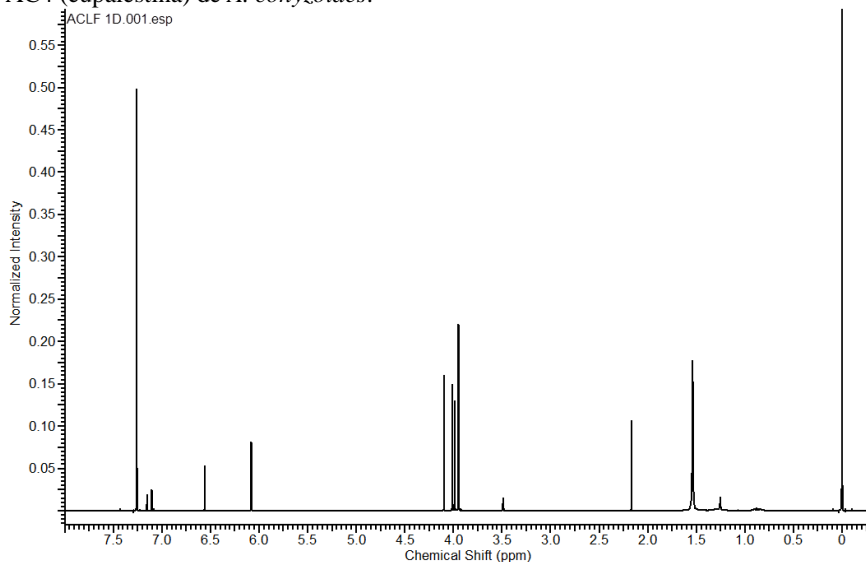
Figura 39 - Estrutura molecular da substância AC3 (5'-metoxinobiletina) de *A. conyzoides*.



5.2.4 Elucidação estrutural e pureza da substância AC4

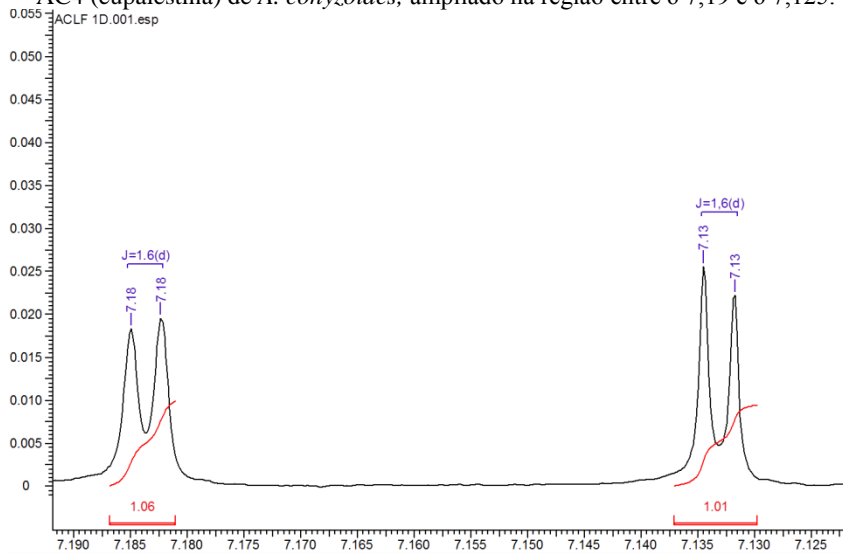
A substância AC4 (12,1 mg) foi isolada na forma de um precipitado branco, solúvel em clorofórmio e metanol. A partir dos dados obtidos de RMN ^1H (Figura 40) e EM para a substância AC4, identificou-se esta como sendo a substância conhecida por eupalestina, com pureza de 99,78%, conforme a análise de CLUE-DAD.

Figura 40 – Espectro de RMN ^1H (600 MHz, TMS, CDCl_3) para a substância AC4 (eupalestina) de *A. conyzoides*.



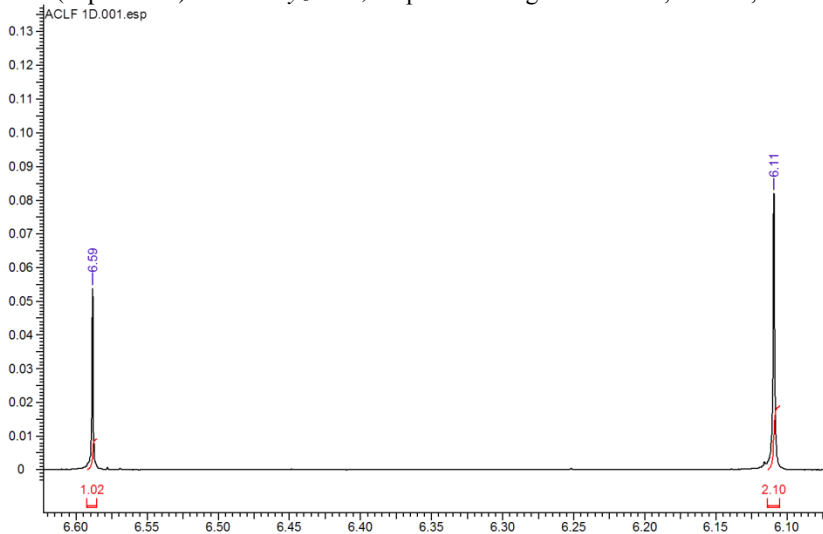
No espectro de RMN ^1H da substância AC3 (Figura 41) mostra um conjunto de hidrogênios típicos de anel aromático formando por dois sinais de duplete em 7,13 ppm (1H, $J=1,6$, H-2') e 7,18 ppm (1H, $J=1,6$, H-6'). As constantes de acoplamento sugerem anel aromático com dois hidrogênios, sendo o hidrogênio δ 7,13 *d* em posição *meta* referente ao hidrogênio em δ 7,18 *d*.

Figura 41 – Espectro de RMN ^1H (600 MHz, TMS, CDCl_3) para a substância AC4 (eupalestina) de *A. conyzoides*, ampliado na região entre δ 7,19 e δ 7,125.



Observa-se no espectro de RMN ^1H (Figura 42) um simpleto em 6,59 ppm (1H, H-3) cujo valor mais desblindado sugere hidrogênio olefínico e um simpleto em 6,11 ppm (2H) cujo valor mais desblindado sugere proximidade a elemento eletronegativo, neste caso ao grupo metilenodioxí.

Figura 42 – Espectro de RMN ^1H (600 MHz, TMS, CDCl_3) para a substância AC4 (eupalestina) de *A. conyzoides*, ampliado na região entre δ 6,60 e δ 6,10.



Os dados de RMN ^1H obtidos para a substância AC4 foram comparados com a literatura (LE-VAN; PHAM, 1979; VYAS; MULCHANDANI, 1984; MOREIRA et al., 2007) e estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Dados de RMN ^1H para a substância AC4 de *A. conyzoides*, e dados comparativos da literatura.

Posição	AC4	(MOREIRA et al., 2007)	(VYAS; MULCHANDANI, 1984)
	δ $^1\text{H mult.}$ (J Hz) (CD_3Cl , 600 MHz)	δ $^1\text{H mult.}$ (J Hz) (CD_3Cl , 400 MHz)	δ $^1\text{H mult.}$ (J Hz) (CD_3Cl , 60 MHz)
H-3	6,59s	6,53s	6,55s
H-2'	7,13d (1,6)	7,06d (1,7)	7,09d (1)
H-6'	7,18d (1,6)	7,11d (1,7)	7,15d (1)
OCH_2O	6,10s	6,05s	6,08s
OCH_3	4,10s	4,07s	4,10s
	4,01s	3,98s	4,02s
	3,99s	3,95s	3,97s
	3,95s	3,92s	3,95s
	3,95s	3,91s	3,95s

A análise de EM (Figura 43) obtido por *ESI(+)* da substância AC4 exibe o valor de m/z equivalente a 417,1176 Da $[M + H]^+$. Comparando-se o valor experimental obtido com o valor teórico calculado para a estrutura proposta (417,1180 Da) obtem-se uma diferença de -0,980 ppm, comprovando que a amostra AC4 trata-se da substância eupalestina (Figura 44).

Figura 43 – Espectro de massa *FTMS full scan ESI(+)* da substância AC4 (eupalestina) de *A. conyzoides*.

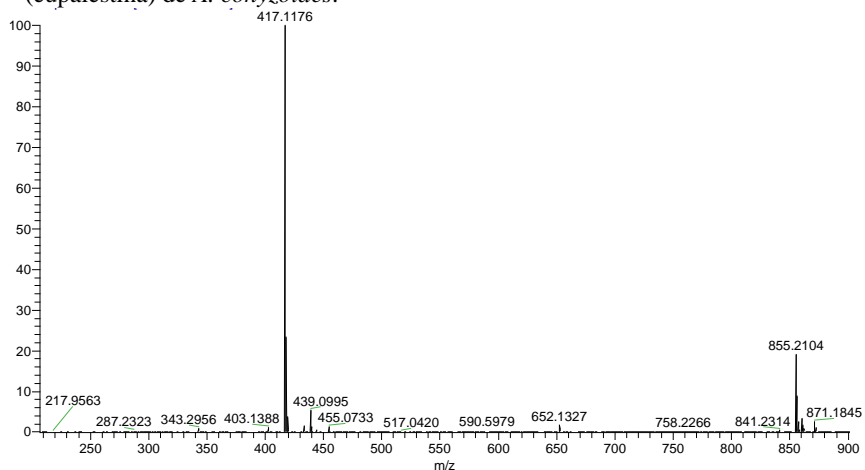
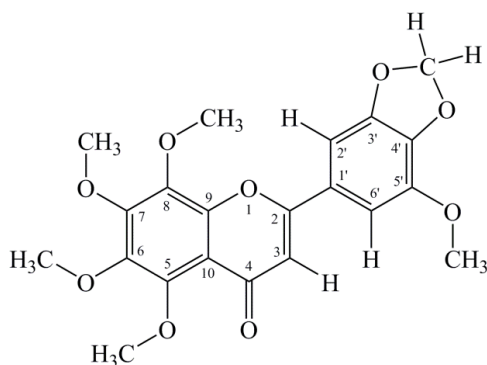


Figura 44 - Estrutura molecular da substância AC4 (eupalestina) de *A. conyzoides*.



5.3 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO POR CLUE-DAD

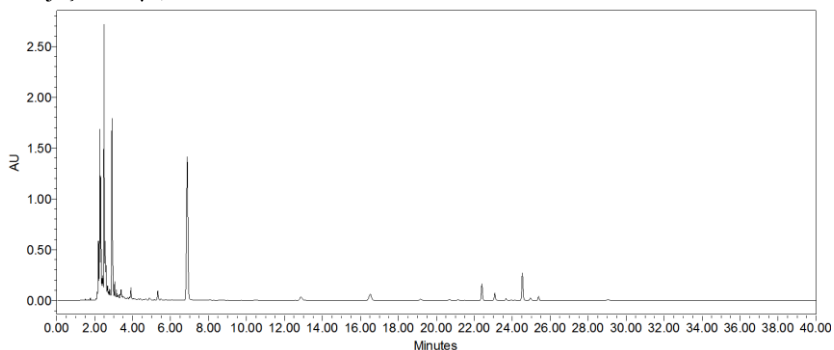
O método analítico foi desenvolvido para a separação e quantificação das substâncias ácido clorogênico (ácido 5-cafeoilquínico); ácido cumárico; cumarina (1,2-benzopirano); 5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavona; nobiletina; 5'-metoxinobiletina e eupalestina, presentes no extrato aquoso de *A. conyzoides*.

Considerando a característica das substâncias presentes neste extrato, o desenvolvimento do método analítico baseou-se, inicialmente, no método desenvolvido por Zhang e colaboradores (2012), cuja fase móvel consistiu em um sistema gradiente de água acidificada com ácido fórmico 0,1% (pH: 3,0) (A) e acetonitrila (B) em um fluxo constante de 0,25 ml/min, nas seguintes condições: 0-3 minutos isocrático de A-B (72:28 v/v); 3-8 minutos gradiente linear de A-B (72:28 v/v) para A-B (70:30 v/v); 8-16 minutos gradiente linear de A-B (70:30 v/v) para A-B (68:32 v/v); 16-20 minutos gradiente linear de A-B (68:32 v/v) para A-B (55:45 v/v); de 20-25 minutos gradiente linear de (55:45 v/v) para A-B (44:56 v/v); 25-30 isocrático de A-B (44:56 v/v); 30-40 minutos gradiente linear de A-B (44:56 v/v) para A-B (72:28 v/v). Utilizou-se como fase estacionária uma coluna de fase reversa Acquity UPLC BEH C18 (150 mm x 2.1 mm i.d.; 1.7 µm). O comprimento de onda utilizado para monitoramento das análises de CLUE-DAD foi de 330 nm.

Após a injeção do extrato aquoso de *A. conyzoides*, nas condições descritas anteriormente, obteve-se o cromatograma apresentado na Figura 45. O método não foi considerado adequado, uma vez que possui um tempo prolongado de análise e pouca separação entre os componentes da amostra.

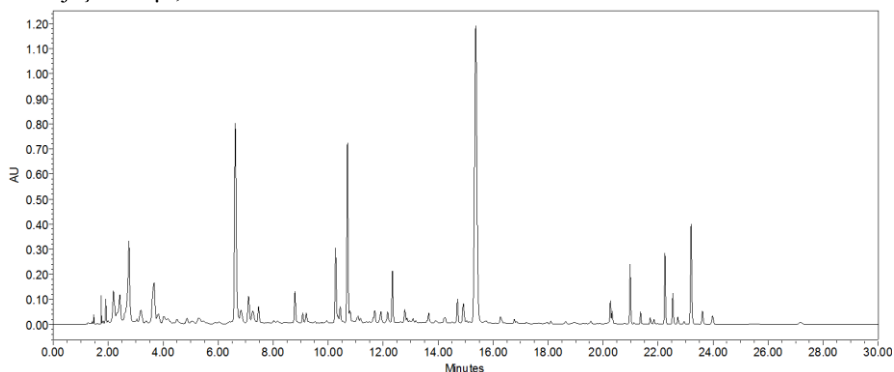
Com o intuito de reduzir o tempo de análise e melhorar a separação entre as substâncias presentes no extrato, foram realizadas alterações nas condições cromatográficas. O gradiente consistiu no mesmo sistema A-B em um fluxo constante de 0,25 ml/min, nas seguintes condições: 0-3 minutos isocrático de A-B (90:10 v/v); 3-15 minutos gradiente linear de A-B (90:10 v/v) para A-B (70:30 v/v); 15-16 minutos gradiente linear de A-B (70:30 v/v) para A-B (68:32 v/v); 16-20 minutos gradiente linear de A-B (68:32 v/v) para A-B (44:56 v/v); 20-25 minutos isocrático de A-B (44:56 v/v); 25-30 minutos gradiente linear de A-B (44:56 v/v) para A-B (90:10 v/v).

Figura 45 – Cromatograma do extrato aquoso das folhas de *A. conyzoides* injetada nas condições descritas, com fases móveis acetoneitrila e água (acidificada com 0,1% de ácido fórmico v/v); fluxo 0,25 ml/min; volume de injeção 10 µl; λ 330 nm.



Após a injeção do extrato aquoso de *A. conyzoides*, nas condições descritas anteriormente com as adaptações, obteve-se o cromatograma apresentado na Figura 46. Observa-se diminuição do tempo total de análise, assim como melhora substancial da separação entre os picos.

Figura 46 – Cromatograma do extrato aquoso das folhas de *A. conyzoides* injetada nas condições descritas, com fases móveis acetoneitrila e água (acidificada com 0,1% de ácido fórmico v/v); fluxo 0,25 ml/min; volume de injeção 10 µl; λ 330 nm.



Foram realizadas outras adequações nas condições cromatográficas com o propósito de melhorar ainda mais a resolução entre os picos, na qual alterou-se algumas condições do gradiente e temperatura da coluna (dados não apresentados).

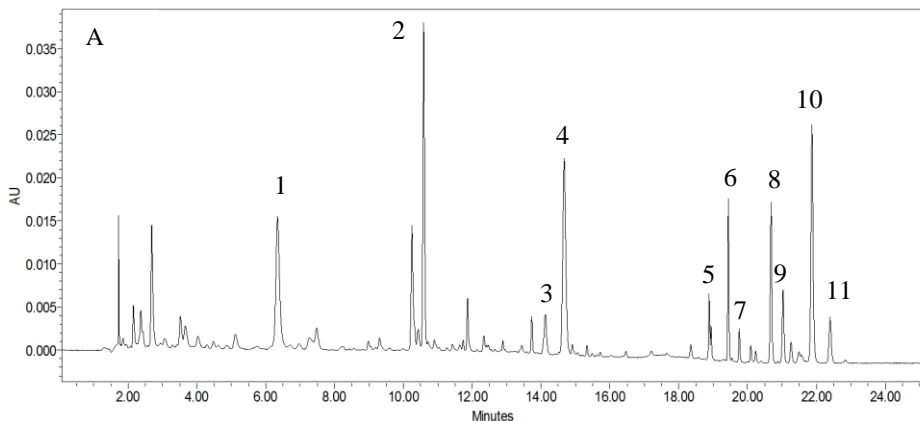
Entre as adequações realizadas, testou-se um sistema gradiente de água acidificada com ácido fórmico 0,1% (pH: 3,0) (A) e acetoneitrila

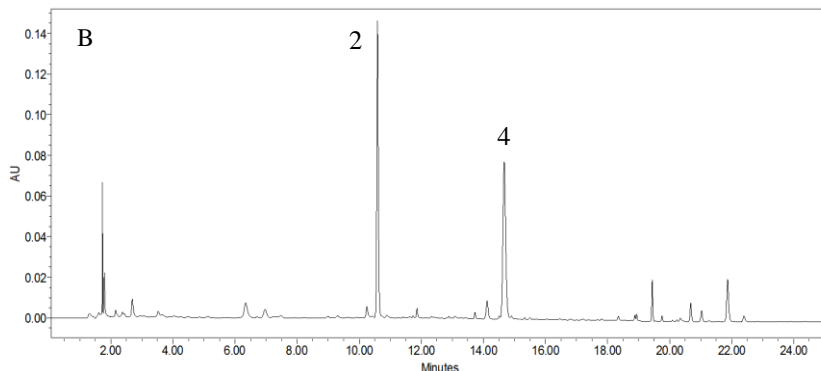
(B) em um fluxo constante de 0,25 ml/min, nas seguintes condições: 0-4 minutos isocrático de A-B (90:10 v/v); 4-13 minutos gradiente linear de A-B (90:10 v/v) para A-B (70:30 v/v); 13-15 minutos isocrático de A-B (70:30 v/v); 15-17 minutos gradiente linear de A-B (70:30 v/v) para A-B (50:50 v/v); 17-24 minutos gradiente linear de A-B (50:50 v/v) para A-B (44:56 v/v); 24-24,1 minutos gradiente linear de A-B (44:56 v/v) para A-B (10:90 v/v); 24,1-25 minutos isocrático de A-B (10:90 v/v); 25-25,1 minutos gradiente linear de A-B (10:90 v/v) para A-B (90:10 v/v); com reequilíbrio da coluna durante 5 minutos. Nesta condição estabeleceu-se 25 °C como temperatura da coluna.

Como resultado obteve-se o cromatograma disposto na Figura 47, no qual observa-se ótima separação entre os picos em um curto período de análise, dessa forma estabeleceu-se as condições cromatográficas acima descritas como as ideais para a separação das substâncias presentes no extrato aquoso de *A. conyzoides*.

Com o método analítico estabelecido, realizou-se a injeção dos padrões analíticos dos marcadores selecionados para identificação dos tempos de retenção dos mesmos no extrato de *A. conyzoides*, assim como procedeu-se a identificação dos picos que foram previamente identificados na caracterização do extrato por CLUE-EM/DAD, cujo resultado é apresentado na Figura 47.

Figura 47 – Cromatogramas do extrato aquoso das folhas de *A. conyzoides* injetado nas condições descritas, com fases móveis acetonitrila e água (acidificada com 0,1% de ácido fórmico v/v); fluxo 0,25 ml/min; volume de injeção 10 µl; forno de coluna 25 °C; (A): λ 330 nm; (B): λ 275 nm.





(1) ácido clorogênico; (2) ácido cumárico *O*-glicopiranosídeo; (3) ácido cumárico; (4) cumarina; (5) ageoniflavona C; (6) 3'-hidroxi, 5, 6, 7, 8, 4', 5' hexametoxiflavona; (7) 7-hidroxi-5,6,8,5'-tetrametoxi-3',4'-metilendioxfilavona; (8) 5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavona; (9) nobiletina; (10) 5'-metoxinobiletina; (11) eupalestina.

5.4 VALIDAÇÃO ANALÍTICA

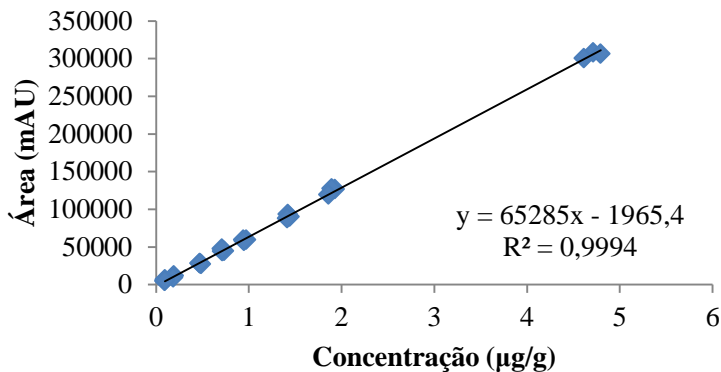
A validação do método analítico foi realizada conforme descrito no item 4.4 para os marcadores: ácido clorogênico (ácido 5-cafeoilquínico); ácido cumárico; cumarina (1,2-benzopirano); 5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavona; nobiletina; 5'-metoxinobiletina e eupalestina.

5.4.1 Linearidade

Segundo a legislação brasileira a linearidade é a habilidade de um método de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito em um dado intervalo de variação (BRASIL, 2003). A linearidade dos marcadores foi verificada através da curva de calibração a partir da análise de regressão linear dos valores de concentração e leitura das áreas obtidos.

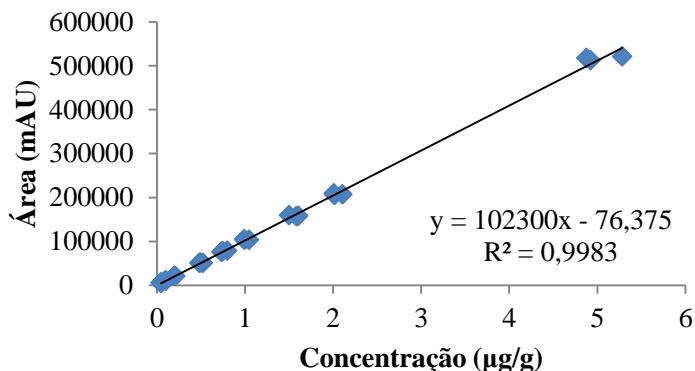
A curva de calibração do ácido clorogênico (Figura 48) é representada pela equação $y = 65285x + 1965,4$, com coeficiente de correlação (r) de 0,9997 e coeficiente de determinação (r^2) de 0,9994, dentro da faixa linear de 0,1 – 5,0 $\mu\text{g/g}$. A análise de variância demonstrou a significância do modelo linear, uma vez que para esta curva o valor de $F_{\text{calculado}}$ (6038) foi superior ao $F_{\text{crítico}}$ (3,53)

Figura 48 – Curva de calibração do ácido clorogênico (Área x Concentração em $\mu\text{g/g}$).



A curva de calibração do ácido cumárico (Figura 49) é representada pela equação $y = 102300x - 76,375$, com coeficiente de correlação (r) de 0,99915 e coeficiente de determinação (r^2) de 0,9983, dentro da faixa linear de 0,05 – 5,0 $\mu\text{g/g}$. A análise de variância demonstrou a significância do modelo linear, uma vez que para esta curva o valor de $F_{\text{calculado}}$ (24329) foi superior ao $F_{\text{crítico}}$ (3,20).

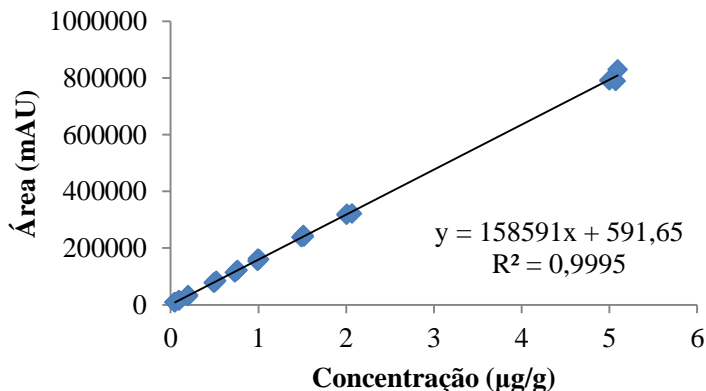
Figura 49 – Curva de calibração do ácido cumárico (Área x Concentração em $\mu\text{g/g}$).



A curva de calibração da cumarina (Figura 50) é representada pela equação $y = 158591x + 591,65$, com coeficiente de correlação (r) de 0,99975 e coeficiente de determinação (r^2) de 0,9995, dentro da faixa linear de 0,05 – 5,0 $\mu\text{g/g}$. A análise de variância demonstrou a

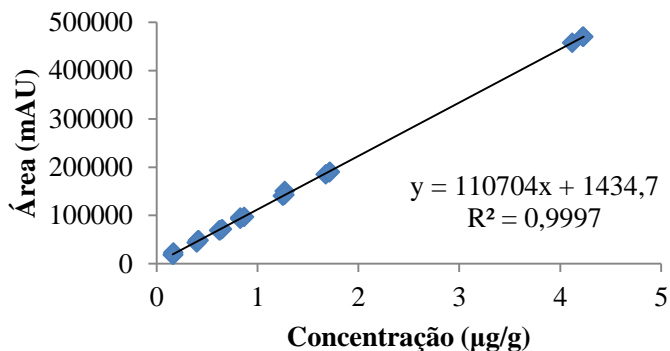
significância do modelo linear, uma vez que para esta curva o valor de $F_{\text{calculado}}$ (3568) foi superior ao $F_{\text{crítico}}$ (3,20).

Figura 50 – Curva de calibração da cumarina (Área x Concentração em $\mu\text{g/g}$).



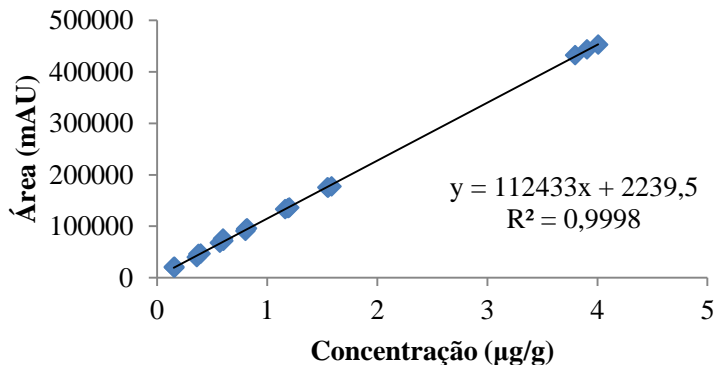
A curva de calibração da 5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavona (Figura 51) é representada pela equação $y = 110707x + 1434,7$, com coeficiente de correlação (r) de 0,99985 e coeficiente de determinação (r^2) de 0,9997, dentro da faixa linear de 0,15 – 4,0 $\mu\text{g/g}$. A análise de variância demonstrou a significância do modelo linear, uma vez que para esta curva o valor de $F_{\text{calculado}}$ (8406) foi superior ao $F_{\text{crítico}}$ (4,00).

Figura 51 – Curva de calibração da 5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavona (Área x Concentração em $\mu\text{g/g}$).



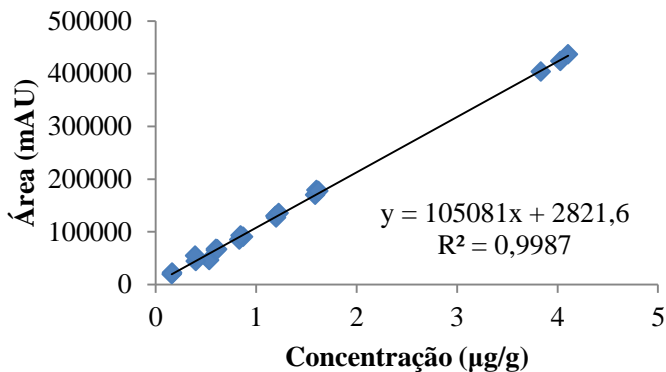
A curva de calibração da nobiletina (Figura 52) é representada pela equação $y = 112433x + 2239,5$, com coeficiente de correlação (r) de 0,9999 e coeficiente de determinação (r^2) de 0,9998, dentro da faixa linear de 0,15 – 4,0 $\mu\text{g/g}$. A análise de variância demonstrou a significância do modelo linear, uma vez que para esta curva o valor de $F_{\text{calculado}}$ (3455) foi superior ao $F_{\text{crítico}}$ (4,00).

Figura 52 – Curva de calibração da nobiletina (Área x Concentração em $\mu\text{g/g}$).



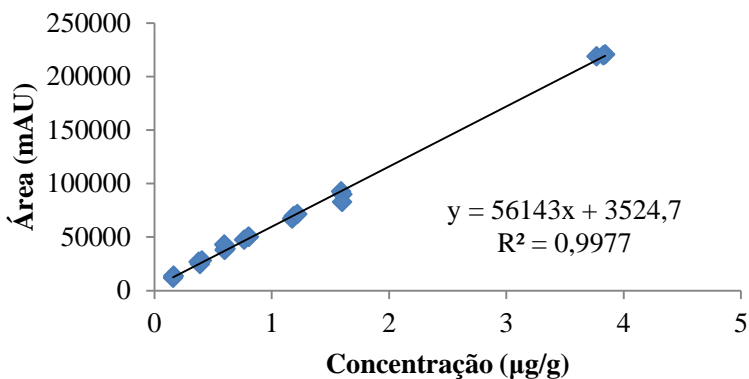
A curva de calibração da 5²-metoxinobiletina (Figura 53) é representada pela equação $y = 105081x + 2821,6$, com coeficiente de correlação (r) de 0,99935 e coeficiente de determinação (r^2) de 0,9987, dentro da faixa linear de 0,15 – 4,0 $\mu\text{g/g}$. A análise de variância demonstrou a significância do modelo linear, uma vez que para esta curva o valor de $F_{\text{calculado}}$ (1484) foi superior ao $F_{\text{crítico}}$ (4,00).

Figura 53 – Curva de calibração da 5'-metoxinobiletina (Área x Concentração em $\mu\text{g/g}$).



A curva de calibração da eupalestina (Figura 54) é representada pela equação $y = 56143x + 3524,7$, com coeficiente de correlação (r) de 0,9988 e coeficiente de determinação (r^2) de 0,9977, dentro da faixa linear de 0,15 – 4,0 $\mu\text{g/g}$. A análise de variância demonstrou a significância do modelo linear, uma vez que para esta curva o valor de $F_{\text{calculado}}$ (2046) foi superior ao $F_{\text{crítico}}$ (4,00).

Figura 54 – Curva de calibração da eupalestina (Área x Concentração em $\mu\text{g/g}$).



Conforme os resultados de linearidade demonstrados pode-se inferir que o método analítico é linear para todos os marcadores, visto que as análises de regressão linear apresentaram um coeficiente de

determinação superior à 0,9977 para todos os marcadores propostos e os testes estatísticos confirmaram a validade e a significância do modelo linear.

5.4.2 Limite de Quantificação (LQ) e Limite de Detecção (LD)

Limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinado com precisão e exatidão aceitáveis. Limite de detecção é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2003; RIBANI et al., 2004; ICH, 2005).

Os limites de quantificação e detecção dos marcadores, segundo as condições cromatográficas desenvolvidas, foram determinados baseados na relação sinal-ruído e estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Parâmetros de LQ e LD, segundo as condições experimentais estabelecidas, dos marcadores presentes no extrato aquoso de *A. conyzoides*.

Marcador	LQ (µg/g)	LD (µg/g)
Ácido clorogênico	0,0500	0,0150
Ácido cumárico	0,0100	0,0040
Cumarina	0,0100	0,0040
5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavona	0,0025	0,0010
Nobiletina	0,0050	0,0015
5'-metoxinobiletina	0,0050	0,0015
Eupalestina	0,0060	0,0020

5.4.3 Especificidade

A seletividade ou especificidade de um método é a capacidade de distinguir, de forma inequívoca, o analito de interesse na presença de outras impurezas, produtos de degradação ou componentes da matriz, que podem interferir na sua determinação em amostras complexas (BRASIL, 2003). A resposta de um determinado método instrumental para uma única substância de interesse é definido como específico, enquanto que um método que produz resposta para vários compostos

químicos, com uma característica em comum, pode ser chamado de seletivo (RIBANI et al., 2004; CASSIANO et al., 2009).

A especificidade do método analítico desenvolvido foi demonstrada a partir da co-injeção do extrato com as substâncias de referência e pela determinação da resolução entre os picos dos marcadores em relação aos picos adjacentes.

Observou-se o aumento proporcional da área dos picos correspondentes a cada padrão injetado juntamente com o extrato de *A. conyzoides*. Assim como, demonstrou-se a partir dos cálculos, resolução superior a 1,5 entre os picos dos marcadores e demais picos próximos, conforme a Tabela 8.

A determinação da especificidade do método para os marcadores também foi verificada através do teste de pureza dos picos utilizando o detector de DAD. A varredura do espectro de UV dos marcadores não demonstrou variação desde o início ao término da eluição dos seus respectivos picos, possibilitando concluir sobre a sua pureza.

Conforme os resultados obtidos, pode-se inferir que o método analítico possui especificidade para os marcadores avaliados, uma vez que não há co-eluição com outras substâncias presentes no extrato obtido.

Tabela 8 – Valores de resolução entre os picos dos marcadores e picos adjacentes, segundo as condições experimentais estabelecidas.

Marcador	R ₁	R ₂
Ácido clorogênico	6,26	3,20
Ácido cumárico	4,14	4,02
Cumarina	4,02	1,78
5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavona	4,90	3,91
Nobiletina	3,91	2,34
5 ⁷ -metoxinobiletina	5,37	4,52
Eupalestina	4,52	-

R₁ – resolução entre o marcador e o pico mais próximo da esquerda; R₂ – resolução entre o marcador e o pico mais próximo da direita.

5.4.4 Precisão

A precisão de um método analítico é definida como o grau de concordância, ou medida dos erros aleatórios, obtido a partir de medidas

independentes de amostragens múltiplas de uma amostra homogênea, sob as condições analíticas estabelecidas (CASSIANO et al., 2009; RAMBLA-ALEGRE; ESTEVE-ROMERO; CARDA-BROCH, 2012).

A determinação da precisão costuma ser subdividida em repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade. A repetibilidade refere-se à precisão do método durante um curto intervalo de tempo, sob as mesmas condições de análise. Enquanto que, a precisão intermediária refere-se a habilidade do método de fornecer os mesmos resultados, sob as mesmas condições analíticas, porém em dias diferentes. Já a reprodutibilidade é utilizada para demonstrar a precisão do método em laboratórios diferentes (CASSIANO et al., 2009; SPÍNOLA; LLORENT-MARTÍNEZ; CASTILHO, 2014).

A análise de precisão do método foi mensurada a partir de seis determinações de soluções independentes do extrato aquoso de *A. conyzoides*, preparadas em um único dia e em dias diferentes pelo mesmo analista e incluem, respectivamente, a determinação da repetibilidade e precisão intermediária do método analítico, conforme descrito no item 4.6.4.

Os resultados da determinação de ácido clorogênico (Tabela 9); ácido cumárico (Tabela 10); cumarina (Tabela 11); 5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavona (Tabela 12); nobiletina (Tabela 13); 5'-metoxinobiletina (Tabela 14) e eupalestina (Tabela 15) são demonstrados em mg de marcador por g de extrato aquoso seco e são expressos em média, desvio padrão (σ) e DPR.

Tabela 9 – Parâmetros de repetibilidade e precisão intermediária do ácido clorogênico, segundo as condições experimentais estabelecidas.

Réplicas	Repetibilidade						Precisão Intermediária*	
	Dia 1 (n= 6)			Dia 2 (n= 6)			(n=12)	
	Concen. ($\mu\text{g/g}$)	Média (σ)	DPR (%)	Concen. ($\mu\text{g/g}$)	Media (σ)	DPR (%)	Média (σ)	DPR (%)
1	10,80			12,152				
2	11,17			11,492				
3	11,28	11,21	2	11,456	12,17	2	11,69	6
4	11,39	(0,23)		13,207	(0,66)		(0,66)	
5	11,09			12,421				
6	11,52			12,275				

* precisão intermediária estabelecida pela média e desvio padrão das doze réplicas relativas as sestuplicatas dos dias 1 e 2 da repetibilidade.

Tabela 10 – Parâmetros de repetibilidade e precisão intermediária do ácido cumárico, segundo as condições experimentais estabelecidas.

Réplicas	Repetibilidade						Precisão Intermediária*	
	Dia 1 (n= 6)			Dia 2 (n= 6)			(n=12)	
	Concen. (µg/g)	Média (σ)	DPR (%)	Concen. (µg/g)	Media (σ)	DPR (%)	Média (σ)	DPR (%)
1	1,29			1,30				
2	1,24			1,29				
3	1,33	1,29	4	1,22	1,30	4	1,30	4
4	1,34	(0,05)		1,40	(0,05)		(0,05)	
5	1,21			1,29				
6	1,33			1,30				

* precisão intermediária estabelecida pela média e desvio padrão das doze réplicas relativas as sestuplicatas dos dias 1 e 2 da repetibilidade.

Tabela 11 – Parâmetros de repetibilidade e precisão intermediária da cumarina, segundo as condições experimentais estabelecidas.

Réplicas	Repetibilidade						Precisão Intermediária*	
	Dia 1 (n= 6)			Dia 2 (n= 6)			(n=12)	
	Concen. (µg/g)	Média (σ)	DPR (%)	Concen. (µg/g)	Media (σ)	DPR (%)	Média (σ)	DPR (%)
1	17,95			17,59				
2	18,57			17,19				
3	18,87	18,19	5	16,61	17,54	4	17,86	5
4	16,42	(0,85)		18,66	(0,81)		(0,88)	
5	18,95			17,73				
6	18,37			17,44				

* precisão intermediária estabelecida pela média e desvio padrão das doze réplicas relativas as sestuplicatas dos dias 1 e 2 da repetibilidade.

Tabela 12 – Parâmetros de repetibilidade e precisão intermediária da 5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavona, segundo as condições experimentais estabelecidas.

Réplicas	Repetibilidade						Precisão Intermediária*	
	Dia 1 (n= 6)			Dia 2 (n= 6)			(n=12)	
	Concen. (µg/g)	Média (σ)	DPR (%)	Concen. (µg/g)	Media (σ)	DPR (%)	Média (σ)	DPR (%)
1	2,71			2,79				
2	2,57			2,79				
3	2,90	2,75	6	2,63	2,80	4	2,78	5
4	2,95	(0,16)		3,03	(0,14)		(0,14)	
5	2,53			2,80				
6	2,86			2,74				

Tabela 13 – Parâmetros de repetibilidade e precisão intermediária da nobiletina, segundo as condições experimentais estabelecidas.

Réplicas	Repetibilidade						Precisão Intermediária*	
	Dia 1 (n= 6)			Dia 2 (n= 6)			(n=12)	
	Concen. (µg/g)	Média (σ)	DPR (%)	Concen. (µg/g)	Media (σ)	DPR (%)	Média (σ)	DPR (%)
1	1,24			1,29				
2	1,16			1,29				
3	1,34	1,27	7	1,22	1,30	5	1,28	6
4	1,36	(0,08)		1,41	(0,07)		(0,07)	
5	1,16			1,33				
6	1,33			1,27				

* precisão intermediária estabelecida pela média e desvio padrão das doze réplicas relativas as sestuplicatas dos dias 1 e 2 da repetibilidade.

Tabela 14 – Parâmetros de repetibilidade e precisão intermediária da 5'-metoxinobiletina, segundo as condições experimentais estabelecidas.

Réplicas	Repetibilidade						Precisão Intermediária*	
	Dia 1 (n= 6)			Dia 2 (n= 6)			(n=12)	
	Concen. (µg/g)	Média (σ)	DPR (%)	Concen. (µg/g)	Media (σ)	DPR (%)	Média (σ)	DPR (%)
1	5,84			6,04				
2	5,46			5,97				
3	6,22	5,91	6	5,70	6,01	4	5,96	5
4	6,32	(0,36)		6,49	(0,31)		(0,31)	
5	5,43			6,01				
6	6,19			5,87				

* precisão intermediária estabelecida pela média e desvio padrão das doze réplicas relativas as sestuplicatas dos dias 1 e 2 da repetibilidade.

Tabela 15 – Parâmetros de repetibilidade e precisão intermediária da eupalestina, segundo as condições experimentais estabelecidas.

Réplicas	Repetibilidade						Precisão Intermediária*	
	Dia 1 (n= 6)			Dia 2 (n= 6)			(n=12)	
	Concen. (µg/g)	Média (σ)	DPR (%)	Concen. (µg/g)	Media (σ)	DPR (%)	Média (σ)	DPR (%)
1	1,93			2,101				
2	1,84			2,085				
3	2,17	2,05	8	2,039	2,16	6	2,11	7
4	2,21	(0,15)		2,371	(0,14)		(0,15)	
5	1,96			2,245				
6	2,21			2,144				

* precisão intermediária estabelecida pela média e desvio padrão das doze réplicas relativas as sestuplicatas dos dias 1 e 2 da repetibilidade.

Verificou-se que o método analítico apresentou boa repetibilidade e precisão intermediária, visto que os DPR foram menores que 8% e 7%, respectivamente. É notável que processos analíticos que avaliam a composição quantitativa de produtos naturais podem apresentar uma ampla variação intrínseca, devido a complexidade química das matrizes biológicas. Deste modo, os resultados encontrados na determinação da precisão do método estão em conformidade com a legislação internacional (EMA, 2011) e estão de acordo com outros estudos analíticos em matrizes biológicas (BATAGLION et al., 2014; QIU et al., 2015; SHI et al., 2015).

5.4.5 Exatidão

A exatidão é definida como o grau de concordância entre o valor obtido pelo método analítico e o valor nominal, aceito como referência (ICH, 2003; ROZET et al., 2007). Neste estudo a exatidão do método foi determinada a partir do ensaio de adição de padrão, que consiste na adição de quantidades conhecidas da substância de referência na matriz da amostra, neste caso o extrato aquoso de *A. conyzoides* (RIBANI et al., 2004). Segundo a legislação brasileira a exatidão pode ser calculada como porcentagem de recuperação da quantidade de substância referência adicionada à matriz (BRASIL, 2003). Nas Tabelas 16 a 22 são apresentados os resultados obtidos para os marcadores avaliados.

Tabela 16 – Parâmetro de exatidão do ácido clorogênico determinado a partir do ensaio de adição de padrão, segundo as condições experimentais estabelecidas.

Concentrações (µg/g) (n= 3)				
Extrato nominal	Padrão adicionado	Extrato contaminado	Recuperação (%)	Média ± DPR
	0,48	2,81	110,36	
2,06	0,87	3,35	114,44	113,34 ± 1,88
	1,94	4,61	115,23	

Tabela 17 – Parâmetro de exatidão do ácido cumárico determinado a partir do ensaio de adição de padrão, segundo as condições experimentais estabelecidas.

Concentrações (µg/g) (n= 3)				
Extrato nominal	Padrão adicionado	Extrato contaminado	Recuperação (%)	Média ± DPR
	0,52	0,78	98,74	
0,27	1,09	1,34	98,64	99,04 ± 0,38
	2,16	2,41	99,54	

Tabela 18 – Parâmetro de exatidão da cumarina determinado a partir do ensaio de adição de padrão, segundo as condições experimentais estabelecidas.

Concentrações (µg/g) (n= 3)			Recuperação (%)	Média ± DPR
Extrato nominal	Padrão adicionado	Extrato contaminado		
3,86	0,23	4,14	101,21	101,19 ± 0,44
	0,81	4,75	101,72	
	1,10	4,99	100,63	

Tabela 19 – Parâmetro de exatidão da 5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavona determinado a partir do ensaio de adição de padrão, segundo as condições experimentais estabelecidas.

Concentrações (µg/g) (n= 3)			Recuperação (%)	Média ± DPR
Extrato nominal	Padrão adicionado	Extrato contaminado		
0,55	0,44	1,01	101,94	101,30 ± 0,80
	0,88	1,45	101,81	
	1,80	2,36	100,15	

Tabela 20 – Parâmetro de exatidão da nobiletina determinado a partir do ensaio de adição de padrão, segundo as condições experimentais estabelecidas.

Concentrações (µg/g) (n= 3)			Recuperação (%)	Média ± DPR
Extrato nominal	Padrão adicionado	Extrato contaminado		
0,26	0,41	0,70	104,49	102,34 ± 1,85
	0,88	1,17	102,63	
	1,76	2,01	99,89	

Tabela 21 – Parâmetro de exatidão da 5'-metoxinobiletina determinado a partir do ensaio de adição de padrão, segundo as condições experimentais estabelecidas.

Concentrações (µg/g) (n= 3)			Recuperação (%)	Média ± DPR
Extrato nominal	Padrão adicionado	Extrato contaminado		
1,16	0,43	1,66	104,01	102,86 ± 1,08
	0,94	2,17	103,22	
	1,75	2,96	101,36	

Tabela 22 – Parâmetro de exatidão da eupalestina determinado a partir do ensaio de adição de padrão, segundo as condições experimentais estabelecidas.

Extrato nominal	Concentrações (µg/g) (n= 3)		Recuperação (%)	Média ± DPR
	Padrão adicionado	Extrato contaminado		
	0,37	0,90	110,69	
0,44	0,84	1,38	107,81	106,91 ± 3,28
	1,78	2,27	102,24	

Como pode ser observado, foram encontrados valores médios de recuperação entre 99,04 – 113,34 %, com desvios inferiores a 3,28 % para todos os marcadores. Os guias internacionais que regulamentam os critérios de validação de métodos não estabelecem o intervalo de recuperação a ser cumprido, entretanto segundo o AOAC (2002) o intervalo de recuperação recomendado para amostras de origem vegetal é de 75 – 120 %, para concentrações na faixa de 1,0 µ/ml. Apesar do intervalo de recuperação recomendado ser abrangente, os resultados obtidos no ensaio de exatidão do método analítico proposto demonstra à sua habilidade em quantificar os marcadores, visto que foram obtidos valores de exatidão muito próximos à 100%.

5.4.6 Robustez

De acordo com a literatura, a robustez mede a suscetibilidade de um método analítico frente a pequenas e deliberativas variações das condições analíticas e é de fundamental importância para que os analistas conheçam quais fatores devem ser estritamente controlados durante as análises de rotina (BRASIL, 2003; CASSIANO et al., 2009).

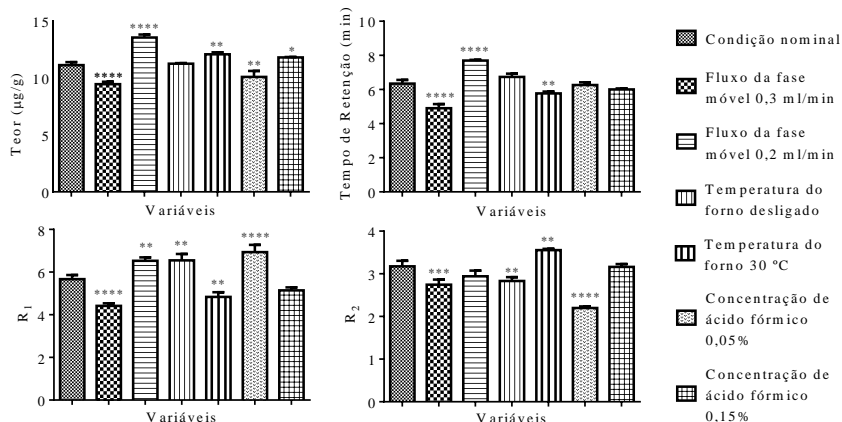
A robustez do método proposto foi avaliada perante a pequenas variações das condições cromatográficas descritas no item 4.6.6, cujos resultados estão apresentados nas Tabelas 23 a 29 e Figuras 55 a 61.

Tabela 23 – Parâmetros cromatográficos avaliados na robustez do método para análise de ácido clorogênico no extrato aquoso de *A. conyzoides*, segundo as condições experimentais estabelecidas.

Variáveis	Nível	Média (DPR%)			
		Teor (mg/g) ¹	TR (min)	R ₁	R ₂
Condição nominal		11,14 (1,89)	5,67 (2,80)	5,83 (4,12)	3,17 (3,42)
Fluxo (ml/min)	0,30	9,47 (1,83)	4,90 (4,03)	4,41 (2,21)	2,75 (3,51)
	0,20	13,56 (1,63)	7,70 (0,38)	6,53 (1,96)	2,94 (3,77)
Temperatura (°C)	30	12,10 (1,16)	5,77 (1,56)	4,84 (3,68)	3,55 (0,66)
	desligado	11,26 (0,43)	6,73 (2,36)	6,55 (3,71)	2,83 (2,58)
Concentração (%)	0,05	10,10 (4,20)	6,26 (2,08)	6,94 (3,93)	2,20 (1,27)
	0,15	11,82 (0,25)	6,00 (0,79)	5,14 (2,23)	3,16 (1,71)

Condição nominal: fluxo de 0,25 ml/min, temperatura do forno a 25 °C e concentração de ácido fórmico a 0,1%; ¹ Teor expresso em mg de ácido clorogênico por g de extrato aquoso seco de *A. conyzoides*; TR: Tempo de retenção; R₁ – resolução entre o biomarcador e o pico mais próximo da esquerda; R₂ – resolução entre o biomarcador e o pico mais próximo da direita.

Figura 55 - Parâmetros cromatográficos avaliados na robustez do método para análise de ácido clorogênico no extrato aquoso de *A. conyzoides*, segundo as condições experimentais estabelecidas.



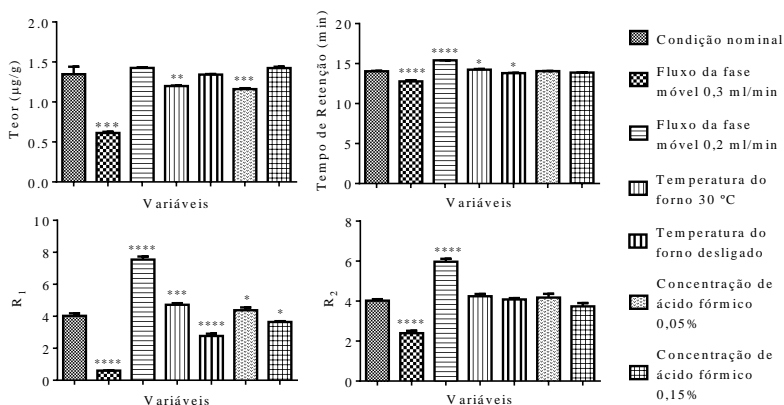
**** p < 0,0001; *** p < 0,001; ** p < 0,01; * p < 0,05.

Tabela 24 – Parâmetros cromatográficos avaliados na robustez do método para análise de ácido cumárico no extrato aquoso de *A. conyzoides*, segundo as condições experimentais estabelecidas.

Variáveis	Nível	Média (DPR%)			
		Teor (mg/g) ¹	TR (min)	R ₁	R ₂
Condição nominal		1,40 (0,47)	14,04 (0,31)	4,03 (3,26)	4,02 (1,42)
Fluxo (ml/min)	0,30	0,60 (2,02)	12,77 (1,02)	0,60 (3,65)	2,40 (3,92)
	0,20	1,42 (0,49)	15,40 (0,06)	7,54 (2,09)	5,97 (2,05)
Temperatura (°C)	30	1,34 (0,41)	13,81 (1,77)	2,77 (4,08)	4,09 (1,22)
	desligado	1,20 (0,49)	14,23 (0,54)	4,72 (1,80)	4,25 (2,16)
Concentração (%)	0,05	1,16 (0,75)	14,05 (0,13)	4,38 (3,17)	4,18 (3,63)
	0,15	1,42 (0,95)	13,87 (0,11)	3,65 (1,12)	3,73 (3,69)

Condição nominal: fluxo de 0,25 ml/min, temperatura do forno a 25 °C e concentração de ácido fórmico a 0,1%; ¹ Teor expresso em mg de ácido cumárico por g de extrato aquoso seco de *A. conyzoides*; TR: Tempo de retenção; R₁ – resolução entre o biomarcador e o pico mais próximo da esquerda; R₂ – resolução entre o biomarcador e o pico mais próximo da direita.

Figura 56 - Parâmetros cromatográficos avaliados na robustez do método para análise de ácido cumárico no extrato aquoso de *A. conyzoides*, segundo as condições experimentais estabelecidas.



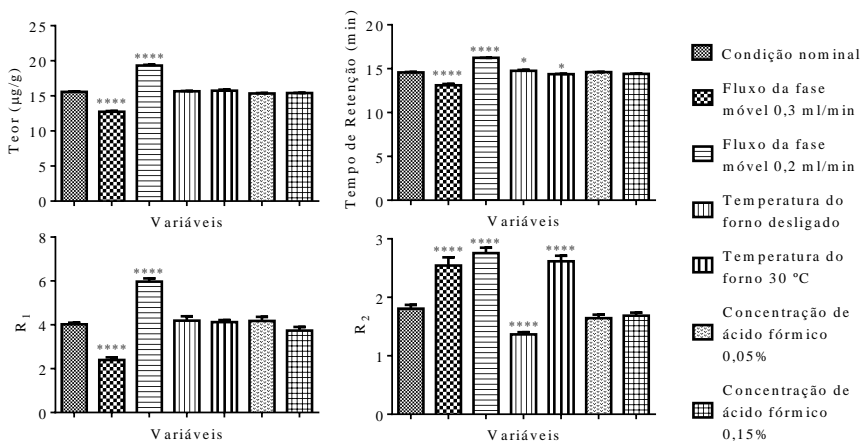
**** p < 0,0001; *** p < 0,001; ** p < 0,01; * p < 0,05.

Tabela 25 – Parâmetros cromatográficos avaliados na robustez do método para análise de cumarina no extrato aquoso de *A. conyzoides*, segundo as condições experimentais estabelecidas.

Variáveis	Nível	Média (DPR%)			
		Teor (mg/g) ¹	TR (min)	R ₁	R ₂
Condição nominal		15,56 (0,41)	14,58 (0,29)	4,02 (1,42)	1,81 (3,02)
Fluxo (ml/min)	0,30	12,75 (0,59)	13,11 (0,86)	2,40 (3,92)	2,54 (4,51)
	0,20	19,14 (0,42)	16,24 (0,06)	5,97 (2,05)	2,76 (2,72)
Temperatura (°C)	30	15,74 (0,80)	14,37 (0,17)	4,12 (1,90)	2,61 (2,96)
	desligado	15,66 (0,25)	14,77 (0,47)	4,19 (3,83)	1,36 (2,24)
Concentração (%)	0,05	15,35 (0,26)	14,60 (0,14)	4,18 (3,62)	1,64 (2,85)
	0,15	15,14 (0,12)	14,41 (0,11)	3,73 (3,69)	1,69 (2,44)

Condição nominal: fluxo de 0,25 ml/min, temperatura do forno a 25 °C e concentração de ácido fórmico a 0,1%; ¹ Teor expresso em mg de cumarina por g de extrato aquoso seco de *A. conyzoides*; TR: Tempo de retenção; R₁ – resolução entre o biomarcador e o pico mais próximo da esquerda; R₂ – resolução entre o biomarcador e o pico mais próximo da direita.

Figura 57 - Parâmetros cromatográficos avaliados na robustez do método para análise de cumarina no extrato aquoso de *A. conyzoides*, segundo as condições experimentais estabelecidas



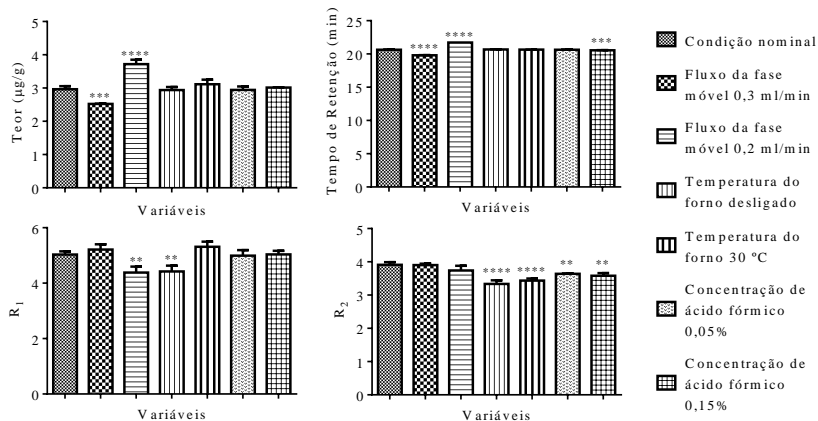
**** p < 0,0001; * p < 0,05.

Tabela 26 – Parâmetros cromatográficos avaliados na robustez do método para análise de 5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavona no extrato aquoso de *A. conyzoides*, segundo as condições experimentais estabelecidas.

Variáveis	Nível	Média (DPR%)			
		Teor (mg/g) ¹	TR (min)	R ₁	R ₂
Condição nominal		2,96 (2,57)	20,64 (0,12)	5,03 (1,87)	3,91 (1,67)
Fluxo (ml/min)	0,30	2,52 (0,22)	19,79 (0,10)	5,21 (2,99)	3,90 (0,96)
	0,20	3,72 (2,89)	21,72 (0,02)	4,38 (4,00)	3,74 (3,05)
Temperatura (°C)	30	3,11 (3,52)	20,65 (0,03)	5,31 (2,84)	3,44 (1,43)
	desligado	2,94 (2,52)	20,68 (0,05)	4,42 (3,89)	3,34 (2,59)
Concentração (%)	0,05	2,94 (2,92)	20,64 (0,11)	4,99 (3,25)	3,64 (0,22)
	0,15	3,01 (0,24)	20,55 (0,05)	5,04 (2,15)	3,58 (1,77)

Condição nominal: fluxo de 0,25 ml/min, temperatura do forno a 25 °C e concentração de ácido fórmico a 0,1%; ¹ Teor expresso em mg de 5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavona por g de extrato aquoso seco de *A. conyzoides*; TR: Tempo de retenção; R₁ – resolução entre o biomarcador e o pico mais próximo da esquerda; R₂ – resolução entre o biomarcador e o pico mais próximo da direita.

Figura 58 - Parâmetros cromatográficos avaliados na robustez do método para análise de 5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavona no extrato aquoso de *A. conyzoides*, segundo as condições experimentais estabelecidas



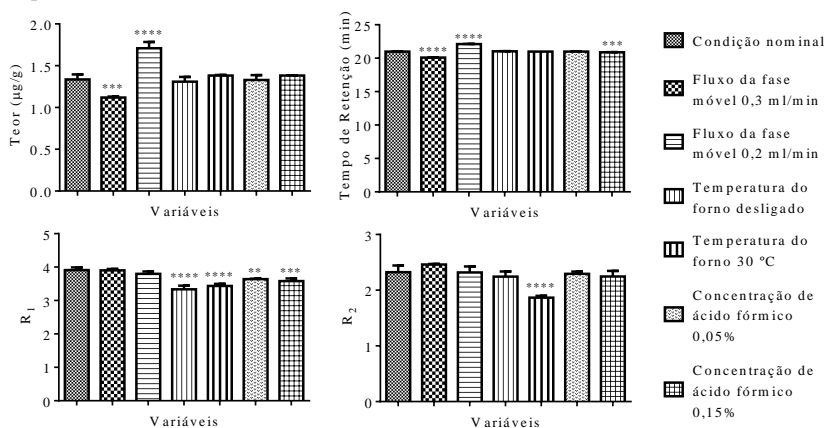
**** p < 0,0001; *** p < 0,001; ** p < 0,01.

Tabela 27 – Parâmetros cromatográficos avaliados na robustez do método para análise de nobiletina no extrato aquoso de *A. conyzoides*, segundo as condições experimentais estabelecidas.

Variáveis	Nível	Média (DPR%)			
		Teor (mg/g) ¹	TR (min)	R ₁	R ₂
Condição nominal		1,34 (3,62)	20,99 (0,13)	3,91 (1,67)	2,32 (4,24)
Fluxo (ml/min)	0,30	1,12 (0,85)	20,09 (0,10)	3,90 (0,96)	2,46 (0,33)
	0,20	1,71 (3,52)	22,12 (0,03)	3,80 (1,58)	2,32 (3,72)
Temperatura (°C)	30	1,38 (0,40)	20,99 (0,00)	3,44 (1,43)	1,87 (1,40)
	desligado	1,31 (3,50)	21,03 (0,05)	3,34 (2,59)	2,24 (3,38)
Concentração (%)	0,05	1,33 (3,58)	20,99 (0,13)	3,64 (0,22)	2,29 (1,44)
	0,15	1,38 (0,23)	20,89 (0,05)	3,58 (1,77)	2,25 (3,64)

Condição nominal: fluxo de 0,25 ml/min, temperatura do forno a 25 °C e concentração de ácido fórmico a 0,1%; ¹ Teor expresso em mg de nobiletina por g de extrato aquoso seco de *A. conyzoides*; TR: Tempo de retenção; R₁ – resolução entre o biomarcador e o pico mais próximo da esquerda; R₂ – resolução entre o biomarcador e o pico mais próximo da direita.

Figura 59 - Parâmetros cromatográficos avaliados na robustez do método para análise de nobiletina no extrato aquoso de *A. conyzoides*, segundo as condições experimentais estabelecidas



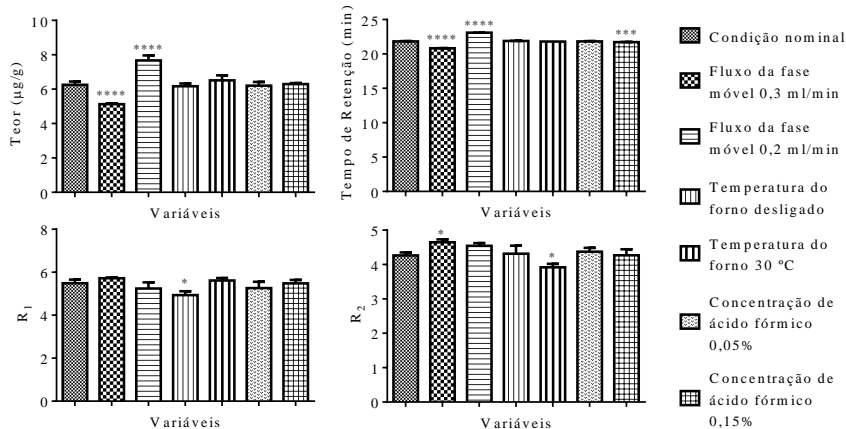
**** p < 0,0001; *** p < 0,001; ** p < 0,01.

Tabela 28 – Parâmetros cromatográficos avaliados na robustez do método para análise de 5^l-metoxinobiletina no extrato aquoso de *A. conyzoides*, segundo as condições experimentais estabelecidas.

Variáveis	Nível	Média (DPR%)			
		Teor (mg/g) ¹	TR (min)	R ₁	R ₂
Condição nominal		6,25 (2,53)	21,83 (0,15)	5,49 (2,49)	4,26 (1,73)
Fluxo (ml/min)	0,30	5,13 (0,87)	20,82 (0,11)	5,72 (0,44)	4,65 (1,48)
	0,20	7,67 (3,12)	23,09 (0,03)	5,25 (4,37)	4,54 (1,44)
Temperatura (°C)	30	6,51 (3,66)	21,81 (0,01)	5,62 (1,62)	3,92 (2,08)
	desligado	6,17 (2,01)	21,88 (0,07)	4,94 (2,98)	4,32 (4,37)
Concentração (%)	0,05	6,20 (2,68)	21,83 (0,15)	5,26 (4,57)	4,37 (2,08)
	0,15	6,30 (0,70)	21,72 (0,06)	5,48 (2,45)	4,27 (3,35)

Condição nominal: fluxo de 0,25 ml/min, temperatura do forno a 25 °C e concentração de ácido fórmico a 0,1%; ¹ Teor expresso em mg de 5^l-metoxinobiletina por g de extrato aquoso seco de *A. conyzoides*; TR: Tempo de retenção; R₁ – resolução entre o biomarcador e o pico mais próximo da esquerda; R₂ – resolução entre o biomarcador e o pico mais próximo da direita.

Figura 60 - Parâmetros cromatográficos avaliados na robustez do método para análise de 5^l-metoxinobiletina no extrato aquoso de *A. conyzoides*, segundo as condições experimentais estabelecidas



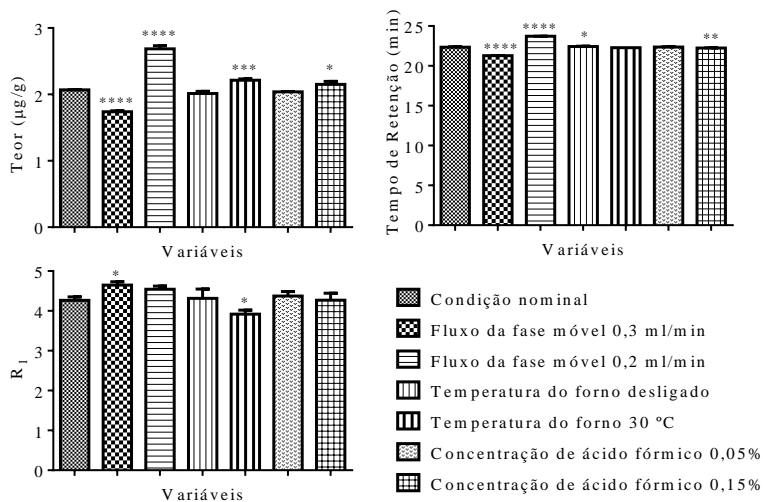
**** p < 0,0001; *** p < 0,001; * p < 0,05.

Tabela 29 – Parâmetros cromatográficos avaliados na robustez do método para análise de eupalestina no extrato aquoso de *A. conyzoides*, segundo as condições experimentais estabelecidas.

Variáveis	Nível	Média (DPR%)		
		Teor (mg/g) ¹	TR (min)	R ₁
Condição nominal		2,07 (0,08)	22,35 (0,16)	4,26 (1,73)
Fluxo (ml/min)	0,30	1,74 (0,78)	21,27 (0,11)	4,65 (1,48)
	0,20	2,69 (1,45)	23,71 (0,03)	4,54 (1,44)
Temperatura (°C)	30	2,21 (0,71)	22,28 (0,01)	3,92 (2,08)
	desligado	2,01 (1,30)	22,43 (0,12)	4,32 (4,37)
Concentração (%)	0,05	2,04 (0,17)	22,36 (0,16)	4,37 (2,08)
	0,15	2,15 (1,65)	22,23 (0,07)	4,27 (3,35)

Condição nominal: fluxo de 0,25 ml/min, temperatura do forno a 25 °C e concentração de ácido fórmico a 0,1%; ¹ Teor expresso em mg de eupalestina por g de extrato aquoso seco de *A. conyzoides*; TR: Tempo de retenção; R₁ – resolução entre o biomarcador e o pico mais próximo da esquerda.

Figura 61 - Parâmetros cromatográficos avaliados na robustez do método para análise de eupalestina no extrato aquoso de *A. conyzoides*, segundo as condições experimentais estabelecidas



**** p < 0,0001; *** p < 0,001; ** p < 0,01; * p < 0,05.

Observa-se nos dados anteriormente apresentados que as pequenas variações de fluxo, temperatura do forno da coluna e concentração de ácido fórmico na fase móvel alteram estatisticamente os parâmetros cromatográficos de todos os marcadores do método analítico.

As variações no fluxo de fase móvel demonstram ser os fatores mais críticos, pois alteram significativamente o teor e o tempo de retenção de todas as substâncias avaliadas, com valor de $p < 0,0001$. São observados diminuição do teor e tempo de retenção com o aumento do fluxo, e aumento do teor e tempo de retenção com a diminuição do fluxo da fase móvel. Deste modo, para a obtenção de resultados coerentes na aplicação do método analítico proposto, deve-se manter um rigoroso controle do fluxo da fase móvel.

Em relação a temperatura do forno da coluna, observa-se que se mantendo a mesma à temperatura ambiente (desligado) não ocorrem alterações significativas no teor e tempo de retenção dos marcadores, exceto para o ácido cumárico, cumarina e eupalestina, os quais apresentaram uma ligeira alteração no tempo de retenção ($p < 0,05$) quando submetidos à esta condição. Enquanto que, mantendo-se o forno à 30 °C ocorrem variações significativas nos teores de ácido clorogênico e eupalestina.

No que se refere à alteração da concentração de ácido fórmico os resultados indicam que quando se utiliza uma concentração de 0,15% (v/v) de ácido fórmico na fase aquosa não se observa diferença significativa no teor das substâncias quantificadas, exceto para a eupalestina. Entretanto, foram observadas alterações significativas no tempo de retenção de todas as metoxiflavonas, com valor de $p < 0,001$, quando se avaliou esta concentração de ácido fórmico na fase aquosa. Quanto à utilização de 0,05% (v/v) de ácido fórmico na fase aquosa, verificou-se que esta condição não afeta significativamente os teores e tempo de retenção dos marcadores, com exceção dos teores de ácido clorogênico e ácido cumárico.

Embora tenham sido encontradas diferenças significativas quando se avaliou a resolução entre os marcadores e os picos próximos essas diferenças não prejudicam a determinação de ácido clorogênico, 5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavona, nobiletina, 5'-metoxinobiletina e eupalestina, uma vez que os valores de resolução encontrados são superiores a 1,866. Contudo, constatou-se que a alteração do fluxo da fase móvel para 0,30 ml/min e mantendo-se o forno da coluna desligado resultam na diminuição da resolução dos picos de ácido cumárico e cumarina, respectivamente.

5.5 QUANTIFICAÇÃO DOS MARCADORES NO EXTRATO AQUOSO

A quantificação dos marcadores no extrato aquoso seco de *A. conyzoides*, cujos valores são provenientes dos ensaios de repetibilidade e precisão intermediária, demonstram um conteúdo de $11,69 \pm 0,66$ mg/g de ácido clorogênico; $1,29 \pm 0,052$ mg/g de ácido cumárico; $17,86 \pm 0,82$ mg/g de cumarina; $2,78 \pm 0,14$ mg/g de 5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavona; $1,28 \pm 0,07$ mg/g de nobiletina; $5,96 \pm 0,31$ mg/g de 5'-metoxinobiletina e $2,11 \pm 0,15$ mg/g de eupalestina. Não foram identificados outros estudos na literatura que quantificam as principais substâncias presentes no extrato aquoso de *A. conyzoides*.

5.6 ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA

O estudo de degradação forçada ou teste de estresse é definido como um ensaio de estabilidade para avaliar a estabilidade intrínseca de fármacos sob condições mais severas do que as utilizadas no estudo de estabilidade acelerada (BRASIL, 2012). Além de identificar e estabelecer as principais rotas de degradação e seus produtos formados, um dos principais objetivos deste teste é demonstrar a especificidade de um método analítico indicativo de estabilidade, especialmente quando poucas informações são disponíveis a respeito dos possíveis produtos de degradação do fármaco a qual o método se propõe a avaliar (REYNOLDS et al., 2002; ICH, 2003).

Com o objetivo de estabelecer as rotas de degradação dos marcadores e investigar se os produtos de degradação prejudicam a análise dos mesmos no método analítico desenvolvido, o extrato aquoso de *A. conyzoides* foi submetido às condições de degradação do estudo de degradação forçada.

5.6.1 Degradação por hidrólise

As reações hidrolíticas estão entre os processos de degradação mais comuns, pois envolvem a decomposição de substâncias químicas em reação com moléculas de água, podendo ser catalisadas por íons hidrogênio e hidroxila (BLESSY et al., 2014; RAWAT; PANDEY, 2015).

Analisando-se as áreas sob a curva (ASC) dos marcadores frente à hidrólise neutra (Tabela 30) aos quais foram submetidos, observa-se redução das ASC de ácido clorogênico (60,57%); 5,6,7,3',4',5'-

hexametoxiflavona (4,75%); nobiletina (8,28%); 5'-metoxinobiletina (6,76%) e eupalestina (18,24%), demonstrando a sensibilidade destas substâncias à condição exposta.

Tabela 30 – Degradação dos marcadores presentes no extrato aquoso de *A. conyzoides* frente à hidrólise neutra sob refluxo por 6 horas.

Tempo de exposição	Marcador (ASC) ¹						
	ACG	ACM	CMR	HMF	NBT	MNB	EPT
0 h	121365	24020	480364	59115	29403	118435	24386
6 h	46505	24246	500261	56262	27198	110404	20751
Degradação (%)	60,57	- 1,15	- 4,37	4,75	8,28	6,76	18,24

¹ média das áreas sob a curva (n=3); ACG: ácido clorogênico; ACM: ácido cumárico; CMR: cumarina; HMF: 5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavona; NBT: nobiletina; MNB: 5'-metoxinobiletina; EPT: eupalestina.

O cromatograma obtido na avaliação da sensibilidade do extrato aquoso de *A. conyzoides* frente à hidrólise neutra sob refluxo é apresentado na Figura 62b. Analisando-se o cromatograma obtido, é possível observar o aparecimento de um pico com tempo de retenção de 8,343 minutos, que não foi detectado no cromatograma do extrato não degradado (Figura 62a).

Figura 62 – Cromatogramas do extrato aquoso das folhas de *A. conyzoides*: a) não submetido à degradação (controle); b) submetido à degradação sob refluxo neutro durante 6 horas; c) sob refluxo alcalino (NaOH 1M) durante 6 horas; d) sob refluxo ácido (HCl 1M) durante 6 horas. λ 330 nm. Em destaque os produtos de degradação formados.

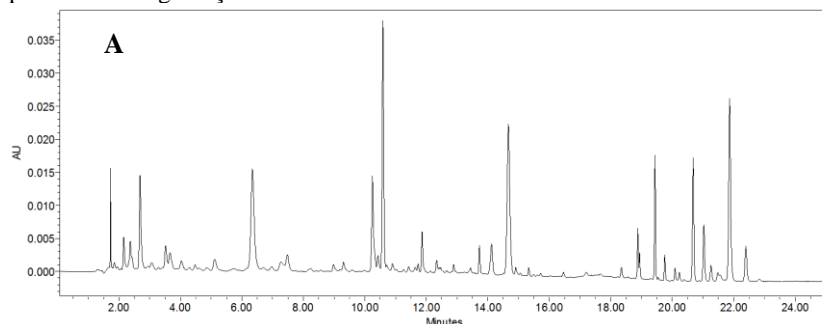
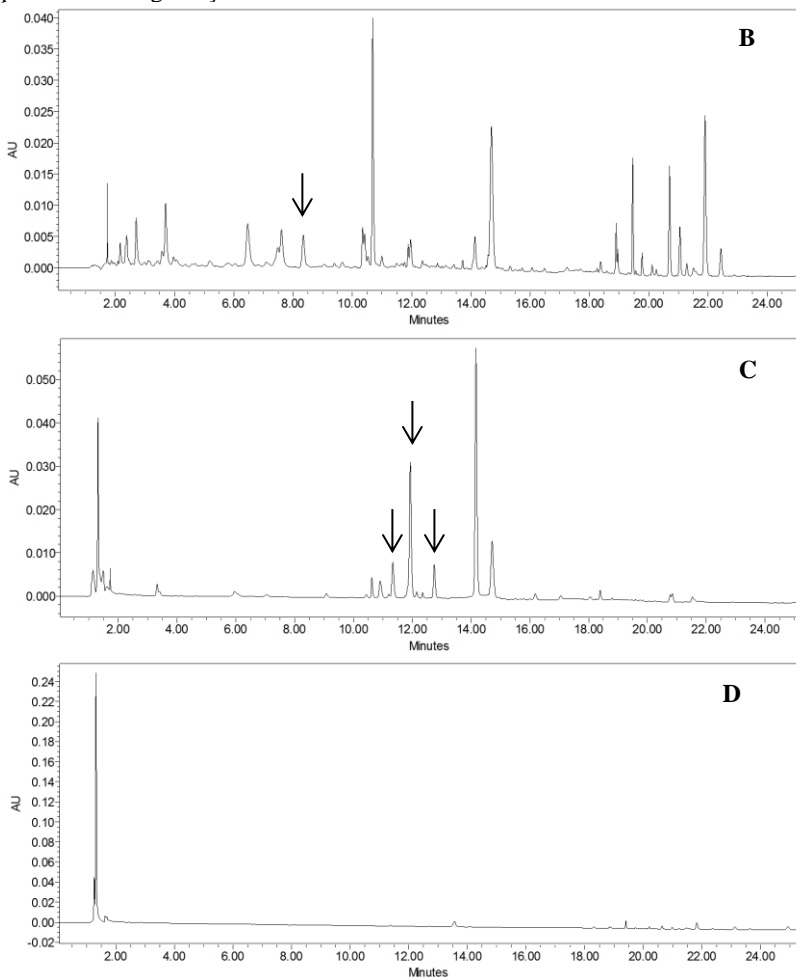


Figura 62 – Cromatogramas do extrato aquoso das folhas de *A. conyzoides*: a) não submetido à degradação (controle); b) submetido à degradação sob refluxo neutro durante 6 horas; c) sob refluxo alcalino (NaOH 1M) durante 6 horas; d) sob refluxo ácido (HCl 1M) durante 6 horas. λ 330 nm. Em destaque os produtos de degradação formados.



Comparando-se o tempo de retenção e o perfil de UV entre o pico da impureza detectado e o padrão analítico disponível (Figura 62b), verificou-se que o mesmo trata-se da substância ácido cafeico. Uma vez que a estrutura do ácido clorogênico corresponde a esterificação do ácido cafeico com o ácido quínico, a hidrólise do ácido clorogênico

presente no extrato resulta no aparecimento de ácido cafeico livre (não esterificado).

Outros trabalhos na literatura reportam a instabilidade do ácido clorogênico em solução aquosa frente à diferentes condições de pH e temperatura (DAWIDOWICZ; TYPEK, 2010; XIE et al., 2011; NARITA; INOUE, 2013)

Quando o extrato foi submetido à hidrólise em meio alcalino após seis horas de refluxo, observou-se a degradação de aproximadamente 100% das metoxiflavonas; 89,28% de ácido clorogênico e 44,96% de cumarina presentes no extrato (Tabela 31). O perfil cromatográfico do extrato submetido à esta condição é apresentado na Figura 62c.

Tabela 31 – Degradação dos marcadores presentes no extrato aquoso de *A. conyzoides* frente à hidrólise alcalina (NaOH 1M) sob refluxo por 6 horas.

Tempo de exposição	Marcador (ASC) ¹						
	ACG	ACM	CMR	HMF	NBT	MNB	EPT
0 h	121365	24020	480364	59115	29403	118435	24386
6 h	11130	259595	266199	ND	ND	ND	ND
Degradação (%)	89,28	-	44,96	100	100	100	100

¹ média das áreas sob a curva (n=3); ACG: ácido clorogênico; ACM: ácido cumárico; CMR: cumarina; HMF: 5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavona; NBT: nobiletina; MNB: 5'-metoxinobiletina; EPT: eupalestina; ND: não detectável.

São observados no cromatograma a ausência dos picos referentes ao ácido clorogênico e as metoxiflavonas, assim como a ausência do pico referente ao ácido cafeico que aparece no cromatograma do extrato submetido à hidrólise neutra. É reportado na literatura que o ácido cafeico é facilmente oxidado em soluções alcalinas, com possível formação de um dímero do ácido cafeico oxidado (ARAKAWA et al., 2004).

Conforme os dados apresentados, observa-se a redução da ASC referente ao pico da cumarina e o aumento expressivo da área do ácido cumárico. Considera-se a hipótese que as condições experimentais favoreçam a abertura do anel lactônico da cumarina e provável conversão da mesma em ácido cumárico, visto que a literatura aponta que esta reação é facilitada em soluções alcalinas (LÓPEZ-CASTILLO et al., 2013).

Considera-se também a hipótese que o aumento expressivo da ASC do ácido cumárico seja ocasionado pela hidrólise do ácido

cumárico glicosilado, visto que não se detecta no cromatograma do extrato submetido à esta condição a presença do pico referente ao ácido cumárico glicosilado.

Ainda em relação ao perfil cromatográfico do extrato submetido à hidrólise alcalina, os resultados demonstram a formação de três produtos de degradação, com tempos de retenção de 11,421; 12,008 e 12,814 minutos, destacados na Figura 62c. Os perfis de absorção no UV referentes aos picos dos produtos formados são inconclusivos e não possibilitaram a identificação de quais substâncias os mesmos são originados, portanto, análises posteriores devem ser conduzidas a fim de identificar quais os produtos de degradação formados.

O resultado obtido a partir da hidrólise ácida do extrato de *A. conyzoides* é apresentado na Figura 62d. Observa-se que a exposição do extrato à condição ácida ocasionou a degradação total de todos os marcadores do extrato, uma vez que as quantidades encontradas foram inferiores ao limite de detecção destas substâncias. Este resultado demonstra que o extrato é altamente sensível a esta condição de degradação.

5.6.2 Degradação por oxidação

A degradação oxidativa é uma das principais causas de instabilidade de fármacos e são ocasionadas por mecanismos que envolvem transferências de elétrons para a formação de ânions ou cátions reativos (SILVA et al., 2009). Grupos funcionais com hidrogênios instáveis como carbonos benzílicos, alílicos, terciários, ou α posicionados em relação à um heteroátomo são suscetíveis à oxidação com formação de hidroperóxidos, hidróxidos ou cetonas (BLESSY et al., 2014).

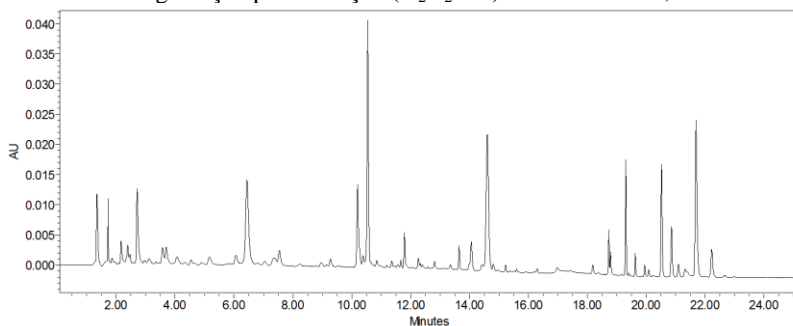
Avaliando-se as ASC dos marcadores frente à degradação oxidativa (Tabela 32) aos quais foram submetidos, observa-se uma pequena redução das áreas de todos os marcadores entre 4,04 – 17,05%. Embora haja uma redução das ASC dos picos, o perfil cromatográfico do extrato submetido à degradação oxidativa, apresentado na Figura 63, não apresenta diferença quando comparado ao perfil cromatográfico do extrato não degradado (Figura 62a).

Tabela 32 – Degradação dos marcadores presentes no extrato aquoso de *A. conyzoides* frente à degradação oxidativa (H_2O_2 3%) por 6 horas.

Tempo de exposição	Marcador (ASC) ¹						
	ACG	ACM	CMR	HMF	NBT	MNB	EPT
0 h	121365	24020	480364	59115	29403	118435	24386
6 h	105415	19761	457580	54790	27159	108131	20899
Degradação (%)	12,28	16,91	4,04	6,82	7,95	8,24	17,05

¹ média das áreas sob a curva (n=3); ACG: ácido clorogênico; ACM: ácido cumárico; CMR: cumarina; HMF: 5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavona; NBT: nobiletina; MNB: 5'-metoxinobiletina; EPT: eupalestina

Figura 63 – Cromatograma do extrato aquoso das folhas de *A. conyzoides* submetido à degradação por oxidação (H_2O_2 3%) durante 6 horas; λ 330 nm.



5.6.3 Degradação térmica

Os resultados do estudo de degradação térmica do extrato aquoso de *A. conyzoides* são apresentados na Tabela 33. É possível observar que houve um decréscimo de área para todos os marcadores quando expostos à 60 °C em estufa por sete dias, com degradação expressiva de ácido clorogênico e cumarina, demonstrando a termolabilidade dessas substâncias.

A instabilidade térmica do ácido clorogênico também foi observada em teste de degradação forçada desenvolvido por Ortmann (2013), onde verificou-se degradação total desta substância após três dias de armazenamento em estufa à 60°C ($\pm 2^\circ\text{C}$).

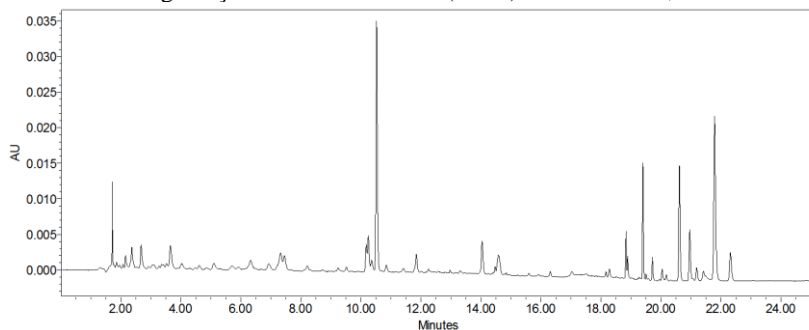
Tabela 33 – Degradação dos marcadores presentes no extrato aquoso de *A. conyzoides* frente à degradação térmica (60 °C) por 7 dias.

Tempo de exposição	Marcador (ASC) ¹						
	ACG	ACM	CMR	HMF	NBT	MNB	EPT
0 h	121365	24020	480364	59115	29403	118435	24386
6 h	13792	18526	61259	50196	24872	99646	19163
Degradação (%)	87,22	22,80	87,37	15,71	17,63	16,48	26,64

¹ média das áreas sob a curva (n=3); ACG: ácido clorogênico; ACM: ácido cumárico; CMR: cumarina; HMF: 5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavona; NBT: nobiletina; MNB: 5'-metoxinobiletina; EPT: eupalestina

Embora as ASC dos picos dos marcadores tenham apresentado variações após a realização do experimento, não foram observadas alterações no perfil cromatográfico do extrato submetido à degradação térmica (Figura 64) quando comparado ao perfil cromatográfico do extrato não degradado (Figura 62a).

Figura 64 – Cromatograma do extrato aquoso das folhas de *A. conyzoides* submetido à degradação térmica em estufa (60 °C) durante 7 dias; λ 330 nm.



Entre os objetivos a serem alcançados na realização do estudo de degradação forçada está a determinação das rotas de degradação dos marcadores presentes no matriz vegetal. De acordo com os resultados obtidos, pode-se afirmar que: todas as substâncias presentes no extrato são altamente sensíveis à hidrólise em meio ácido; as metoxiflavonas identificadas no extrato são extremamente vulneráveis à hidrólise em meio alcalino e ácido; o ácido clorogênico é facilmente degradado em temperaturas elevadas e diferentes condições de pH; a cumarina

demonstrou ser instável frente à elevações na temperatura do ambiente a qual foi exposta.

Estes resultados corroboram com os dados disponíveis na literatura acerca da instabilidade do ácido clorogênico e fornece indícios em relação a sensibilidade das metoxiflavonas em soluções alcalinas e ácidas, uma vez que não foram encontrados trabalhos na literatura a respeito da estabilidade dessas substâncias.

Os resultados obtidos ainda possibilitam a interpretação acerca do comportamento dos marcadores estudados em meio fisiológico, visto que observou-se intensa hidrólise do extrato em condições ácidas. Outras considerações incluem quais precauções devem ser tomadas no armazenamento e processamento do extrato de *A. conyzoides*.

6 CONCLUSÕES

A fim de obter os padrões analíticos de metoxiflavonas, foram purificadas e identificadas as substâncias 5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavona, nobiletina, 5'-metoxinobiletina e eupalestina a partir de frações semipurificadas obtidas da espécie *A. conyzoides*. Os ensaios realizados demonstraram pureza superior a 97% para todas as metoxiflavonas purificadas, suficiente para utilizá-las como substâncias de referência nas etapas de desenvolvimento e validação do método analítico.

Neste trabalho a caracterização química por CLUE-EM/DAD do extrato aquoso de *A. conyzoides* permitiu a identificação de 17 substâncias. São estas: licopsamina; licopsamina *N*-óxido; isômero *N*-óxido da licopsamina; ácido clorogênico (ácido 5-cafeoilquínico); ácido cumárico *O*-glicopiranosídeo; ácido cumárico; cumarina (1,2-benzopirano); ageconiflavona C; 3'-hidroxi-5,6,7,8,4',5'-hexametoxiflavona; sinensetina; 5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavona; nobiletina; linderoflavona B; 5'-metoxinobiletina e eupalestina. Além das substâncias mencionadas a caracterização sugere a presença da substância 7-hidroxi-5,6,8,5'-tetrametoxi-3',4'-metilenedioxiflavona e outra substância com perfil de substituição de dihidroxi-trimetoxiflavona. Sendo as substâncias ácido clorogênico e 7-hidroxi-5,6,8,5'-tetrametoxi-3',4'-metilenedioxiflavona reportadas pela primeira vez na espécie.

Desenvolveu-se um método analítico para quantificação simultânea de ácido clorogênico (ácido 5-cafeoilquínico), ácido cumárico, cumarina (1,2-benzopirano), 5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavona, nobiletina, 5'-metoxinobiletina e eupalestina no extrato aquoso de *A. conyzoides*. A validação do método analítico apresentou resultados apropriados, sendo considerado específico, linear, preciso, exato e com boa sensibilidade para a quantificação destes marcadores.

Entre os marcadores estudados, as substâncias pertencentes à classe das metoxiflavonas são metabólitos pouco comuns entre espécies do reino vegetal. Por este motivo, este trabalho sugere o estabelecimento da metoxiflavona 5'-metoxinobiletina como marcador para a espécie *A. conyzoides*, visto que esta substância está presente em grande quantidade nesta planta.

O estudo de degradação forçada do extrato de *A. conyzoides* permitiu inferir que método analítico desenvolvido pode ser considerado indicativo de estabilidade, visto que não foram observadas alterações no

perfil cromatográfico que comprometem a determinação dos marcadores selecionados, assim como possibilitou a detecção de produtos de degradação durante as condições do estudo de degradação forçada (hidrólise em meio neutro, alcalino e ácido, degradação oxidativa e térmica) podendo ser aplicado em estudos de estabilidade de extratos de *A. conyzoides*.

REFERÊNCIAS

- ABENA, A.A.; KINTSANGOULA-MBAYA, G.S.; DIANTAMA, J.; BIOKA, D. Effets analgésiques d'un extrait brut d'*Ageratum conyzoides* chez le rat. **L'Encéphale**, v. 19, n. 4, p. 329-332, 1993.
- ACHOLA, K.J.; MUNENGE, R.W. Activity of *Ageratum conyzoides* on isolated rat phrenic nerve-diaphragm and blood pressure on anaesthetised rats. **Pharm. Biol.**, v. 35, n. 1, p. 31-37, 1997.
- ADEBAYO, A.H.; TAN, N.-H.; AKINDAHUNSI, A.A.; ZENG, G.-Z.; ZHANG, Y.-M. Anticancer and antiradical scavenging activity of *Ageratum conyzoides* L.(Asteraceae). **Pharmacog. Mag.**, v. 6, n. 21, p. 62, 2010.
- ADESOGAN, E.K.; OKUNADE, A.L. A new flavone from *Ageratum conyzoides*. **Phytochemistry**, v. 18, n. 11, p. 1863-1864, 1979.
- ADJOU, E.S.; DAHOUENON-AHOUSI, E.; DEGNON, R.; SOUMANOU, M.M.; SOHOUNHLOUE, D.C.K. Investigations on bioactivity of essential oil of *Ageratum conyzoides* L., from Benin against the growth of fungi and aflatoxin production. **Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.**, v. 13, n. 1, p. 143-148, 2012.
- ANDREWS, G.J.; BOON, H. CAM in Canada: places, practices, research. **Complement. Ther. Clin. Pract.**, v. 11, n. 1, p. 21-27, 2005.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists International. **Guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals 2002.**
- ARAKAWA, R.; YAMAGUCHI, M.; HOTTA, H.; OSAKAI, T.; KIMOTO, T. Product analysis of caffeic acid oxidation by on-line electrochemistry/electrospray ionization mass spectrometry. **J. Am. Soc. Mass Spectrom.**, v. 15, n. 8, p. 1228-1236, 2004.
- AVULA, B.; SAGI, S.; WANG, Y.-H.; ZWEIGENBAUM, J.; WANG, M.; KHAN, I.A. Characterization and screening of pyrrolizidine alkaloids and N-oxides from botanicals and dietary supplements using UHPLC-

high resolution mass spectrometry. **Food Chem.**, v. 178, n., p. 136-148, 2015.

AWAD, N.E.; KASSEM, H.A.; ELKHAYAT, Z.A.; EL-FEKY, A.M.; MATLOUB, A.A. Chemical composition and anti-inflammatory evaluation of *Ageratum conyzoides* L. leaves. **J. Appl. Sci. Res.**, v. 9, n. 3, p. 2126-2134 2013.

BARNES, P.M.; BLOOM, B.; NAHIN, R. National Center for Complementary and Alternative Medicine. **The Use of Complementary and Alternative Medicine in the United States.** United States, 2008.

BATAGLION, G.A.; DA SILVA, F.M.; EBERLIN, M.N.; KOOLEN, H.H. Simultaneous quantification of phenolic compounds in buriti fruit (*Mauritia flexuosa* Lf) by ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Food Res. Int.**, v. 66, n., p. 396-400, 2014.

BATISH, D.R.; KAUR, S.; SINGH, H.P.; KOHLI, R.K. Role of root-mediated interactions in phytotoxic interference of *Ageratum conyzoides* with rice (*Oryza sativa*). **Flora**, v. 204, n. 5, p. 388-395, 2009.

BIRADAR, S.M.; ASWATHANARAYANA, B.J.; KULKARNI, V.H.; KULKARNI, P.V.; SMITA, D.M.; TARAK, K.C. Protective effects of ethanolic extracts of *Ageratum conyzoides* on experimental induced inflammatory bowel disease. **J. Pharmacol. Toxicol.**, v. 6, n. 8, p. 664-678, 2011.

BLESSY, M.; PATEL, R.D.; PRAJAPATI, P.N.; AGRAWAL, Y.K. Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs—A review. **J. Pharm. Anal.**, v. 4, n. 3, p. 159-165, 2014.

BOSI, C.F. Presença de alcaloides pirrolizidínicos em *Ageratum conyzoides* L., Asteraceae. **Dissertação de Mestrado**, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis/SC. Brasil, 2012.

BOSI, C.F.; ROSA, D.W.; GROUGNET, R.; LEMONAKIS, N.; HALABALAKI, M.; SKALTSOUNIS, A.L.; BIAVATTI, M.W. Pyrrolizidine alkaloids in medicinal tea of *Ageratum conyzoides*. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 23, n. 3, p. 425-432, 2013.

BOUDA, H.; TAPONDJOU, L.A.; FONTEM, D.A.; GUMEDZOE, M.Y.D. Effect of essential oils from leaves of *Ageratum conyzoides*, *Lantana camara* and *Chromolaena odorata* on the mortality of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera, Curculionidae). **J. Stored. Prod. Res.**, v. 37, n. 2, p. 103-109, 2001.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução n. 899, de 29 de maio de 2003**. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, Brasília, 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC n.º 10, de 09 de março de 2010**. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e dá outras providências, Brasília, 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução n. 45, de 09 de agosto de 2012**. Dispõe sobre a realização de estudos de estabilidade de insumos farmacêuticos ativos, Brasília, 2012.

BRAUN, L.A.; TIRALONGO, E.; WILKINSON, J.M.; SPITZER, O.; BAILEY, M.; POOLE, S.; DOOLEY, M. Perceptions, use and attitudes of pharmacy customers on complementary medicines and pharmacy practice. **BMC Complement. Altern. Med.**, v. 10, n. 1, p. 38, 2010.

CABRERA, A.L.; KLEIN, R.M. Compostas 4: Tribo Eupatoriae. in REITZ, R. **Flora Ilustrada Catarinense** Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 10, p. 415-750, 1989.

CASS, Q.B.; DEGANI, A.L.G. **Desenvolvimento de métodos por HPLC: fundamentos, estratégias e validação** São Carlos, EdUFSCar, 2001.

CASSIANO, N.; BARREIRO, J.; MARTINS, L.; OLIVEIRA, R.; CASS, Q. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Quím. Nova**, v. 32, n., p. 1021-1030, 2009.

CHAH, K.F.; EZE, C.A.; EMUELOSI, C.E.; ESIMONE, C.O. Antibacterial and wound healing properties of methanolic extracts of some Nigerian medicinal plants. **J. Ethnopharmacol.**, v. 104, n. 1, p. 164-167, 2006.

CHEN, C.; CHEN, Y.; HSU, H.; CHEN, Y. New flavones from *Bauhinia championii* BENTH. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 32, n. 1, p. 166-169, 1984.

CHEN, T.; MEI, N.; FU, P.P. Genotoxicity of pyrrolizidine alkaloids. **J. Appl. Toxicol.**, v. 30, n. 3, p. 183-196, 2010.

CIMANGA, R.K.; KIKWETA, C.M.; TSHODI, M.E.; NSAKA, S.L.; MBAMU, B.M.; MANIENGA, K.; BUMOYI, M.; KAMBU, O.K. Antibacterial and antifungal screening of extracts from six medicinal plants collected in Kinshasa-Democratic Republic of Congo against clinical isolate pathogens. **J. Pharmacognosy Phytother.**, v. 6, n. 3, p. 24-32, 2014.

COLLINS, C. Michael Tswett e o “nascimento” da cromatografia. **Sci. Chromatographica**, v. 1, n. 1, p. 7-21, 2009.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia** Campinas, Unicamp, 2006.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochim. Biophys. Acta** v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.

CRUZ, G.L. **Dicionário das plantas úteis do Brasil** 5 ed., Rio de Janeiro, Editora Civilizacao Brasileira SA, 1995.

DA SILVA MOMESSO, L.; DE MOURA, R.M.X.; JARDIM, D.H. Atividade antitumoral do *Ageratum conyzoides* L.(Asteraceae). **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 19, n. 3, p. 660-663, 2009.

DASH, G.K.; MURTHY, P.N. Wound healing effects of *Ageratum conyzoides* Linn. **Int. J. Pharm. Bio. Sci.**, v. 2, n. 2, p. 369-382, 2011.

DAWIDOWICZ, A.L.; TYPEK, R. Thermal stability of 5-O-caffeoylquinic acid in aqueous solutions at different heating conditions. **J. Agr. Food Chem.**, v. 58, n. 24, p. 12578-12584, 2010.

DAYIE, N.; NEWMAN, M.J.; AYITEY-SMITH, T. Screening for antimicrobial activity of *Ageratum conyzoides* L: a pharmacomicrobiological approach. **Internet J. Pharmacol.**, v. 5, n. 2, p., 2008.

DE MELO, L.V.; SAWAYA, A.C.H.F. UHPLC–MS quantification of coumarin and chlorogenic acid in extracts of the medicinal plants known as guaco (*Mikania glomerata* and *Mikania laevigata*). **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 25, n. 2, p. 105-110, 2015.

DE MELO, N.I.; MAGALHAES, L.G.; DE CARVALHO, C.E.; WAKABAYASHI, K.A.L.; AGUIAR, G.P.; RAMOS, R.C.; MANTOVANI, A.L.L.; TURATTI, I.C.C.; RODRIGUES, V.; GROPPPO, M.; CUNHA, W.; VENEZIANI, R.C.S.; CROTTI, A.E.M. Schistosomicidal activity of the essential oil of *Ageratum conyzoides* L.(Asteraceae) against adult *Schistosoma mansoni* worms. **Molecules**, v. 16, n. 1, p. 762-773, 2011.

DE MENDONÇA, F.A.C.; DA SILVA, K.F.S.; DOS SANTOS, K.K.; JÚNIOR, K.R.; SANT'ANA, A.E.G. Activities of some Brazilian plants against larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. **Fitoterapia**, v. 76, n. 7, p. 629-636, 2005.

DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica** 2 São Paulo, Editora Unesp, 2002.

DIALLO, A.; EKLU-GADEGBEKEU, K.; AMEGBOR, K.; AGBONON, A.; AKLIKOKOU, K.; CREPPY, E.; GBEASSOR, M. In vivo and in vitro toxicological evaluation of the hydroalcoholic leaf extract of *Ageratum conyzoides* L.(Asteraceae). **J. Ethnopharmacol.**, v. 155, n. 2, p. 1214-1218, 2014.

DONG, M.W.; ZHANG, K. Ultra-high-pressure liquid chromatography (UHPLC) in method development. **Trends Anal. Chem.**, v. 63, n., p. 21-30, 2014.

DŨNG, N.X.; THO, P.T.T.; DAN, N.V.; LECLERCQ, P.A. Chemical composition of the oil of *Ageratum conyzoides* L. from Vietnam. **J. Essent. Oil Res.**, v. 1, n. 3, p. 135-136, 1989.

EGUNYOMI, A.; GBADAMOSI, I.T.; ANIMASHAHUN, M.O. Hypoglycaemic activity of the ethanol extract of *Ageratum conyzoides*

linn. shoots on alloxan-induced diabetic rats. **J. Med. Plants Res.**, v. 5, n. 22, p. 5347-5350, 2011.

EKOR, M. The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. **Front. Pharmacol.**, v. 4, n. 177, p. 1-10, 2014.

EKUNDAYO, O.; LAAKSO, I.; HILTUNEN, R. Essential oil of *Ageratum conyzoides*. **Planta Med.**, v. 54, n. 1, p. 55-57, 1988.

EMA. European Medicine Agency. **Guideline on bioanalytical method validation**. 2011.

FAN, T.-P.; DEAL, G.; KOO, H.-L.; REES, D.; SUN, H.; CHEN, S.; DOU, J.-H.; MAKAROV, V.G.; POZHARITSKAYA, O.N.; SHIKOV, A.N. Future development of global regulations of Chinese herbal products. **J. Ethnopharmacol.**, v. 140, n. 3, p. 568-586, 2012.

GALATI, E.M.; MICELI, N.; TAVIANO, M.F.; SANOGO, R.; RANERI, E. Anti-inflammatory and antioxidant activity of *Ageratum conyzoides*. **Pharm. Biol.**, v. 39, n. 5, p. 336-339, 2001.

GBOLADE, A.A.; ONAYADE, O.A.; AYINDE, B.A. Insecticidal activity of *Ageratum conyzoides* L. volatile oil against *Callosobruchus maculatus* F. in seed treatment and fumigation laboratory tests. **Int. J. Trop. Insect. Sci.**, v. 19, n. 2-3, p. 237-240, 1999.

GONZÁLEZ, A.G.; AGUIAR, Z.E.; GRILLO, T.A.; LUIS, J.G.; RIVERA, A.; CALLE, J. Chromenes from *Ageratum conyzoides*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 4, p. 1137-1139, 1991a.

GONZÁLEZ, A.G.; AGUIAR, Z.E.; GRILLO, T.A.; LUIS, J.G.; RIVERA, A.; CALLE, J. Methoxyflavones from *Ageratum conyzoides*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 4, p. 1269-1271, 1991b.

GUPTA, M.P. **270 plantas medicinales iberoamericanas** Santa Fe de Bogotá, Talleres de Editorial Presencia, 1995.

HASSAN, M.M.; SHAHID-UD-DAULA, A.F.M.; JAHAN, I.A.; NIMMI, I.; ADNAN, T.; MANSUR, A.A.; HOSSAIN, H. Anti-inflammatory activity, total flavonoids and tannin content from the ethanolic extract of

Ageratum conyzoides Linn. leaf. **Int. J. Pharm. Phytopharm. Res.**, v. 1, n. 5, p. 234-241, 2012.

HO, C.-T.; PAN, M.; LAI, C.; LI, S. Polymethoxyflavones as food factors for the management of inflammatory diseases. **Neuropathology**, v. 20, n., p. 337-341, 2012.

HORIE, T.; TOMINAGA, H.; KAWAMURA, Y. Revised structure of a natural flavone from *Ageratum conyzoides*. **Phytochemistry**, v. 32, n. 4, p. 1076-1077, 1993.

HOSSAIN, H.; KARMAKAR, U.K.; BISWAS, S.K.; SHAHID-UD-DAULA, A.; JAHAN, I.A.; ADNAN, T.; CHOWDHURY, A. Antinociceptive and antioxidant potential of the crude ethanol extract of the leaves of *Ageratum conyzoides* grown in Bangladesh. **Pharm. Biol.**, v. 51, n. 7, p. 893-898, 2013.

HUSSEIN, T.A.; MOHAMED, N.S.-E.; MOUSTAFA, M.F.; EL-SAYED, M.A. A new natural pyrrolone from the Egyptian *Ageratum* species. **Eur. J. Chem.**, v. 1, n. 2, p. 140-141, 2010.

ICH. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. **ICH Harmonised Tripartite Guideline**. Stability Testing of New Drugs Substances and Products - ICH Q1A (R2), 2003.

ICH. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. **ICH Harmonized Tripartite Guidelines**. Validation of analytical procedures: text and methodology - ICH Q2 (R1), 2005.

JIANG, Y.; DAVID, B.; TU, P.; BARBIN, Y. Recent analytical approaches in quality control of traditional Chinese medicines—a review. **Anal. Chim. Acta**, v. 657, n. 1, p. 9-18, 2010.

KAMBOJ, A.; SALUJA, A.K. *Ageratum conyzoides* L.: A review on its phytochemical and pharmacological profile. **Int. J. Green Pharm.**, v. 2, n. 2, p. 59-68, 2008.

KAMBOJ, A.; SALUJA, A.K. Isolation of stigmasterol and β -sitosterol from petroleum ether extract of aerial parts of *Ageratum conyzoides* (Asteraceae). **Int. J. Pharm. Pharm. Sci.**, v. 3, n. 1, p. 94-96, 2011.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DE-BEER, E.J. Acetic acid for analgesic screening. **Fed. Proc.**, v. 18, n., p. 418-420, 1959.

LE-VAN, N.; PHAM, T.V.C. Two new flavones from *Eupatorium coelestinum*. **Phytochemistry**, v. 18, n. 11, p. 1859-1861, 1979.

LI, N.; XIA, Q.; RUAN, J.; FU, P.P.; LIN, G. Hepatotoxicity and tumorigenicity induced by metabolic activation of pyrrolizidine alkaloids in herbs. **Curr. Drug Metab.**, v. 12, n. 9, p. 823-834, 2011.

LI, S.; PAN, M.-H.; LAI, C.-S.; LO, C.-Y.; DUSHENKOV, S.; HO, C.-T. Isolation and syntheses of polymethoxyflavones and hydroxylated polymethoxyflavones as inhibitors of HL-60 cell lines. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 15, n. 10, p. 3381-3389, 2007.

LI, S.; PAN, M.-H.; LO, C.-Y.; TAN, D.; WANG, Y.; SHAHIDI, F.; HO, C.-T. Chemistry and health effects of polymethoxyflavones and hydroxylated polymethoxyflavones. **J. Funct. Foods**, v. 1, n. 1, p. 2-12, 2009.

LIMA, R.K.; DAS GRAÇAS CARDOSO, M.; MORAES, J.C.; ANDRADE, M.A.; MELO, B.A.; RODRIGUES, V.G. Caracterização química e atividade inseticida do óleo essencial de *Ageratum conyzoides* L. sobre a lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797)(Lepidoptera: Noctuidae). **Biosci. J.**, v. 26, n. 1, p. 1-5, 2010.

LIU, M.; LI, Y.; CHOU, G.; CHENG, X.; ZHANG, M.; WANG, Z. Extraction and ultra-performance liquid chromatography of hydrophilic and lipophilic bioactive components in a Chinese herb *Radix Salviae Miltiorrhizae*. **J. Chromatogr. A** v. 1157, n. 1, p. 51-55, 2007.

LIU, X.C.; LIU, Z.L. Evaluation of larvicidal activity of the essential oil of *Ageratum conyzoides* L. aerial parts and its major constituents against *Aedes albopictus*. **J. Entomol. Zool. Stud.**, v. 2, n. 4, p. 345-350, 2014.

LÓPEZ-CASTILLO, N.N.; ROJAS-RODRÍGUEZ, A.D.; PORTA, B.M.; CRUZ-GÓMEZ, M.J. Process for the obtention of coumaric acid from coumarin:

analysis of the reaction conditions. **Adv. Chem. Engineer. Sci.**, v. 3, n., p. 195-201, 2013.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais brasileiras: nativas e exóticas** second, Nova Odessa, Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, 2008.

MAGALHÃES, J.F.G.; VIANA, C.F.G.; ARAGÃO JÚNIOR, A.G.M.; MORAES, V.G.; RIBEIRO, R.A.; VALE, M.R. Analgesic and antiinflammatory activities of *Ageratum conyzoides* in rats. **Phytother. Res.**, v. 11, n. 3, p. 183-188, 1997.

MALDANER, L.; JARDIM, I.C.S.F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Quím. Nova**, v. 32, n. 1, p. 214-222, 2009.

MARQUES NETO, J.F.; COSTALLAT, L.T.L.; FERNANDES, S.R.M.; NAPOLI, M.D.M.D.; SAMARA, A.M. Efeitos do *Ageratum conyzoides*, Linèe no tratamento da artrose. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 28, n. 4, p. 109-114, 1988.

MASSUOD, W.A.M.; RAQIB, S.M.; BUDIHARJO, A.; MAHAJOENA, E. Larvicidal potentiality of the banded (*Ageratum conyzoides*) leaves for controlling the three important species of mosquitoes (*Aedes Aegypti*, *Culex Quinquefasciatus* and *Anopheles Maculatus*). **Int. J. Chem. Biol. Sci.**, v. 1, n. 6, p. 33-43, 2014.

MISHRA, S.; DWIVEDI, B.; SINGH, A.; THAKUR, L.; RANI, R.; PARJAPATI, R. Development of a TLC autographically guided CG-MS profile of major phytochemical constituents for comparative assessment in different extracts of *Ageratum conyzoides* L. **Int. J. Pharm. Pharm. Sci.**, v. 6, n. 2, p. 559-561, 2014.

MIYAZAWA, M.; OKUNO, Y.; FUKUYAMA, M.; NAKAMURA, S.-I.; KOSAKA, H. Antimutagenic activity of polymethoxyflavonoids from *Citrus aurantium*. **J. Agric. Food. Chem.**, v. 47, n. 12, p. 5239-5244, 1999.

MOREIRA, M.D.; PICANÇO, M.C.; BARBOSA, L.C.A.; GUEDES, R.N.C.; BARROS, E.C.; CAMPOS, M.R. Compounds from *Ageratum conyzoides*: isolation, structural elucidation and insecticidal activity. **Pest Manag. Sci.**, v. 63, n. 6, p. 615-621, 2007.

MOURA, A.C.A.; SILVA, E.L.F.; FRAGA, M.C.A.; WANDERLEY, A.G.; AFIATPOUR, P.; MAIA, M.B.S. Antiinflammatory and chronic toxicity study of the leaves of *Ageratum conyzoides* L. in rats. **Phytomedicine**, v. 12, n. 1, p. 138-142, 2005.

MUNIKISHORE, R.; PADMAJA, A.; GUNASEKAR, D.; BLOND, A.; BODO, B. Two new flavonoids from *Ageratum conyzoides*. **Indian J. Chem.**, v. 52B, n., p. 1479-1482, 2013.

NARITA, Y.; INOUE, K. Degradation kinetics of chlorogenic acid at various pH values and effects of ascorbic acid and epigallocatechin gallate on its stability under alkaline conditions. **J. Agr. Food Chem.**, v. 61, n. 4, p. 966-972, 2013.

NDIP, R.N.; TARKANG, A.E.M.; MBULLAH, S.M.; LUMA, H.N.; MALONGUE, A.; NDIP, L.M.; NYONGBELA, K.; WIRMUM, C.; EFANGE, S.M. In vitro anti-Helicobacter pylori activity of extracts of selected medicinal plants from North West Cameroon. **J. Ethnopharmacol.**, v. 114, n. 3, p. 452-457, 2007.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v., n., p., 2016.

NOGUEIRA, J.H.C.; GONÇALEZ, E.; GALLETI, S.R.; FACANALI, R.; MARQUES, M.O.M.; FELÍCIO, J.D. *Ageratum conyzoides* essential oil as aflatoxin suppressor of *Aspergillus flavus*. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 137, n. 1, p. 55-60, 2010.

NOUR, A.M.M.; KHALID, S.A.; KAISER, M.; BRUN, R.; WAI'L, E.A.; SCHMIDT, T.J. The antiprotozoal activity of methylated flavonoids from *Ageratum conyzoides* L. **J. Ethnopharmacol.**, v. 129, n. 1, p. 127-130, 2010.

NOVAKOVA, L.; MATYSOVA, L.; SOLICH, P. Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis. **Talanta**, v. 68, n. 3, p. 908-918, 2006.

OKEMY, N.A.; MOUSSOUNGOU, A.S.; KOLOUNGOUS, B.C.; ABENA, A.A. Topical anti-inflammatory effect of aqueous extract ointment of *Ageratum conyzoides* L. In rat wistar. **Int. J. Phyto Pharm.**, v. 5, n. 3, p. 37-41, 2015.

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

OKWORI, A.; DINA, C.; JUNAID, S.; OKEKE, I.; ADETUNJI, J.; OLABODE, A. Antibacterial activities of *Ageratum conyzoides* extracts on selected bacterial pathogens. **Internet J. Microbiol.**, v. 4, n. 1, p., 2007.

ORTMANN, C.F. Avaliação da estabilidade de extratos, frações e flavonoides C-glicosídeos presentes em *Cecropia glaziovii*. **Dissertação de Mestrado**, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis/SC. Brasil, 2013.

PARI, K.; RAO, P.J.; SUBRAHMANYAM, B.; RASTHOGI, J.N.; DEVAKUMAR, C. Benzofuran and other constituents of the essential oil of *Ageratum conyzoides*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 5, p. 1385-1388, 1998.

PASSADOR, E.A.P.; DA SILVA, M.F.D.G.F.; FO, E.R.; FERNANDES, J.B.; VIEIRA, P.C.; PIRANI, J.R. A pyrano chalcone and a flavanone from *Neoraputia magnifica*. **Phytochemistry**, v. 45, n. 7, p. 1533-1537, 1997.

PATIL, R.P.; NIMBALKAR, M.S.; JADHAV, U.U.; DAWKAR, V.V.; GOVINDWAR, S.P. Antiaflatoxigenic and antioxidant activity of an essential oil from *Ageratum conyzoides* L. **J. Sci. Food Agr.**, v. 90, n. 4, p. 608-614, 2010.

POSADAS, I.; BUCCI, M.; ROVIEZZO, F.; ROSSI, A.; PARENTE, L.; SAUTEBIN, L.; CIRINO, G. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. **Br. J. Pharmacol.**, v. 142, n. 2, p. 331-338, 2004.

PRAJAPATI, V.; TRIPATHI, A.K.; KHANUJA, S.P.S.; KUMAR, S. Anti-insect screening of medicinal plants from Kukrail Forest, Lucknow, India. **Pharm. Biol.**, v. 41, n. 3, p. 166-170, 2003.

PROKUDINA, E.A.; HAVLÍČEK, L.; AL-MAHARIK, N.; LAPČÍK, O.; STRNAD, M.; GRUZ, J. Rapid UPLC-ESI-MS/MS method for the analysis of isoflavonoids and other phenylpropanoids. **J. Food Comp. Anal.**, v. 26, n. 1, p. 36-42, 2012.

QIU, J.-Y.; CHEN, X.; LI, Z.; WANG, S.-R.; WU, X.-W.; LI, Y.-J.; YANG, D.-Z.; YU, Y.-Y.; YIN, X.-X.; TANG, D.-Q. LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of 11 compounds of *Ginkgo biloba* extract in lysates of mesangial cell cultured by high glucose. **J. Chromatogr. B**, v. 997, n., p. 122-128, 2015.

QUEIROZ, A.C.D.; ALVES, H.D.S.; CAVALCANTE-SILVA, L.H.A.; DIAS, T.D.L.M.F.; SANTOS, M.D.S.; MELO, G.M.D.A.; CAMPESATTO, E.A.; CHAVES, M.C.D.O.; ALEXANDRE-MOREIRA, M.S. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of flavonoids PMT1 and PMT2 isolated from *Piper montealegreanum* Yuncker (Piperaceae) in mice. **Nat. Prod. Res.**, v. 28, n. 6, p. 403-406, 2014.

RAHMAN, A.; AKTER, N.; RASHID, H.; AHMED, N.U.; UDDIN, N.; ISLAM, S. Analgesic and anti-inflammatory effect of whole *Ageratum conyzoides* and *Emilia sonchifolia* alcoholic extracts in animal models. **Afr. J. Pharm. Pharmacol.**, v. 6, n. 20, p. 1469-1476, 2012.

RAMBLA-ALEGRE, M.; ESTEVE-ROMERO, J.; CARDA-BROCH, S. Is it really necessary to validate an analytical method or not? That is the question. **J. Chromatogr. A**, v. 1232, n., p. 101-109, 2012.

RAWAT, T.; PANDEY, I.P. Forced degradation studies for drug substances and drug products-scientific and regulatory considerations. **J. Pharm. Sci. & Res.**, v. 7, n. 5, p. 238-241, 2015.

REYNOLDS, D.W.; FACCHINE, K.L.; MULLANEY, J.F.; ALSANTE, K.M.; HATAJIK, T.D.; MOTTO, M.G. Available guidance and best practices for conducting forced degradation studies. **Pharm. Technol.**, v. 26, n. 2, p. 48-56, 2002.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quím. Nova**, v. 27, n., p. 771-780, 2004.

ROBINSON, M.M.; ZHANG, X. World Health Organization. **The world medicines situation 2011: traditional medicines: global situation, issues and challenges**. Geveva, 2011.

ROZET, E.; CECCATO, A.; HUBERT, C.; ZIEMONS, E.; OPREAN, R.; RUDAZ, S.; BOULANGER, B.; HUBERT, P. Analysis of recent

pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. **J. Chromatogr. A**, v. 1158, n. 1, p. 111-125, 2007.

SAINT-HILAIRE, A.D. **Plantas usuais dos brasileiros** Paris, Grimbart, 2009.

SALIM, E.; KUMLOSASI, E.; JANTAN, I. Inhibitory effect of selected medicinal plants on the release of pro-inflammatory cytokines in lipopolysaccharide-stimulated human peripheral blood mononuclear cells. **J. Nat. Med.**, v. 68, n. 3, p. 647-653, 2014.

SAMPSON, J.H.; PHILLIPSON, J.D.; BOWERY, N.G.; O'NEILL, M.J.; HOUSTON, J.G.; LEWIS, J.A. Ethnomedicinally selected plants as sources of potential analgesic compounds: indication of in vitro biological activity in receptor binding assays. **Phytother. Res.**, v. 14, n. 1, p. 24-29, 2000.

SAMY, R.P.; IGNACIMUTHU, S.; RAJA, D.P. Preliminary screening of ethnomedicinal plants from India. **J. Ethnopharmacol.**, v. 66, n. 2, p. 235-240, 1999.

SAXENA, R.C.; DIXIT, O.P.; SUKUMARAN, P. Laboratory assessment of indigenous plant extracts for anti-juvenile hormone activity in *Culex quinquefasciatus*. **Indian J. Med. Res.**, v. 95, n., p. 204-206, 1992.

SHAILAJAN, S.; WADKE, P.; JOSHI, H.; TIWARI, B. Evaluation of quality and efficacy of an ethnomedicinal plant *Ageratum conyzoides* L. in the management of pediculosis. **J. Young Pharm.**, v. 5, n. 4, p. 139-143, 2013.

SHARMA, P.D.; SHARMA, O.P. Natural products chemistry and biological properties of the *Ageratum* plant. **Toxicol. Environ. Chem.**, v. 50, n. 1-4, p. 213-232, 1995.

SHEKHAR, T.C.; ANJU, G. A comprehensive review on *Ageratum conyzoides* Linn.(Goat weed). **Int. J. Pharm. Phytopharm. Res.**, v. 1, n. 6, p. 391-395, 2012.

SHI, Y.; HONG, C.; XU, J.; YANG, X.; XIE, N.; FENG, F.; LIU, W. Simultaneous quantification of two canthinone alkaloids of *Picrasma quassioides* in rat plasma by liquid chromatography–tandem mass

spectrometry and its application to a rat pharmacokinetic study. **J. Chromatogr. B**, v. 986, n., p. 100-107, 2015.

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

SILVA, K.; ALVES, L.D.S.; SOARES, M.; PASSOS, R.; FARIA, A.; ROLIM NETO, P. Modelos de avaliação da estabilidade de fármacos e medicamentos para a indústria farmacêutica. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 30, n. 2, p. 129-135, 2009.

SILVA, M.J.M.; CAPAZ, F.R.; VALE, M.R. Effects of the water soluble fraction from leaves of *Ageratum conyzoides* on smooth muscle. **Phyther. Res.**, v. 14, n. 2, p. 130-132, 2000.

SINGH, P.; PRAKASH, B.; DUBEY, N.K. Insecticidal activity of *Ageratum conyzoides* L., *Coleus aromaticus* Benth. and *Hyptis suaveolens* (L.) Poit essential oils as fumigant against storage grain insect *Tribolium castaneum* Herbst. **J. Food Sci. Technol.**, v. 51, n. 9, p. 2210-2215, 2014.

SPÍNOLA, V.; LLORENT-MARTÍNEZ, E.J.; CASTILHO, P.C. Determination of vitamin C in foods: current state of method validation. **J. Chromatogr. A**, v. 1369, n., p. 2-17, 2014.

SULTANA, M.; VERMA, P.K.; RAINA, R.; PRAWEZ, S.; DAR, M. Quantitative analysis of total phenolic, flavonoids and tannin contents in acetone and n-hexane extracts of *Ageratum conyzoides*. **Int. J. ChemTech Res.**, v. 4, n. 3, p. 996-999, 2012.

SVOBODA, P.; VLČKOVÁ, H.; NOVÁKOVÁ, L. Development and validation of UHPLC-MS/MS method for determination of eight naturally occurring catechin derivatives in various tea samples and the role of matrix effects. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 114, n., p. 62-70, 2015.

TROPICOS.ORG, (2015). **Missouri Botanical Garden *Ageratum conyzoides* L.**, Acessado em: 21/08/2015, 2015, disponível em: <http://tropicos.org/Name/2700026>

UKWE, C.V.; EKWUNIFE, O.I.; EPUEKE, E.A.; UBAKA, C.M. Antimalarial activity of *Ageratum conyzoides* in combination with chloroquine and artesunate. **Asian Pac. J. Trop. Med.**, v. 3, n. 12, p. 943-947, 2010.

VÁZQUEZ, M.M.; AMARO, A.R.; JOSEPH-NATHAN, P. Three flavonoids from *Ageratum tomentosum* var. *bracteatum*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 11, p. 3706-3707, 1988.

VERA, R. Chemical composition of the essential oil of *Ageratum conyzoides* L.(Asteraceae) from Réunion. **Flavour Frag. J.**, v. 8, n. 5, p. 257-260, 1993.

VERMA, P.K.; RAINA, R.; SULTANA, M.; PRAWEZ, S.; JAMWAL, N. Hepatoprotective mechanisms of *Ageratum conyzoides* L. on oxidative damage induced by acetaminophen in Wistar rats. **Free Radicals and Antioxidants**, v. 3, n. 2, p. 73-76, 2013.

VINEGAR, R.; SCHREIBER, W.; HUGO, R. Biphasic development of carrageenin edema in rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 166, n. 1, p. 96-103, 1969.

VYAS, A.V.; MULCHANDANI, N.B. Structure reinvestigation of conyzorigun, a new chromone from *Ageratum conyzoides*. **J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1** v., n., p. 2945-2947, 1984.

VYAS, A.V.; MULCHANDANI, N.B. Polyoxyxygenated flavones from *Ageratum conyzoides*. **Phytochemistry**, v. 25, n. 11, p. 2625-2627, 1986.

WANG, D.; WANG, J.; HUANG, X.; TU, Y.; NI, K. Identification of polymethoxylated flavones from green tangerine peel (*Pericarpium Citri Reticulatae Viride*) by chromatographic and spectroscopic techniques. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 44, n. 1, p. 63-69, 2007.

WANG, X.; LI, F.; ZHANG, H.; GENG, Y.; YUAN, J.; JIANG, T. Preparative isolation and purification of polymethoxylated flavones from Tangerine peel using high-speed counter-current chromatography. **J. Chromatogr. A** v. 1090, n. 1, p. 188-192, 2005.

WANG, Y.; HE, S.; CHENG, X.; LU, Y.; ZOU, Y.; ZHANG, Q. UPLC-Q-TOF-MS/MS fingerprinting of Traditional Chinese Formula SiJunZiTang. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 80, n., p. 24-33, 2013.

WHO. **WHO guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues** Geneva, World Health Organization, 2007.

WHO. World Health Organization. **Traditional medicine strategy: 2014-2023**. Geneva, 2013.

WIDODO, G.P.; SUKANDAR, E.Y.; SUKRASNO; ADNYANA, I.K. A coumarin from *Ageratum* leaves (*Ageratum conyzoides* L.). **Int. J. Pharm.**, v. 4, n. 1, p. 56-59, 2008.

WIEDENFELD, H. Plants containing pyrrolizidine alkaloids: toxicity and problems. **Food Addit. Contam.**, v. 28, n. 3, p. 282-292, 2011.

WIEDENFELD, H.; RODER, E. Pyrrolizidine alkaloids from *Ageratum conyzoides*. **Planta Med.**, v. 57, n. 6, p. 578-579, 1991.

XIE, C.; YU, K.; ZHONG, D.; YUAN, T.; YE, F.; JARRELL, J.A.; MILLAR, A.; CHEN, X. Investigation of isomeric transformations of chlorogenic acid in buffers and biological matrixes by ultraperformance liquid chromatography coupled with hybrid quadrupole/ion mobility/orthogonal acceleration time-of-flight mass spectrometry. **J. Agr. Food Chem.**, v. 59, n. 20, p. 11078-11087, 2011.

XUAN, T.D.; SHINKICHI, T.; HONG, N.H.; KHANH, T.D.; MIN, C.I. Assessment of phytotoxic action of *Ageratum conyzoides* L.(billy goat weed) on weeds. **Crop Prot.**, v. 23, n. 10, p. 915-922, 2004.

YADAVA, R.N.; KUMAR, S. A novel isoflavone from the stems of *Ageratum conyzoides*. **Fitoterapia**, v. 70, n. 5, p. 475-477, 1999.

ZHANG, J.-Y.; LI, N.; ZHOU, Y.; JIANG, Y.; TU, P.-F. Simultaneous qualitative and quantitative determination of major polymethoxylated flavonoids in the leaves of *Murraya paniculata* by RRLC-DAD-ESI-MS. **Anal. Methods**, v. 4, n. 10, p. 3399-3406, 2012.

ZHOU, D.-Y.; ZHANG, X.-L.; XU, Q.; XUE, X.-Y.; ZHANG, F.-F.; LIANG, X.-M. UPLC/Q-TOFMS/MS as a powerful technique for rapid identification of polymethoxylated flavones in *Fructus aurantii*. **J. Pharm. Biomed. Anal.** , v. 50, n. 1, p. 2-8, 2009.