



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Larissa Gabriela Faqueti

Investigação farmacológica em dor inflamatória da fração padronizada de polimetoxiflavonas de *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae) e avaliação farmacocinética do marcador 5'-metoxinobiletina

Florianópolis
2021

Larissa Gabriela Faqueti

Investigação farmacológica em dor inflamatória da fração padronizada de polimetoxiflavonas de *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae) e avaliação farmacocinética do marcador 5'-metoxinobiletina

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de doutora em Farmácia
Orientadora: Profa. Dra. Maique Weber Biavatti

Florianópolis

2021

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

Faqueti, Larissa Gabriela

Investigação farmacológica em dor inflamatória da fração padronizada de polimetoxiflavonas de *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae) e avaliação farmacocinética do marcador 5'-metoxinobiletina / Larissa Gabriela Faqueti ; orientadora, Maique Weber Biavatti, 2021.
166 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. *Ageratum conyzoides*. 3. polimetoxiflavonas. 4. dor. 5. 5'-metoxinobiletina. I. Biavatti, Maique Weber . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

Larissa Gabriela Faqueti

Investigação farmacológica em dor inflamatória da fração padronizada de polimetoxiflavonas de *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae) e avaliação farmacocinética do marcador 5'-metoxinobiletina

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa., Dra. Christiane Meyre da Silva Bittencourt
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof., Dr. Juliano Ferreira
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa., Dra. Francinete Ramos Campos
Universidade Federal do Paraná

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Farmácia.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Profa. Dra. Maique Weber Biavatti
Orientadora

Florianópolis, 2021

AGRADECIMENTOS

Há um provérbio africano que diz “Se você quer ir rápido, vá sozinho. Se quiser ir longe, vá acompanhado”. Da mesma maneira os resultados obtidos neste trabalho só foram possíveis por meio do auxílio e orientação de vários indivíduos, que contribuíram fornecendo especialmente aquilo que lhes é mais valioso, o seu conhecimento.

Agradeço inicialmente à minha orientadora Maique Weber Biavatti por aceitar esse desafio e amparar-me em todas as adversidades advindas durante essa caminhada.

Ao professor Adair Roberto Soares dos Santos, do Laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação (LANDI) desta universidade e às professoras Teresa Cristina Dalla Costa e Bibiana Verlindo de Araújo da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela orientação na realização dos estudos farmacológicos. Seus incentivos me ajudaram a crescer como pesquisadora e expandir minhas habilidades na experimentação animal. Estendo os agradecimentos aos colegas do LANDI, especialmente aos alunos Scheila Kraus e Gustavo dos Santos, pela grande colaboração na realização dos ensaios em animais.

À veterinária Luciana Aparecida Honorato, responsável pelo biotério setorial do departamento de Farmacologia, que participou ativamente no planejamento e execução dos experimentos de farmacocinética.

Ao professor Andersson Barrison e à aluna Maria de Fátima Costa, da Universidade Federal do Paraná, que colaboraram na realização das análises de RMN. Também, aos professores Louis Pergaud Sandjo e César Simionatto por contribuírem com excelentes sugestões no andamento deste trabalho.

Aos parceiros de bancada e experimentos, Layzon e Gabriela Salim, pela imensurável colaboração no desenvolvimento deste trabalho, tanto na realização de experimentos, quanto na discussão de resultados e redação dos artigos.

Agradeço aos grandes amigos do Laboratório Central Analítica & Agregados que percorreram comigo essa jornada: Amanda, Ana Caroline, Erlon, Guilherme, Ingrid, Larissa, Layzon e Luiz. Obrigada pela amizade, apoio, abraços, discussões, almoços do RU, pastéis na

feirinha, idas a Jivago, rodas de terapia e entre tantos outros momentos. Vocês são meus cientistas preferidos no mundo.

À minha família, especialmente meus pais Calixto e Açoely, assim como meus irmãos Thaís e Charles, meus exemplos de fé e coragem, que me motivam a sempre persistir na busca pelos meus sonhos. Nossas almas estarão sempre unidas pelo elo do amor.

Meu agradecimento especial aos animais que doaram suas vidas para a realização deste trabalho e contribuíram para o avanço do conhecimento científico.

RESUMO

Ageratum conyzoides é utilizada na medicina popular como analgésica e anti-inflamatória. Entre as substâncias de interesse identificadas nesta espécie estão as polimetoxiflavonas (PMF). Diante da necessidade do desenvolvimento de alternativas terapêuticas para o manejo de manifestações dolorosas e inflamatórias, este trabalho teve por objetivo obter e padronizar uma fração enriquecida em polimetoxiflavonas de *A. conyzoides* (FEPMF-*Ac*), avaliando sua efetividade farmacológica em modelos de nocicepção, assim como estabelecendo os parâmetros farmacocinéticos do marcador 5'-metoxinobiletina (5'-MeONB). A otimização das condições de extrações para a obtenção das PMF indicou como condições ideais o uso de *n*-hexano em aparato de Soxhlet. A otimização dos métodos de fracionamento cromatográfico do extrato bruto possibilitou a obtenção da FEPMF-*Ac* em apenas duas etapas de purificação, utilizando a cromatografia de partição centrífuga (CPC) como ferramenta inicial de enriquecimento da fração, seguida por filtração por cromatografia em coluna utilizando resina Sephadex® LH20 para a remoção das substâncias interferentes. A caracterização da FEPMF-*Ac* por UPLC-EM possibilitou a identificação de nove PMF, ageconiflavona C, 3'-hidroxi-5,6,7,8,4',5'-hexametoxiflavona, 7-hidroxi-5,6,8,5'-tetrametoxi-3',4'-metilenodioxiflavona, sinensetina, 5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavona, nobiletina, linderoflavona B, 5-MeONB e eupalestina. A quantificação do teor de PMF totais na FEPMF-*Ac* foi realizada em função de 5'-MeONB. A validação do método analítico desenvolvido em UPLC-EM demonstrou ser linear, exato e preciso para a quantificação deste marcador. Na investigação da atividade antinociceptiva em camundongos, utilizando o modelo de formalina, a FEPMF-*Ac* apresentou efeito antinociceptivo em diferentes doses, com maior inibição da nocicepção durante a fase inflamatória. Paralelamente, inibiu a nocicepção induzida por glutamato, bradicinina, histamina, assim como por substâncias ativadoras dos canais TRPV1 e ASIC e proteínas quinases C e A. Além disso, constatou-se que a 5'-MeONB contribuiu para este efeito desempenhado pela fração, visto que a mesma demonstrou atividade antinociceptiva. A biodisponibilidade oral em ratos foi de 8-11%. A compreensão dos parâmetros farmacocinéticos da 5'-MeONB contribuiu para o planejamento das próximas etapas incluídas no desenvolvimento de fármacos. Os resultados obtidos demonstram o potencial biológico das PMF de *A. conyzoides* para o alívio de quadros dolorosos inflamatórios.

Palavras-chave: *Ageratum conyzoides*; polimetoxiflavonas; dor; 5'-metoxinobiletina.

ABSTRACT

Ageratum conyzoides is used in folk medicine as an analgesic and anti-inflammatory. Among the substances of biological interest identified in this species are polymethoxyflavones (PMF). In order to develop therapeutic alternatives for the management of painful and inflammatory manifestations, this study aimed to obtain and standardize an enriched fraction of polymethoxyflavones from *A. conyzoides* (EFPMF-*Ac*), evaluating its pharmacological effectiveness in nociception models, as well as establishing the pharmacokinetic parameters of the fraction marker 5'-methoxynobiletin (5'-MeONB). Conditions for the extraction of the PMF were optimized, indicating the ideal conditions as *n*-hexane in Soxhlet apparatus. Optimization of chromatographic fractionation methods of the crude extract has enabled to obtain EFPMF-*Ac* in two purification steps, using centrifugal partition chromatography (CPC) as the initial enrichment tool, followed by column chromatography filtration using Sephadex® LH20 resin for the removal of interfering substances. Characterization of EFPMF-*Ac* by UPLC-MS enabled the identification of nine PMF, ageconyflavone C, 3'-hydroxy-5,6,7,8,4',5'-hexamethoxyflavone, 7-hydroxy-5,6,8,5'-tetramethoxy-3',4'-metilenedioxyflavone, sinensetin, 5,6,7,3',4',5'-hexamethoxyflavone, nobiletin, linderoflavone B, 5-MeONB and eupalestina. Quantification of total PMF content in the EFPMF-*Ac* was performed using the major substance 5'-MeONB as reference. Validation of the UPLC-MS analytical method developed has proved to be linear, accurate and precise for the quantification of 5'-MeONB. EFPMF-*Ac* has showed antinociceptive effect at different doses, in the investigation of antinociceptive activity in mice using formalin, with greater inhibition of nociception during the inflammatory phase. In addition, it has been effective by inhibiting nociception induced by glutamate, bradykinin, histamine, as well as activating substances of TRPV1 and ASIC channels and protein kinases C and A. Similarly, it was found that 5'-MeONB contributes to the effect of EFPMF-*Ac*, since it has demonstrated antinociceptive activity. Characterization of the pharmacokinetic parameters of 5'-MeONB revealed an oral bioavailability in rats of around 8-11%. The understanding of the pharmacokinetic parameters of the marker contributes to planning the next steps included in the development of drugs. Results obtained demonstrate the biological potential of PMF from *A. conyzoides* to relief painful inflammatory conditions.

Keywords: *Ageratum conyzoides*; polymethoxyflavones; pain; 5'-methoxynobiletin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química das substâncias diosgenina e dioscina.....	26
Figura 2 - Partes aéreas de <i>Ageratum conyzoides</i> L. (Asteraceae).....	34
Figura 3 - Partes aéreas de <i>Ageratum conyzoides</i> L. (Asteraceae).....	35
Figura 4 - Distribuição pantropical de <i>Ageratum conyzoides</i> L. (Asteraceae).....	36
Figura 5 - Cromenos, benzofuranos, cromona e cromonona identificados no óleo essencial de <i>A. conyzoides</i>	41
Figura 6 - Cromenos identificados no extrato de n-hexano de <i>A. conyzoides</i>	41
Figura 7 - Polimetoxiflavonas identificadas em <i>A. conyzoides</i>	42
Figura 8 - Flavonoides hidroxilados identificados em <i>A. conyzoides</i>	43
Figura 9 - Outras classes de metabólitos identificados em <i>A. conyzoides</i>	44
Figura 10 - Esqueleto base dos flavonoides	47
Figura 11 - Estrutura de outras polimetoxiflavonas isoladas de espécies vegetais	47
Figura 12 - Fluxograma de otimização do processo de extração.	56
Figura 13 - Fluxograma de obtenção da fração enriquecida em polimetoxiflavonas de <i>A. conyzoides</i>	64
Figura 14 - Aparato de campo aberto.	71
Figura 15 - Estrutura química da substância crisina, utilizada como padrão interno.....	75
Figura 16 - Análise comparativa entre os cromatogramas de intensidade de pico base (BPI) obtidos por <i>ESI(+)</i> dos extratos de <i>A. conyzoides</i> preparados por maceração estática.	84
Figura 17 - Análise comparativa entre os cromatogramas de intensidade de pico base (BPI) obtidos por <i>ESI(+)</i> dos extratos de <i>A. conyzoides</i> preparados em aparato de Soxhlet.	84
Figura 18 - Curva de calibração para 5'-metoxinobiletina em função da Área X Concentração.	86
Figura 19 - Análise comparativa do teor de 5'-metoxinobiletina por UPLC-MS das diferentes combinações extrativas obtidas na otimização do processo de extração das polimetoxiflavonas de <i>A. conyzoides</i>	87
Figura 20 - Análise por CCD das subfrações H-J e A-G provenientes do fracionamento do extrato bruto de n-hexano por CLV, conforme condições descritas no item 4.4.3.	89
Figura 21 - Cromatograma do fracionamento cromatográfico do extrato bruto de n-hexano de <i>A. conyzoides</i> em sistema de CPC, de acordo com as condições descritas no item 4.4.2.2. λ 330 nm.	93

Figura 22 - Fluxograma dos métodos de fracionamento por cromatografia em coluna clássica experimentados para o enriquecimento final da fração de polimetoxiflavonas de <i>A. conyzoides</i> , conforme condições descritas no item 4.4.4.....	94
Figura 23 - Análise comparativa entre os espectros de RMN ¹ H (300 MHz, TMS, CDCl ₃) das frações reunidas obtidas na purificação da subfração IV-VII utilizando Diaion [®] HP20 como fase estacionária.....	95
Figura 24 - Análise comparativa entre os espectros de RMN ¹ H (300 MHz, TMS, CDCl ₃) das frações reunidas obtidas na purificação da subfração IV-VII utilizando Sephadex [®] LH20 como fase estacionária e acetona como fase móvel.	96
Figura 25 - Análise comparativa entre os espectros de RMN ¹ H (300 MHz, TMS, CDCl ₃) das frações reunidas obtidas na purificação da subfração IV-VII utilizando sílica gel como fase estacionária.	96
Figura 26 - Análise comparativa entre os espectros de RMN ¹ H (300 MHz, TMS, CDCl ₃) das frações reunidas obtidas na purificação da subfração IV-VII utilizando Sephadex [®] LH20 como fase estacionária e diclorometano-metanol como fase móvel.	97
Figura 27 - Análise comparativa entre os cromatogramas de intensidade de pico base (BPI) obtidos por <i>ESI</i> (+) das frações reunidas contendo as polimetoxiflavonas, provenientes dos diferentes métodos de fracionamento por cromatografia em coluna. A seta indica o pico cromatográfico referente a substância interferente cumarina.....	98
Figura 28 - Fluxograma de obtenção da fração enriquecida em polimetoxiflavonas de <i>A. conyzoides</i> a partir dos extratos de <i>n</i> -hexano obtidos em 2016 e 2018.....	99
Figura 29 - Cromatograma de intensidade de pico base (BPI) obtido por UPLC-ESI-MS da fração enriquecida em polimetoxiflavonas de <i>A. conyzoides</i> obtido a partir da coleta de 2016.	100
Figura 30 - Cromatograma de intensidade de pico base (BPI) obtido por UPLC-ESI-MS da fração enriquecida em polimetoxiflavonas de <i>A. conyzoides</i> obtido a partir da coleta de 2018.	100
Figura 31 - Curva de calibração para 5'-metoxinobiletina em função da Área X Concentração.	102
Figura 32 - Gráfico dos resíduos em função da concentração (µg/g) para o ajuste do modelo $y = 106059x + 4584,9$ para a substância 5'-metoxinobiletina.....	102
Figura 33 - Espectro de RMN ¹ H (600 MHz, TMS, CDCl ₃) para a fração enriquecida em polimetoxiflavonas de <i>A. conyzoides</i>	106

Figura 34 - Análise comparativa da expansão dos espectros de RMN ¹ H (600 MHz, TMS, CDCl ₃) dos padrões isolados de polimetoxiflavonas e da fração enriquecida em polimetoxiflavonas de <i>A. conyzoides</i> , ampliado na região entre δ 7,60 e δ 6,00.	107
Figura 35 - Efeito da fração enriquecida em polimetoxiflavonas de <i>A. conyzoides</i> (30-300 mg/kg, i.g.) e indometacina (Indo, 10 mg/kg, i.p.) no comportamento nociceptivo induzido pela injeção intraplantar de formalina em camundongos <i>Swiss</i> fêmeas.....	110
Figura 36 - Efeito da fração enriquecida em polimetoxiflavonas de <i>A. conyzoides</i> parcialmente dissolvida em óleo de milho (30 e 100 mg/kg, i.g.) no comportamento nociceptivo induzido pela injeção intraplantar de formalina em camundongos <i>Swiss</i> fêmeas.....	112
Figura 37 - Efeito da fração enriquecida em polimetoxiflavonas de <i>A. conyzoides</i> (30-300 mg/kg, i.g.) no comportamento nociceptivo induzido pela injeção intraplantar de formalina em camundongos <i>Swiss</i> machos.....	114
Figura 38 - Efeito da fração enriquecida em polimetoxiflavonas de <i>A. conyzoides</i> (10 e 100 mg/kg, i.g.) no comportamento nociceptivo induzido pela injeção intraplantar de glutamato, bradicinina e histamina em camundongos <i>Swiss</i> machos.....	118
Figura 39 - Efeito da fração enriquecida em polimetoxiflavonas de <i>A. conyzoides</i> (10 e 100 mg/kg, i.g.) no comportamento nociceptivo induzido pela injeção intraplantar de capsaicina, cinamaldeído e salina acidificada em camundongos <i>Swiss</i> machos.....	121
Figura 40 - Efeito da fração enriquecida em polimetoxiflavonas de <i>A. conyzoides</i> (10 e 100 mg/kg, i.g.) no comportamento nociceptivo induzido pela injeção intraplantar de forbol 12-miristato 13-acetato e forskolina em camundongos <i>Swiss</i> machos.	122
Figura 41 - Efeito da fração enriquecida em polimetoxiflavonas de <i>A. conyzoides</i> (30-300 mg/kg, i.g.) no teste do campo aberto em camundongos <i>Swiss</i> machos.	124
Figura 42 - Cromatograma do fracionamento cromatográfico da fração enriquecida em polimetoxiflavonas de <i>A. conyzoides</i> em sistema de CPC para isolamento do marcador 5'-metoxinobiletina, de acordo com as condições descritas no item 4.8.1. λ 330 nm.	126
Figura 43 - Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, TMS, CDCl ₃) da substância 5'-metoxinobiletina isolada por cromatografia de partição centrífuga.	127
Figura 44 - Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, TMS, CDCl ₃) da substância 5'-metoxinobiletina isolada por cromatografia de partição centrífuga, ampliado na região entre δ 7,50 e 6,50....	127
Figura 45 - Cromatograma de intensidade de pico base (BPI) obtido por UPLC-ESI-MS da substância 5'-metoxinobiletina.....	128

Figura 46 - Efeito do marcador 5'-metoxinobiletina (10-100 mg/kg, i.g.) no comportamento nociceptivo induzido pela injeção intraplantar de formalina em camundongos <i>Swiss</i> fêmeas.	129
Figura 47 - Efeito do decurso temporal do marcador 5'-metoxinobiletina (100 mg/kg, i.g.) no comportamento nociceptivo induzido pela injeção intraplantar de formalina em camundongos <i>Swiss</i> fêmeas.	130
Figura 48 - Cromatogramas de íons extraído (<i>ESI+</i>) para 5'-metoxinobiletina (5'-MeONB, t_R : 1,78 min, m/z 433,1494) e crisina (IS, t_R :1,57 min, m/z 255,0657) em amostras de plasma.	133
Figura 49 - Curva de calibração para 5'-metoxinobiletina em função da Razão das Área X Concentração.	134
Figura 50 - Gráfico dos resíduos em função da concentração (ng/mL) para o ajuste do modelo $y = 1,2538x + 0,022$ para a substância 5'-metoxinobiletina.	134
Figura 51 - Perfis de concentração plasmática de 5'-MeONB em ratos e camundongos estabelecidos pela modelagem populacional.	138
Figura 52 - Gráficos de adequação dos modelos popPK para 5'-MeONB em ambas espécies.	139

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Rendimento de extração dos diferentes extratos obtidos na otimização do processo de extração das polimetoxiflavonas de <i>A. conyzoides</i>	83
Tabela 2 - Substâncias identificadas por <i>ESI(+)</i> Q-Tof nos extratos de <i>A. conyzoides</i> , obtidos na etapa de otimização do processo de extração.	85
Tabela 3 - Teor de 5'-metoxinobiletina por UPLC-MS das diferentes combinações extrativas obtidas na otimização do processo de extração das polimetoxiflavonas de <i>A. conyzoides</i>	87
Tabela 4 - Valores de coeficiente de partição (KD) obtidos para os modos de eluição ascendente (ASC) e descendente (DSC) para a cumarina (1,2-benzopirona) e as polimetoxiflavonas majoritárias presentes no extrato bruto de <i>n</i> -hexano de <i>A. conyzoides</i> , determinados segundo as condições experimentais descritas no item 4.4.3.1.....	91
Tabela 5 - Substâncias identificadas por <i>ESI(+)</i> Q-Tof na fração enriquecida em polimetoxiflavonas de <i>A. conyzoides</i>	101
Tabela 6 - Parâmetros de repetibilidade e precisão intermediária para o marcador 5'-metoxinobiletina na fração enriquecida em polimetoxiflavonas de <i>A. conyzoides</i> , segundo as condições experimentais estabelecidas.....	103
Tabela 7 - Parâmetros de exatidão para o marcador 5'-metoxinobiletina na fração enriquecida em polimetoxiflavonas de <i>A. conyzoides</i> , determinado a partir do ensaio de adição de padrão, segundo as condições experimentais estabelecidas.	104
Tabela 8 - Teores das polimetoxiflavonas majoritária e polimetoxiflavonas totais na fração enriquecida em polimetoxiflavonas de <i>A. conyzoides</i> obtida a partir da coleta em 2016.	104
Tabela 9 - Teores das polimetoxiflavonas majoritária e polimetoxiflavonas totais na fração enriquecida em polimetoxiflavonas de <i>A. conyzoides</i> obtida a partir da coleta em 2018.	105
Tabela 10 - Valores de coeficiente de partição (K_D) obtidos para os modos de eluição ascendente (ASC) e descendente (DSC) para as polimetoxiflavonas nobiletina, 5'-metoxinobiletina e eupalestina presentes no extrato bruto de <i>n</i> -hexano de <i>A. conyzoides</i> frente ao sistema de Hex-AcOEt-EtOH-H ₂ O (1:1:1:1), determinados segundo as condições experimentais descritas no item 4.4.3.1.....	126
Tabela 11- Parâmetros de repetibilidade e precisão intermediária para o marcador 5'-metoxinobiletina em plasma de rato, segundo as condições experimentais estabelecidas.....	135
Tabela 12 - Parâmetros de exatidão para o marcador 5'-metoxinobiletina em plasma de rato, segundo as condições experimentais estabelecidas.	136

Tabela 13 - Parâmetros de efeito matriz e recuperação para o marcador 5'-metoxinobiletina em plasma desproteinizado e hemolisado de rato, segundo as condições experimentais estabelecidas.	136
Tabela 14 - Parâmetros de efeito matriz e recuperação para o padrão interno crisina em plasma desproteinizado e hemolisado de rato, segundo as condições experimentais estabelecidas. .	136
Tabela 15 - Integridade da diluição 1:10 de plasma de rato contendo 5'-MeONB, segundo as condições experimentais estabelecidas.....	138
Tabela 16 - Parâmetros farmacocinéticos estimados para 5'-MeONB pela abordagem não compartimental após administração de 10 mg/kg i.v. <i>bolus</i> e oral de 50 mg/kg a ratos <i>Wistar</i> e administração oral de 100 mg/kg em camundongos <i>Swiss</i>	140
Tabela 17 - Parâmetros farmacocinéticos estimados para 5'-MeONB pela abordagem populacional após administração de 10 mg/kg i.v. <i>bolus</i> e oral de 50 mg/kg a ratos <i>Wistar</i> e administração oral de 100 mg/kg em camundongos <i>Swiss</i>	140

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, FÓRMULAS E UNIDADES

5'-MeONB	<i>5'-metoxinobiletina</i>
ACN	<i>acetonitrila</i>
AcOEt	<i>acetato de etila</i>
AMP	<i>adenosina 3',5'-monofosfato (do inglês, adenosine 3',5'-monophosphate)</i>
ANC	<i>análise não compartimental</i>
ANOVA	<i>análise de variância</i>
AP	<i>alcaloides pirrolizidínicos</i>
ASC	<i>ascendente</i>
ASICs	<i>canais iônicos sensíveis à ácidos (do inglês, acid-sensing ion channel)</i>
ATP	<i>adenosina trifosfato (do inglês, adenosine triphosphate)</i>
AUC	<i>área sob a curva (do inglês, area under the curve)</i>
BCRP	<i>proteína de resistência ao câncer de mama (do inglês, breast cancer resistance protein)</i>
BPI	<i>intensidade de pico base (do inglês, base peak ion)</i>
BSEP	<i>bomba de exportação de sais biliares (do inglês, bile salt export pump)</i>
CC	<i>cromatografia em coluna</i>
CCD	<i>cromatografia em camada delgada</i>
CDCl ₃	<i>clorofórmio deuterado</i>
CGRP	<i>peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (do inglês, calcitonin gene-related peptide)</i>
CL	<i>clearance</i>
CLV	<i>cromatografia líquida a vácuo</i>
COX	<i>ciclo-oxigenase</i>
CPC	<i>cromatografia de partição centrífuga</i>
CQ	<i>controle de qualidade</i>
CYP	<i>citocromo P450</i>
d	<i>duplete</i>
Da	<i>Dalton</i>
DCM	<i>diclorometano</i>
dd	<i>duplete de duplete</i>
DI ₅₀	<i>dose inibitória de 50% da nocicepção</i>
DMSO	<i>dimetilsulfóxido</i>

DPR	<i>desvio padrão relativo</i>
DSC	<i>descendente</i>
ECCS	<i>extended clearance classification system (sem tradução para o português)</i>
EM	<i>espectrometria de massa</i>
EPM	<i>erro padrão da média</i>
EtOH	<i>etanol</i>
FE	<i>fase estacionária</i>
FEPMF-Ac	<i>fração enriquecida em polimetoxiflavonas de Ageratum conyzoides</i>
FI	<i>fase inferior</i>
FID	<i>decaimento de indução livre (do inglês, free induction decay)</i>
FM	<i>fase móvel</i>
F _{oral}	<i>biodisponibilidade oral</i>
FS	<i>fase superior</i>
h	<i>hora</i>
Hex	<i>n-hexano</i>
H ₂ O	<i>água</i>
IL	<i>interleucina</i>
iNOS	<i>óxido nítrico sintase induzível (do inglês, inducible nitric oxide synthase)</i>
J	<i>constante de acoplamento (expresso em Hertz)</i>
K _D	<i>coeficiente de partição</i>
kg	<i>quilograma</i>
kV	<i>quilovolt</i>
L	<i>litro</i>
LOX	<i>lipo-oxigenase</i>
LQ	<i>limite de quantificação</i>
LYSA	<i>ensaio de solubilidade por liofilização (do inglês, lyophilisation solubility assay)</i>
MAT	<i>tempo médio de absorção (do inglês, mean absorption time)</i>
MeOH	<i>metanol</i>
mg	<i>miligrama</i>
min	<i>minuto</i>
mL	<i>mililitro</i>
mm	<i>milímetro</i>
MRT	<i>tempo de residência médio (do inglês, mean residence time)</i>

m/z	<i>razão massa carga</i>
NaOH	<i>hidróxido de sódio</i>
NADPH	<i>fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (do inglês, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)</i>
NFκB	<i>fator nuclear kappa B (do inglês, nuclear factor kappa B)</i>
ng	<i>nanograma</i>
nm	<i>nanometro</i>
nmol	<i>nanomol</i>
NPA	<i>abordagem naïve pooling (do inglês, naïve pooling approach)</i>
PAMPA	<i>ensaio de permeabilidade em membrana artificial paralela (do inglês, parallel artificial membrane permeability assay)</i>
PBS	<i>tampão fosfato salino (do inglês, phosphate buffered saline)</i>
PEG	<i>polietilenoglicol</i>
PGE2	<i>prostaglandina E₂</i>
P-gp	<i>glicoproteína P</i>
PI	<i>padrão interno</i>
PMA	<i>forbol 12-miristato 13-acetato (do inglês, phorbol-12-miristato-13-acetato)</i>
PMF	<i>polimetoxiflavonas</i>
ppm	<i>partes por milhão</i>
popPK	<i>farmacocinética populacional (do inglês, populational pharmacokinetic)</i>
PVDF	<i>polivinilideno difluorido</i>
RMN ¹ H	<i>ressonância magnética nuclear de hidrogênio</i>
RPM	<i>rotações por minuto</i>
s	<i>segundo</i>
SNC	<i>sistema nervoso central</i>
SNP	<i>sistema nervoso periférico</i>
t _{1/2}	<i>tempo de meia-vida</i>
T _{max}	<i>tempo para alcançar a concentração máxima no plasma</i>
TMS	<i>tetrametilsilano</i>
TNF-α	<i>fator de necrose tumoral alfa (do inglês, tumor necrosis fractor alpha)</i>
t _R	<i>tempo de retenção</i>
TRP	<i>receptor de potencial transitório ((do inglês, transient receptor potential)</i>
TRPA	<i>receptor de potencial transitório anquirina (do inglês, transient receptor potential ankyrin)</i>

TRPC	<i>receptor de potencial transitório canônico (do inglês, transient receptor potential canonical)</i>
TRPM	<i>receptor de potencial transitório melastatina (do inglês, transient receptor potential melastatin)</i>
TRPML	<i>receptor de potencial transitório mucolipina (do inglês, transient receptor potential mucolipin)</i>
TRPP	<i>receptor de potencial transitório policistina (do inglês, transient receptor potential polycystic)</i>
TRPV	<i>receptor de potencial transitório vaniloide (do inglês, transient receptor potential vanilloid)</i>
UPLC-DAD	<i>cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos (do inglês, ultra performance liquid chromatography coupled to diodearray detector)</i>
UPLC-MS	<i>cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (do inglês, ultra performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry)</i>
v	<i>volume</i>
V	<i>volt</i>
V _{dss}	<i>volume de distribuição no estado estacionário (do inglês, volume of distribution at steady state)</i>
δ (delta)	<i>deslocamento químico (expresso em partes por milhão – ppm em relação ao padrão interno TMS)</i>
°C	<i>grau Celsius</i>
λ	<i>taxa constante de eliminação</i>
μg	<i>micrograma</i>
μm	<i>micrometros</i>
μmol	<i>micromol</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	28
2.1	Inflamação e dor	28
2.2	<i>Ageratum conyzoides</i> L. ASTERACEAE	34
2.2.1	Aspectos botânicos e etnofarmacológicos	34
2.2.2	Aspectos farmacológicos: dor e inflamação	37
2.2.3	Aspectos fitoquímicos	40
2.2.4	Aspectos toxicológicos	44
2.3	POLIMETOXIFLAVONAS	46
2.3.1	Fração enriquecida de polimetoxiflavonas de <i>Ageratum conyzoides</i>.....	52
3	OBJETIVOS	54
3.1	OBJETIVO GERAL.....	54
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	54
4	MATERIAIS E MÉTODOS	55
4.1	MATERIAL VEGETAL	55
4.1.1	Coleta da planta e identificação da espécie	55
4.2	OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO das PMF	55
4.2.1	Desenvolvimento do método analítico por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (UPLC-MS)	57
<i>4.2.1.1</i>	<i>Determinação do teor de polimetoxiflavonas nas soluções extrativas.....</i>	<i>57</i>
4.2.2	Obtenção dos extratos brutos otimizados.....	58
4.3	OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO.....	59
4.3.1	Monitoramento das PMF por CCD, UPLC-MS e RMN de ¹H	59
4.3.2	Fracionamento das PMF por CLV	59
4.3.3	Fracionamento das PMF por CPC.....	60
<i>4.3.3.1</i>	<i>Seleção do sistema bifásico pela análise de coeficiente de partição (KD)</i>	<i>60</i>

4.3.3.2	<i>Fracionamento do extrato bruto por CPC: sistema de n-hexano-acetato de etil- etanol-água 1:1:1:1 (ASC)</i>	61
4.3.4	Purificação adicional das PMF por CC	62
4.3.4.1	<i>Cromatografia em coluna de permeação molecular</i>	62
4.3.4.1.1	Condição 1.....	62
4.3.4.1.2	Condição 2.....	62
4.3.4.2	<i>Cromatografia em coluna de troca iônica</i>	63
4.3.4.3	<i>Cromatografia em coluna de adsorção</i>	63
4.3.4.3.1	Condição 1.....	63
4.3.4.3.2	Condição 2.....	63
4.4	PADRONIZAÇÃO DA FEPMF-Ac	64
4.5	CARACTERIZAÇÃO DA FEPMF-Ac POR UPLC-MS	64
4.5.1	Parâmetros analíticos de mérito do método	65
4.5.1.1	<i>Linearidade e limites de quantificação e detecção</i>	65
4.5.1.2	<i>Precisão</i>	66
4.5.1.3	<i>Exatidão</i>	66
4.5.2	Quantificação do teor de polimetoxiflavonas totais por UPLC-MS	67
4.6	CARACTERIZAÇÃO DA FEPMF-Ac POR RMN ¹H	67
4.7	AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO E ANTI- INFLAMATÓRIO DA FEPMF-Ac	67
4.7.1	Animais	67
4.7.2	Drogas e Tratamentos	68
4.7.3	Nociceção induzida pela injeção intraplantar de formalina	69
4.7.4	Nociceção induzida pela injeção intraplantar de mediadores químicos endógenos	69
4.7.5	Nociceção induzida pela injeção intraplantar de substâncias ativadoras de canais TRPs e ASICs	70

4.7.6	Nociceção induzida pela injeção intraplantar de substâncias ativadoras de proteína quinase C e adenilato ciclase	70
4.7.7	Avaliação locomotora: Teste do campo aberto (<i>open field</i>).....	71
4.7.8	Análise estatística.....	72
4.8	AVALIAÇÃO DA FARMACODINÂMICA E FARMACOCINÉTICA DO MARCADOR 5'-MeONB.....	72
4.8.1	Purificação do marcador 5'-MeONB por CPC.....	72
<i>4.8.1.1</i>	<i>Identificação e determinação da pureza do marcador 5'-MeONB</i>	<i>73</i>
4.8.2	Animais	73
4.8.3	Avaliação do efeito antinociceptivo do marcador 5'-MeONB.....	74
4.8.4	Método bioanalítico para quantificação de 5'-MeONB em plasma por UPLC-MS.....	74
<i>4.8.4.1</i>	<i>Preparação das amostras de solução estoque, padrões de calibração e controle de qualidade.....</i>	<i>75</i>
<i>4.8.4.2</i>	<i>Parâmetros bioanalíticos de mérito do método</i>	<i>76</i>
<i>4.8.4.2.1</i>	<i>Seletividade</i>	<i>76</i>
<i>4.8.4.2.2</i>	<i>Linearidade e limite de quantificação (LQ).....</i>	<i>76</i>
<i>4.8.4.2.3</i>	<i>Precisão e exatidão</i>	<i>77</i>
<i>4.8.4.2.4</i>	<i>Recuperação e efeito matriz</i>	<i>77</i>
<i>4.8.4.2.5</i>	<i>Estabilidade</i>	<i>78</i>
<i>4.8.4.2.6</i>	<i>Efeito residual.....</i>	<i>78</i>
<i>4.8.4.2.7</i>	<i>Diluição</i>	<i>78</i>
4.8.5	Estudo farmacocinético pré-clínico.....	78
<i>4.8.5.1</i>	<i>Preparação das doses de 5'-MeONB</i>	<i>79</i>
<i>4.8.5.2</i>	<i>Farmacocinética em ratos</i>	<i>79</i>
<i>4.8.5.3</i>	<i>Farmacocinética em camundongos</i>	<i>80</i>
4.8.6	Análise dos dados farmacocinéticos.....	80
<i>4.8.6.1</i>	<i>Análise não compartimental.....</i>	<i>80</i>

4.8.6.2	<i>Análise farmacocinética populacional</i>	81
4.8.7	Estudo farmacocinético <i>in silico</i>	81
4.8.8	Análise estatística	81
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	83
5.1	OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO	83
5.2	OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO	88
5.2.1	Fracionamento do extrato bruto por CPC: sistema de Hex:AcOEt:EtOH:H₂O (1:1:1:1) (ASC)	92
5.2.2	Purificação adicional da subfração IV-VII por cromatografia em coluna clássica (CC)	94
5.2.3	Desenvolvimento da FEPMF-<i>Ac</i>	98
5.3	CARACTERIZAÇÃO DA FEPMF- <i>Ac</i> POR UPLC-MS	99
5.3.1	Parâmetros analíticos de mérito do método	101
5.3.1.1	<i>Linearidade e limites de detecção e quantificação</i>	101
5.3.1.2	<i>Precisão</i>	102
5.3.1.3	<i>Exatidão</i>	103
5.3.2	Quantificação do teor de polimetoxiflavonas totais por UPLC-MS	104
5.4	CARACTERIZAÇÃO DA FEPMF- <i>Ac</i> POR RMN ¹ H	105
5.5	AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO E ANTI-INFLAMATÓRIO DA FEPMF- <i>Ac</i>	108
5.5.1	Nociceção induzida pela administração intraplantar de formalina	108
5.5.1.1	<i>Avaliação em camundongos Swiss fêmeas</i>	108
5.5.1.2	<i>Avaliação em camundongos Swiss machos</i>	113
5.5.2	Nociceção induzida pela injeção intraplantar de mediadores químicos endógenos	115
5.5.3	Nociceção induzida pela injeção intraplantar de substâncias ativadoras de canais TRPs e ASICs	118

5.5.4	Nociceção induzida pela injeção intraplantar de substâncias ativadoras de proteína quinase C e adenilato ciclase	121
5.5.5	Avaliação locomotora: Teste do campo aberto (<i>open field</i>).....	123
5.6	AVALIÇÃO DA FARMACODINÂMICA E FARMACOCINÉTICA DO MARCADOR 5'-MeONB.....	125
5.6.1	Purificação do marcador 5'-MeONB por CPC.....	125
5.6.2	Identificação e determinação da pureza do marcador 5'-MeONB.....	127
5.6.3	Efeito antinociceptivo do marcador 5'-MeONB	128
5.6.4	Método bioanalítico para quantificação de 5'-MeONB por UPLC-MS.....	131
<i>5.6.4.1</i>	<i>Desenvolvimento do método bioanalítico e processamento da amostra biológica.....</i>	<i>131</i>
<i>5.6.4.2</i>	<i>Parâmetros bioanalíticos de mérito do método</i>	<i>132</i>
<i>5.6.4.2.1</i>	<i>Seletividade</i>	<i>132</i>
<i>5.6.4.2.2</i>	<i>Linearidade e limite de quantificação.....</i>	<i>134</i>
<i>5.6.4.2.3</i>	<i>Precisão e exatidão</i>	<i>135</i>
<i>5.6.4.2.4</i>	<i>Recuperação e efeito matriz</i>	<i>136</i>
<i>5.6.4.2.5</i>	<i>Estabilidade</i>	<i>137</i>
<i>5.6.4.2.6</i>	<i>Efeito residual.....</i>	<i>137</i>
<i>5.6.4.2.7</i>	<i>Diluição</i>	<i>137</i>
5.6.5	Estudo farmacocinético pré-clínico.....	138
6	CONCLUSÕES.....	144
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	146
	REFERÊNCIAS.....	148

1 INTRODUÇÃO

A grande maioria das doenças que atingem os seres humanos manifestam-se fisiopatologicamente como neoplasia, degeneração ou inflamação, e ainda que estas possam se apresentar em diferentes graus na mesma enfermidade, a inflamação destaca-se como a principal resposta fisiopatológica inserida no cotidiano da população mundial (SOEHNLEIN *et al.*, 2017).

A inflamação pode ser definida essencialmente como uma resposta biológica à interrupção da homeostasia tecidual provocada por inúmeros estímulos, como por exemplo, agentes infecciosos, isquemia, interação antígeno-anticorpo, lesões térmicas, químicas ou mecânicas. Na condição inflamatória, o sistema imunológico empenha-se em eliminar ou neutralizar estes estímulos prejudiciais por meio da ação de proteínas plasmáticas, fluidos e leucócitos, restaurando o equilíbrio fisiológico (ROTELLI *et al.*, 2003; ASHLEY; WEIL; NELSON, 2012; SHALAPOUR; KARIN, 2015).

Uma das principais características dos processos inflamatórios e a queixa mais evidente dos pacientes é o aparecimento de dor. Mediadores pró-inflamatórios, como prostaglandinas, citocinas, quimiocinas, proteases, neuropeptídeos e fatores de crescimento são liberados nos locais da inflamação, sensibilizando os neurônios periféricos e promovendo a percepção da dor. Três órgãos são particularmente suscetíveis ao desenvolvimento de dor inflamatória: a pele, as articulações e o intestino (MULEY; KRUSTEV; MCDOUGALL, 2016).

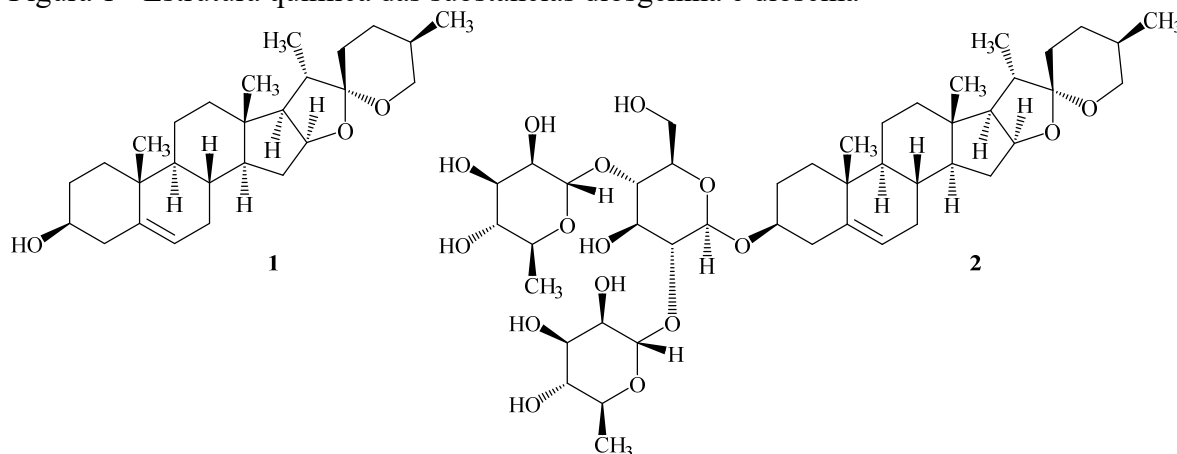
Usualmente, as terapias anti-inflamatórias são focadas em reduzir ou neutralizar o efeito dos mediadores pró-inflamatórios, ou inibir o recrutamento de leucócitos e sua posterior ativação, incluindo principalmente a utilização de fármacos anti-inflamatórios não esteroidais e glicocorticoides sintéticos. Entretanto, essas terapias medicamentosas disponíveis não têm demonstrado muito sucesso no manejo de desordens inflamatórias crônicas, paralelamente ao aparecimento de efeitos adversos. Portanto, torna-se um desafio desenvolver agentes mais eficazes e menos tóxicos para o tratamento das manifestações inflamatórias (GARCÍA-LAFUENTE *et al.*, 2009; ALESSANDRI *et al.*, 2013).

A contribuição das plantas medicinais para o manejo de afecções inflamatórias é amplamente observada desde os primórdios da ciência. Há mais de 250 anos descobriu-se que as cascas de salgueiro (*Salix sp.*) poderiam ser utilizadas para o controle da dor, febre e inflamação, estimulando as pesquisas que culminaram no isolamento do ácido salicílico em 1828 a partir das cascas de *Salix alba* e, posteriormente, da espécie *Filipendula ulmaria*. A

partir desta descoberta, e em associação aos conhecimentos da química medicinal, Felix Hoffman e Arthur Eichengrün realizam a acetilação do ácido salicílico no intuito de melhorar suas propriedades medicinais, produzindo o ácido acetilsalicílico (AAS) em 1897, posteriormente patentado em 1899 pela Bayer® como aspirina, um dos fármacos analgésico e anti-inflamatório mais vendidos no mundo (JACK, 1997; HOWES, 2017).

Estimulados por esta descoberta, números estudos foram conduzidos com produtos naturais evidenciando o potencial anti-inflamatório dos seus fitoconstituintes. Pode-se citar o isolamento da diosgenina (1), uma sapogenina esteroidal originária da hidrólise da saponina dioscina (2), que pode ser obtida de diversas espécies vegetais dos gêneros *Dioscorea*, *Trigonella*, *Costus* e *Smilax*. A diosgenina possui grande importância para a indústria farmacêutica como fonte natural de hormônios esteroidais, visto que esta substância é o principal precursor na fabricação de cortisona e outros glicocorticoides sintéticos (JESUS *et al.*, 2016; HERRÁIZ, 2017). Apesar dos avanços dos estudos nessa área, ainda existe a necessidade da busca de novas moléculas anti-inflamatórias e, portanto, produtos de origem natural se mostram alternativas muito promissoras a serem investigadas.

Figura 1 - Estrutura química das substâncias diosgenina e dioscina



Entre as espécies de interesse medicinal e científico destaca-se a *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae). No Brasil, a infusão aquosa desta planta costuma ser utilizada internamente como anti-inflamatória e analgésica, no alívio dos sintomas de artrite e de cólicas menstruais e intestinais (LORENZI, 1991). Por conta da sua tradicionalidade, diversos estudos investigaram os efeitos anti-inflamatório e antinociceptivo de preparações obtidas a partir das folhas de *A. conyzoides*, demonstrando um sugestivo potencial terapêutico da espécie (MAGALHÃES *et al.*, 1997; SILVA; CAPAZ; VALE, 2000; MOURA *et al.*, 2005; HASSAN *et al.*, 2012;

RAHMAN *et al.*, 2012; AWAD *et al.*, 2013; HOSSAIN *et al.*, 2013; SALIM; KUMOLOSASI; JANTAN, 2014).

A respeito da composição fitoquímica de *A. conyzoides*, as polimetoxiflavonas (PMF) são abundantemente encontradas. Previamente em nosso grupo de pesquisa, foram avaliados os efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório da fração de PMF obtida de *A. conyzoides* em modelos de nocicepção aguda induzido por formalina, prostaglandinas E₂ (PGE₂) e as citocinas pró-inflamatórias interleucina-1 β (IL-1 β) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Os resultados demonstram que esta fração possui atividade antinociceptiva e anti-inflamatória em diferentes doses (30-300 mg/kg), com uma inibição mais pronunciada da nocicepção durante a segunda fase do modelo de formalina, significativa inibição da formação do edema e redução da nocicepção induzida pela administração intraplantar de prostaglandinas E₂ e IL-1 β (FAQUETI *et al.*, 2016).

Apesar dos benefícios encontrados para as PMF presentes em *A. conyzoides*, a utilização de extratos brutos desta espécie é fortemente desaconselhada, uma vez que foram identificadas na espécie substâncias altamente tóxicas, pertencentes ao grupo dos alcaloides pirrolizidínicos (AP), sendo a licopsamina (**51**) e seus derivados oxidados, substâncias reconhecidas por sua hepatotoxicidade, genotoxicidade, teratogenicidade e carcinogenicidade (WIEDENFELD, 2011). A cumarina 1,2-benzopirona (**45**) é também conhecida por ser hepatotóxica (ABRAHAM *et al.*, 2010). No caso da cumarina, por exemplo, o regulamento estabelecido pela Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) define os limites máximos de 5 a 50 mg/kg permitidos em determinados alimentos que possuem naturalmente essa substância na sua composição, além de proibir a sua adição em produtos alimentícios (EFSA, 2008).

Desta forma, a fim de se evitar a toxicidade apresentada por estas substâncias, é de suma importância o desenvolvimento e a padronização de um processo de purificação do extrato que permita a obtenção de uma fração de PMF mantendo as promissoras propriedades antinociceptiva e anti-inflamatória demonstradas e sem a presença dos AP e da cumarina.

Os resultados obtidos até o momento, considerando o potencial terapêutico e o amplo emprego desta espécie na medicina popular, sugerem a necessidade de realizar estudos adicionais, investigando a aplicação desta fração purificada e enriquecida para o tratamento de manifestações inflamatórias dolorosas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 INFLAMAÇÃO E DOR

Em condições normais, a inflamação é um processo essencial para proteger o organismo de patógenos invasores, bem como para promover a reparação de tecidos lesionados. O processo inflamatório é iniciado quando macrófagos residentes nos tecidos detectam quaisquer perturbações imunológicas, ocasionada por diferentes estímulos, por meio dos receptores de reconhecimento de padrões e induzem a produção de citocinas inflamatórias e prostaglandinas (MEDZHITOV, 2010; NETEA *et al.*, 2017). O mediador primário da resposta inflamatória pode variar de acordo com a natureza do evento inicial, entretanto, a citocina TNF- α aparece na fase aguda inicial da inflamação liberada por mastócitos e macrófagos residentes no tecido, desencadeando a liberação das interleucinas IL-1, IL-6 e IL-8 (BOTTING; BOTTING, 2000).

As citocinas ativam as células endoteliais, aumentando assim a permeabilidade vascular e facilitando a entrada de células imunes nos tecidos inflamados, gerando conseqüentemente o extravasamento vascular, vasodilatação e hipotensão. Além desses, as citocinas TNF- α e IL-1 β podem ter efeitos sistêmicos quando secretadas em grandes quantidades, como indução da produção de proteínas de fase aguda (proteína C reativa) e fatores de coagulação nos hepatócitos, além de estimular a liberação de prostaglandinas que agem no sistema nervoso central promovendo o chamado comportamento de doença: febre, anorexia, fadiga, sonolência e retraimento social (MEDZHITOV, 2010; NETEA *et al.*, 2017).

A dor aguda, também conhecida como dor nociceptiva, é uma das características fundamentais da inflamação (JI; CHAMESSIAN; ZHANG, 2016). A ativação de células não neuronais na área lesionada (incluindo mastócitos, basófilos, plaquetas, macrófagos, neutrófilos, células endoteliais, queratinócitos e fibroblastos), juntamente com uma ampla gama de moléculas de sinalização liberadas, incluindo neurotransmissores (glutamato), peptídeos (substância P, CGRP, bradicinina), eicosinóides (prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos), citocinas (IL-1 β , TNF- α), neurotrofinas, quimiocinas (CCL2/MCP-1 e CXCL8/IL-8) bem como proteases extracelulares (trombina) e prótons, dão origem à chamada “sopa inflamatória”. Esse conjunto de fatores liberados são responsáveis pela estimulação das vias de detecção e condução da informação dolorosa da periférica até o sistema nervoso central (SNC) (BASBAUM *et al.*, 2009; JI; XU; GAO, 2014).

A dor é um dos sintomas mais comuns pelo qual os pacientes procuram atendimento médico (MELNIKOVA, 2010). De acordo com a Associação Internacional para Estudo da Dor (IASP, do inglês *International Association for the Study of Pain*), a dor pode ser definida como uma experiência sensitiva e emocional desagradável associada, ou semelhante àquela associada, a uma lesão tecidual real ou potencial. Esta definição busca fornecer uma caracterização universal da experiência humana de dor, demonstrando que a percepção da dor é um processo complexo e subjetivo, que envolve tanto um componente sensorial quanto emocional com quatro dimensões principais: sensorial-discriminatória; afetivo e emocional; cognitivo; e comportamental (LOESER; MELZACK, 1999).

O termo nocicepção, derivado do latim *noci* (dano ou injúria), corresponde ao componente sensorial utilizado para descrever a resposta neural a estímulos traumáticos ou nocivos. A nocicepção envolve quatro processos fisiológicos: transdução, transmissão, modulação e percepção. A transdução se refere ao processo pelo qual estímulos nocivos são transformados em sinais elétricos nas terminações nervosas sensoriais dos neurônios aferentes primários ou neurônios de primeira ordem, denominados nociceptores, disseminados por toda a pele, músculos, articulações e paredes dos órgãos (CALVINO; GRILO, 2006; ZAKY; ZAKY; ABD-ELSAYED, 2019).

Normalmente, a nocicepção e a percepção da dor são desencadeadas em situações de forças mecânicas e temperaturas extremas o suficiente para potencialmente ferir tecidos, assim como por substâncias tóxicas e mediadores inflamatórios, detectados pelos nociceptores (DUBIN; PATAPOUTIAN, 2010). A despolarização de membranas induzidas nos nociceptores por estimulação direta de agentes térmicos, químicos e mecânicos, além de moléculas liberadas no local da inflamação, provocam potenciais de ação que se propagam ao longo do axônio periférico e central até o sistema nervoso central (PETHŐ; REEH, 2012). Interessantemente, os nociceptores são ativados apenas quando as intensidades dos estímulos atingem a faixa nociva, sugerindo que eles possuem propriedades biofísicas e moleculares que os permitem detectar seletivamente e responder a estímulos potencialmente prejudiciais (BASBAUM *et al.*, 2009).

A ação de mediadores inflamatórios nos nociceptores é dependente de seus receptores específicos, que se enquadram em três categorias gerais: 1) receptores acoplados à proteína G (GPCR), como por exemplo os receptores da bradicinina B₁ e B₂; receptores ativados por protease PAR1-4 e receptor de histamina H₁; 2) receptores tirosina-quinase, exemplificado pelos receptores de fatores de crescimento TrkA e TrkB e 3) receptores ionotrópicos/canais de

íons, por exemplo os receptores purinérgicos P2X; canais iônicos sensíveis a ácido (ASICs) e canais receptores de potencial transitório (TRPs). Nos dois primeiros casos, a ativação dos receptores por seus respectivos ligantes desencadeia uma cascata de sinalização celular específica visando canais de íons, enquanto que no terceiro caso, os receptores são os próprios canais iônicos (LINLEY *et al.*, 2010).

Os sinais que codificam o estímulo nociceptivo trafegam ao longo das fibras aferentes primárias dos neurônios sensoriais até atingirem a medula espinhal. Existem duas classes principais de fibras sensoriais que transmitem estímulos nociceptivos: fibras C (não-mielinizadas) e fibras A δ (pouco mielinizadas), sendo ambas distintas das fibras A α e A β , que são mielinizados e respondem a estímulos mecânicos não nociceptivos (COUTAUX *et al.*, 2005; CALVINO; GRILO, 2006). As fibras A δ são de diâmetro intermediário (1-5 μ m), com velocidade de condução intermediária (4-30 m/s), responsáveis pela detecção da dor rápida e aguda. Já as fibras C são fibras de pequeno calibre (0,3-1,5 μ m), não mielinizadas e de velocidade de condução lenta (0,4-2 m/s), responsáveis pela detecção de dor lenta e difusa (COUTAUX *et al.*, 2005; BASBAUM *et al.*, 2009). As unidades que respondem a estímulos térmicos, mecânicos e químicos (polimodais) são o tipo de fibra C mais comumente observado (DUBIN; PATAPOUTIAN, 2010).

As fibras aferentes primárias alcançam a medula espinhal através das raízes dorsais dos nervos espinais, projetando seus axônios dentro do corno dorsal da medula espinhal, onde formam sinapses com neurônios de segunda ordem. O corno dorsal é organizado em lâminas, conforme características anatômicas e eletrofisiológicas distintas, que constituem as chamadas lâminas de Rexed. A maioria das fibras nociceptivas C projetam-se para neurônios de segunda ordem nas lâminas I, II e, em menor grau, na lâmina V. Em contraste, a sinapse nociceptiva das fibras A δ ocorre nas lâminas I, V e, em menor grau, na lâmina X (CALVINO; GRILO, 2006; ZAKY; ZAKY; ABD-ELSAAYED, 2019).

As primeiras cinco lâminas que compõem o corno dorsal constituem a principal via de comunicação entre o corno dorsal e o cérebro e representam o principal local de modulação da dor através de vias neuronais ascendentes e descendentes (ZAKY; ZAKY; ABD-ELSAAYED, 2019). Os neurônios de projeção do corno dorsal, projetam-se rostralmente e transmitem a resposta nociceptiva para a formação reticular do tronco cerebral e o tálamo. Entre as vias ascendentes que surgem do corno dorsal estão os tratos espinotalâmico e espino-reticulotalâmico, relevantes aos aspectos sensoriais discriminativos da experiência dolorosa (localização e intensidade do estímulo) e em situações de dores mal localizadas,

respectivamente, bem como a via espinoparabraquial-amígdala, que fornece acesso mais direto aos circuitos emocionais límbicos no cérebro via amígdala (BASBAUM; JESSELL, 2000).

Uma vez que a informação neuronal alcança o tronco cerebral e o tálamo, o estímulo é projetado às demais estruturas corticais. Os estudos de neuroimagem demonstram que não existe uma região específica do cérebro responsável pelo processamento da dor, em vez disso, identificou-se uma rede de estruturas somatossensorial, límbica e associativa provenientes de diversas vias nociceptivas. Algumas regiões mais associadas com as propriedades discriminativas sensoriais, como o córtex somatossensorial e outras com o aspecto emocional, como o córtex cingulado anterior e córtex insular (APKARIAN *et al.*, 2005; BASBAUM *et al.*, 2009).

Além das vias ascendentes, os neurônios do corno dorsal também participam de reflexos medulares polissinápticos segmentais (flexores ou reflexos de retirada), ativando grupos musculares que movem o corpo afastando-o do estímulo e, assim, protegendo o tecido de danificar-se. Esses reflexos são comumente avaliados como uma medida de dor percebida em testes comportamentais nociceptivos em modelos animais de dor (VELÁZQUEZ; MOHAMMAD; SWEITZER, 2007).

Uma característica importante dos nociceptores é sua capacidade de se manter sensibilizado por estimulação persistente ou por ação de mediadores químicos inflamatórios. Cerca de 10 a 20% das fibras C dos nociceptores são normalmente silenciosas, ou seja, não responsivas a estímulos nociceptivos agudos. Entretanto, durante a resposta inflamatória as mesmas sofrem ativação gradual, contribuindo ativamente para o desenvolvimento da hiperalgesia, um processo caracterizado como uma maior capacidade de resposta a estímulos nocivos (COUTAUX *et al.*, 2005; MCDOWELL, 2019).

A amplificação da resposta nociceptiva não é produzida apenas pelas substâncias liberadas no local da inflamação, mas também pelas fibras aferentes primárias sensibilizadas, fenômeno conhecido como inflamação neurogênica. As fibras aferentes primárias liberam periféricamente, em resposta à lesão do tecido, glutamato e os neuropeptídeos substância P e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP, do inglês *calcitonin gene-related peptide*) (BASBAUM *et al.*, 2009). A substância P causa extravasamento de plasma e o CGRP induz a vasodilatação via ativação de seus respectivos receptores nos vasos sanguíneos de pequeno calibre e arteríolas terminais. Tão importante quanto, esses neuropeptídeos se ligam às células vizinhas, desencadeando a liberação de mediadores inflamatórios e nociceptivos, contribuindo ainda mais para o aumento do processo inflamatório e da dor. Em um contexto clínico, a

inflamação neurogênica é implicada como um mecanismo patogênico relevante nas condições de dor aguda e crônica (COUTAUX *et al.*, 2005; OTTESTAD; ANGST, 2013).

Uma dor que persiste ou recorre por mais de três meses é considerada crônica (NICHOLAS *et al.*, 2019). A dor crônica é geralmente desencadeada por alterações na resposta fisiológica em condições como em uma lesão neural, trauma, amputação, infecção viral, inflamação, crescimento de tumor, exposição a neurotoxinas, doença autoimune, doenças vasculares, distúrbios metabólicos ou alterações relacionadas ao estresse (KUNER; FLOR, 2017). Uma estimativa populacional sobre a prevalência da dor crônica em 2016 entre adultos nos Estados Unidos da América demonstrou que 20,4% (50 milhões) da população adulta americana queixava-se de dor crônica e 8% (19,6 milhões) apresentava dor crônica de alto impacto, com considerável variação entre os subgrupos populacionais investigados (DAHLHAMER *et al.*, 2018). No Brasil, ao longo dos anos alguns estudos mapearam a manifestação de dor crônica na população adulta residente em regiões urbanas, encontrou-se 29% de prevalência na cidade de São Paulo em 2009 (DIAS *et al.*, 2009), 31% na cidade do Rio de Janeiro em 1998 (GUREJE *et al.*, 1998), 26% em Florianópolis no ano de 2015 (SANTOS *et al.*, 2015) e 40% em Salvador no ano de 2008 (SÁ *et al.*, 2008).

Existe uma preocupação crescente de saúde em todo o mundo a respeito dos acometimentos da dor crônica, estando em muitos casos relacionada a restrições de mobilidade e atividades diárias, dependência de opioides, ansiedade, depressão, comprometimento do sono, isolamento e percepção de saúde ruim ou qualidade reduzida de vida. Além disso, esses efeitos negativos não se restringem apenas ao indivíduo acometido, mas também englobam situações que comprometem as suas relações familiares e sociais (REID; ECCLESTON; PILLEMER, 2015; DAHLHAMER *et al.*, 2018).

De fato, a dor crônica é uma das principais causas de sofrimento humano no mundo, especialmente porque terapias eficazes, específicas e seguras ainda precisam ser desenvolvidas e estabelecidas. Um estudo epidemiológico europeu em 2006, realizado em quinze países e envolvendo 4.839 indivíduos diagnosticados com dores crônicas dentre 46.394 indivíduos pesquisados, identificou que 64% daqueles que tomavam medicamentos prescritos para o controle dos quadros dolorosos acreditavam que a sua medicação era inadequada, 48% das pessoas que sofriam de dor crônica não tomavam analgésicos, sendo que 14% interromperam o tratamento devido aos efeitos adversos dos medicamentos (BREIVIK *et al.*, 2006). Além disso, parece haver uma carência no preparo dos profissionais de saúde, visto que pesquisas

envolvendo a percepção dos pacientes revelaram que a maioria se sente subtratada por seus prestadores de cuidados primários (UPSHUR; BACIGALUPE; LUCKMANN, 2010).

O manejo farmacológico continua sendo a opção terapêutica mais importante para o alívio da dor crônica, incluindo principalmente o uso de fármacos anti-inflamatórios não esteroidais (AINE) e analgésicos opioides, e em menor grau observa-se a utilização de fármacos antidepressivos, anticonvulsivantes e AINE inibidores seletivos da enzima ciclo-oxigenase 2 (COX-2) (MELNIKOVA, 2010; GILRON; JENSEN; DICKENSON, 2013).

Os fármacos AINE são os medicamentos mais prescritos para o tratamento de dor leve a moderada, especialmente no contexto de condições inflamatórias, pois apresentam propriedades analgésicas e anti-inflamatórias eficazes, além de serem relativamente bem tolerados em terapias de curta duração. Entretanto, em tratamentos a longo prazo estes são frequentemente associados à uma série de efeitos colaterais, particularmente em relação ao trato gastrointestinal, o sistema cardiovascular e os rins (GROESCH; NIEDERBERGER; GEISSLINGER, 2017).

Em relação à prescrição de analgésicos opioides, apesar destes atuarem rapidamente na melhora de muitos tipos de quadros dolorosos agudos, os benefícios dos opioides quando prescritos para dor crônica são muito questionáveis (GATCHEL *et al.*, 2014). Comprovou-se que a efetividade dos opioides diminui à medida que seu uso persiste, podendo ocasionar o desenvolvimento da hiperalgesia induzida por opioides (BRUSH, 2012). Além dos fatores clínicos, os opioides atuam inibindo ou distorcendo a percepção da realidade e consciência, o que impulsionou a sua utilização como droga psicoativa. A generalização do seu consumo é responsável por uma epidemia de dependência e mortes por overdose de opioides, cujas estimativas são que entre os anos de 1999 a 2014, mais de 165.000 pessoas morreram de overdose relacionada a utilização de analgésicos opioides nos Estados Unidos (DOWELL; HAEGERICH; CHOU, 2016).

Deste modo, apesar da variedade de medicamentos analgésicos disponíveis, os resultados ainda são insatisfatórios. Observa-se que muitos pacientes não obtêm alívio suficiente da dor devido à ineficácia dos medicamentos ou à ocorrência de efeitos adversos graves, demonstrando claramente a necessidade de novos agentes com propriedades analgésicas e anti-inflamatórias.

2.2 *Ageratum conyzoides* L. ASTERACEAE

2.2.1 Aspectos botânicos e etnofarmacológicos

Ageratum, pertencente a tribo Eupatorieae, compreende a um restrito gênero de plantas que espalham-se com facilidade em grandes áreas de terrenos abandonados e terras aráveis, sendo reconhecidas como algumas das mais relevantes ervas daninhas em regiões de cultivo no mundo (SHARMA; SHARMA, 1995).

A espécie *Ageratum conyzoides* (Figuras 2 e 3) foi descrita primeiramente por Linnaeus em 1753, entretanto, outras sinonímias botânicas são referidas para esta espécie, como *Ageratum album* Willd. ex Steud.; *Ageratum arsenei* B.L. Rob.; *Ageratum ciliare* L.; *Ageratum conyzoides* var. *inaequipaleaceum* Hieron.; *Ageratum cordifolium* Roxb.; *Ageratum hirsutum* Poir.; *Ageratum hirtum* Lam.; *Ageratum humile* Salisb.; *Ageratum latifolium* Cav.; *Ageratum latifolium* var. *galapageium* B.L. Rob.; *Ageratum microcarpum* (Benth.) Hemsl.; *Ageratum pinetorum* (L.O. Williams) R.M. King & H. Rob.; *Ageratum suffruticosum* Regel; *Alomia microcarpa* (Benth.) B.L. Rob.; *Alomia pinetorum* L.O. Williams; *Cacalia mentrasto* Vell.; *Caelestina microcarpa* Benth.; *Carelia conyzoides* (L.) Kuntze; *Coelestina microcarpa* Benth. e *Eupatorium conyzoides* (L.) E.H.L. Krause (TROPICOS.ORG, 2019).

Figura 2 - Partes aéreas de *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae).



Fonte: A autora

Figura 3 - Partes aéreas de *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae).

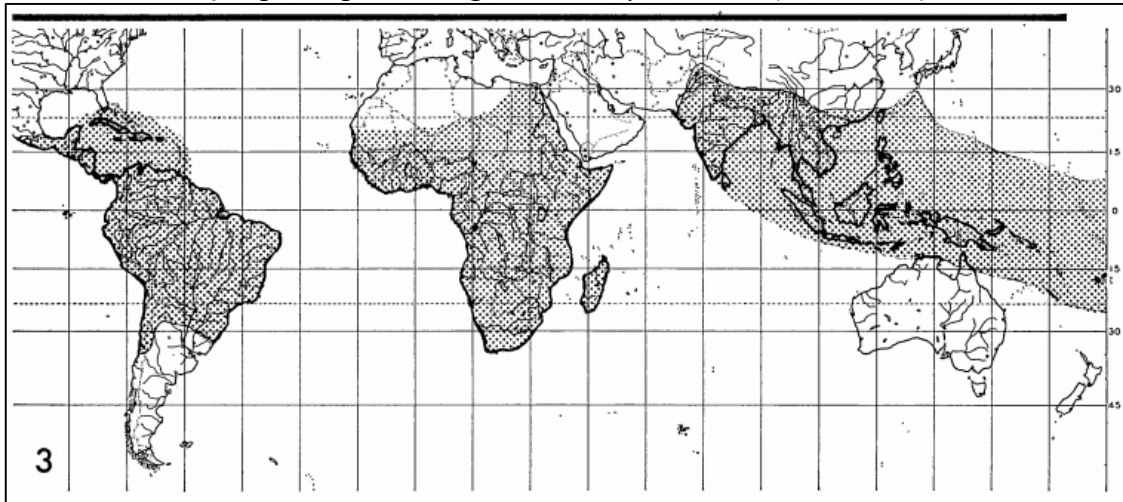


Fonte: A autora

A. conyzoides 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 que medem até 7,5 cm, e as flores são reunidas em pequenos capítulos de coloração branca a lilás (Figuras 2 e 3) (CABRERA; KLEIN, 1989). A planta cresce normalmente nas proximidades das habitações, podendo prosperar em qualquer solo de jardim, facilitando o seu desenvolvimento em locais abandonados e terrenos arruinados.

Em relação à sua distribuição geográfica, é considerada um planta pantropical, sendo comum encontrá-la na África, Ásia, América Central e do Sul, conforme ilustrado na Figura 4 (JOHNSON, 1971; OKUNADE, 2002).

Figura 4 - Distribuição pantropical de *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae).



Fonte: (JOHNSON, 1971)

Devido a sua ampla distribuição geográfica a espécie foi incorporada à medicina tradicional de regiões da África, Ásia e América do Sul, como alternativa 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 (GUMISIRIZA *et al.*, 2021). Na Índia e Vietnã é empregada para tratar leptospirose, doenças ginecológicas e caspa. Algumas indicações clínicas na Índia são citadas na *Ayurveda*, *Charaka Samhita* e *Sushruta Samhita*, livros da medicina tradicional indiana (SHEKHAR; ANJU, 2012). No Brasil a infusão da planta é usada internamente como anti-inflamatória, analgésica, antirreumática e no alívio de cólicas menstruais e intestinais, assim como utilizada topicamente como cicatrizante e anti-inflamatória (CRUZ, 1995; GUPTA, 1995; OKUNADE, 2002).

Além destas, na América do Sul costuma ser altamente valorizada como terapia no tratamento de hemorragias não-menstruais e no alívio de dores estomacais na Venezuela e Colômbia. Em Bornéu, as folhas de *A. conyzoides* são aplicadas externamente em feridas na pele causadas pela mordida de cachorros ou crocodilos (JOHNSON, 1971).

Outras indicações populares incluem: antipruriginoso; desinfetante bucal; antitussígeno; vermífugo; tônico; no combate a pediculose; dores de cabeça; micoses; febre tifoide; antifídico; antimalária; antitétano; prolapso do ânus; infecção de garganta; abscesso e leucorreia (YADAV *et al.*, 2019b). Além disso, as folhas são aplicadas em cortes e feridas como agente anti-inflamatório, hemostático e bactericida (KAMBOJ; SALUJA, 2011)

Em consequência de sua ampla distribuição, a espécie recebe numerosas denominações populares. No Brasil, costuma ser reconhecida como “mentrasto”, “erva-de-são-joão”, “maria-preta”, “picão-branco”, “picão-roxo”, “erva-de-santa-luzia”, “camará-opela”, entre outras denominações (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002). Em El Salvador e Argentina, denomina-se “erva-de-cachorro” ou “erva-do-Zorro”, devido ao odor desagradável da planta (JOHNSON, 1971). Na Austrália, a espécie é popularmente conhecida como “*goat weed*” ou “catinga-de-bode”, devido ao seu odor peculiar, comparado ao de um bode (YADAV *et al.*, 2019b).

2.2.2 Aspectos farmacológicos: dor e inflamação

Em virtude da variedade de indicações na medicina popular para o alívio de processos inflamatórios e dolorosos, grande parte dos estudos farmacológicos desenvolvidos procuraram investigar estas propriedades na espécie *A. conyzoides*. Neste sentido, diversos estudos avaliaram o efeito anti-inflamatório de extratos obtidos das folhas de *A. conyzoides* utilizando o modelo de edema de pata induzido pela aplicação de carragenina (GALATI *et al.*, 2001; HASSAN *et al.*, 2012; RAHMAN *et al.*, 2012; AWAD *et al.*, 2013; CORREA *et al.*, 2015).

Galati e colaboradores (2001) verificaram a inibição significativa da formação do edema de pata após três horas da administração intraperitoneal do extrato metanólico e de uma fração de flavonoides de *A. conyzoides*, na dose de 500 mg/kg quando comparados ao grupo controle. Hassan e colaboradores (2012) demonstraram a inibição significativa da formação do edema de pata após 5 horas da administração por via oral do extrato hidroetanólico (80% de etanol) nas doses 200 e 400 mg/kg, com inibições de 40% e 59%, respectivamente. Rahman e colaboradores (2012) constataram a diminuição significativa de 50% da formação do edema após 4h 30 min da administração por via oral de um extrato etanólico na dose de 1500 mg/kg. Awad e colaboradores (2013) observaram a diminuição significativa de 87% da formação do edema de pata após 5 horas da administração por via oral do extrato hidroetanólico (70% de etanol) na dose de 250 mg/kg. Corrêa e colaboradores (2015) demonstraram que a dose de 300 mg/kg dos extratos hidrometanólico (50% de metanol), metanólico e etanólico da planta inteira foi capaz de inibir a formação de edema de pata entre 65-76%.

De Mello e colaboradores (2016) investigaram o potencial anti-inflamatório de extratos, frações e substâncias isoladas de *A. conyzoides* utilizando o modelo de pleurisia induzida por carragenina. Os resultados obtidos demonstraram redução significativa da contagem de leucócitos, do infiltrado de neutrófilos e diminuição da concentração de proteínas no exsudato

após o tratamento intraperitoneal prévio com os extratos, frações e substâncias isoladas nas diferentes doses testadas, além de redução da concentração de alguns marcadores inflamatórios, como mieloperoxidase, adenosina desaminase e nitrito/nitrato (NO_x) e mediadores pró-inflamatórios, como interleucinas 17A (IL-17A) e 6 (IL-6), TNF e interferon gama (IFN- γ) e aumento dos níveis de IL-10, o mediador anti-inflamatório mais importante encontrado na resposta imune. Os autores sugerem que *A. conyzoides* não age apenas inibindo o influxo de neutrófilos no local inflamatório, como também atua diminuindo a ativação dos neutrófilos.

Moura e colaboradores (2005) avaliaram a atividade anti-inflamatória do extrato hidroetanólico (70% de etanol) obtido das folhas de *A. conyzoides* na dose de 250 mg/kg, pela via oral, nos 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 danos às mucosas gástricas relacionados ao tratamento.

Além destes, o efeito anti-inflamatório da espécie também foi investigado por meio da sua aplicação tópica. Andissa e colaboradores (2015) aplicaram o extrato aquoso das folhas em doses entre 2-8 g/kg, utilizando como veículo vaselina, o qual demonstrou atividade nos modelos 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. Adicionalmente, demonstrou-se a atividade anti-inflamatória tópica, no modelo de edema de orelha induzido pela aplicação tópica de óleo de cróton, dos extratos hidrometanólico (50% de metanol), metanólico e etanólico da planta inteira incorporados em cremes contendo 1%, 3% 5% de cada um dos extratos, demonstrando inibições entre 56-77% da formação de edema após 6 horas da indução da inflamação (CORREA *et al.*, 2015).

A atividade anti-inflamatória do extrato hidroetanólico (95% de etanol) foi avaliada no tratamento da doença inflamatória intestinal utilizando o modelo de indução da doença por indometacina e ácido acético, na qual o extrato foi administrado por via oral nas doses de 500 mg/kg e 750 mg/kg, durante dez dias. Os resultados demonstram diminuição da largura das úlceras, diminuição da atividade das mieloperoxidases e lipoperoxidase e redução da inflamação, além de diminuição da infiltração celular, descamação e danos nas vilosidades intestinais nos achados histológicos (BIRADAR *et al.*, 2011).

Em relação ao potencial analgésico de *A. conyzoides*, a atividade antinociceptiva do extrato hidroetanólico (70% de etanol) das folhas, nas doses de 30 mg/kg e 50 mg/kg por via

intraperitoneal e 90 mg/kg e 150 mg/kg por via oral, foi constatada no modelo de incapacidade articular induzida por aplicação de carragenina no joelho de ratos. Neste modelo, a administração intra-articular de carragenina causa a incapacitação dos animais, atingindo um máximo entre 3 a 4 horas. Durante esse período os animais são forçados a andar em um cilindro metálico rotativo durante 60 segundos e é avaliado o período que a pata traseira dos animais não toca a superfície do cilindro, sendo o tempo de elevação da pata indicativo de nocicepção. O tratamento com o extrato por via intraperitoneal (30 e 50 mg/kg) e oral (90 e 150 mg/kg) reduziu significativamente o tempo de elevação da pata após 3 horas da administração de carragenina, com inibições da resposta nociceptiva entre 28-45%. Este efeito não foi revertido por antagonistas opioides, sugerindo que a atividade exibida seja independente de receptores opioides. Adicionalmente, verificou-se a 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 (MAGALHÃES *et al.*, 1997).

Em adição, avaliou-se o potencial antinociceptivo dos extratos hidroetanólico (80% de etanol) e etanólico, obtido das folhas da espécie, utilizando o modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético (RAHMAN *et al.*, 2012; HOSSAIN *et al.*, 2013). Os extratos testados nos diferentes trabalhos exibiram uma atividade antinociceptiva dose dependente com inibição das contorções entre 25-45%, entretanto a inibição da resposta nociceptiva não foi superior ao fármaco diclofenaco de sódio (40 mg/kg), utilizado como controle positivo nos ensaios.

A respeito do mecanismo de ação proposto para a atividade anti-inflamatória, Salim e colaboradores (2014) demonstraram que o extrato metanólico das folhas possui a capacidade de inibir a liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 α , IL-1 β e IL-6 de células mononucleares, quando avaliado em modelo *in vitro* na dose de 5 μ g/mL. Paralelamente, Sampson e colaboradores (2000) sugerem seletividade ao receptor de bradicinina B₂, implicado na mediação de dor.

Adicionalmente, buscando investigar as bases científicas para a indicação popular de *A. conyzoides* no alívio de cólicas intestinais e menstruais, Silva e colaboradores (2000) sugerem o efeito antiespasmódico do extrato hidroetanólico (70% de etanol) de *A. conyzoides* no relaxamento e inibição a contração muscular induzida por agonistas na musculatura lisa em úteros e duodeno de ratos (*ex vivo*) incubados com o extrato nas doses de 0,2 e 0,4 mg/mL.

Além dos estudos pré-clínicos desenvolvidos, um estudo clínico desenvolvido por Marques-Neto e colaboradores (1988) objetivou avaliar o efeito do extrato aquoso (chá) de *A. conyzoides* no alívio da dor em pacientes com diagnóstico de artrose. O estudo clínico desenvolvido apresenta várias limitações metodológicas, entretanto, os resultados demonstraram diminuição da intensidade da dor em 66% dos pacientes e consequente melhora da 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.

2.2.3 Aspectos fitoquímicos

Estudos fitoquímicos com a espécie resultaram no isolamento de uma rica variedade de constituintes químicos, divididos entre as classes de metabólitos: cromenos, cromonas, benzofuranos, cumarinas, terpenos, alcaloides pirrolizidínicos, esteroides e flavonoides.

Entre as substâncias encontradas no óleo essencial de *A. conyzoides*, os cromenos precoceno I (3) e precoceno II (4) parecem ser majoritários, entretanto outros cromenos foram identificados: encecalina (5); 6-vinil-7-metoxi-2,2-dimetilcromeno (6); dihidroencecalina (7); dihidrodemetoxiencecalina (8); demetoxiencecalina (9); demetilencecalina (10) e 2-(1'-oxo-2'-metilpropil-2-metil-6,7-dimetoxicromeno (11) (EKUNDAYO; LAAKSO; HILTUNEN, 1988; DÛNG *et al.*, 1989; PARI *et al.*, 1998; PATIL *et al.*, 2010). Também foram identificados o benzofurano 2-(2'-metiletil)-5,6-dimetoxibenzofurano (12), a cromona 3-(2'-metilpropil)-2-metil-6,8-dimetoxi-crom-4-ona (13) e a cromanona 2-(2'-metilprop-2'-enil)-2-metil-6,7-dimetoxi-croman-4-ona (14) (Figura 5) (PARI *et al.*, 1998).

Adicionalmente às substâncias relatadas no óleo essencial, foram identificados outros cromenos no extrato de *n*-hexano obtidos das partes aéreas desta espécie, 6-(1'-metoxietil)-7-metoxi-2,2-dimetilcromeno (15); 6-(1'-hidroxietil)-7-metoxi-2,2-dimetilcromeno (encecalol) (16); 6-(1'-etoxietil)-7-metoxi-2,2-dimetilcromeno (17); 6-angeloiloxi-7-metoxi-2,2-dimetilcromeno (18) e a mistura de encecanescinas (19-21) (Figura 6) (GONZÁLEZ *et al.*, 1991a).

Figura 5 - Cromenos, benzofuranos, cromona e cromonona identificados no óleo essencial de *A. conyzoides*.

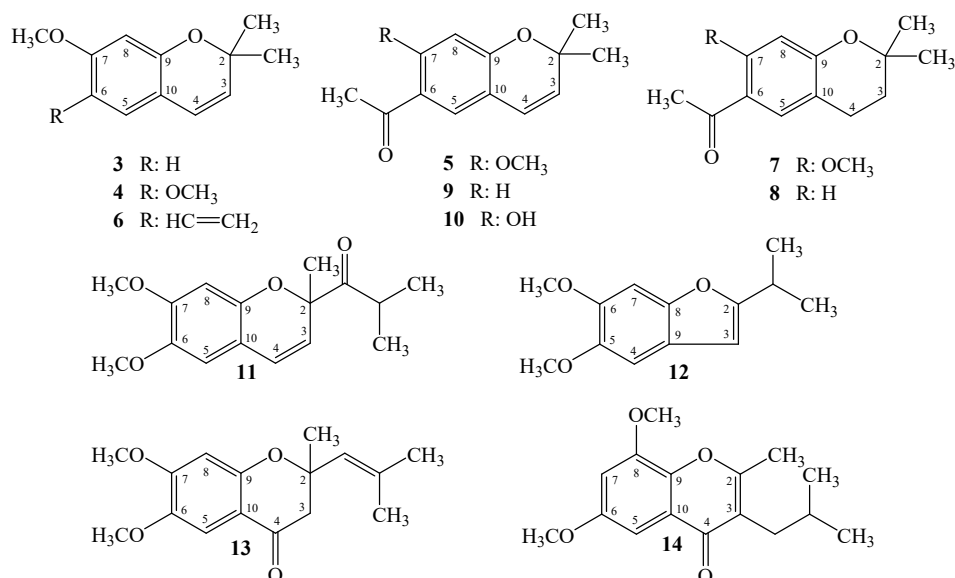
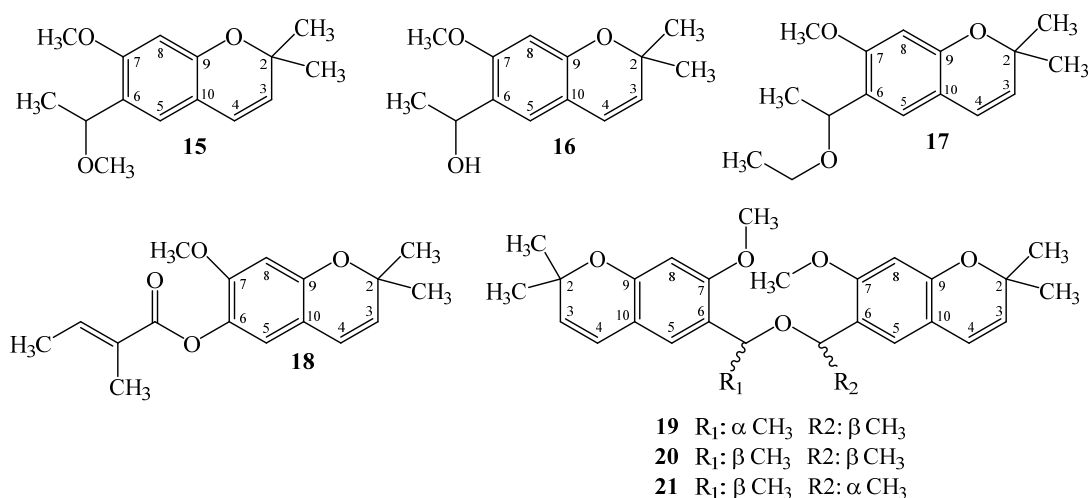


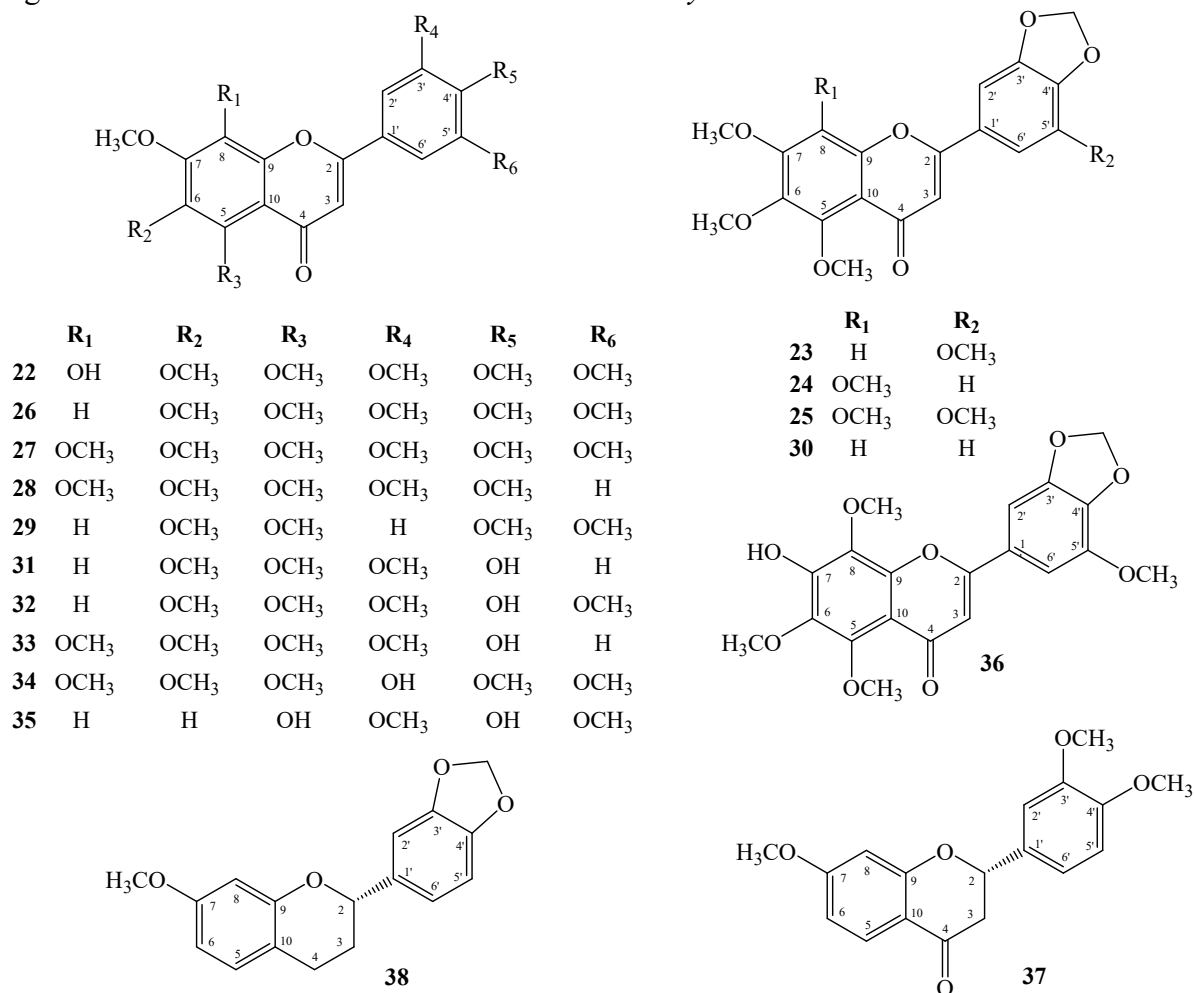
Figura 6 - Cromenos identificados no extrato de n-hexano de *A. conyzoides*.



Diversos estudos apontam a presença de flavonoides nesta espécie, incluindo um restrito grupo de produtos naturais conhecido como polimetoxiflavonas (PMF). Entre as PMF reportadas para *A. conyzoides* estão: 8-hidroxi-5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavona (**22**); 5,6,7,5'-tetrametoxi-3',4'-metilenodioxiflavona (**23**); 5,6,7,8- tetrametoxi-3',4'-metilenodioxiflavona (linderoflavona B) (**24**); 5,6,7,8,5'-pentametoxi-3',4'-metilenodioxiflavona (eupalestina) (**25**); 5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavona (**26**); 5,6,7,8,3',4',5'- heptametoxiflavona (5'-MeONB) (**27**); 5,6,7,8,3',4'-hexametoxiflavona (nobiletina) (**28**); 5,6,7,3',4'-pentametoxiflavona

(sinensetina) **(29)** (GONZÁLEZ *et al.*, 1991b); 5,6,7-trimetoxi-3',4'-metilenodioxiflavona (ageconiflavona A) **(30)**; 4'-hidroxi-5,6,7,3'-tetrametoxiflavona (ageconiflavona B) **(31)**; 4'-hidroxi-5,6,7,3',5'-pentametoxiflavona (ageconiflavona C) **(32)**; 4'-hidroxi-5,6,7,8,3'-pentametoxiflavona **(33)** (VYAS; MULCHANDANI, 1986); 3'-hidroxi-5,6,7,8,4',5'-hexametoxiflavona **(34)** (BOSI *et al.*, 2013); 5,4'-dihidroxi-7,3',5'-trimetoxiflavona **(35)** (HUSSIEN *et al.*, 2010); 7-hidroxi-5,6,8,5'-tetrametoxi-3',4'-metilenodioxiflavona **(36)** (FAQUETI; SANDJO; BIAVATTI, 2017); (2S)-7,3',4'-trimetoxiflavanona **(37)** e (2S)-7-metoxi-3',4'-metilenodioxiflavona **(38)** (Figura 7) (MUNIKISHORE *et al.*, 2013).

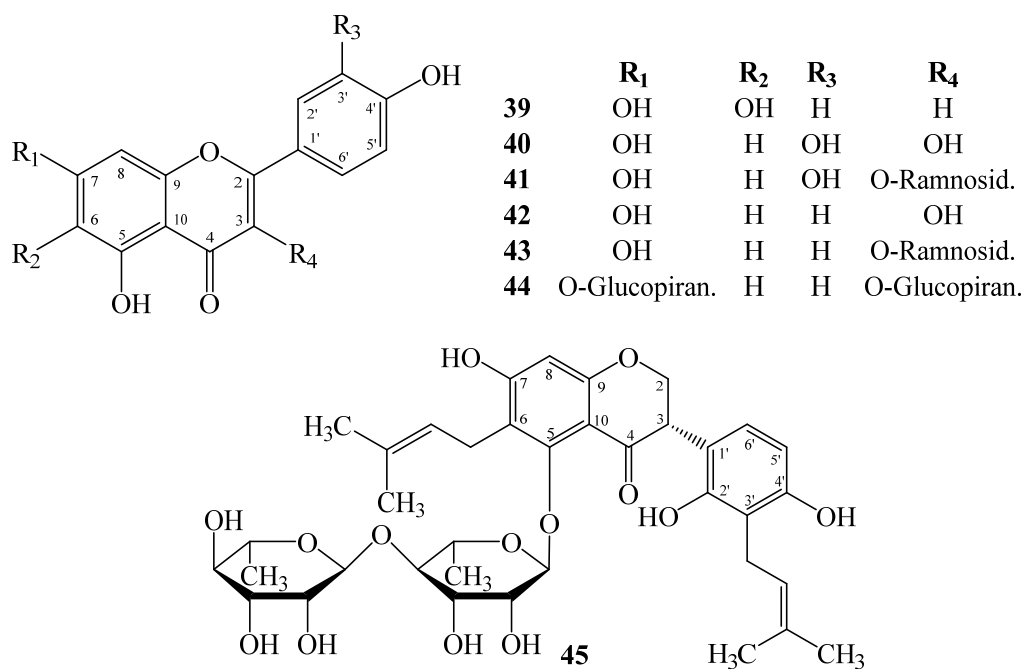
Figura 7 - Polimetoxiflavonas identificadas em *A. conyzoides*.



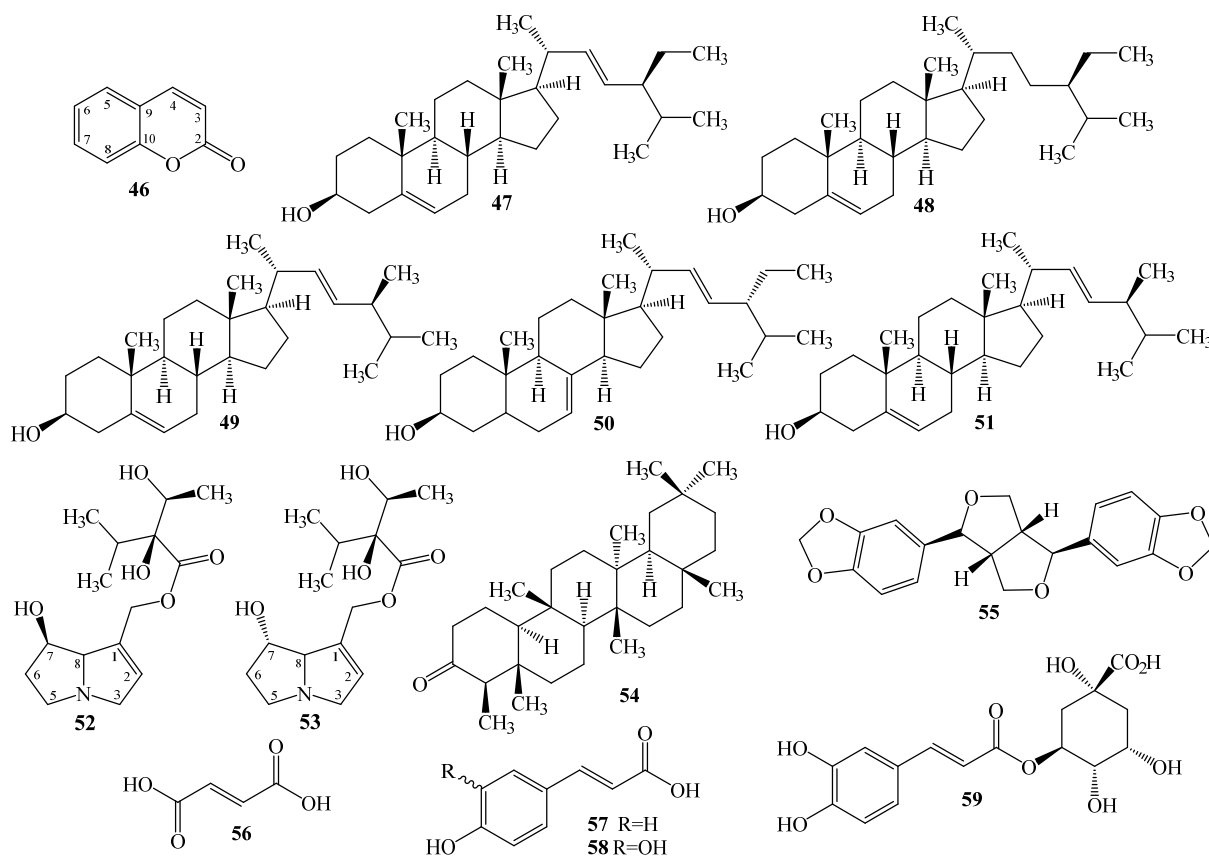
Além das PMF mencionadas, foram identificados flavonoides hidroxilados em *A. conyzoides*, são estes: escutelareina **(39)**; quercetina **(40)**; quercetina-3-ramnopiranosídeo **(41)**; canferol **(42)**, canferol-3-ramnopiranosídeo **(43)**; canferol 3,7-diglicopiranosídeo **(44)** e

5,7,2',4'-tetrahidroxi-6,3'-di-(3,3-dimetilalil)- isoflavona 5-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)- α -L-ramnopiranosídeo (**45**) (Figura 8) (YADAVA; KUMAR, 1999; OKUNADE, 2002).

Figura 8 - Flavonoides hidroxilados identificados em *A. conyzoides*.



Referente a outras classes de metabólitos secundários, é reportado para a espécie o isolamento da cumarina 1,2-benzopirano (**46**) (VERA, 1993), os esteroides estigmasterol (**47**), β -sitoesterol (**48**) (KAMBOJ; SALUJA, 2011), brassicasterol (**49**) (WIEDENFELD; RODER, 1991), espinasterol (**50**) (VERA, 1993) e dihidrobrassicasterol (**51**) (PARI *et al.*, 2000), os alcaloides licopsamina (**52**) e equinatina (**53**), juntamente com os seus derivados oxidados (WIEDENFELD; RODER, 1991; BOSI *et al.*, 2013), o triterpeno friedelina (**54**) (KASTURI; MANITHOMAS, 1967), a lignana (+)-sesamina (**55**) (SUR *et al.*, 1997) e os ácidos fumárico (**56**), cafeico (**57**) (NAIR; KOTIYAL; SUBRAMANIAN, 1977) cumárico (**58**) e clorogênico (**59**) (FAQUETI; SANDJO; BIAVATTI, 2017) (Figura 9).

Figura 9 - Outras classes de metabólitos identificados em *A. conyzoides*.

2.2.4 Aspectos toxicológicos

Apesar do potencial biológico verificado nos extratos obtidos de *A. conyzoides*, a identificação de substâncias tóxicas na sua composição química despertou o alerta da comunidade acadêmica a respeito da toxicidade desta espécie. Entre as substâncias tóxicas identificadas na espécie pode-se citar os alcaloides pirrolizidínicos (**52-53**), conhecidos pelas propriedades hepatotóxicas, carcinogênicas, genotóxicas, teratogênicas e em alguns casos pneumotóxicas (CHEN; MEI; FU, 2010; WIEDENFELD, 2011). O envenenamento pela ingestão de alcaloides pirrolizidínicos em humanos é dose-dependente e pode ocorrer de forma aguda ou crônica, podendo ser progressivo de forma a finalmente resultar em efeitos tóxicos crônicos irreversíveis, como por exemplo a manifestação da doença veno-oclusiva hepática (CHEN; HUO, 2010; WIEDENFELD; EDGAR, 2011).

Adicionalmente, o isolamento da substância cumarina 1,2-benzopirano (**46**) na espécie reforça a preocupação quanto ao risco de intoxicação, visto que o consumo de altas doses de cumarina por via oral estão associados à toxicidade hepática em roedores. Ensaios

crônicos relataram tumores no fígado de ratos e camundongos e tumores de pulmão em camundongos após a administração oral da substância, levantando preocupações quanto à segurança da cumarina (FELTER *et al.*, 2006). O seu uso como aditivo alimentar foi proibido pela agência regulatória americana em 1954, com base em relatos de hepatotoxicidade em ratos. Além disso, o instituto federal alemão para avaliação de riscos (BfR) estabeleceu um valor limite de ingestão diária tolerável de 0,1 mg de cumarina por kg de peso corporal (BFR, 2006; IWATA *et al.*, 2016).

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 (ALT). Da mesma forma, no estudo realizado por Diallo e colaboradores (2010) a administração diária, durante 28 dias, pela via oral de 500 e 1000 mg/kg do extrato hidroetanólico (90% de etanol) das folhas de *A. conyzoides* não demonstrou diferença significativa no peso corporal e dos órgãos dos ratos tratados com o extrato, exceto para o fígado, onde houve um aumento significativo em ratos que receberam a dose de 1000 mg/kg.

Entretanto, hepatotoxicidade e outros achados toxicológicos significativos foram demonstrados na avaliação toxicológica realizada em um período de 90 dias em roedores que receberam o extrato hidroetanólico (90% de etanol) de *A. conyzoides* (DIALLO *et al.*, 2014). Após o período de tratamento do ensaio detectou-se, no grupo de animais tratado com 1000 mg/kg de extrato, o aumento significativo do peso do fígado, baço e rins, assim como diminuição das concentrações sérica de hemoglobina, hematócrito e contagem total de hemácias; aumento do número de plaquetas; aumento da concentração sérica de ALT, aspartato transaminase (AST) e fosfatase alcalina e aumento da glicemia. No grupo de animais tratados por 90 dias com 500 mg/kg de extrato observou-se o aumento das concentrações séricas de alanina transaminase e glicose.

Alterações toxicológicas relevantes também foram encontradas a um estudo de toxicidade oral, na qual foram administradas durante 14 dias, por via oral, as doses de 500, 1000 e 1500 mg/kg do extrato hidroetanólico (95% de etanol) das folhas de *A. conyzoides*. Foram detectadas diminuições dos níveis séricos de AST, lactato desidrogenase e creatina quinase nos grupos tratados com 1000 e 1500 mg/kg do extrato, além de elevação significativa na contagem de leucócitos, volume plaquetário médio e da amplitude de distribuição das plaquetas.

Adicionalmente, os estudos histopatológicos indicaram vários graus de necrose hepatocelular em todos os grupos tratados, acompanhados por aumentos significativos no peso do fígado e do baço (ADEBAYO *et al.*, 2010).

Interessantemente, no estudo desenvolvido por Palmer e colaboradores (2019) foram investigados os efeitos tóxicos de um extrato hidroetanólico (90% de etanol) das partes aéreas de *A. conyzoides* livre de alcaloides, na qual os mesmos foram removidos por precipitação a temperatura ambiente. A administração oral, durante 90 dias, das doses de 1000 e 2000 mg/kg desse extrato, demonstrou apenas um aumento no peso médio do fígado de ratos machos, entretanto essa diferença não ocorreu em fêmeas, e não refletiu em aumento dos níveis séricos dos marcadores hepáticos AST, ALT e fosfatase alcalina. Além disso, nenhuma evidência morfológica de danos agudos ou subagudos foram encontradas durante a avaliação histopatológica dos órgãos investigados. Os resultados dos testes de genotoxicidade não mostraram evidência de mutagenicidade, clastogenicidade ou toxicidade genética *in vivo*. Estes resultados indicam que os efeitos tóxicos relatados para *A. conyzoides* podem ser dependentes dos alcaloides presentes na planta.

Os resultados dos ensaios toxicológicos realizados até o momento com a espécie demonstraram que o efeito tóxico parece ser cumulativo pela via oral, necessitando de administrações prolongadas em altas doses do extrato. Além disso, as primeiras manifestações estão relacionadas a alterações hepáticas, fortemente relacionadas aos efeitos tóxicos já demonstrados pelos alcaloides pirrolizidínicos e a cumarina, fornecendo subsídios para dissuadir a utilização de preparações medicinais contendo o extrato bruto de *A. conyzoides*.

2.3 POLIMETOXIFLAVONAS

As polimetoxiflavonas (PMF) são um subtipo de flavonoide, que contêm dois ou mais substituintes metoxi (OCH₃) ligados ao esqueleto base dos flavonoides (Figura 10) (LI *et al.*, 2009). São relatadas diferentes atividades biológicas para esta classe de substâncias, incluindo principalmente as propriedades anti-inflamatória (HO *et al.*, 2012) e anticarcinogênica (WANG *et al.*, 2014).

Especificamente a respeito das propriedades anti-inflamatórias desta classe de metabólitos, são encontrados diversos estudos na literatura demonstrando o seu potencial biológico. Kim e colaboradores (2014) indicaram que a substância 5-hidroxi-3,6,7,8,3',4'-hexametoxiflavona (**60**) (Figura 11) em cultura de macrófagos é capaz de reduzir

significativamente a produção de PGE2, óxido nítrico e de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-1 β , bem como regular a produção das enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e ciclooxigenase-2 (COX-2).

Figura 10 - Esqueleto base dos flavonoides

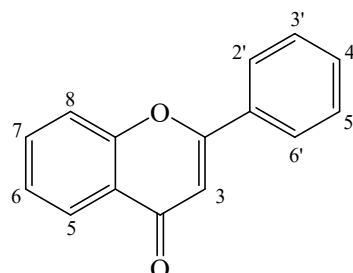
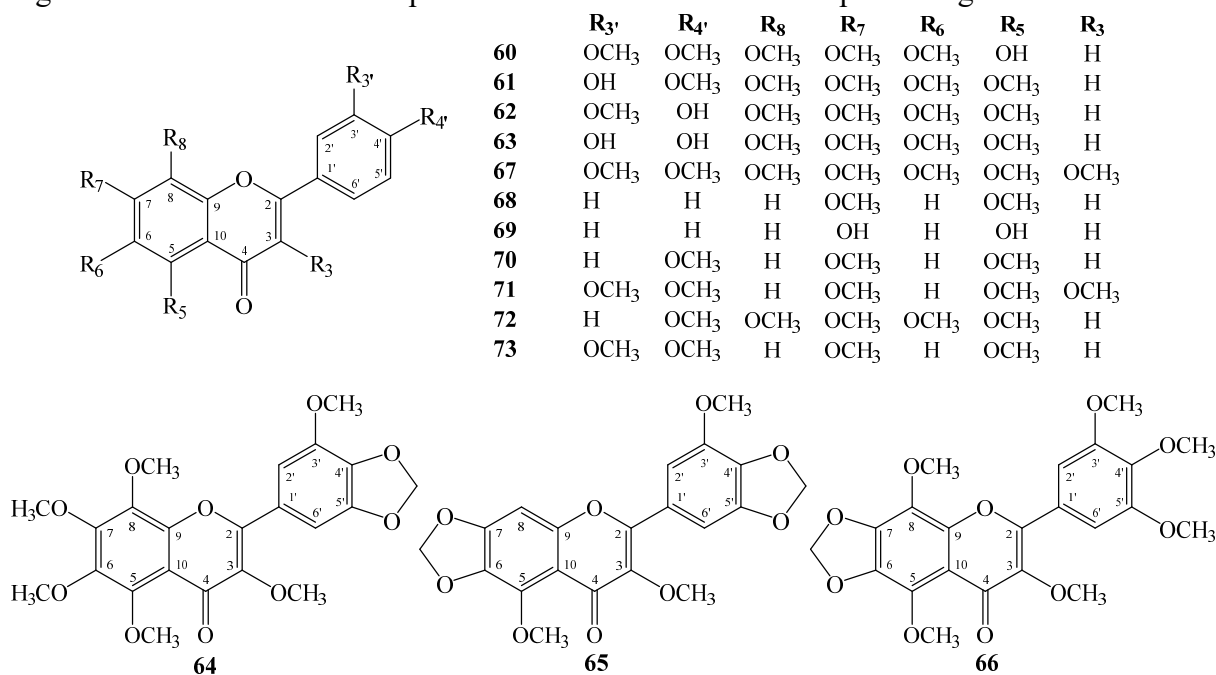


Figura 11 - Estrutura de outras polimetoxiflavonas isoladas de espécies vegetais



A substância nobiletina (**28**), identificada na espécie *A. conyzoides* e também em espécies do gênero *Citrus*, vem demonstrando um potencial anti-inflamatório para doenças articulares. Ishiwa e colaboradores (2000) observaram que essa substância reduz efetivamente a produção da enzima proteolítica pró-matriz metaloproteinases-9 (proMMP-9), assim como suprimiu a produção de PGE2 induzida por IL-1 em células sinoviais de coelho e condrócitos articulares. Posteriormente, Lin e colaboradores (2003) demonstraram que a nobiletina também inibe a produção e gene expressão de proMMP-1 e pro-MMP-3 em células sinoviais humanas,

assim como regula negativamente a expressão de mRNA de COX-2, diferente de COX-1 e a gene expressão das citocinas pró-inflamatórias IL-1 α , IL-1 β , IL-6, e TNF- α em macrófagos.

Em relação aos estudos *in vivo* desenvolvidos que investigaram o efeito anti-inflamatório da nobiletina, Imada e colaboradores (2008) observaram que a administração intraperitoneal diária (15-60 mg/kg), durante três semanas, em camundongos no modelo de artrite induzida por colágeno demonstrou que a incidência de artrite foi significativamente reduzida em todos os grupos de animais tratados com nobiletina, com diminuição da infiltração celular e erosão óssea e da cartilagem. /Os autores também demonstraram que o tratamento efetivamente interferiu na expressão das enzimas agreganase-1 e agreganase-2 nos tecidos articulares dos animais, que juntamente com as enzimas proMMP-1, proMMP-3 e proMMP-9 estão envolvidas na destruição da matriz de componentes em tecidos conjuntivos em condições patológicas como artrite reumatoide e osteoartrite (IMADA *et al.*, 2008). Utilizando o mesmo modelo de artrite induzida por colágeno, os resultados obtidos por Yang e colaboradores (2017) revelaram proteção eficaz para a formação de edema e angiogênese do tecido sinovial, além da diminuição de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , CCL2/MCP-1, IL-6 e TNF- α no tecido após o tratamento diário com nobiletina pela via oral (100-400 mg/kg) durante 21 dias.

Além destes, a nobiletina também demonstrou potencial de atuar a nível ósseo inibindo a formação de osteoclastos e a reabsorção óssea induzida por IL-1 *in vitro* (HARADA *et al.*, 2011). Em experimentos *in vivo*, o tratamento com nobiletina (0,25 mg/dia durante quatro semanas) suprimiu a redução da densidade mineral óssea total em 61% de camundongos ovariectomizados (MURAKAMI *et al.*, 2007).

Os efeitos anti-inflamatórios tópicos da nobiletina foram avaliados por Murakami e colaboradores (2000) utilizando o modelo de inflamação cutânea em camundongos induzida por éster de forbol em um protocolo de duplo tratamento. Os autores relatam que o tratamento tópico com nobiletina inibiu significativamente os parâmetros de edema, espessura epidérmica e contagem de leucócitos infiltrados, além dos achados histológicos relacionados ao dano oxidativo e à inflamação. Adicionalmente, parece haver um efeito aditivo na reaplicação de nobiletina.

O potencial antialérgico da nobiletina também foi verificado utilizando os modelos de inflamação eosinofílica das vias aéreas de ratos asmáticos e prurido induzido por histamina. Wu e colaboradores (2006) utilizando o modelo de asma alérgica induzida por ovalbumina, demonstraram que o tratamento prévio com nobiletina (1,5 e 5 mg/kg, intraperitoneal) durante uma semana reduz significativamente os achados histopatológicos característicos da resposta

inflamatória, além do número de eosinófilos no sangue e no lavado bronco alveolar. Os autores sugerem que a nobiletina exerce seus efeitos benéficos na inflamação asmática reduzindo o nível de eotaxina, uma quimiocina envolvida no recrutamento de eosinófilos na resposta asmática (YING, 2000), assim como, aumentando o índice de apoptose de eosinófilos pelo aumento da expressão de Fas, um receptor expressado em eosinófilos que quando ativado por FasL leva à morte apoptótica (NAGATA; GOLSTEIN, 1995). Do mesmo modo, Jang e colaboradores (2013) demonstraram os efeitos da administração oral de nobiletina (25 mg/kg) em inibir 71% o comportamento de coçar induzido pela aplicação subcutânea de histamina em camundongos. Os autores também observaram que o tratamento prévio com nobiletina inibiu significativamente em 45% a permeabilidade vascular induzida pela histamina, assim como inibiu em 84% e 94% a expressão de IL-4 e TNF- α na pele dos animais, respectivamente.

Adicionalmente aos efeitos anti-inflamatórios reportados para a nobiletina, verificou-se que os seus produtos de metabolismo hepático, as substâncias 3'-demetilnobiletina (**61**), 4'-demetilnobiletina (**62**) e 3',4'-didemetilnobiletina (**63**), apresentam maior eficácia na inibição da liberação de óxido nítrico e expressão de iNOS e COX-2, em macrófagos murinos, que a própria nobiletina (LI *et al.*, 2007). Sendo o mesmo observado na investigação do efeito anti-inflamatório da nobiletina e do seu metabólito 4'-demetilnobiletina em modelo carcinogênese no cólon de camundongos (WU *et al.*, 2015).

De Mello e colaboradores (2016) também demonstraram o efeito anti-inflamatório *in vivo* das substâncias 5'-MeONB (**27**) e eupalestina (**25**) (2,5-10 mg/kg, intraperitoneal), isoladas da espécie *A. conyzoides*, no modelo de pleurisia induzida por carragenina, reduzindo a contagem de leucócitos, o influxo de neutrófilos e concentração de proteína do exsudato, bem como níveis reduzidos de vários mediadores pró-inflamatórios. Os autores também demonstraram o efeito dessas substâncias na inibição da subunidade p65 fosforilada do fator de transcrição Kappa B (p-p65 NF- κ B) e proteína quinase ativada por mitógeno p38 (p-p38 MAPK), responsável pela regulação da expressão de muitos marcadores envolvidos na inflamação, como enzimas induzíveis, quimiocinas e citocinas, sugerindo a regulação negativa de p-p65 NF- κ B e p-p38 MAPK como o possível mecanismo de ação anti-inflamatório.

Além dos estudos de atividade anti-inflamatória, demonstrou-se a atividade antinociceptiva das substâncias 3,3',5,6,7,8-hexametoxi-4',5'-metilenodioxiflavona (**64**), 6,7,4',5'-dimetilenodioxi-3,5,3'-trimetoxiflavona (**65**), 3,3',4',5,5',8-hexametoxi-6,7-metilenodioxiflavona (**66**), isoladas da espécie *Nicotiana plumbaginifolia*, em diferentes modelos de dor nociceptiva e inflamatória (SHAJIB *et al.*, 2018). Os ensaios demonstraram que

as substâncias, administradas pela via oral nas doses de 12,5 e 25 mg/kg, atuam inibindo a dor por meio de receptores opioides e canais de K^+ sensíveis ao ATP, bem como suprimindo a liberação de mediadores inflamatórios como prostaglandinas, COX e lipo-oxigenases (LOX). Adicionalmente, os resultados fornecidos pelos autores sugerem que a presença do anel metilendioxi potencializa o efeito antinociceptivo, visto que a substância 6,7,4',5'-dimetilendioxi-3,5,3'-trimetoxiflavona que apresenta duplamente essa substituição apresentou os melhores resultados.

O efeito antinociceptivo mediado por receptores opioides também é reportado para outras mono (THIRUGNANASAMBANTHAM *et al.*, 1993), dimetoxi (PANDURANGAN *et al.*, 2014) e trimetoxiflavonas (NADIPELLY *et al.*, 2016). O estudo de relação estrutura atividade desenvolvido por Thirugnanasambanthan e colaboradores (1993) indica que a presença da metoxila nas posições 5 e 7 do anel A da flavona possivelmente induz a analgesia mediada por opioides.

Considerando as possíveis vias de administração dessas substâncias, Manthey e colaboradores (2008) avaliaram a atividade anti-inflamatória da substância 3',4',3,5,6,7,8-heptametoxiflavona (**67**) nos modelos de edema de pata induzido por carragenina e lipopolissacarídeo estimulador da produção de TNF- α em duas vias de administração, intraperitoneal e oral. Os resultados demonstraram que a administração intraperitoneal da PMF na dose de 100 mg/kg inibiu significativamente a formação do edema na pata dos animais em 56% quando comparado ao grupo controle, assim como inibiu significativamente em 30 e 40% a liberação de TNF- α nas doses de 33 e 100 mg/kg, respectivamente. Entretanto, nenhum resultado positivo foi observado quando a substância foi administrada pela via oral na dose de 100 mg/kg. Os autores avaliaram as concentrações plasmáticas da substância nos grupos e encontraram níveis inferiores da PMF no plasma dos animais que receberam a substância por via oral, quando comparado aos animais que receberam por administração intraperitoneal, sugerindo uma biodisponibilidade oral reduzida desta substância.

Devido à natureza hidrofóbica das metoxilas em relação às hidroxilas, as polimetoxiflavonas são mais lipofílicas que os flavonoides polihidroxilados, possibilitando uma maior permeabilidade dessas substâncias através do intestino delgado, entretanto as mesmas possuem uma baixa solubilidade em água que dificulta a sua solubilidade no trato gastrointestinal. Embora a solubilidade ou a permeabilidade sejam insuficientes para descrever a absorção e biodisponibilidade, a avaliação da solubilidade e da permeabilidade fornecem

evidências para entender melhor a biodisponibilidade e a estreita relação entre solubilidade, permeabilidade, absorção e potência (LI *et al.*, 2009).

Trabalhos publicados procuraram avaliar a absorção das PMF a partir do estudo da permeabilidade *in vitro*, com o intuito de prever a biodisponibilidade dessas. Demonstrou-se que os flavonoides metoxilados apresentam permeabilidade cinco a oito vezes maior na parede intestinal do que seus equivalentes não metoxilados. Além disso, sugere-se que a metilação dos grupos hidroxilas protege as PMF de sofrerem uma extensa conjugação com ácido glicurônico por metabolismo intestinal, melhorando a estabilidade metabólica dessas substâncias (WEN; WALLE, 2006). No que tange a porcentagem de permeação, Murakami e colaboradores (2001) demonstraram uma permeação relativamente alta da nobiletina através de células Caco-2 diferenciadas que mimetizam as células epiteliais que revestem o intestino delgado, na qual após quatro horas de incubação constatou-se que mais de 48% da quantidade de nobiletina permeou para o compartimento basolateral.

Li e colaboradores (2008) realizaram uma avaliação sistemática *in vitro* dos parâmetros de solubilidade e permeabilidade de doze PMF, utilizando o ensaio de solubilidade por liofilização (LYSA) e os ensaios de permeabilidade em células Caco-2 e permeabilidade em membrana artificial paralela (PAMPA) (Tabela 1). Foram encontrados valores de solubilidade entre 6 – 53 µg/mL para as PMF avaliadas, indicativos de uma solubilidade muito baixa, uma vez que valores abaixo de 100 µg/mL representam uma baixa solubilidade, segundo o mesmo autor. Paralelamente, a presença de grupos hidroxila melhora a solubilidade das PMF, visto que foram encontrados valores de solubilidade superior para as PMF hidroxiladas, além disso a presença do grupo hidroxila na posição 3 do anel C demonstrou melhorar drasticamente a solubilidade das PMF. Em contrapartida, os valores de permeabilidade determinados pelo ensaio de PAMPA ($0,55 - 1,62 \times 10^{-6}$ cm/s) e células Caco-2 (0,6 – 0,9) permitiram inferir que, no geral, a permeabilidade das PMF é de média a alta, sugerindo que os PMF podem facilmente cruzar a membrana de fosfolípidios, um reflexo da sua natureza hidrofóbica definida pela presença de múltiplos grupos metoxila.

Corroborando com os resultados *in vitro* obtidos por Wen e Walle (2006) e Li e colaboradores (2008), estudos *in vivo* demonstram que a metilação melhora grandemente a biodisponibilidade oral de flavonas. Em um estudo de absorção em ratos, comparou-se a absorção oral da substância 5,7-dimetoxiflavona (**68**) e seu análogo não metoxilados, o flavonoides crisina (**69**), sendo determinada uma área sob a curva (AUC) de 58,8 µg/mL.min para a 5,7-dimetoxiflavona, enquanto as concentrações de crisina ficaram abaixo do limite de

quantificação do método analítico (WALLE *et al.*, 2007) Além disso, o estudo farmacocinético das PMF presentes no extrato de *Kaempferia parviflora* demonstrou aumento da biodisponibilidade conforme o número de substituintes metoxilas, com 1,75% para a substância 5,7-dimetoxiflavona (**68**), 2,10% para a substância 5,7,4'-trimetoxiflavona (**70**) e 3,32% para a substância 3,5,7,3',4'-pentametoxiflavona (**71**) (MEKJARUSKUL; JAY; SRIPANIDKULCHAI, 2012).

Estudos de farmacocinética em ratos demonstram que a nobiletina possui uma permeabilidade média no trato gastrointestinal, com uma biodisponibilidade oral de 35,9% (KUMAR *et al.*, 2012), assim como as PMF tangerina (**72**) e 5,7,3',4'-tetrametoxiflavona (**73**), que apresentaram uma biodisponibilidade oral de 27,11 e 14,3%, respectivamente. (WEI; HWANG; TSAI, 2014; HUNG *et al.*, 2018).

Apesar das informações disponíveis, pouco se conhece a respeito da absorção, distribuição, metabolismo e eliminação destas substâncias *in vivo*, revelando a necessidade de estudos que avaliem a farmacocinética desta promissora classe de substâncias, especialmente porque a biodisponibilidade oral parece ser um fator limitante para a eficácia das polimetoxiflavonas.

2.3.1 Fração enriquecida de polimetoxiflavonas de *Ageratum conyzoides*

Considerando a relevância biológica das PMF, um estudo anterior desenvolvido em nosso grupo de pesquisa procurou avaliar a atividade antinociceptiva e anti-inflamatório de uma fração enriquecida em polimetoxiflavonas de *A. conyzoides* (FEPMF-*Ac*), utilizando os modelos de nocicepção aguda induzido por formalina, PGE2 e citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α) (FAQUETI *et al.*, 2016).

Os resultados demonstram que o tratamento prévio dos animais com a fração reduziu significativamente ambas as fases do modelo, com inibições de $14 \pm 7\%$, $34 \pm 6\%$ ($p < 0,05$) e $42 \pm 8\%$ ($p < 0,01$) para a fase neurogênica e $15 \pm 8\%$, $45 \pm 10\%$ ($p < 0,01$) e $68 \pm 11\%$ ($p < 0,001$) para fase inflamatória nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg, respectivamente, em comparação ao grupo controle. Os dados demonstram que a FEPMF-*Ac* apresentou um efeito mais pronunciado na segunda fase do modelo, a fase inflamatória, com uma dose inibitória de 50% da nocicepção (DI₅₀), de 139,1 mg/kg e seus respectivos limites de confiança de 95%, (83,0–233,0 mg/kg). Além da inibição da formação de edema de pata nos camundongos de $32 \pm 6\%$ ($p < 0,01$) na dose de 300 mg/kg (FAQUETI *et al.*, 2016).

Neste ensaio, o tratamento com o medicamento indometacina (10 mg/kg, intraperitoneal), um analgésico e anti-inflamatório não esteroide, utilizado como controle positivo, foi capaz de reduzir significativamente a fase inflamatória e o edema de pata, com inibição de $64 \pm 6\%$ ($p < 0,001$) e $39 \pm 5\%$ ($p < 0,001$), respectivamente, em comparação ao grupo controle, entretanto não foi observada inibição da fase neurogênica do teste da formalina (FAQUETI *et al.*, 2016).

Em outros modelos de nociceção avaliados neste trabalho o tratamento com a FEPMF-*Ac* na dose de 100 mg/kg significativamente reduziu ($p < 0,001$) a resposta nociceptiva induzida pela administração intraplantar de PGE2, comparado ao grupo controle, com inibição de $85 \pm 18\%$ da resposta. Também se demonstrou que a fração na dose de 100 mg/kg significativamente reduziu ($p < 0,001$) a resposta nociceptiva induzida pela administração intratecal de IL-1 β , uma das principais citocinas envolvidas na gênese da dor e na destruição da cartilagem e inibição do reparo tecidual da osteoartrite (MOBASHERI; BATT, 2016). Neste ensaio obteve-se uma inibição de $90 \pm 12\%$ da resposta nociceptiva induzida por IL-1 β , quando comparada ao grupo controle. Paralelamente, não se obteve redução da resposta nociceptiva induzida por TNF- α com os tratamentos com a FEPMF-*Ac* (100 mg/kg) e o fármaco indometacina (FAQUETI *et al.*, 2016).

Cabe ressaltar que a FEPMF-*Ac* produzida nesse estudo foi obtida por meio de múltiplas etapas cromatográficas, dificultando a sua reprodutibilidade. Neste sentido, propõem-se a otimização do processo de fracionamento, a fim de padronizar o processo de obtenção que garanta resultados reproduzíveis.

Os resultados obtidos demonstram o potencial biológico das PMF de *A. conyzoides* para o tratamento de afecções dolorosas, principalmente as de caráter de inflamatório, atuando, em parte, na modulação negativa de prostanoídes e da citocina pró-inflamatória IL-1 β em níveis periféricos e centrais (FAQUETI *et al.*, 2016). Por conseguinte, sugeriu-se a continuidade dos estudos em outros modelos de dor para investigar os mecanismos envolvidos na sua ação farmacológica, bem como a avaliação das características farmacocinéticas do marcador da fração, a substância 5'-MeONB, visto que a biodisponibilidade oral parece ser um fator limitante para a eficácia das PMF.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito farmacológico pré-clínico em modelos de dor inflamatória da fração padronizada de polimetoxiflavonas de *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae) e avaliar a farmacocinética do marcador 5'-metoxinobiletina.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar e padronizar o processo de obtenção da fração de polimetoxiflavonas a partir das partes aéreas de *A. conyzoides*;
- Desenvolver e validar o método analítico para quantificação das polimetoxiflavonas na fração de polimetoxiflavonas de *A. conyzoides*;
- Avaliar a atividade antinociceptiva da fração de polimetoxiflavonas de *A. conyzoides* por via oral;
- Isolar e caracterizar o marcador químico da fração, a polimetoxiflavona 5'-metoxinobiletina;
- Avaliar a contribuição do marcador 5'-metoxinobiletina para a atividade antinociceptiva da fração de polimetoxiflavonas de *A. conyzoides*;
- Desenvolver e validar o método bioanalítico para quantificação do marcador 5'-metoxinobiletina em plasma para aplicação no estudo de farmacocinética;
- Estudar a farmacocinética do marcador 5'-metoxinobiletina utilizando o plasma dos animais tratados por via oral e endovenosa.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAL VEGETAL

4.1.1 Coleta da planta e identificação da espécie

As partes aéreas (caules, folhas e flores) de *Ageratum conyzoides* L. foram coletadas em dois períodos distintos nos municípios de Florianópolis (Santa Catarina) e Camboriú (Santa Catarina). A primeira coleta foi realizada em agosto de 2016 nas dependências do Horto Didático Medicinal e do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Santa Catarina (27°35'52.6"S 48°31'01.2"O).

Com o intuito de obter-se grandes quantidade de material vegetal, foram realizadas entre os meses de fevereiro até agosto de 2018 outras cinco coletas das partes aéreas de *A. conyzoides* nos arredores do Horto Didático Medicinal do Centro de Ciências da Saúde (27°35'52.6"S 48°31'01.2"O), do Centro de Ciências Biológicas (27°35'50.9"S 48°30'55.6"O) e da Moradia Estudantil da Universidade Federal de Santa Catarina (27°35'55.9"S 48°31'30.2"O), Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima. Adicionalmente, foram realizadas duas coletas no bairro Rio Pequeno, no município de Camboriú (27°03'17.2"S 48°37'46.5"O). O material vegetal proveniente das diferentes coletas realizadas neste segundo período foi reunido, constituindo a segunda remessa de material vegetal.

A identidade botânica das partes aéreas coletadas foi confirmada por meio da comparação com exsicata da espécie (No. SMDB 13.138) depositada no Herbário da Universidade Federal de Santa Maria.

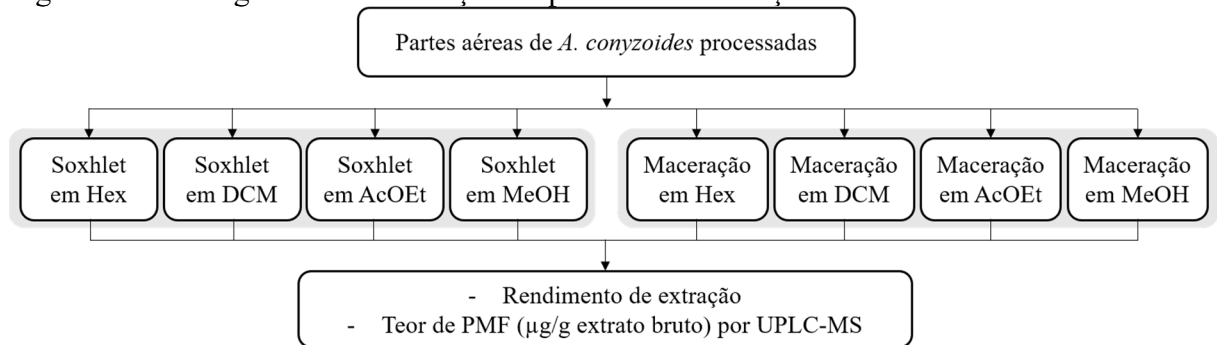
Após a coleta, as partes aéreas foram secas em estufa de circulação de ar (± 40 °C) durante três dias e posteriormente trituradas em moinho de facas (MAQMONT) com malha de 5 mm. A droga vegetal processada foi acondicionada em sacos de plástico preto e armazenada ao abrigo da luz e umidade em ambiente refrigerado (5 - 8 °C) aguardando a etapa de extração.

4.2 OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DAS PMF

Com o objetivo de determinar as condições ideais para a extração das PMF presentes nas partes aéreas de *A. conyzoides*, procurou-se avaliar a influência dos solventes extratores e das técnicas de extração sobre a extração do material vegetal, mantendo-se fixa a proporção de

material vegetal e líquido extrator. Desta maneira, investigou-se como solventes extratores as opções *n*-hexano (Hex), diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH), sendo os mesmos avaliados por dois métodos de extração distintos, extração em aparato de Soxhlet e maceração estática (Figura 12).

Figura 12 - Fluxograma de otimização do processo de extração.



Hex: *n*-hexano; DCM: diclorometano; AcOEt: acetato de etila; MeOH: metanol

Para tanto, quatro alíquotas contendo exatamente cerca de 10,0 g de droga vegetal foram submetidas à maceração estática em temperatura ambiente utilizando 200 mL dos diferentes solventes extratores separadamente, durante três dias, com re-extração da mesma droga vegetal por mais três dias visando a extração exaustiva do material vegetal. Outras quatro alíquotas de 10,0 g foram submetidas à extração em aparato Soxhlet contendo separadamente, 200 mL dos solventes extratores. Manteve-se a temperatura do banho de aquecimento à 85 °C (suficiente para a ebulição de todos os solventes extratores), sendo o processo de extração mantido até a finalização de oito ciclos de extração no aparato de Soxhlet. Os extratos obtidos foram filtrados por papel filtro e o solvente extrator removido em evaporador rotatório sob pressão reduzida, sendo levado à secura, resultando nos extratos brutos que foram armazenados em ambiente refrigerado (5 - 8 °C).

A influência dos fatores de extração foi avaliada nos oitos extratos obtidos quanto ao rendimento de extração (expresso % de massa de extrato bruto referente a massa inicial corrigida) e o teor de PMF, expresso em função de 5'-metoxinobiletina (em µg/g de extrato), sendo esta determinada por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (UPLC-MS), conforme descrito no item 4.2.1. Os valores obtidos foram comparados por análise de variância (ANOVA) de duas vias e pós teste de Bonferroni com auxílio do *software* GraphPad Prism versão 9 (GraphPad Software, Inc., Califórnia, Estados Unidos). Diferenças significativas foram consideradas com valor de $p < 0,05$.

4.2.1 Desenvolvimento do método analítico por UPLC-MS

O método analítico utilizado para a avaliação da composição fitoquímica das diferentes preparações obtidas na otimização do processo de extração foi desenvolvido em cromatógrafo Waters[®], modelo *Acquity H-Class UPLC* equipado com bomba quaternária, injetor automático, forno de coluna e detector de arranjo de foto diodo, acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução *Xevo G2-S QToF* com fonte de ionização por eletronebulização (ESI) Zpray[™] e analisadores quadrupolo e tempo de voo (QToF).

A separação dos constituintes foi obtida utilizando-se coluna Waters[®] *Acquity UPLC BEH C₁₈* (100 x 2,1 mm; 1,7 µm) mantida à 25 °C em um sistema de fase móvel gradiente composto de água acidificada com ácido fórmico 0,1% (pH 3,0) (A) e acetonitrila (B) em um fluxo constante de 0,3 mL/min, nas seguintes condições: 0-2 min, 70-60% (A); 2-5 min, 60-55% (A); 5-7 min, 55-40% (A); 7-8 min, 40-5% (A); 8-10 min 5% (A), após esse tempo ocorreu o retorno à condição inicial do gradiente, sendo o mesmo mantido por 3 minutos para o condicionamento do sistema cromatográfico às condições iniciais de separação. O volume de injeção foi de 5 µL.

O processo de nebulização foi aplicado no modo positivo, nas seguintes condições: voltagem do capilar de ionização de 3 kV; voltagem do cone de 40 V; voltagem *offset* da fonte de 80 V; temperatura da fonte de 80 °C; temperatura de dessolvatação de 120 °C; fluxo de gás do cone de 200 L/h; fluxo do gás de dessolvatação de 900 L/h. Os dados de EM foram adquiridos em modo contínuo, em um arranjo de massa entre 100 e 1000 Da com tempo de aquisição de 1,0 s. Para a aquisição e interpretação dos dados utilizou-se o *software* MassLynx 4.1 (Waters Corporation, Massachusetts, Estados Unidos).

4.2.1.1 Determinação do teor de PMF nas soluções extrativas

O teor de PMF nas soluções extrativas obtidas na etapa de otimização foi determinado utilizando-se como marcador a substância 5'-MeONB, previamente isolada do extrato etanólico de *A. conyzoides* e caracterizada por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H) e espectrometria de massas (EM), com pureza de 98,62%, conforme a análise de UPLC-DAD (FAQUETI, 2016).

Para a construção da curva de calibração, preparou-se uma solução estoque de 5'-MeONB a 1250 µg/g diluída em metanol e a partir desta foram realizadas diluições sucessivas

no intervalo de 0,20 – 7,0 µg/g, em sete níveis. As amostras, curva de calibração e soluções extrativas foram diluídas em acetonitrila, grau HPLC, filtradas em filtro de PVDF 0,22 µm e injetadas no sistema cromatográfico UPLC-MS segundo o método descrito no item 4.2.1.1.

A aquisição das áreas dos picos foi processada utilizando a ferramenta QuanLynx, disponível no *software* MassLynx 4.1, a partir do qual realizou-se a extração do cromatograma do íon exato m/z 433.1475 [M+H]⁺, aceitando-se um desvio de até 5 ppm. A partir dos resultados obtidos determinou-se a equação da reta e os coeficientes de correlação (r) e determinação (r²) da curva analítica utilizando o *software* Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corporation, Redmond, Estados Unidos).

4.2.2 Obtenção dos extratos brutos otimizados

Os extratos brutos de *A. conyzoides* foram preparados utilizando as condições extrativas otimizadas. Alíquotas do material vegetal processado resultantes das coletas realizadas em 2016 e 2018, foram transferidas para o cartucho de extração do aparato Soxhlet, sendo posteriormente adicionado o solvente extrator *n*-hexano. A quantidade de solvente extrator adicionado ao balão de destilação conectado ao aparato variou conforme a capacidade total do aparato Soxhlet, sendo a quantidade 200, 350 e 600 mL de *n*-hexano utilizados para os aparatos de 350, 500 e 1000 mL, respectivamente. Manteve-se a temperatura do banho de aquecimento a 85 °C até a finalização de oito ciclos de extração, baseado na observação da coloração das soluções extrativas obtidas durante os ciclos. Esse processo foi repetido até a extração de todo o material vegetal processado.

As soluções extrativas obtidas, referentes às coletas dos anos de 2016 e 2018 foram filtradas por papel filtro e o solvente removido em evaporador rotatório sob pressão reduzida, resultando nos extratos brutos de *n*-hexano de 2016 e 2018, com rendimentos de 33,6 e 170,3 g, a partir de 1,76 e 5,83 kg de material vegetal, respectivamente.. Os quais foram armazenados em temperatura reduzida (8 °C) para posteriores análises e fracionamento cromatográfico.

4.3 OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO

4.3.1 Monitoramento das PMF por CCD, UPLC-MS e RMN de ¹H

Para avaliar a presença das PMF nas frações de interesse durante o processo de fracionamento cromatográfico do extrato bruto, utilizou-se 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.

Para caracterizar o perfil fitoquímico do extrato bruto/frações obtidas as amostras foram também avaliadas por UPLC-MS, utilizando o equipamento e as condições experimentais descritas no item 4.2.1.1. Para estas análises, realizou-se a correção dos dados espectrométricos, durante a aquisição, para garantir a exatidão dos valores de massa. Para tal, procedeu-se a infusão direta a 20 µL/min, de solução do padrão de referência externa leucina encefalina em sistema LockSpray[®] em intervalos de 5 segundos, em concentração de 1 ng/mL, cujo íon molecular corresponde à m/z 556.2771 [M+H]⁺.

Além dos métodos cromatográficos descritos, utilizou-se a RMN ¹H para investigar a complexidade química do extrato e frações obtidas do fracionamento cromatográfico. Os experimentos foram desenvolvidos em espectrômetro Bruker[®] modelo *Fourier 300* (300 MHz) e os dados adquiridos (FID) processados em *software* TopSpin 3.5 (Bruker Corporation, Massachusetts, Estados Unidos).

4.3.2 Fracionamento das PMF por CLV

Inicialmente experimentou-se a purificação do extrato bruto de *n*-hexano de *A. conyzoides* por cromatografia líquida a vácuo (CLV). Desta forma, a partir de uma alíquota do extrato bruto (1,07 g) preparou-se uma pastilha com a FE sílica gel 60 (230-400 *mesh*; 0,04-0,063 mm). Procedeu-se a cromatografia em uma coluna de vidro utilizando 89,5 g de FE e como FM um sistema gradiente, compostos por solventes orgânicos de ordem crescente de polaridade. Iniciando com *n*-hexano-acetato de etila (95:5, 200 mL); *n*-hexano-acetato de etila (85:15, 200 mL); *n*-hexano-acetato de etila (75:25, 200 mL); *n*-hexano-acetato de etila (65:35, 200 mL); *n*-hexano-acetato de etila (50:50, 200 mL); *n*-hexano-acetato de etila (30:70, 200 mL);

acetato de etila 100% (100 mL); acetato de etila-metanol (50:50, 100 mL) e ao final metanol 100% (100 mL). As frações foram coletadas em blocos de acordo com o sistema eluente utilizado, resultando em dez frações que foram monitoradas por CCD e reunidas de acordo com o perfil cromatográfico.

4.3.3 Fracionamento das PMF por CPC

Visando a obtenção de grandes quantidades da FEPMF-Ac no menor número possível de etapas, o extrato bruto de *n*-hexano foi submetido ao fracionamento por cromatografia de partição centrífuga (CPC).

As separações cromatográficas por CPC foram desenvolvidas em equipamento Armen[®] modelo SCPC-250- L equipado com rotor para capacidade de 250 mL, acoplado a um sistema Spot Prep II equipado com uma bomba quaternária, detector de arranjo de diodos e um coletor automático. O controle do sistema cromatográfico foi executado utilizando-se o *software* Armen Glider CPC v.5.0 (Armen Instrument, Saint Ave, França). As condições cromatográficas empregadas, como o sistema eluente bifásico, modo de eluição (ascendente ou descendente), fluxo e frequência de rotação foram estabelecidos com o desenvolvimento do processo de fracionamento.

4.3.3.1 Seleção do sistema bifásico pela análise de coeficiente de partição (K_D)

A seleção do sistema de solventes desempenha uma importante função na aplicação do sistema de CPC. O conjunto de sistema a ser testado geralmente é baseado na familiaridade prática entre eles, ou em dados descritos na literatura sobre sistema de solventes empregados para determinada classe de compostos ou espécie. Considerando as famílias de sistemas de solventes mais frequentemente utilizadas compostas por hexano/acetato de etila/metanol/água (HEMWat), clorofórmio/metanol/água (ChMWat) e acetato de etila/butanol/água (EBuWat) tendem a ser mais utilizadas (FRIESEN; AHMED; PAULI, 2015), diferentes combinações do sistemas supracitados foram testadas a fim de encontrar-se o sistema ideal para a obtenção da FEPMF-Ac.

A escolha do sistema de solventes baseou-se no coeficiente de partição (K_D) dos compostos de interesse nos diferentes sistemas bifásicos, determinados por meio do método de *shake-flask*. Para tal, alíquotas do extrato bruto (± 2 mg) foram adicionadas a tubos de ensaio

contendo 2 mL da mistura dos sistemas de solventes propostos. Os tubos foram vigorosamente agitados por um minuto e posteriormente mantidos sob repouso até que fosse alcançado o equilíbrio entre as duas fases. As fases superior e inferior foram separadas em tubos distintos, sendo avaliadas quanto ao perfil cromatográfico por CCD. Posteriormente, para a determinação do coeficiente de partição dos compostos de interesse, as fases foram concentradas até a secura em concentrador de frações a vácuo (SPD1010 e SPD2010 *Integrated SpeedVac Systems*, Thermo Scientific®), rediluídas em 2 mL de acetonitrila, filtradas em membrana de bifluoreto de polivinilideno (PVDF) modificada de 0,22 µm de porosidade e analisadas por UPLC-MS (condições descritas no item 4.2.1.1).

O coeficiente de partição de cada um dos compostos de interesse nos sistemas de solventes foi estabelecido em função da razão entre a área do pico do composto nos cromatogramas das fases estacionária (FE) e móvel (FM), conforme descrito na equação 1. Sendo designada no modo de eluição ascendente a fase inferior como fase estacionária (FE) e a fase superior como fase móvel (FM). Enquanto que, no modo de eluição descendente esta designação é inversa.

$$K_D = \frac{\text{Área do pico}_{(fase\ estacionária)}}{\text{Área do pico}_{(fase\ móvel)}} \quad (\text{Eq. 1})$$

4.3.3.2 Fracionamento do extrato bruto por CPC: sistema de *n*-hexano-acetato de etila-etanol-água 1:1:1:1 (ASC)

Uma vez definido o sistema de solventes mais adequado para a purificação das PMF, uma alíquota do extrato bruto de *n*-hexano de *A. conyzoides* (921,1 mg) foi submetida à análise de CPC, desenvolvida de modo de eluição ascendente, utilizando o sistema bifásico de solventes hexano-acetato de etila-etanol-água 1:1:1:1 (v/v/v/v), previamente preparado em funil de separação para obtenção das fases superior (FS) e inferior (FI). A amostra foi dissolvida em 10 mL de mistura FS-FI 1:1 (v/v) e injetada no sistema em seringa de vidro. Inicialmente realizou-se o preenchimento do sistema com a FE, que nesta análise tratava-se da FI, a um fluxo de 30 mL/min, com rotação de 500 RPM, durante 10 minutos. Após este período, a FS móvel começou a ser bombeada através da FE, a um fluxo de 8 mL/min e rotação de 1800 RPM até que as mesmas atingissem a condição de equilíbrio no sistema, sendo obtido após 9 minutos com 77,35 % de retenção da FE. Consequentemente, deu-se início ao processo cromatográfico

com a injeção da amostra e bombeamento da FM durante 75 minutos, realizando-se a coleta de 10 mL/fração. Posteriormente, a FS foi bombeada a uma taxa de fluxo de 30 mL/min, a 1800 rpm, durante 12 minutos, para a etapa de extrusão, com uma coleta de 15 mL/fração. As frações eluídas de CPC foram monitoradas a 275 e 330 nm, produzindo 77 frações.

4.3.4 Purificação adicional das PMF por CC

As subfrações intermediárias enriquecidas em PMF, provenientes do fracionamento por CPC, foram submetidas a diferentes condições de cromatografia em coluna (CC) a fim de complementar de forma mais eficiente o processo de enriquecimento das PMF de *A. conyzoides*.

4.3.4.1 Cromatografia em coluna de permeação molecular

4.3.4.1.1 Condição 1

Uma alíquota da fração intermediária enriquecida em PMF (202,36 mg) foi filtrada por Sephadex[®] LH20 tendo acetona como eluente (170 mL). A amostra foi solubilizada em 1 mL do eluente e aplicada diretamente na fase estacionária, com auxílio de uma pipeta de Pasteur. O leito cromatográfico foi montado em uma coluna de vidro sem torneira, a fim de manter um fluxo constante do eluente. As frações foram coletadas por tempo, em um intervalo de 30 segundos, resultando em 90 subfrações, que foram reunidas de acordo com o perfil cromatográfico avaliado por CCD.

4.3.4.1.2 Condição 2

Outra alíquota da fração intermediária (196,4 mg) foi filtrada por Sephadex[®] LH20 tendo uma mistura de diclorometano-metanol 70:30 (v/v) como eluente (150 mL). A amostra foi solubilizada em 1 mL do eluente e aplicada diretamente na fase estacionária. O leito cromatográfico foi montado em uma coluna de vidro sem torneira, a fim de manter um fluxo constante do eluente. As frações foram coletadas por tempo, em um intervalo de 30 segundos, resultando em 88 subfrações, que foram reunidas de acordo com o perfil cromatográfico avaliado por CCD.

4.3.4.2 Cromatografia em coluna de troca iônica

Uma suspensão da fração intermediária a 51,03 mg/mL em água-etanol 90:10 (v/v), foi filtrada por resina de Diaion[®] HP20. A quantidade de 5,06 g de resina foi inicialmente ativada em metanol p.a. durante 15 minutos, sendo posteriormente substituído o metanol por água purificada e transferida para uma coluna cromatográfica. Utilizou-se como fase móvel um sistema gradiente, iniciando com água-etanol (90:10 - 15 mL); água-etanol (70:30 - 15 mL); água-etanol (50:50 - 15 mL); água-acetona (50:50, 15 mL); etanol-acetona (30:70, 15 mL), finalizando com acetona 100% (15 mL). As frações foram coletadas em blocos de acordo com o sistema eluente utilizado, resultando em nove subfrações, que foram reunidas de acordo com o perfil cromatográfico avaliado por CCD.

4.3.4.3 Cromatografia em coluna de adsorção

4.3.4.3.1 Condição 1

Uma alíquota da fração intermediária (53,2 mg) foi solubilizada em 1 mL de uma mistura de hexano-acetato de etila (60:40) (v/v) e aplicada diretamente a fase estacionária sílica gel (4,29 g) montada em uma coluna cromatográfica de vidro a vácuo, ainda sem solvente. Utilizou-se como fase móvel um sistema gradiente nas seguintes condições: hexano-acetato de etila (60:40, 15 mL); hexano-acetato de etila (10:90, 15 mL); acetato de etila-metanol (90:10, 15 mL); acetato de etila-metanol (70:30, 15 mL), finalizando em metanol 100% (15 mL). As frações foram coletadas em blocos de acordo com o sistema eluente utilizado, resultando em cinco subfrações, que foram reunidas de acordo com o perfil cromatográfico avaliado por CCD.

4.3.4.3.2 Condição 2

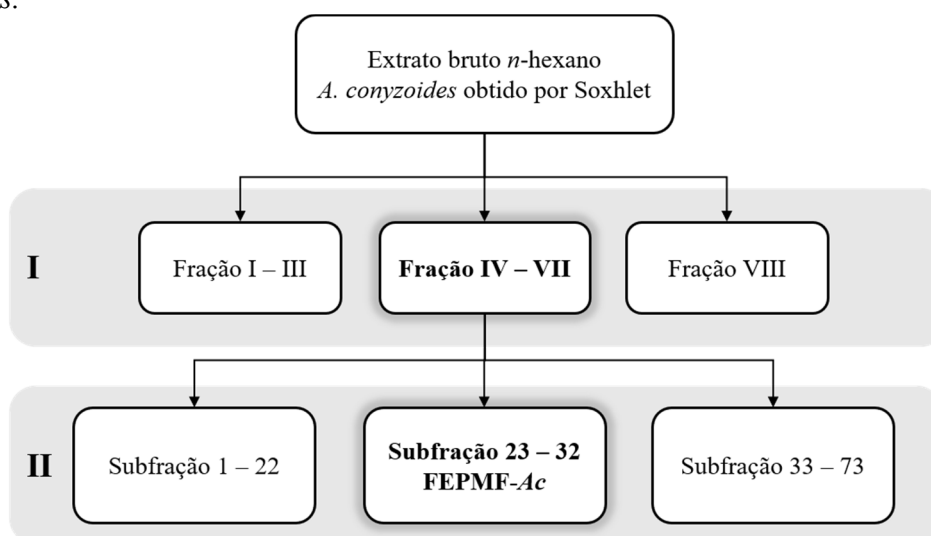
Outra alíquota da fração intermediária (51,9 mg) foi solubilizada em 1 mL de uma mistura de hexano-acetato de etila (70:30) (v/v) e aplicada diretamente a fase estacionária sílica gel (4,36 g) montada em uma coluna cromatográfica de vidro a vácuo, ainda sem solvente. Utilizou-se como fase móvel um sistema gradiente nas seguintes condições: hexano-acetato de etila (70:30, 3x[15 mL]); hexano-acetato de etila (10:90, 15 mL); acetato de etila-metanol (90:10, 15 mL); acetato de etila-metanol (70:30, 15 mL), finalizando em metanol 100% (15

mL). As frações foram coletadas em blocos de acordo com o sistema eluente utilizado, resultando em sete subfrações, que foram reunidas de acordo com o perfil cromatográfico avaliado por CCD.

4.4 PADRONIZAÇÃO DA FEPMF-*Ac*

Baseado nas condições de fracionamento otimizadas do extrato bruto de *n*-hexano e frações (vide item 4.4), padronizou-se a obtenção da FEPMF-*Ac* seguindo as condições experimentais ilustradas na Figura 13.

Figura 13 - Fluxograma de obtenção da fração enriquecida em polimetoxiflavonas de *A. conyzoides*.



I: Separação por CPC Hex:AcOEt:EtOH:H₂O (1-1-1-1) ASC. Análise: 8 mL/min a 1800 RPM durante 75 min. Extrusão: 12 min a 30 mL/min e 1800 RPM; **II:** Filtração por Sephadex LH20. Eluente isocrático: DCM-MeOH (70-30).

4.5 CARACTERIZAÇÃO DA FEPMF-*Ac* POR UPLC-MS

A FEPMF-*Ac* obtida teve seu perfil qualitativo e quantitativo determinado utilizando metodologia desenvolvida por UPLC-MS em cromatógrafo Waters[®], modelo *Acquity H-Class UPLC* acoplado a um espectrômetro de massas *Xevo G2-S QToF* descrito no item 4.2.1.1.

A separação das PMF foi obtida empregando-se coluna *Hypersil Gold C₁₈* (100 x 2,1 mm; 1,9 µm) mantida à 40 °C em um sistema de fase móvel gradiente composto de água acidificada com ácido fórmico 0,1% (pH 3,0) (A) e acetonitrila (B) em um fluxo constante de 0,3 mL/min, nas seguintes condições: 0-4 min, 55-40% (A); 4-6 min, 40% (A), após esse tempo ocorreu o retorno à condição inicial do gradiente, sendo o mesmo mantido por 3 minutos para

o recondicionamento do sistema cromatográfico às condições iniciais de separação. O volume de injeção correspondeu a 2 μL .

O processo de nebulização foi aplicado no modo positivo, nas seguintes condições: voltagem do capilar de ionização de 3 kV; voltagem do cone de 40 V; voltagem *offset* da fonte de 80 V; temperatura da fonte de 90 °C; temperatura de dessolvatação de 400 °C; fluxo de gás do cone de 200 L/h; fluxo do gás de dessolvatação de 900 L/h. Os dados de EM foram adquiridos em modo centroide, em um arranjo de massa entre 100 e 1000 Da com tempo de aquisição de 0,3 s. Realizou-se a correção dos dados espectrométricos, durante a aquisição, por meio da infusão direta do padrão de referência externa leucina encefalina, em intervalos de 10 segundos, com tempo de aquisição de 0,2 s. Para a aquisição e interpretação dos dados utilizou-se o *software* MassLynx 4.1.

As amostras, foram diluídas em acetonitrila, grau HPLC, filtradas em filtro de PVDF 0,22 μm e injetadas no sistema cromatográfico UPLC-MS segundo o método descrito.

4.5.1 Parâmetros analíticos de mérito do método

O método analítico desenvolvido para quantificação das PMF na FEPMF-*Ac* foi validado segundo os parâmetros definidos pela ICH (2005), incluindo a determinação da linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão do método. Elegeu-se a substância 5'-MeONB como marcador químico da fração, visto que esta substância é exclusiva da espécie *A. conyzoides* e trabalhos anteriores já haviam demonstrado que a mesma é a PMF mais abundante da espécie (FAQUETI; SANDJO; BIAVATTI, 2017).

4.5.1.1 Linearidade e limites de quantificação e detecção

Para a verificação da linearidade do método foi construída uma curva de calibração utilizando o padrão externo 5'-MeONB. Preparou-se uma solução estoque do padrão na concentração de 900 $\mu\text{g/g}$ diluído em metanol e a partir desta foram realizadas diluições sucessivas, em triplicata, no intervalo de 0,07 a 2,5 $\mu\text{g/g}$, em sete níveis (0,07; 0,15; 0,30; 0,75; 1,0; 1,5 e 2,5 $\mu\text{g/g}$) que foram analisadas por UPLC-MS seguindo as condições experimentais descritas no item 4.6. A partir dos resultados obtidos das áreas do pico do padrão externo nos cromatogramas determinou-se a equação da reta e os coeficientes de correlação (r) e determinação (r^2) da curva analítica utilizando *software* Microsoft Excel 2013.

Os limites de detecção e quantificação foram estabelecidos baseados em parâmetros da curva de calibração, utilizando as equações 2 e 3, respectivamente (BRASIL, 2017). Na qual, IC refere-se à inclinação da curva de calibração e σ é o desvio padrão do intercepto com o eixo Y de três curvas de calibração.

$$LD = \frac{3,3 \cdot \sigma}{IC} \quad (\text{Eq. 2})$$

$$LQ = \frac{10 \cdot \sigma}{IC} \quad (\text{Eq. 3})$$

4.5.1.2 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 da FEPMF-Ac a 5,0 $\mu\text{g/g}$ no mesmo dia e após dois dias, respectivamente. Os valores de repetibilidade e precisão intermediária foram expressos pelo desvio padrão relativo entre as injeções (DPR%).

4.5.1.3 Exatidão

A exatidão do método foi obtida por meio do ensaio de adição do padrão. Quantidades conhecidas do padrão externo, em três níveis de concentração, foram adicionadas em soluções da FEPMF-Ac a 2,5 $\mu\text{g/g}$, em triplicata. Em seguida, as mesmas foram injetadas, assim como as soluções contendo apenas a FEPMF-Ac e as soluções contendo apenas o padrão externo em concentração correspondente à quantidade adicionada nas soluções da FEPMF-Ac. Os resultados foram expressos pela razão entre a concentração do padrão externo na FEPMF-Ac contaminada e a concentração teórica (estabelecida pela soma das concentrações medidas do padrão externo nas soluções contendo apenas a FEPMF-Ac e nas soluções contendo apenas o padrão externo).

4.5.2 Quantificação do teor de polimetoxiflavonas totais por UPLC-MS

A quantificação de polimetoxiflavonas totais na FEPMF-*Ac* foi obtida por metodologia de padrão externo, utilizando 5'-MeONB como referência. O teor foi determinado por meio da soma dos teores dos picos identificados como PMF, sendo o teor calculado a partir da curva de calibração do padrão de 5'-MeONB. O teor de polimetoxiflavonas totais foi expresso em miligramas de 5'-MeONB por grama de FEPMF-*Ac*.

4.6 CARACTERIZAÇÃO DA FEPMF-*Ac* POR RMN ¹H

Além do método cromatográfico descrito, utilizou-se a ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H) para investigar a complexidade química da FEPMF-*Ac* obtida. Os experimentos foram desenvolvidos em espectrômetro *Ascend 600* (600 MHz para ¹H e 150 MHz para ¹³C), vinculado ao Departamento de Química da UFPR, Curitiba/PR. Os dados adquiridos (FID) foram processados em *software* TopSpin 3.5 e os resultados comparados com dados disponíveis na literatura.

4.7 AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO E ANTI-INFLAMATÓRIO DA FEPMF-*Ac*

Os ensaios farmacológicos foram realizados no Laboratório de Neurobiologia da Dor e da Inflamação (LANDI), pertencente ao departamento de Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências Biológicas (CCB – UFSC), sob supervisão e orientação do professor Dr. Adair Roberto Soares dos Santos e com a colaboração da doutoranda Scheila Kraus.

4.7.1 Animais

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos *Swiss* fêmeas e machos adultos (2 meses de idade), pesando entre 25-50 g, provenientes do Biotério Central da UFSC, mediante aprovação dos protocolos experimentais pela Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) desta mesma Universidade (protocolo PP00745). Uma vez recebidos do Biotério Central, os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Neurobiologia da Dor e da Inflamação (LANDI), acondicionados em no máximo 15 animais por caixa,

aclimatizados com temperatura controlada de 22 ± 2 °C, 60 – 80% de umidade, em ciclo claro/escuro de 12 horas (luzes acesas às 6:00 h) e com livre acesso a comida e água. Uma hora antes dos testes, os animais foram ambientados nas condições de trabalho do laboratório. Os testes foram realizados durante o dia.

O número de animais (6-12 animais por grupo) e a intensidade dos estímulos dolorosos utilizados nos experimentos foram o mínimo necessário para demonstrar um efeito consistente dos tratamentos testados. Os animais foram distribuídos aleatoriamente entre os grupos e utilizados uma vez, sendo imediatamente eutanaziado em câmara de CO₂ após a execução dos modelos.

4.7.2 Drogas e Tratamentos

L-glutâmico (glutamato), capsaicina, cinamaldeído, histamina e forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) foram obtidos da Sigma–Aldrich® (Missouri, Estados Unidos). Bradicinina e forskolina foram adquiridas da Tocris Bioscience® (Missouri, Estados Unidos). Ácido acético glacial e etanol foram adquiridos da Dinâmica (São Paulo, Brasil). Formaldeído e hidróxido de sódio foram adquiridos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Óleo de milho foi adquirido em fornecedor alimentício. *Tween* 80 foi adquirido da Merck (Darmstadt, Alemanha).

As diluições das substâncias para teste e veículo foram: formalina (2,5% em salina, correspondente a 0,92% d formaldeído); capsaicina a solução mãe diluída em 10% etanol/10% *tween* 80 em salina e posteriormente diluída em salina; cinamaldeído a solução mãe diluída em 5% *tween* 80 em salina e posteriormente diluída em salina; salina ácida (0,2% ácido acético em salina, pH 5,0 ajustado com NaOH); glutamato diluído em salina e pH ajustado para 7,0 com NaOH; bradicinina diluída em PBS; histamina e PMA diluídas em salina e forskolina diluída em etanol e posteriormente em salina.

Os animais foram tratados com a FEPMF-*Ac* e os veículos dos testes, uma hora antes da realização de todos os testes. A administração das substâncias indutoras de nocicepção foi realizada no momento dos testes. Em todos os experimentos os animais foram tratados e avaliados por pesquisadores diferentes, a fim de garantir o cegamento dos experimentos, assim como realizados no mínimo em dois momentos diferentes para confirmar os efeitos obtidos e assegurar a reprodução dos dados e para aferição da temperatura utilizou-se termômetro digital

4.7.3 Nociceção induzida pela injeção intraplantar de formalina

Para verificar o efeito antinociceptivo agudo da FEPMF-*Ac* foi utilizado o teste de nociceção induzida pela injeção intraplantar de formalina, utilizando camundongos *Swiss* fêmeas e machos. Esse modelo permite evidenciar duas fases de nociceção: a primeira durante os primeiros 5 minutos após a injeção da formalina (origem neurogênica), e a segunda entre 15 e 30 min após a injeção, representando a resposta tônica à dor, acompanhada de uma resposta inflamatória relacionada com a liberação de mediadores químicos da inflamação. O procedimento utilizado foi similar ao descrito anteriormente (HUNSKAAR; FASMER; HOLE, 1985; FAQUETI *et al.*, 2016).

Os animais foram divididos em dois grupos de tratamento: 1) a FEPMF-*Ac* por via intragástrica (i.g) (30-300 mg/kg) dissolvida em solução salina contendo 5% de *tween* 80; 2) a FEPMF-*Ac* (i.g) (30-100 mg/kg) dissolvida em óleo de milho comercial. Após o intervalo de tratamento, os animais receberam 20 µL de formalina a 2,5% (0,92% de formaldeído) na região ventral da pata posterior direita. Após a injeção de formalina, os animais foram colocados individualmente em uma câmara acrílica e observados por 30 minutos no total, sendo os primeiros 5 minutos correspondentes à fase neurogênica e o tempo entre 15 e 30 minutos representou a fase inflamatória do modelo de formalina. Com o uso de um cronômetro, a soma do tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata durante as duas fases foi registrada e considerada indicativa de resposta de nociceção. Uma redução significativa do tempo de resposta nociceptiva do grupo tratado em relação ao grupo controle (veículo) foi considerada indicativa de atividade antinociceptiva.

Ao final do tempo de observação, foi realizada a verificação da temperatura dos animais e do edema na pata posterior direita, sendo que para a medida do edema utilizou-se um micrômetro externo digital da marca Mitutoyo (MDC-293-821-30) para medir a espessura imediatamente proximal à linha média na superfície plantar do animal.

4.7.4 Nociceção induzida pela injeção intraplantar de mediadores químicos endógenos

A fim de elucidar os mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo e anti-inflamatório observado para a FEPMF-*Ac*, foram realizados ensaios de nociceção induzida por químicos endógenos envolvidos nos processos dolorosos, tais como bradicinina, glutamato e histamina. Para a avaliação deste modelo utilizou-se camundongos *Swiss* machos, utilizando

procedimentos similares aos descritos previamente (MEOTTI; COELHO; SANTOS, 2010; PIGATTO *et al.*, 2017; SIMÕES *et al.*, 2018). O tratamento consistiu na FEPMF-*Ac* (10 e 100 mg/kg i.g.), dissolvida em solução salina contendo 5% de *tween* 80. Após o período de adaptação e tratamento, os animais receberam, individualmente, um volume de 20 µL de bradicinina (3 nmol/sítio), glutamato (20 µmol/sítio) ou histamina (100 nmol/sítio) injetado na superfície ventral da pata direita dos animais. Imediatamente após a indução da nocicepção, observou-se individualmente o tempo que os animais permaneceram lambendo ou mordendo a pata injetada durante o período de 15 minutos (glutamato e bradicinina) ou 60 minutos (histamina). O tempo em que cada animal lambeu ou mordeu a pata foi considerado indicativo de nocicepção.

4.7.5 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de substâncias ativadoras de canais TRPs e ASICs.

Dando continuidade aos ensaios de mecanismo de ação foram realizados os ensaios de nocicepção induzida por capsaicina (ativador de receptor de potencial transitório vaniloide subtipo 1 - TRPV1), cinamaldeído (ativador de receptor de potencial transitório anquirina 1 - TRPA1) e salina ácida (ativador de ASICs), utilizando camundongos *Swiss* machos. Os procedimentos utilizados foram similares aos descritos previamente (CÓRDOVA *et al.*, 2011; PIGATTO *et al.*, 2017). O tratamento consistiu na FEPMF-*Ac* (10 e 100 mg/kg i.g.), dissolvida em solução salina contendo 5% de *tween* 80. Após o período de adaptação e tratamento, os animais receberam, individualmente, um volume de 20 µL de capsaicina (5,2 nmol/sítio), cinamaldeído (10 nmol/sítio) ou salina acidificada (pH 5,0), injetado na superfície ventral da pata direita dos animais. Cada animal foi colocado em uma câmara de acrílico e o tempo de mordida ou lambida da pata foi cronometrado durante 5 minutos para capsaicina e cinamaldeído e 15 minutos para salina acidificada. O tempo em que cada animal lambeu ou mordeu a pata foi considerado indicativo de nocicepção.

4.7.6 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de substâncias ativadoras de proteína quinase C e adenilato ciclase

Para a avaliação deste modelo utilizou-se camundongos *Swiss* machos, utilizando procedimentos similares aos descritos previamente (BAGGIO *et al.*, 2012; PIGATTO *et al.*,

2017). O tratamento consistiu na FEPMF-*Ac* (10 e 100 mg/kg i.g.), dissolvida em solução salina contendo 5% de *tween* 80. Após o período de adaptação e tratamento, os animais receberam, individualmente, um volume de 20 μ L de PMA (substância ativadora de proteína quinase C, 500 nmol/sítio) ou forskolina (substância ativadora de adenilato ciclase, 50 nmol/sítio) injetado na superfície ventral da pata direita dos animais. Imediatamente após a indução da nocicepção, observou-se individualmente o tempo que os animais permaneceram lambendo ou mordendo a pata injetada durante o período de 10 minutos para a substância indutora forskolina, enquanto que para o PMA foi cronometrado o apenas o tempo acumulado que os animais permaneceram lambendo ou mordendo a pata entre 15 a 45 minutos (30 minutos) após a indução da nocicepção.

4.7.7 Avaliação locomotora: Teste do campo aberto (*open field*)

O teste do campo aberto foi realizado a fim de excluir a ação de efeitos inespecíficos da FEPMF-*Ac*, tanto em nível central quanto periférico, sobre a atividade locomotora dos animais, utilizando camundongos *Swiss* machos. Os animais foram tratados com a FEPMF-*Ac* (30-300 mg/kg i.g.), dissolvida em solução salina contendo 5% de *tween* 80. O aparato de avaliação consiste de uma arena aberta quadrada feita de madeira lisa medindo 38 cm x 41 cm (Figura 14). O piso da arena é dividido em quadrantes semelhantes e o número de cruzamentos atravessados com todas as patas (parâmetro de locomoção), assim como o tempo de permanência média no centro do aparato (parâmetro de ansiedade), foi contado cumulativamente durante 5 minutos. Os camundongos foram submetidos ao teste de campo aberto em uma avaliação após tratamento único (agudo). A arena foi limpa, com uma solução de etanol 70% entre os testes, a fim de eliminar pistas olfativas entre os animais.

Figura 14 - Aparato de campo aberto.



Fonte: A autora

4.7.8 Análise estatística

Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) e apresentaram distribuição normal após terem sido submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando análise de variância (ANOVA) de uma via seguido pelo teste de Bonferroni. Para todos os casos, os valores de p foram considerados estatisticamente significativos apenas quando inferior a 0,05. Para todos os cálculos estatísticos foi utilizado o *software* GraphPad Prism versão 9.

4.8 AVALIAÇÃO DA FARMACODINÂMICA E FARMACOCINÉTICA DO MARCADOR 5'-MeONB

Para a condução dos estudos que avaliaram a contribuição do marcador 5'-MeONB no efeito biológico da FEPMF-Ac, fez-se necessária uma etapa inicial de purificação dessa substância a partir de uma alíquota da FEPMF-Ac.

4.8.1 Purificação do marcador 5'-MeONB por CPC

Visto que o método desenvolvido por CPC para o enriquecimento das PMF presentes no extrato de *n*-hexano de *A. conyzoides* também era adequado para o isolamento da substância 5'-MeONB, uma alíquota da FEPMF-Ac (370,3 mg) foi submetida à análise de CPC, desenvolvida no modo de eluição ascendente, utilizando o sistema bifásico de solventes *n*-hexano-acetato de etila-etanol-água (1:1:1:1), previamente separado em funil de separação como fases superior (FS) e inferior (FI). A amostra dissolvida em 10 mL da mistura de FS-FI 1:1 foi injetada no sistema em seringa de vidro. Inicialmente realizou-se o preenchimento do sistema com a FE, que nesta análise tratava-se da FI, a um fluxo de 30 mL/min, com rotação de 500 RPM, durante 10 minutos. Após este período, a FS móvel começou a ser bombeada através da FE, a um fluxo de 8 mL/min e rotação de 2000 RPM até que as mesmas atingissem a condição de equilíbrio no sistema, sendo obtido após 9 minutos com 71,70 % de retenção da FE. Consequentemente, deu-se início ao processo cromatográfico com a injeção da amostra e bombeamento da FM durante 60 minutos, realizando-se a coleta de 3 mL/fração. Posteriormente, a FS foi bombeada a uma taxa de fluxo de 30 mL/min, a 2000 rpm, durante 12

minutos, para a etapa de extrusão, com uma coleta de 15 mL/fração. As frações eluídas de CPC foram monitoradas a 275 e 330 nm, produzindo 118 frações.

As frações eluídas foram avaliadas quanto ao seu perfil cromatográfico por CCD e reunidas em três frações principais de acordo com a identificação preliminar da substância 5'-MeONB isolada.

4.8.1.1 Identificação e determinação da pureza do marcador 5'-MeONB

Para a identificação da estrutura e confirmação do isolamento do marcador 5'-MeONB, a substância de foi submetida à análise espectroscópica de RMN ^1H . O experimento de RMN ^1H foi desenvolvido em equipamento Bruker[®] modelo *Fourier 300* (300 MHz), sendo os dados adquiridos (FID) processados em *software* TopSpin 3.5 e os resultados comparados com dados disponíveis na literatura.

Adicionalmente, para a confirmação da estrutura e determinação da pureza da substância isolada utilizou-se como ferramenta a espectrometria de massas, cujos experimentos foram desenvolvidos em espectrômetro de massas Waters[®] modelo *Xevo G2-S QToF*, conforme as condições experimentais descritas no item 4.6. Para a aquisição e interpretação dos dados utilizou-se o *software* MassLynx 4.1.

4.8.2 Animais

Para a realização dos experimentos foram utilizados ratos da linhagem *Wistar*, machos adultos, com massa corporal variando entre 280 e 320 g, assim como camundongos da linhagem *Swiss* fêmeas adultos, com massa corporal variando entre 25-35 g provenientes do Biotério Central da UFSC, mediante aprovação do projeto pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) (protocolo 9838290719). Após o recebimento os animais foram mantidos no biotério de ratos e camundongos, separadamente, do Laboratório de Neurobiologia da Dor e da Inflamação (LANDI), acondicionados em caixas, aclimatizados com temperatura controlada de 22 ± 2 °C, 60 – 80% de umidade, em ciclo claro/escuro de 12 horas (luzes acesas às 6:00 h) e mantidos com água e comida *ad libitum*.

Para a realização dos experimentos de farmacocinética na qual a substância foi administrada pela via oral, os ratos permaneceram em jejum *overnight* (12 h) e os camundongos em jejum de 3 h. Ambas espécies receberam água e alimento, 2 h e 4 h após a administração da

substância, respectivamente. Esse período de jejum foi necessário para minimizar a variação da absorção nos animais.

4.8.3 Avaliação do efeito antinociceptivo do marcador 5'-MeONB

O efeito antinociceptivo da substância 5'-MeONB, marcador químico da FEPMF-Ac, foi avaliado utilizando o modelo de nocicepção induzido por formalina, conforme o procedimento descrito previamente no item 4.9.3. Para a avaliação deste modelo utilizou-se camundongos *Swiss* fêmeas.

Inicialmente, os animais foram tratados com 5'-MeONB (10-100 mg/kg, i.g.) dissolvida em solução salina contendo 5% de *tween* 80, 1 h antes da injeção de formalina na pata traseira direita, a fim de estabelecer-se a curva dose-resposta. Os animais pertencentes ao grupo controle foram tratados com veículo (10 mL/kg, gavagem oral) 1 h antes da injeção de formalina.

Posteriormente, avaliou-se o decurso temporal do efeito antinociceptivo da 5'-MeONB no experimento de nocicepção induzida por formalina. Os animais foram pré-tratados por via oral com uma dose de 100 mg/kg de 5'-MeONB (ou 10 mL/kg de veículo) nos tempos de 15, 30, 60, 180 e 360 minutos antes da injeção de formalina. Como parte dos animais utilizados nesse experimento teve seu sangue coletado para a avaliação da farmacocinética de 5'-MeONB, utilizou-se uma solução contendo PEG (polietilenoglicol) 400 e DMSO (dimetilsulfóxido) (80:20) (v/v) como veículo do teste para solubilizar a 5'-MeONB antes da administração oral.

4.8.4 Método bioanalítico para quantificação de 5'-MeONB em plasma por UPLC-MS

A concentração de 5'-MeONB nas amostras de plasma provenientes do estudo de farmacocinética foi realizada conforme o método bioanalítico desenvolvido e validado em cromatógrafo Waters[®], modelo *Acquity H-Class UPLC* acoplado a um espectrômetro de massas *Xevo G2-S QToF* (FAQUETI *et al.*, 2020).

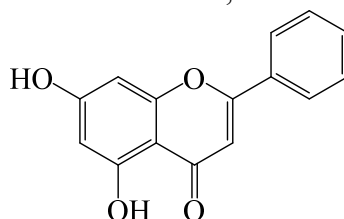
Alcançou-se a separação cromatográfica utilizando coluna *Thermo Scientific Hypersil Gold[®] C₁₈* (50 x 2,1 mm; 1,9 µm) acoplada à uma pré-coluna *Phenomenex[®] AJO-4287* e mantidas à 40 °C. A fase móvel consistiu em um sistema gradiente contendo água acidificada com ácido fórmico 0,1% (pH 3,0) (A) e acetonitrila (B) em um fluxo constante de 0,35 mL/min, nas seguintes condições: 0-2 min, 55% A; 2-2.1 min, 55-5% A; 2.1-6 min, 5% A; 6-6.1 min, 5-95% A, sendo o mesmo mantido por 3 minutos para o condicionamento do sistema

cromatográfico às condições iniciais de separação. As amostras foram conservadas no injetor automático à 8 ± 1 °C e injetadas no sistema cromatográfico utilizando-se 3 μ L de amostra.

O processo de nebulização foi aplicado no modo positivo, nas seguintes condições: voltagem do capilar de ionização de 3 kV; voltagem do cone de 40 V; voltagem offset da fonte de 80 V; temperatura da fonte de 80 °C; temperatura de dessolvatação de 400 °C; fluxo de gás do cone de 50 L/h; fluxo do gás de dessolvatação de 900 L/h. Os dados de EM foram adquiridos em modo centroide, *full-scan*, em um arranjo de massa entre 250 e 600 Da com tempo de aquisição de 0,7 s. Realizou-se a correção dos dados espectrométricos, durante a aquisição, por meio da infusão direta do padrão de referência externa leucina encefalina, em intervalos de 60 segundos, com tempo de aquisição de 0,2 s.

A integração das áreas dos picos de 5'-MeONB e crisina, utilizado como padrão interno, (Figura 15) foi estabelecida realizando-se os cromatogramas do íon extraído, com massa exata de m/z 433.1475 e m/z 255.0657, respectivamente, considerando uma tolerância de até 5 ppm. Para a aquisição e interpretação dos dados utilizou-se o *software* MassLynx 4.1 e sua ferramenta QuanLynx.

Figura 15 - Estrutura química da substância crisina, utilizada como padrão interno.



4.8.4.1 Preparação das amostras de solução estoque, padrões de calibração e controle de qualidade

As soluções estoques de 5'-MeONB e do padrão interno crisina foram preparadas em acetonitrila nas concentrações de 400 e 50 μ g/mL, respectivamente. A partir da solução contendo 400 μ g/mL de 5'-MeONB foram realizadas diluições em acetonitrila nas concentrações de 150, 300, 750, 1950, 2550 e 3750 ng/mL utilizadas para o preparo da curva de calibração. Em triplicata, transferiu-se 20 μ L de cada solução diluída para um microtubo contendo 80 μ L de plasma de rato, obtendo-se as concentrações finais da curva de calibração: 30, 60, 150, 390, 510 and 750 ng/mL.

As amostras de controle de qualidade (CQ) nos níveis baixo (90 ng/mL), médio (360 ng/mL) e alto (600 ng/mL), foram preparadas similarmente a partir de soluções diluídas a 450, 1800 e 3000 ng/mL. A solução de padrão interno crisina foi diluída na concentração de 1500 ng/mL.

Anteriormente as análises cromatográficas, as amostras da curva de calibração e controle de qualidade foram submetidas a um processo de precipitação de proteínas por meio da adição de 200 µL de solução de crisina a 1500 ng/mL, resultando na concentração final de crisina na amostra equivalente a 1000 ng/mL. As amostras foram homogeneizadas em agitador vórtex durante um minuto e centrifugadas (Sigma 2K15, Sigma Laboratory Centrifuges®) a 12000 rpm durante dez minutos a 4 ± 1 °C. O sobrenadante centrifugado foi acondicionado em vials e injetado no sistema cromatográfico.

4.8.4.2 Parâmetros bioanalíticos de mérito do método

O método bioanalítico desenvolvido para quantificação de 5'-MeONB em amostras de plasma foi validado segundo os parâmetros definidos pela agência de regulamentação americana (FDA, 2018), e inclui a determinação da seletividade, linearidade, limite de quantificação (LQ), precisão, exatidão, efeito matriz, recuperação, estabilidade, efeito residual (*carryover*) e integridade de diluição.

4.8.4.2.1 Seletividade

A seletividade do método bioanalítico foi investigada em relação à possível interferência de substâncias presentes na matriz na determinação de 5'-MeONB e crisina. Dessa forma, cromatogramas dos íons extraídos m/z 433.1494 (5'-MeONB) e m/z 255.0657 (crisina) de amostras de plasma branco foram comparados aos cromatogramas obtidos das amostras da curva de calibração a 30 ng/mL, assim como aos cromatogramas do plasma dos animais tratados com 5'-MeONB (2 mg/kg i.v.).

4.8.4.2.2 Linearidade e limite de quantificação (LQ)

Com o objetivo de determinar a linearidade, preparou-se em triplicata a curva de calibração em seis níveis de concentração, variando de 30 a 750 ng/mL. Calculou-se a curva de

calibração em plasma utilizando análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, baseado na razão entre as áreas dos picos de 5'-MeONB e de crisina versus a concentração de 5'-MeONB, obtendo-se os valores de inclinação (*a*), interceptação (*b*) e coeficiente de determinação (R^2). Adicionalmente, a variância da linearidade da curva foi avaliada pelo teste de ANOVA. O limite de quantificação (LQ) foi estabelecido como o menor valor de concentração testado na curva de calibração com precisão e exatidão superior a 20%.

4.8.4.2.3 Precisão e exatidão

Avaliou-se a precisão do método por meio da determinação da repetibilidade (intradia) e precisão intermediária (interdia) em amostras de CQ nos três níveis de concentração (90, 360 e 600 ng/mL) e do LQ (30 ng/mL), realizadas em quintuplicata e em três dias consecutivos. Calculou-se o DPR entre as réplicas, sendo a precisão intermediária estimada como o DPR entre todos os valores obtidos nos três dias consecutivos ($n = 15$) para as amostras de CQ e LQ. A exatidão do método foi verificada comparando-se as concentrações nominal e a experimental obtidas na determinação da precisão de cada amostra. Os critérios de aceitação para exatidão e precisão foram $\pm 15\%$ de desvio para determinações de CQ e $\pm 20\%$ de desvio para o LQ.

4.8.4.2.4 Recuperação e efeito matriz

A recuperação (eficiência de extração) e efeito matriz do método foram estabelecidos utilizando-se as áreas dos picos de 5'-MeONB e crisina, extraídas dos cromatogramas das amostras de CQ nos três níveis de concentração. A recuperação de 5'-MeONB e crisina foi determinada comparando-se as áreas dos picos em amostras de CQ usuais (as soluções de 5'-MeONB e crisina são adicionadas antes do procedimento de desproteínização) com amostras de CQ preparadas com plasma desproteínizado antes da adição de 5'-MeONB e crisina nas concentrações correspondentes. Além deste, comparou-se a recuperação dos analitos em amostras preparadas utilizando plasma hemolisado.

Avaliou-se o efeito matriz dividindo-se a área do pico de cada analito (5'-MeONB e crisina) obtida nos cromatogramas de amostras preparadas em plasma (amostras de CQ) e em solução de acetonitrila, ambos preparados em quintuplicata nas concentrações de 90, 360 e 600 ng/mL. O coeficiente de variação da recuperação e efeito matriz não pode exceder 15%.

4.8.4.2.5 Estabilidade

A avaliação preliminar da estabilidade de 5'-MeONB no plasma de ratos foi determinada em amostras de CQ inferior e superior (90 e 600 ng/mL), preparadas em triplicata. A estabilidade foi investigada após 30 dias de estocagem a -80 ± 2 °C. Além disso, amostras já processadas e mantidas no amostrador automático do cromatógrafo por 12 horas a 8 ± 1 °C também foram avaliadas quanto à sua estabilidade. Aceita-se desvios de $\pm 15\%$ da concentração nominal em cada nível para a determinação da estabilidade.

4.8.4.2.6 Efeito residual

O efeito residual (*carryover*) foi investigado baseado na observação dos cromatogramas de cinco amostras contendo apenas acetonitrila, após a injeção sucessiva de cinco amostras da maior concentração da curva de calibração (750 ng/mL). O efeito residual não pode exceder 20% do LQ para o analito e 5% para o padrão interno.

4.8.4.2.7 Diluição

Durante o processo de validação a integridade da diluição costuma ser investigada com o objetivo de garantir a quantificação das amostras provenientes do estudo farmacocinético cujas concentrações estejam acima do limite superior da curva de calibração. Dessa forma, avaliou-se um processo de diluição 1/10 por meio da determinação de cinco amostras a 300 ng/mL, preparadas diluindo-se com acetonitrila soluções independentes preparadas a 3000 ng/mL em plasma. A exatidão e o DPR entre as concentrações experimental e nominal foram determinados.

4.8.5 Estudo farmacocinético pré-clínico

O estudo farmacocinético foi conduzido no Laboratório de Neurobiologia da Dor e da Inflamação (LANDI), pertencente ao departamento de Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências Biológicas (CCB – UFSC), sob orientação da professora Dra. Teresa Cristina Dalla Costa, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e com a colaboração do pós-doutorando

Layzon Antônio da Silva e da veterinária, do departamento de Farmacologia, Luciana Honorato.

4.8.5.1 Preparação das doses de 5'-MeONB

A solução de 5'-MeONB para administração intravenosa (i.v.) e oral usada no ensaio de farmacocinética foi preparada em PEG 400-DMSO (80:20, v/v), seguido por sonicação em ultrassom por 5 minutos. A solução para administração i.v. foi filtrada através de uma membrana microporosa de 0,45 µm (Tedia Company, Inc., Ohio, Estados Unidos) antes da administração.

4.8.5.2 Farmacocinética em ratos

Com o objetivo de avaliar a farmacocinética da substância 5'-MeONB em ratos, foram utilizados ratos *Wistar* machos para as administrações oral e intravenosa (i.v.), divididos em dois grupos. Os animais acordados foram tratados com uma dose única de 5'-MeONB 10 mg/kg (n = 3) i.v. *bolus* na veia caudal ou 50 mg/kg (n = 7) por gavagem oral.

A coleta das amostras de sangue e administração da substância na veia caudal foi realizada com o auxílio de um acesso venoso periférico (*Angiocath*[®], azul, modelo 22G x 1,00", BD[®]) inserido em uma das veias caudais laterais dos animais. Para tal, os animais foram imobilizados com ajuda de uma flanela para indução anestésica com isoflurano (solução para inalação) e propilenoglicol (30:70) (v/v). Com os animais posicionados em decúbito lateral, manteve-se a cauda imersa em água aquecida, favorecendo a dilatação das veias caudais, até a perda do reflexo protetor. Após o bloqueio anestésico, a veia foi cateterizada com o cateter, sendo inserido 100 µL de solução salina contendo 2% de heparina (5.000 UI/mL) para impedir a obstrução do cateter. Para impedir a perda de sangue no cateter, foi acoplado um adaptador do tipo PRN ao cateter, sendo o mesmo coberto com esparadrapo. Os animais que receberam a substância pela via intravenosa foram cateterizados em ambos lados da veia lateral, sendo o cateter utilizado para administração da substância imediatamente removido após a administração.

A administração por via oral e i.v. da substância foi realizada após a eliminação do anestésico e conseqüentemente retomada de consciência dos animais, para evitar possíveis

alterações dos parâmetros farmacocinéticos em estudo. Cada grupo recebeu uma única dose de 5'-MeONB, administrada no cateter (via i.v.) ou gavagem (via oral).

Aproximadamente 300 μL de sangue foram coletados, pelo cateter posicionado na veia caudal lateral, em microtubos heparinizados contendo 10 μL de heparina (5.000 UI/mL), nos tempos de 5, 10, 30, 45, 60, 120, 240, 360 e 480 minutos após a administração da substância pela via i.v. e nos tempos de 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 340 e 480 minutos após a administração pela via oral. Em seguida a coleta de sangue em cada um dos tempos estabelecidos, administrou-se 100 μL de solução salina estéril e 100 μL de heparina 2% no acesso venoso para a reposição do volume de sangue coletado e limpeza do cateter.

O plasma foi separado por centrifugação (Sigma 2K15, Sigma Laboratory Centrifuges[®]) durante 15 minutos a 3500 rpm e $4 \pm 1^\circ\text{C}$, e armazenado a $-80 \pm 2^\circ\text{C}$ até a análise. As amostras de plasma (100 μL) foram desproteinizadas e processadas de acordo com o item 4.9.1.1 antes das injeções.

4.8.5.3 Farmacocinética em camundongos

A fim de se avaliar a farmacocinética de substância 5'-MeONB em camundongos, quarenta camundongos *Swiss* fêmeas foram usados para administração oral de 5'-MeONB, divididos em 10 grupos contendo 4 animais/tempo. Os animais foram tratados com uma dose oral única de 100 mg/kg 5'-MeONB por gavagem e eutanaziados em pontos de tempo predeterminados (5, 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 420 e 480 minutos) após a administração oral. As amostras de sangue foram coletadas em microtubos heparinizados e o plasma foi separado por centrifugação a 3500 rpm, $4 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 min e armazenado a $-80 \pm 2^\circ\text{C}$ até a análise UPLC-MS, conforme as condições descritas no item 4.9.11.

4.8.6 Análise dos dados farmacocinéticos

4.8.6.1 Análise não compartimental

A análise não compartimental (ANC) dos perfis individuais dos ratos e dos perfis médios dos camundongos foi realizada com o *software* Microsoft Excel 2013. Os parâmetros farmacocinéticos determinados incluíram a taxa constante de eliminação (λ), tempo de meia-vida de eliminação e absorção ($t_{1/2}$), a área sob a curva de concentração-tempo (AUC) calculada

pela regra trapezoidal linear, o tempo de residência médio (MRT), o tempo médio de absorção (MAT), a depuração total, ou *clearance* (CL), o volume de distribuição no estado estacionário (V_{dss}) e a biodisponibilidade absoluta (F_{oral}) (SHARGEL; ANDREW; WU-PONG, 2012).

4.8.6.2 Análise farmacocinética populacional

A modelagem farmacocinética populacional (popPK) foi realizada utilizando o *software* NONMEM 7.0 (ICON development solutions, Dublin, Irlanda) e o pacote PREDPP (ADVAN4, TRANS4). Um total de 40 observações derivadas de 40 camundongos e 93 observações derivadas de 10 ratos foram incluídas no conjunto de dados. Em relação à natureza esparsa dos dados, a abordagem *naïve pooling* (NPA) foi selecionada para a análise farmacocinética. Nessa abordagem, é pressuposto que todos os dados são de um único sujeito experimental, permitindo estimar o perfil farmacocinético típico e parâmetros caracterizados pelo modelo estrutural e erros residuais, em uma primeira análise exploratória.

As concentrações de 5'-MeONB obtidas foram transformadas em escala logarítmica e vários modelos estruturais foram avaliados por meio da comparação de valor de função objetivo, do inglês *objective function value*, e da avaliação visual dos gráficos de adequação. Para melhor descrever os dados, foram selecionados os modelos de dois compartimentos em ratos e de um compartimento em camundongos, com eliminação de primeira ordem e erro residual proporcional para as concentrações plasmáticas.

4.8.7 Estudo farmacocinético *in silico*

As propriedades físico-químicas e farmacocinéticas de 5'-MeONB foram previstas utilizando o *software* ADMET Predictor versão 9.5 e a ferramenta MedChem Designer (Simulation Plus, Lancaster, Califórnia, Estados Unidos).

4.8.8 Análise estatística

Os parâmetros farmacocinéticos determinados pela ANC após a administração i.v. e oral em ratos foram comparados estatisticamente por meio do teste t de Student ($\alpha = 0,05$).

Os resultados da atividade antinociceptiva são apresentados como média \pm E.P.M. A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando análise de variância (ANOVA) de uma

via seguido pelo teste de Bonferroni para os resultados obtidos na curva dose-resposta e o teste t de Student para comparação entre os grupos no experimento do decurso temporal do efeito antinociceptivo. Para todos os casos, os valores de p foram considerados estatisticamente significativos apenas quando inferior a 0,05. Os cálculos estatísticos foram realizados utilizando o *software* GraphPad Prism versão 9.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO

Com o intuito de obter-se grandes quantidades das PMF de interesse, procedeu-se a extração a partir das partes aéreas de *A. conyzoides*, visto que trabalhos anteriores demonstraram a presença dessas substâncias tanto nos caules, quanto nas folhas e flores dessa espécie (BOSI *et al.*, 2013). Para o estudo da otimização do processo de extração das PMF presentes nas partes aéreas de *A. conyzoides* foram preparadas oito combinações extrativas diferentes, variando-se o solvente extrator e o método de extração. Os resultados do rendimento de extração (biomassa), expressos em porcentagem referente a massa inicial corrigida pelo teor de umidade das partes aéreas secas utilizadas, estão apresentados na Tabela 1.

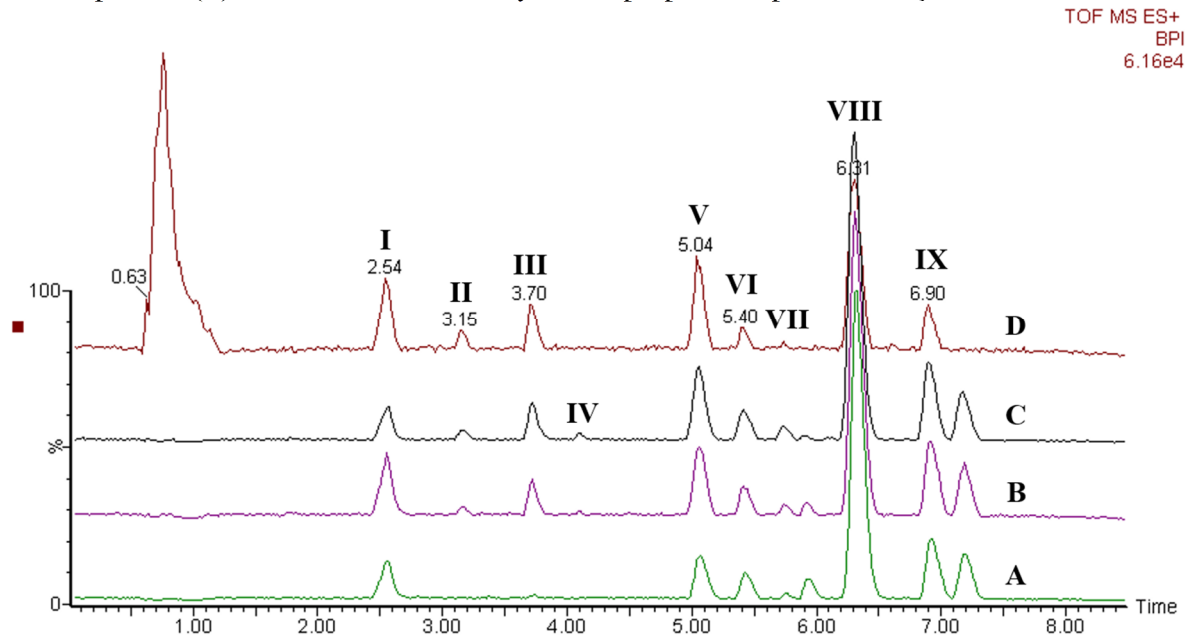
Tabela 1 - Rendimento de extração dos diferentes extratos obtidos na otimização do processo de extração das polimetoxiflavonas de *A. conyzoides*.

Solvente extrator	Método de extração	
	Maceração estática	Aparato Soxhlet
<i>n</i> -hexano	1,359 %	4,816 %
Diclorometano	2,156 %	6,903 %
Acetato de etila	3,764 %	4,641 %
Metanol	20,235 %	18,699 %

Ao observar-se os valores de rendimento de extração (Tabela 1) é possível considerar que o método de extração em aparato de Soxhlet apresentou maiores rendimentos de extração, enquanto que o solvente extrator parece ter menor influência sobre o resultado, com exceção para o solvente extrator metanol que apresentou os maiores valores de rendimento de extração. Era esperado que o metanol apresentasse os melhores rendimentos de extração, visto que solventes com lipofilicidade intermediária, como metanol e etanol, tendem a extrair uma ampla faixa de metabólitos secundários em materiais vegetais e conseqüentemente apresentarem maiores rendimentos de extração, resultando em uma maior complexidade de fracionamento e isolamento dos metabólitos de interesse.

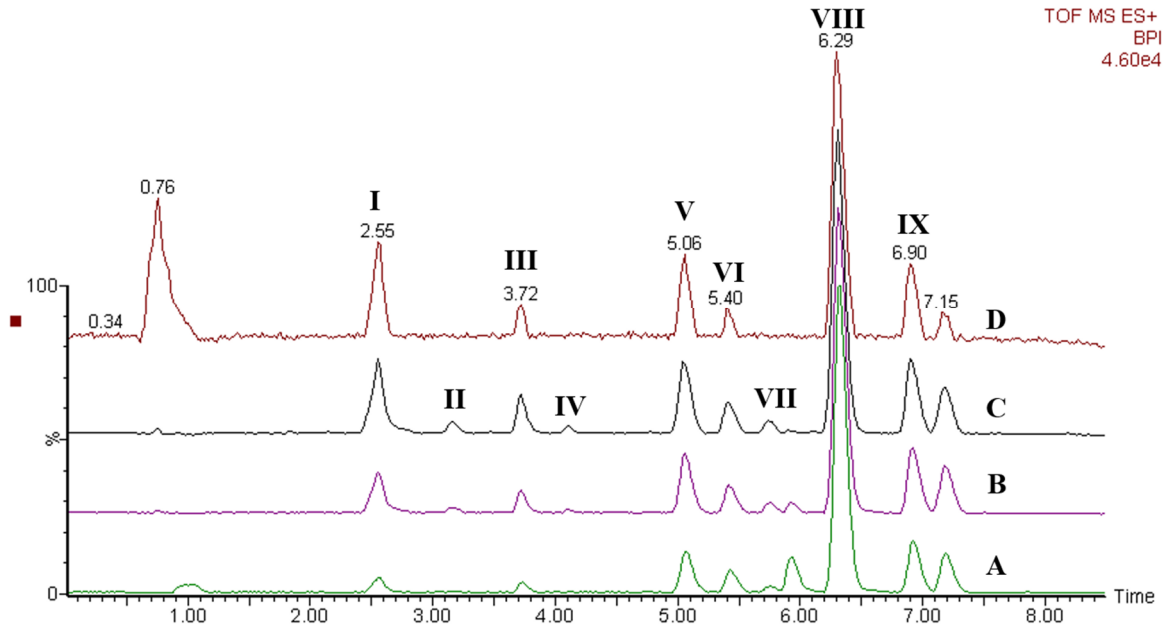
Para tanto, a complexidade química e o teor de PMF nas preparações obtidas foi avaliada por UPLC-MS, permitindo analisar de forma mais efetiva os extratos. Os perfis cromatográficos das preparações obtidas por maceração e em aparato Soxhlet estão representados, respectivamente, nas Figuras 16 e 17.

Figura 16 - Análise comparativa entre os cromatogramas de intensidade de pico base (BPI) obtidos por *ESI(+)* dos extratos de *A. conyzoides* preparados por maceração estática.



(A) extrato *n*-hexano; (B) extrato diclorometano; (C) extrato de acetato de etila; (D) extrato de metanol; (I) cumarina; (II) ageconiflavona C; (III) 3'-hidroxi-5,6,7,8,4',5'-hexametoxiflavona; (IV) 7-hidroxi-5,6,8,5'-tetrametoxi-3',4'-metilenedioxiflavona; (V) 5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavona; (VI) nobiletina; (VII) linderoflavona B; (VIII) 5'-metoxinobiletina; (IX) eupalestina.

Figura 17 - Análise comparativa entre os cromatogramas de intensidade de pico base (BPI) obtidos por *ESI(+)* dos extratos de *A. conyzoides* preparados em aparato de Soxhlet.



(A) extrato *n*-hexano; (B) extrato diclorometano; (C) extrato de acetato de etila; (D) extrato de metanol; (I) cumarina; (II) ageconiflavona C; (III) 3'-hidroxi-5,6,7,8,4',5'-hexametoxiflavona; (IV) 7-hidroxi-5,6,8,5'-tetrametoxi-3',4'-metilenedioxiflavona; (V) 5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavona; (VI) nobiletina; (VII) linderoflavona B; (VIII) 5'-metoxinobiletina; (IX) eupalestina.

Conforme demonstrado nos cromatogramas, os extratos obtidos apresentam de forma geral um perfil cromatográfico similar, contudo observa-se a diminuição da intensidade de alguns picos com maior tempo de retenção nos extratos obtidos utilizando-se como solvente extrator metanol e acetato de etila.

Adicionalmente, o método analítico desenvolvido possibilitou uma boa resolução entre os sinais analíticos facilitando a identificação das substâncias presentes nos extratos. Análises qualitativas permitiram identificar a presença de onze PMF nas preparações extrativas analisadas. A identificação dos picos referentes as PMF baseou-se nos valores de massa monoisotópica m/z e no perfil espectral de MS, assumindo-se uma tolerância de 5 ppm entre a massa teórica e a fórmula molecular proposta, assim como comparando-se os dados de UPLC-MS com os padrões disponíveis e as informações bibliográficas (FAQUETI; SANDJO; BIAVATTI, 2017). As substâncias identificadas, compreendendo os tempos de retenção, fórmula molecular e massa monoisotópica experimental são descritas na Tabela 2.

Tabela 2 - Substâncias identificadas por *ESI(+)*Q-Tof nos extratos de *A. conyzoides*, obtidos na etapa de otimização do processo de extração.

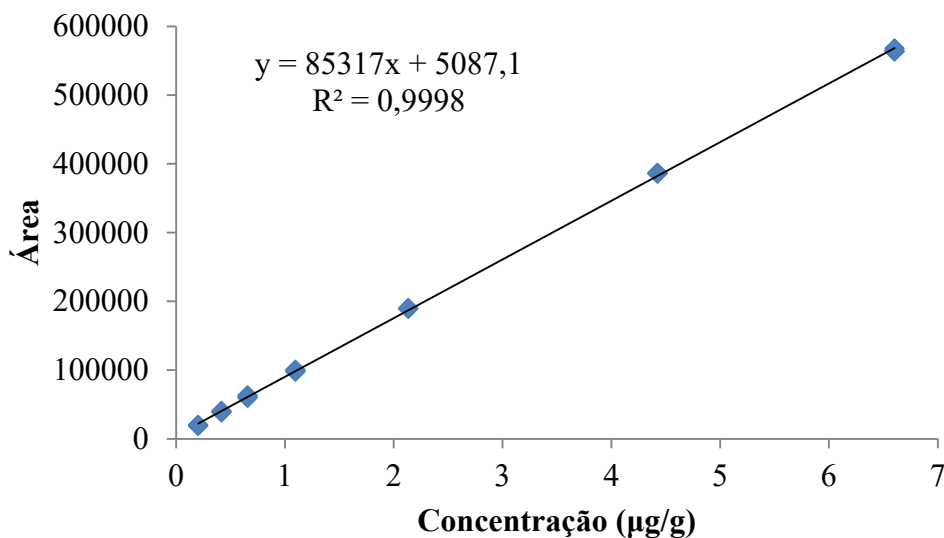
Substância	t_R (min)	Fórmula molecular	m/z [M+H] ⁺ (erro, ppm)	Estrutura química
cumarina (1,2-benzopirona)	2,55	C ₉ H ₇ O ₂	147,0441 (-3,4)	(46)
ageconiflavona C	3,16	C ₂₀ H ₂₀ O ₈	389,1218 (-4,6)	(32)
3'-hidroxi-5,6,7,8,4',5'-hexametoxiflavona	3,72	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	419,1323 (-4,5)	(34)
7-hidroxi-5,6,8,5'-tetrametoxi-3',4'-metilenodioxiflavona	4,09	C ₂₀ H ₁₈ O ₉	403,1015 (-3,5)	(36)
sinensetina	4,43	C ₂₀ H ₂₀ O ₇	373,1284 (-0,8)	(29)
PMF com perfil de substituição dihidroxi-tetrametoxiflavona	4,63	C ₁₉ H ₁₈ O ₈	375,1071 (-2,4)	-
5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavona	5,06	C ₂₁ H ₂₂ O ₈	403,1375 (-4,5)	(26)
nobiletina	5,40	C ₂₁ H ₂₂ O ₈	403,1380 (-3,2)	(28)
linderoflavona B	5,73	C ₂₀ H ₁₈ O ₈	387,1063 (-4,4)	(24)
PMF com perfil de substituição dihidroxi-trimetoxiflavona	6,10	C ₁₈ H ₁₆ O ₇	345,0972 (-0,6)	-
5'-metoxinobiletina	6,29	C ₂₂ H ₂₄ O ₉	433,1483 (-3,7)	(27)
eupalestina	6,90	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	417,1166 (-4,8)	(25)

t_R : tempo de retenção

Entre as PMF identificadas observa-se que a 5'-MeONB trata-se da substância em maior intensidade nos cromatogramas, sendo selecionada como marcador para avaliar-se o teor de PMF nos extratos. A análise quantitativa para a determinação do teor de 5'-MeONB nos extratos foi realizada a partir de curva analítica construída em sete níveis de concentração, sob o mesmo método descrito no item 4.2.1.1.

A curva de calibração da 5'-MeONB (Figura 18) é representada pela equação $y = 85317x + 5087,1$, com coeficiente de correlação (R) de 0,9999 e coeficiente de determinação (R^2) de 0,9998, na faixa linear de 0,20 – 7,0 $\mu\text{g/g}$. Indicando um bom ajuste linear e que os resultados de quantificação obtidos foram diretamente proporcionais à concentração do analito em um determinado intervalo de variação.

Figura 18 - Curva de calibração para 5'-metoxinobiletina em função da Área X Concentração.



Utilizando a equação de reta obtida a partir da curva de calibração foi possível calcular o teor de 5'-MeONB (expresso em $\mu\text{g/g}$ de extrato seco) nas diferentes preparações, cujos valores estão apresentados na Tabela 3 e representados na Figura 19.

A análise de variância (ANOVA) de duas vias, em um intervalo de confiança de 95%, do teor de 5'-MeONB nas preparações extrativas demonstra que o tipo de extração ($F_{\text{calculado}(1;15)}=523,4$ [$p<0,0001$] maior que $F_{\text{crítico}}=4,54$) bem como o solvente extrator ($F_{\text{calculado}(3;15)}=432,0$ [$p<0,0001$] maior que $F_{\text{crítico}}=3,29$) exercem influência sob a concentração de 5'-MeONB, e que o tipo de extração e o solvente extrator utilizados interferem em 24,57% e 60,84% na concentração do marcador, respectivamente.

A aplicação do pós-teste de Bonferroni, em um intervalo de confiança de 95%, para as comparações múltiplas entre os solventes extratores revelou que existe diferença estatística no teor de 5'-MeONB entre os mesmos quando avaliados separadamente no método de extração por maceração quanto em aparato Soxhlet, com exceção da comparação entre os extratos de *n*-hexano e acetato de etila obtidos por maceração, o qual não apresentou diferença estatística. Quando comparados os tipos de extração, o pós-teste de Bonferroni indicou que existe diferença

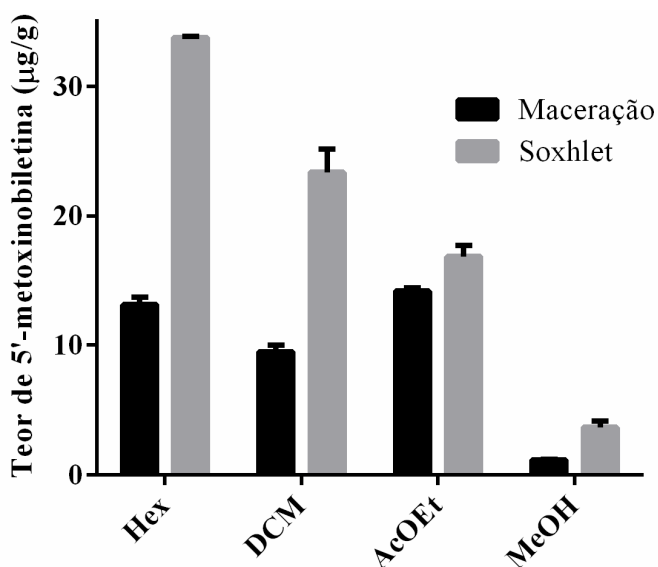
estatística entre todos os extratos preparados por maceração e por aparato Soxhlet obtidos no mesmo solvente extrator.

Tabela 3 - Teor de 5'-metoxinobiletina por UPLC-MS das diferentes combinações extrativas obtidas na otimização do processo de extração das polimetoxiflavonas de *A. conyzoides*.

Solvente extrator	Método de extração	
	Maceração estática	Aparato Soxhlet
<i>n</i> -hexano	13,11 ± 0,96	33,75 ± 0,17
Diclorometano	9,49 ± 0,88	23,37 ± 2,55
Acetato de etila	14,23 ± 0,40	16,89 ± 1,45
Metanol	1,17 ± 0,06	3,68 ± 0,85

Os valores foram expressos como a média ± desvio padrão (n=3) de µg de 5'-metoxinobiletina/g de extrato seco.

Figura 19 - Análise comparativa do teor de 5'-metoxinobiletina por UPLC-MS das diferentes combinações extrativas obtidas na otimização do processo de extração das polimetoxiflavonas de *A. conyzoides*.



Hex: *n*-hexano; DCM: diclorometano; AcOEt: acetato de etila; MeOH: metanol.

A comparação entre o teor de 5'-MeONB nos diferentes extratos (Figura 19) suportado pelos resultados da análise estatística, permitem inferir que a extração por aparato de Soxhlet apresenta uma melhor eficiência de extração, assim como um melhor rendimento de extração quando comparado ao método de extração por maceração. O fato da amostra ser repetidamente colocada em contato com as porções livres do solvente, ajudando assim a mover o equilíbrio de transferência, e a temperatura do sistema permanecer relativamente alta são as principais vantagens da extração desenvolvida em aparato Soxhlet e possivelmente tais fatores estão envolvidos na obtenção dos melhores resultados de rendimento e teor do marcador alcançados

na utilização desse método para a extração das PMF de *A. conyzoides*, quando avaliado pelo teor de 5'-MeONB (DE CASTRO; GARCIA-AYUSO, 1998).

Uma preocupação importante quando utiliza-se altas temperaturas para a extração de materiais vegetais é quanto à estabilidade das substâncias, entretanto se observa que a temperatura utilizada na extração em aparato Soxhlet não interferiu nos constituintes extraídos uma vez que o perfil cromatográfico das amostras extraídas nesse aparato é bastante semelhante ao perfil cromatográfico das amostras extraídas por maceração à temperatura ambiente.

Entre os solventes utilizados na otimização do método de extração, os solventes *n*-hexano e diclorometano apresentaram as maiores concentrações do marcador 5'-MeONB. Visto que os mesmos possuem um caráter mais lipofílico e dessa forma facilitam a extração de moléculas orgânicas lipossolúveis, como as PMF (LogP entre 2,90 e 3,40), já se esperava que estes solventes apresentassem os melhores resultados. Complementarmente, a literatura recomenda a utilização de hexano como solvente para a extração de outras PMF (GONZÁLEZ *et al.*, 1991b; WANG *et al.*, 2005).

Dessa forma, considerando-se os resultados de rendimento de extração e do teor de 5'-MeONB nos extratos obtidos, somado ao fato do alto risco toxicológico e ambiental do solvente diclorometano (TEAF, 2000; SCHLOSSER *et al.*, 2015), selecionou-se como as melhores condições para a extração das PMF nas partes aéreas de *A. conyzoides* o uso de *n*-hexano como solvente extrator utilizando o método de extração em aparato Soxhlet.

5.2 OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO

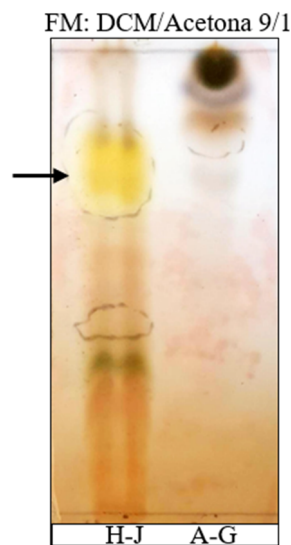
A partir do processo de extração otimizado das partes aéreas de *A. conyzoides* foi possível obter 33,6 g de extrato bruto proveniente do material vegetal coletado em 2016. Aliquotas deste extrato foram submetidas a processos de fracionamento a fim de padronizar-se um processo rápido e eficiente da FEPMF-*Ac*.

A partição líquido-líquido é considerada uma ferramenta simples para a remoção de graxas, ceras e outras substâncias lipofílicas de extratos vegetais, a qual consiste na separação entre duas fases não miscíveis, geralmente água e hexano. Entretanto, não foi possível a aplicação desse método no fracionamento do extrato bruto, visto que as PMF apresentam grande afinidade por *n*-hexano e dessa forma não ocorreria a separação entre as mesmas e os interferentes lipofílicos presentes no extrato bruto.

Inicialmente, investigou-se o fracionamento do extrato bruto por cromatografia líquida a vácuo (CLV). Foram obtidas dez frações que foram reunidas conforme o perfil cromatográfico avaliado por CCD, resultando em duas subfrações: A-G (976,4 mg) e H-J (199,7 mg), estando nesta última contidas as PMF de interesse representadas pela mancha de coloração amarelada em destaque na Figura 20.

No entanto, a utilização desta metodologia não demonstrou ser efetiva no isolamento das PMF ao restante das demais substâncias presentes no extrato bruto, na medida que parte das clorofilas e outros contaminantes apresentavam um fator de retenção muito próximo ao das PMF na fase estacionária sílica gel. Além disso, para o fracionamento desta alíquota de extrato foram utilizados 1,5 L de *n*-hexano e acetato de etila, um consumo muito superior à quantidade de solvente utilizada para a purificação da mesma amostra usando a CPC.

Figura 20 - Análise por CCD das subfrações H-J e A-G provenientes do fracionamento do extrato bruto de *n*-hexano por CLV, conforme condições descritas no item 4.4.3.



Revelador: solução de anisaldeído sulfúrico. A seta indica a mancha de coloração amarelada correspondente as polimetoxiflavonas na subfração. Fase móvel: diclorometano-metanol 9:1.

Outra alternativa considerada para o fracionamento do extrato bruto de *A. conyzoides* foi a cromatografia de partição centrífuga. Esta técnica apresenta vantagens quando comparada a outros métodos de separação convencionais, tal como a eliminação do uso de uma fase estacionária sólida, excluindo danos à amostra por conta de adsorção irreversível, assim como recuperação total da quantidade de amostra injetada, baixo risco de desnaturação da amostra, além do baixo consumo de solventes orgânicos, que tornam esta uma alternativa sustentável (BOJCZUK; ŻYŻELEWICZ; HODUREK, 2017).

Alíquotas do extrato bruto de *n*-hexano foram submetidas ao teste de *shake flask* para a determinação do coeficiente de partição (K_D) das PMF nos sistemas bifásicos elencados, seguindo algumas recomendações que a literatura sugere para essa classe de substâncias (ITO, 2005; ISOBE *et al.*, 2006; UCKOO; JAYAPRAKASHA; PATIL, 2011). Os valores de K_D obtidos para os modos de eluição ascendente e descendente das substâncias alvo estão apresentados na Tabela 4.

Com o intuito de alcançar uma resolução eficiente entre as substâncias as quais deseje-se separar no processo cromatográfico, o cálculo do valor de K_D é uma ferramenta importantíssima, pois informa a taxa de transferências das substâncias entre duas fases imiscíveis, permitindo predizer valores como o tempo de retenção das substâncias no sistema. Baixos valores de K_D tendem a diminuir a resolução entre os picos, enquanto que altos valores produzem o alargamento dos picos cromatográficos e excessivos tempos de análise. Para uma separação eficiente por CPC indica-se que o valor de K_D deva estar dentro da faixa aproximada de 0,4 e 2,5 (FRIESEN; PAULI, 2005; SKALICKA-WOŹNIAK; GARRARD, 2014).

Entre os sistemas bifásicos propostos para a separação das outras substâncias presentes no extrato bruto de *A. conyzoides* foram considerados os sistemas terciários contendo *n*-hexano-metanol-água (Hex-MeOH-H₂O); *n*-hexano-acetona-água (Hex-Acetona-H₂O); acetato de etila-acetonitrila-água (AcOEt-ACN-H₂O) e acetato de etila-acetona-água (AcOEt-Acetona-H₂O), assim como os sistemas quaternários contendo *n*-hexano-acetato de etila-metanol-água (Hex-AcOEt-MeOH-H₂O); *n*-hexano-acetato de etila-etanol-água (Hex-AcOEt-EtOH-H₂O) e *n*-hexano-acetato de etila-acetonitrila-água (Hex-AcOEt-ACN-H₂O).

Tabela 4 - Valores de coeficiente de partição (KD) obtidos para os modos de eluição ascendente (ASC) e descendente (DSC) para a cumarina (1,2-benzopirona) e as polimetoxiflavonas majoritárias presentes no extrato bruto de *n*-hexano de *A. conyzoides*, determinados segundo as condições experimentais descritas no item 4.4.3.1.

Sistemas Bifásicos	Valores de K _D das substâncias alvo											
	CUMA		3'-HDX		HEXA		NOBI		5'-MeONB		EUPA	
	ASC	DSC	ASC	DSC	ASC	DSC	ASC	DSC	ASC	DSC	ASC	DSC
Hex-MeOH-H ₂ O (3:3:4)	25,30	0,04	213,41	0,01	60,39	0,02	17,80	0,06	13,36	0,08	5,54	0,18
Hex-MeOH-H ₂ O (3:1:3)	>1000	<0,01	69,39	0,01	9,43	0,11	2,77	0,36	1,36	0,74	0,53	1,87
Hex-Acetona-H ₂ O (3:1:3)	5,93	0,17	37,75	0,03	7,85	0,13	3,38	0,29	1,42	0,70	0,62	1,62
Hex-Acetona-H ₂ O (3:2:4)	14,86	0,07	57,90	0,02	16,21	0,06	8,03	0,12	3,58	0,28	1,67	0,60
Hex-AcOEt-MeOH-H ₂ O (1:0,8:1:1)	5,99	0,17	11,03	0,09	6,01	0,17	4,44	0,22	1,85	0,54	1,08	0,92
Hex-AcOEt-MeOH-H ₂ O (1:1:1,3:1)	18,60	0,05	19,57	0,05	9,63	0,10	5,55	0,18	4,15	0,24	2,57	0,39
Hex-AcOEt-EtOH-H ₂ O (1:0,8:1:1)	8,95	0,12	27,53	0,04	6,47	0,15	4,73	0,21	1,53	0,65	1,98	0,51
Hex-AcOEt-EtOH-H₂O (1:1:1:1)	7,05	0,14	4,75	0,21	3,83	0,26	3,94	0,25	1,72	0,58	1,12	0,89
Hex-AcOEt-EtOH-H ₂ O (1:1:1:0,8)	7,68	0,13	8,22	0,12	5,05	0,20	3,76	0,27	2,37	0,42	1,74	0,57
Hex-AcOEt-EtOH-H ₂ O (0,8:1:1:1)	6,45	0,15	6,00	0,17	3,91	0,25	2,89	0,35	1,93	0,52	1,20	0,83
Hex-AcOEt-EtOH-H ₂ O (1:1:1,3:1)	11,94	0,08	16,47	0,06	9,38	0,11	6,88	0,14	4,82	0,21	3,50	0,29
Hex-AcOEt-EtOH-H ₂ O (0,8:1,2:1:1)	1,34	0,74	2,03	0,49	1,46	0,69	1,17	0,85	0,95	1,05	0,59	1,70
Hex-AcOEt-EtOH-H ₂ O (1:2:1:2)	ND	ND	0,05	21,95	0,12	8,32	0,07	13,63	0,10	10,27	0,04	26,47
Hex-AcOEt-EtOH-H ₂ O (5:6:5:6)	3,19	0,31	1,13	0,89	0,77	1,29	0,61	1,64	0,75	1,34	0,50	1,99
Hex-AcOEt-EtOH-H ₂ O (6:5:6:5)	15,82	0,06	17,83	0,06	9,33	0,11	6,54	0,15	2,31	0,43	2,59	0,39
Hex-AcOEt-ACN-H ₂ O (1:1:1:1)	0,08	12,59	0,06	16,96	0,04	22,75	<0,01	>1000	0,02	38,99	0,02	45,34
Hex-Acetona-EtOH-H ₂ O (1:1:1:1)	ND	ND	125,70	0,01	107,60	0,01	61,65	0,02	70,49	0,02	53,92	0,02
AcOEt-ACN-H ₂ O (3,5:2,5:4)	<0,01	>1000	<0,01	>1000	<0,01	>1000	<0,01	>1000	<0,01	>1000	<0,01	>1000
AcOEt-Acetona-H ₂ O (4:2:4)	ND	ND	0,15	6,64	0,04	26,07	0,03	35,86	0,03	35,65	0,01	67,22

Hex: *n*-hexano; MeOH: metanol; H₂O: água; AcOEt: acetato de etila; EtOH; etanol; ACN: acetonitrila; CUMA: cumarina; 3'-HDX: 3'-hidroxi-5,6,7,8,4',5'-hexametoxiflavona; HEXA: 5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavona; NOBI: nobiletina; 5'-MeONB: 5'-metoxinobiletina; EUPA: eupalestina; ASC: ascendente; DSC: descendente; ND: não detectado.

Comparando-se os resultados dos valores de K_D , os sistemas quaternários contendo Hex-AcOEt-MeOH-H₂O e Hex-AcOEt-EtOH-H₂O apresentaram as melhores resoluções entre as substâncias de interesse, salientando a versatilidade desses sistemas amplamente demonstrada na literatura (FRIESEN; PAULI, 2005; LIU *et al.*, 2018). Nota-se que a substituição de metanol por etanol na composição do sistema, quando utilizados na mesma proporção, não resultou em mudanças relevantes nos valores de K_D das substâncias avaliadas. Conseqüentemente, aplicando-se os princípios de química verde, optou-se por utilizar etanol na composição do sistema de solventes considerando os riscos ocupacionais envolvidos na utilização de metanol, reduzindo os impactos negativos gerados pelo processo de enriquecimento do extrato.

Foram realizadas pequenas alterações na proporção dos solventes do sistema de Hex-AcOEt-EtOH-H₂O, a fim de buscar-se as condições ideais para a obtenção da FEPMF-*Ac*. Quando comparados os valores de K_D das substâncias alvo, no modo de eluição ascendente, entre o sistema contendo (1:1:1:1) da mistura bifásica e os restantes alterados, observa-se que a redução na proporção de acetato de etila ou água ocasiona pequenos aumentos dos valores de K_D , enquanto que o aumento da proporção de etanol acarreta o aumento expressivo dos valores de K_D .

Trabalhando-se no modo de eluição ascendente considera-se que a fase inferior (aquosa) como estacionária, neste caso com a diminuição da polaridade dessa fase gerada pela diminuição da proporção de água ou o aumento da proporção de etanol no sistema, espera-se o aumento da retenção das substâncias no sistema cromatográfico, visto que diminui-se a diferença de polaridade entre as FE e FM.

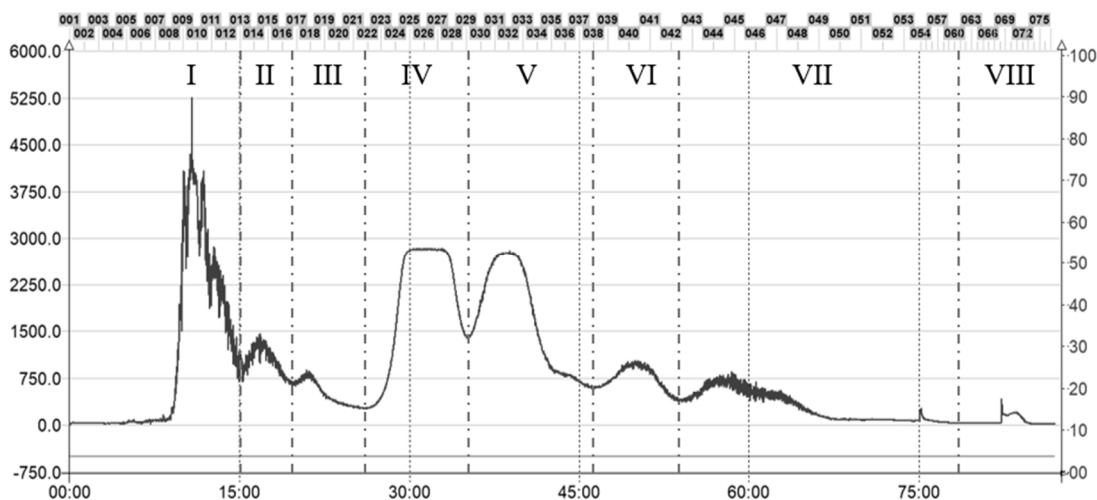
Considerando os valores de K_D para os sistemas bifásicos investigados expostos na Tabela 4, selecionou-se o sistema de solvente com Hex-AcOEt-EtOH-H₂O na proporção de 1:1:1:1 e no modo de eluição ascendente para o fracionamento do extrato bruto de *A. conyzoides*, uma vez que os valores de K_D determinados estão dentro da faixa de equilíbrio apropriado.

5.2.1 Fracionamento do extrato bruto por CPC: sistema de Hex:AcOEt:EtOH:H₂O (1:1:1:1) (ASC)

Após a escolha do sistema bifásico Hex-AcOEt-EtOH-H₂O (1:1:1:1), em modo de eluição ascendente como o mais adequado para o enriquecimento das PMF de *A. conyzoides*,

uma alíquota do extrato bruto de *n*-hexano (921,1 mg) foi submetida ao fracionamento cromatográfico no sistema de CPC, conforme ilustrado no cromatograma da Figura 21.

Figura 21 - Cromatograma do fracionamento cromatográfico do extrato bruto de *n*-hexano de *A. conyzoides* em sistema de CPC, de acordo com as condições descritas no item 4.4.2.2. λ 330 nm.



No cromatograma do extrato bruto submetido ao processo de fracionamento por CPC observa-se a presença de oito frações principais, as quais foram reunidas segundo o perfil cromatográfico avaliado por CCD, resultando em três subfrações: I-III (789,3 mg), IV-VII (116,8 mg) e VIII (15,0 mg).

O fracionamento do extrato bruto em sistema de CPC, utilizando as condições cromatográficas descritas no item 4.4.2.2, demonstrou ser eficiente para o enriquecimento das PMF de *A. conyzoides*, visto que obteve-se uma boa resolução entre os picos das mesmas e aqueles iniciais referentes às substâncias mais apolares do extrato (clorofilas, ácidos graxos e outros lipídeos). Observou-se que as primeiras PMF coletadas apresentaram tempo de retenção próximo de 30 minutos, condizente com os valores de K_D próximo a 1 encontrados no método de *shake-flask*, enquanto que aquelas com os maiores valores de K_D foram eluídas do sistema próximos à etapa de extrusão. As frações contendo as PMF foram reunidas na subfração IV-VII, com rendimento de 12,68%.

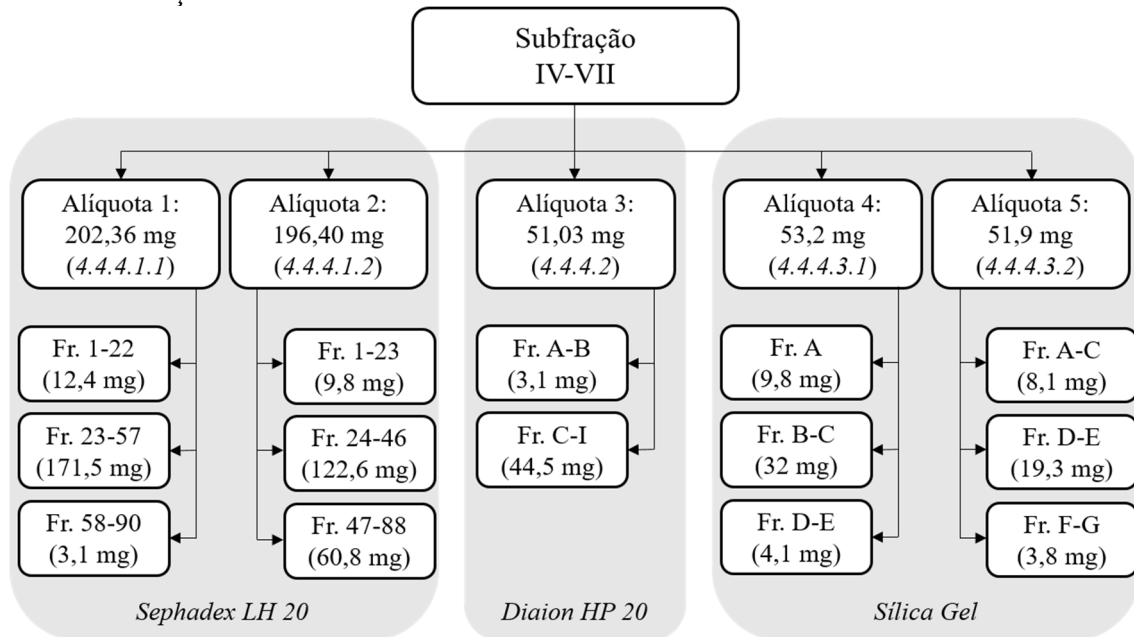
Embora o método de *shake-flask* tenha sido eficiente para prever o coeficiente de partição e consequentemente o comportamento das PMF entre as fases no sistema, o mesmo não se obteve para a substância cumarina. Nos testes de *shake-flask* realizados esta substância apresentava elevados valores de K_D , entretanto durante o fracionamento do extrato por CPC a

cumarina coeluiu juntamente com outras PMF, sendo detectada próximo ao tempo de retenção de 30 minutos. Em virtude do exposto, fez-se necessária uma etapa adicional ao método de obtenção da FEPMF-*Ac* para a eliminação da cumarina.

5.2.2 Purificação adicional da subfração IV-VII por cromatografia em coluna clássica (CC)

Com o intuito de remover a cumarina da subfração IV-VII (fração enriquecida em PMF intermediária), testou-se diferentes condições de separação em cromatografia em coluna clássica, a partir de alíquotas dessa subfração, segundo as condições representadas no fluxograma da Figura 22.

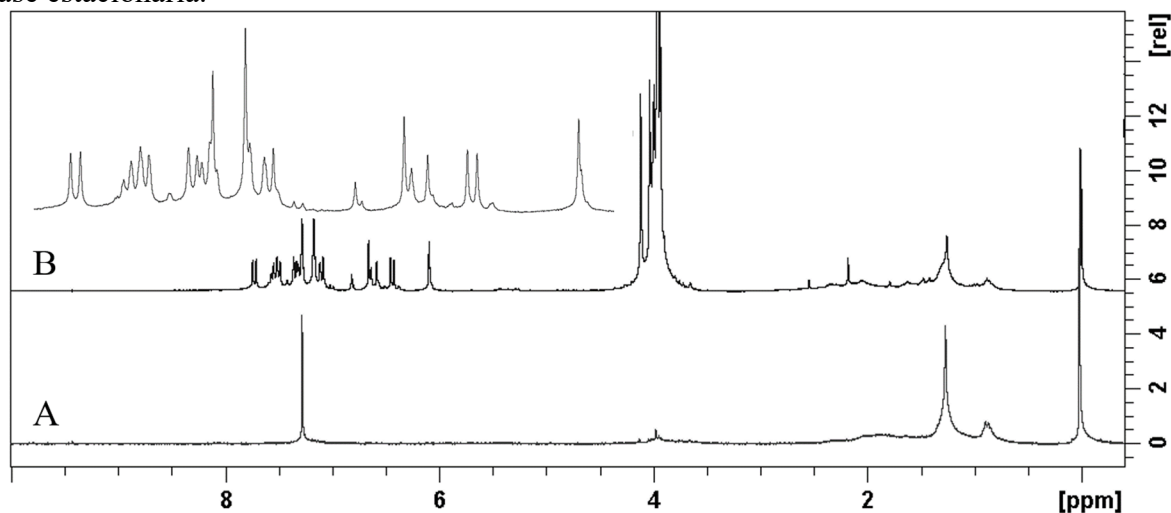
Figura 22 - Fluxograma dos métodos de fracionamento por cromatografia em coluna clássica experimentados para o enriquecimento final da fração de polimetoxiflavonas de *A. conyzoides*, conforme condições descritas no item 4.4.4.



Entre as condições cromatográficas testadas, o processo de remoção da cumarina utilizando como fase estacionária a resina Diaion[®] HP20 demonstrou ser o processo menos eficiente de fracionamento, uma vez que a avaliação das frações obtidas por CCD revelou um perfil cromatográfico muito semelhante entre as mesmas, ocasionando o agrupamento de praticamente todas as frações provenientes desta coluna. Na análise comparativa entre os espectros de RMN ¹H das frações reunidas oriundas desse processo cromatográfico (Figura 23)

é possível observar a presença de sinais referentes à produtos naturais quase exclusivamente no espectro da fração C-I (Figura 23-B), evidenciando a incapacidade desta resina na purificação das substâncias de interesse.

Figura 23 - Análise comparativa entre os espectros de RMN ^1H (300 MHz, TMS, CDCl_3) das frações reunidas obtidas na purificação da subfração IV-VII utilizando Diaion[®] HP20 como fase estacionária.



(A) Fração A-B (ácidos graxos); (B) Fração C-I (presença de polimetoxiflavonas e cumarina).

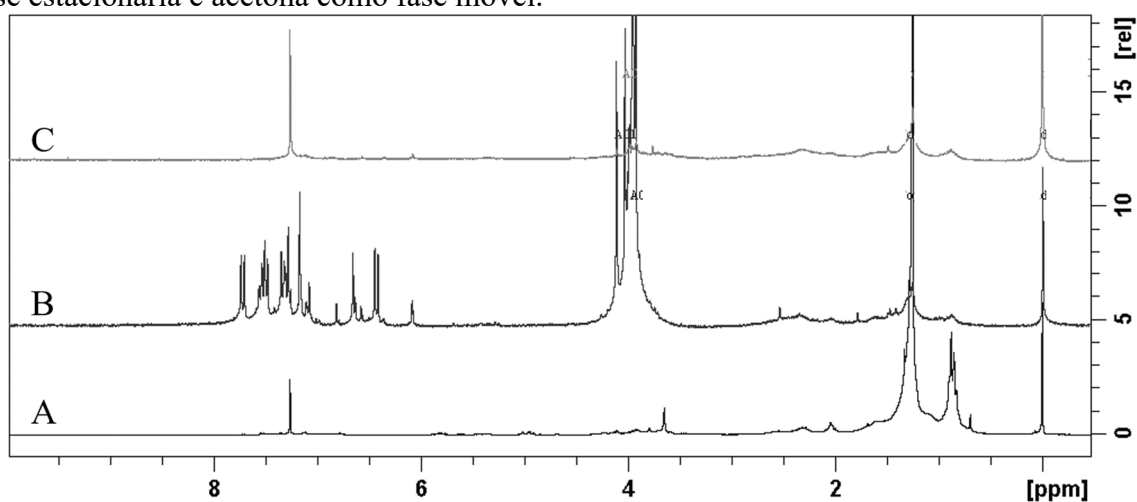
Igualmente, a purificação da fração intermediária IV-VII empregando a resina Sephadex[®] LH20 em acetona não demonstrou ser um método eficiente para a separação da substância interferente ao restante da fração de PMF. Observa-se na análise comparativa dos espectros de RMN ^1H das frações reunidas (Figura 24) que os sinais referentes a mistura de cumarina e das PMF estão presentes no espectro da fração 23-57, ao oposto dos outros espectros que apresentam apenas sinais referentes ao solvente utilizado na análise e substâncias com longa cadeia carbônica (graxa).

Em relação a utilização de sílica gel como fase estacionária, na primeira condição testada descrita no item 4.4.4.3.1 foi possível isolar parte da cumarina ao restante da fração de PMF, entretanto por conta da adsorção da cumarina à fase estacionária esta substância também foi detectada, em menor quantidade, em mistura às PMF. Conseqüentemente, foram realizadas alterações na quantidade de fase móvel utilizada, a fim de garantir a completa eluição da cumarina na coluna cromatográfica antes da mudança de eluente, quando o mesmo processo foi repetido no item 4.4.4.3.2.

Pode-se observar nos espectros de RMN ^1H das frações reunidas provenientes da segunda tentativa de utilizar-se sílica gel como fase estacionária (Figura 25), os sinais referentes

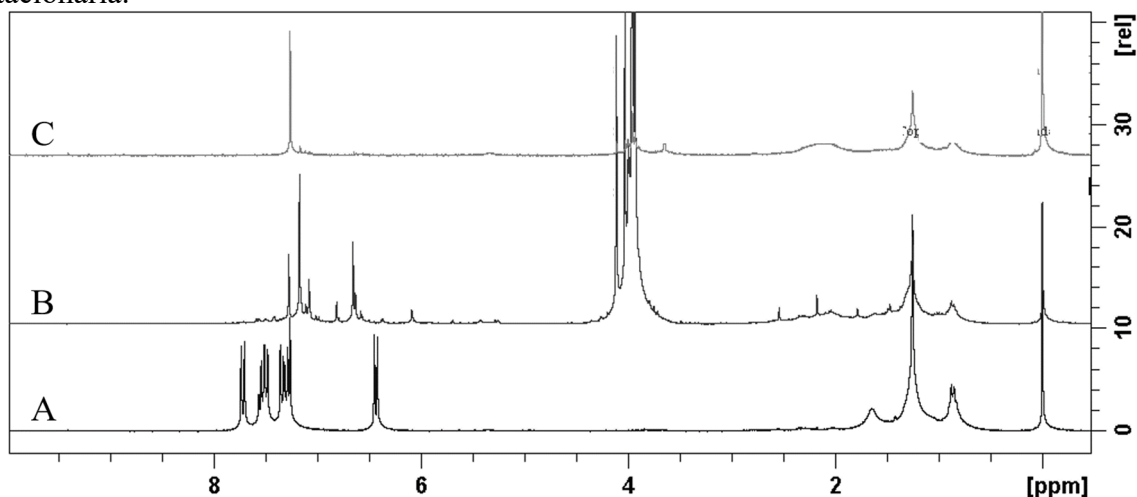
a cumarina na fração A-C, identificados como um duplete em 7,72 ppm (1H; $J=9.5$), os multipletos em 7,58 – 7,47 ppm (2H) e 7,37 – 7,26 (2H), e um duplete em 6,43 ppm (1H; $J=9.5$). (Figura 25-A). Em contrapartida aos sinais referentes as PMF que estão disponíveis no espectro da fração D-E (Figura 25-B), evidenciados pela presença de simpletos entre 3,93 – 4,11 ppm referentes às metoxilas e outros simpletos entre 6,09 – 7,17 ppm referentes aos hidrogênios dos anéis aromáticos. Entretanto, a presença de outros sinais próximo a 2 ppm no espectro de RMN ^1H da fração reunida D-E (Figura 25-B) indica que a fração ainda possui outras substâncias contaminantes mesmo após esta etapa adicional de purificação.

Figura 24 - Análise comparativa entre os espectros de RMN ^1H (300 MHz, TMS, CDCl_3) das frações reunidas obtidas na purificação da subfração IV-VII utilizando Sephadex[®] LH20 como fase estacionária e acetona como fase móvel.



(A) Fração 1-22 (ácidos graxos); (B) Fração 23-57 (presença de polimetoxiflavonas e cumarina); (C) Fração 58-90 (ácidos graxos).

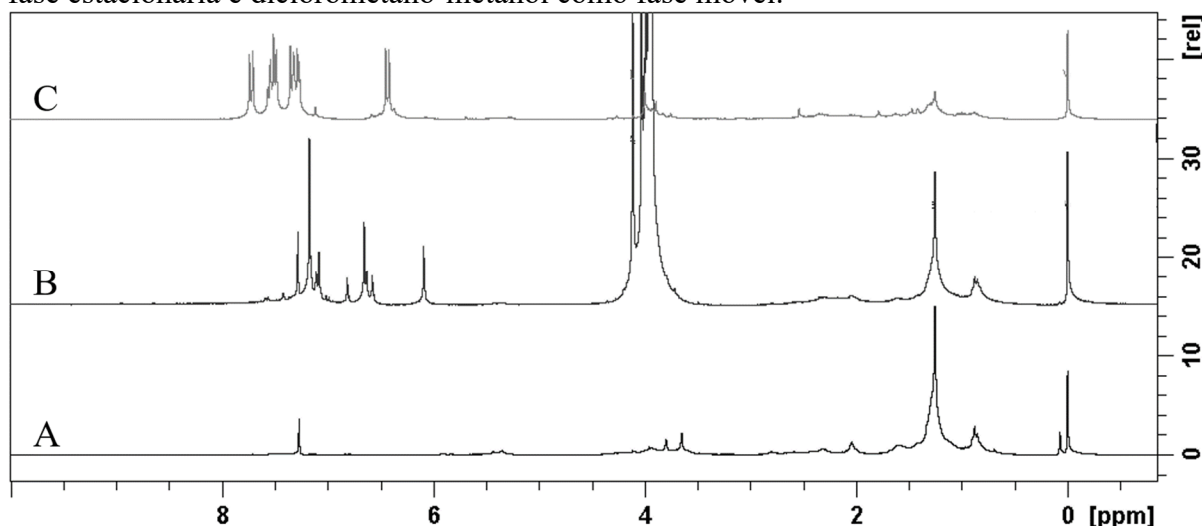
Figura 25 - Análise comparativa entre os espectros de RMN ^1H (300 MHz, TMS, CDCl_3) das frações reunidas obtidas na purificação da subfração IV-VII utilizando sílica gel como fase estacionária.



(A) Fração A-C (presença da cumarina); (B) Fração D-E (presença de polimetoxiflavonas); (C) Fração F-G (ácidos graxos).

Por fim, a purificação da fração intermediária utilizando a resina Sephadex[®] LH20 como fase estacionária em combinação com diclorometano-metanol (70:30) (v/v) como eluente demonstrou ser o método mais eficiente para o enriquecimento das PMF na fração de *A. conyzoides*. O espectro de RMN ¹H obtidos da fração reunida 24-46 (Figura 26-B) evidencia a presença de apenas sinais referentes às PMF neste espectro, assim como a ausência de sinais referentes a cumarina e outros interferentes. Além disso, nos espectros de RMN ¹H das outras frações deste método de fracionamento observa-se a presença de diversos sinais referentes a outros interferentes que estavam presentes na subfração intermediária IV-VII.

Figura 26 - Análise comparativa entre os espectros de RMN ¹H (300 MHz, TMS, CDCl₃) das frações reunidas obtidas na purificação da subfração IV-VII utilizando Sephadex[®] LH20 como fase estacionária e diclorometano-metanol como fase móvel.

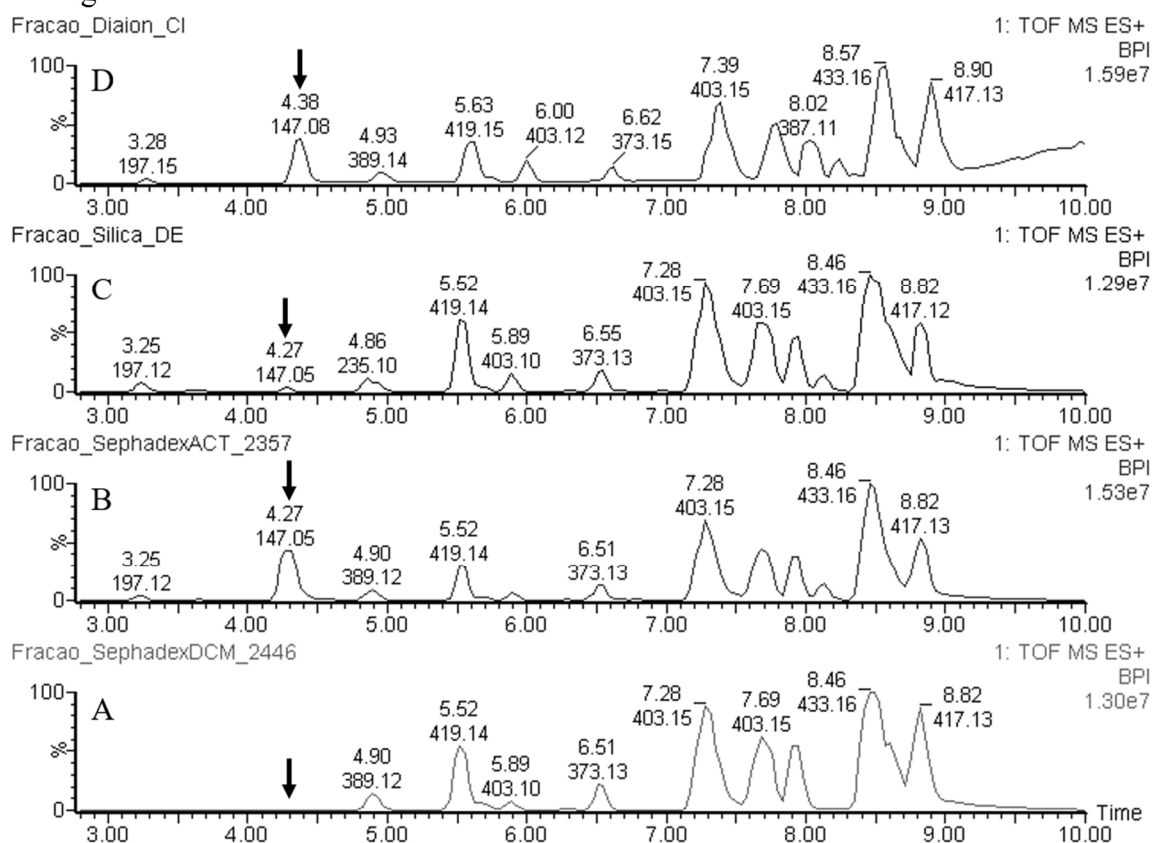


(A) Fração 1-23 (ácidos graxos); (B) Fração 24-46 (presença das polimetoxiflavonas); (C) Fração 47-88 (presença da cumarina).

As frações reunidas contendo as PMF, provenientes dos diferentes métodos de fracionamento por cromatografia em coluna, tiveram o seu perfil cromatográfico comparado por UPLC-MS, conforme apresentado na Figura 27. Apesar do espectro de RMN ¹H da fração reunida D-E (Figura 25-B), oriunda do processo de fracionamento com sílica gel como fase estacionária, não apresentar sinais referentes a cumarina, foi detectado no cromatograma desta fração (Figura 27-C) o pico referente a esta substância com tempo de retenção de 4,27 minutos, assim como nos cromatogramas das frações de PMF purificadas por resina Diaion[®] HP20 (Figura 27-D) e Sephadex[®] LH20 em acetona (Figura 27-A), demonstrando a sensibilidade dos detectores de EM quando comparado a RMN.

Dessa forma concluiu-se que o único processo capaz de remover os principais interferentes a fim de obter-se a FEPMF-*Ac* foi a utilização de resina de Sephadex® LH20 preparada em diclorometano:metanol 70-30 (v/v), uma vez que o pico cromatográfico da cumarina não foi detectado nesta fração (Figura 27-A).

Figura 27 - Análise comparativa entre os cromatogramas de intensidade de pico base (BPI) obtidos por *ESI*(+) das frações reunidas contendo as polimetoxiflavonas, provenientes dos diferentes métodos de fracionamento por cromatografia em coluna. A seta indica o pico cromatográfico referente a substância interferente cumarina.



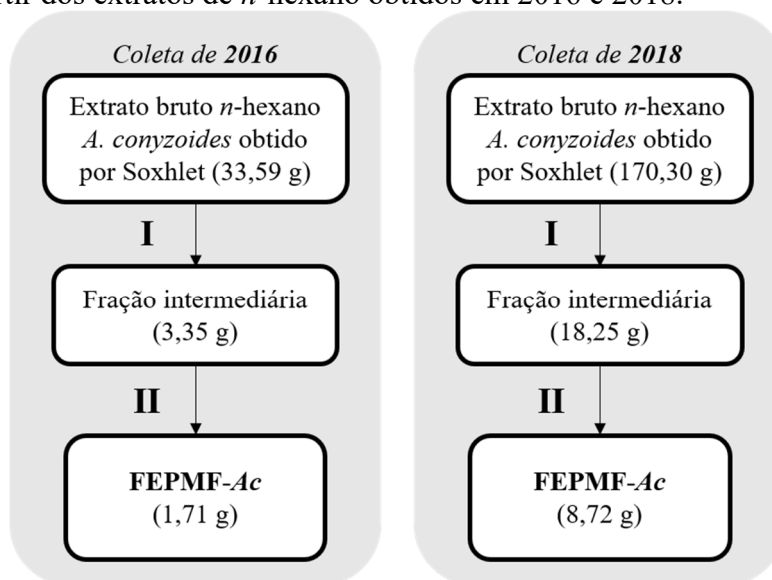
(A) Fração 24-46 oriunda do fracionamento com Sephadex® LH20 em diclorometano-metanol; (B) Fração D-E oriunda do fracionamento com sílica gel; (C) Fração 23-57 oriunda do fracionamento com Sephadex® LH20 em acetona; (D) Fração C-I oriunda do fracionamento com resina Diaion® HP20.

5.2.3 Desenvolvimento da FEPMF-*Ac*

A partir da padronização do processo de fracionamento do extrato de *n*-hexano para a obtenção da FEPMF-*Ac*, o extrato bruto preparado em 2016 e em 2018 foram primeiramente fracionados em uma etapa no sistema de CPC, sendo a subfração de oriunda desse processo posteriormente refinada por cromatografia em coluna com resina de Sephadex® LH20 utilizando como eluente diclorometano-metanol (70:30) (v/v), conforme ilustrado no

fluxograma da Figura 28. Para ambos os extratos, ao final obteve-se a FEPMF-*Ac* correspondendo a 5,1 % do extrato de *n*-hexano.

Figura 28 - Fluxograma de obtenção da fração enriquecida em polimetoxiflavonas de *A. conyzoides* a partir dos extratos de *n*-hexano obtidos em 2016 e 2018.



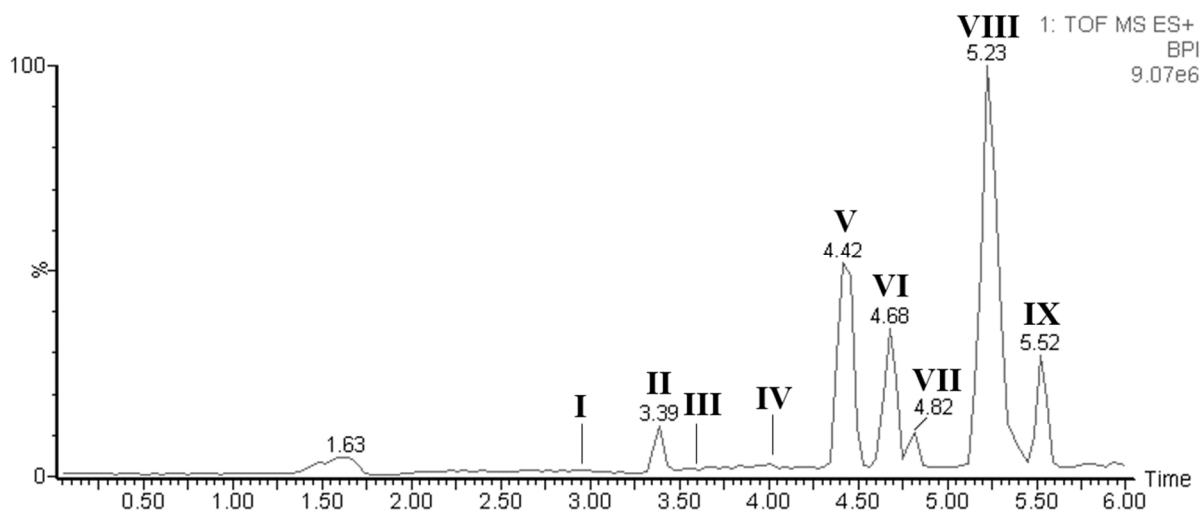
I: Separação por CPC Hex:AcOEt:EtOH:H₂O (1-1-1-1) ASC. Análise: 8 mL/min a 1800 RPM durante 75 min. Extrusão: 12 min a 30 mL/min e 1800 RPM; **II:** Filtração por Sephadex LH20. Eluente isocrático: DCM-MeOH (70-30).

5.3 CARACTERIZAÇÃO DA FEPMF-*Ac* POR UPLC-MS

A otimização das condições cromatográficas permitiu o desenvolvimento de um método analítico por UPLC-MS para a padronização da FEPMF-*Ac* com ótima separação entre os picos cromatográficos em um curto período de análise de seis minutos, conforme observa-se nos cromatogramas dispostos na Figuras 29 e 30.

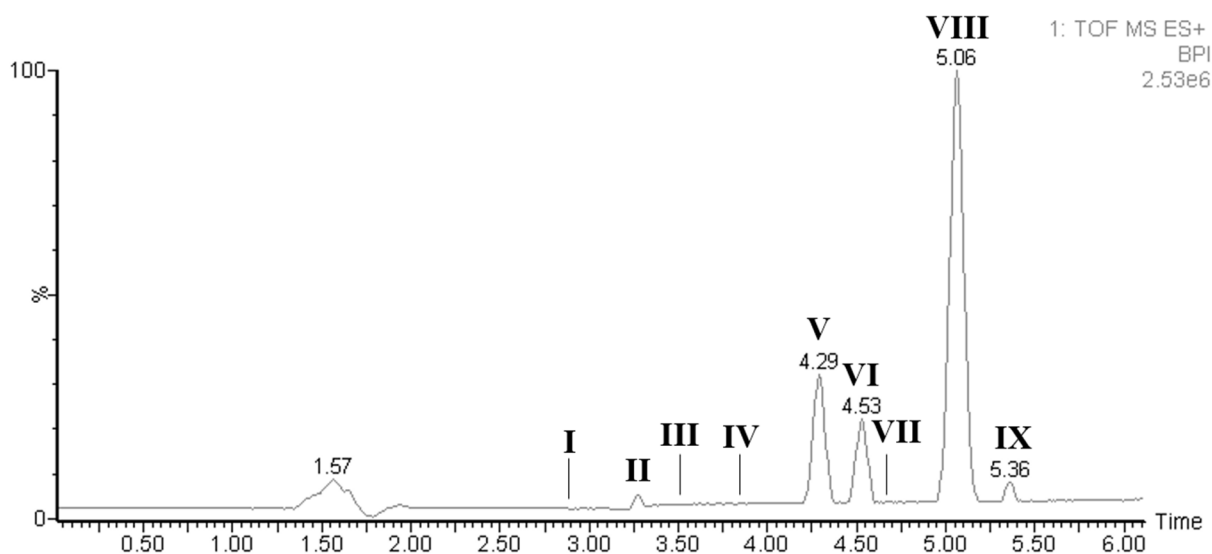
Além do sinal cromatográfico das PMF, observa-se a presença de um sinal adicional com tempo de retenção de 1,63 e 1,57 minutos nos cromatogramas da FEPMF-*Ac* apresentado nas Figuras 29 e 30, respectivamente. Este pico, apresentou íon de m/z 573,2578 $[M+H]^+$, corresponde a um contaminante da fase móvel, uma vez que o mesmo pico foi observado no cromatograma obtido quando injeta-se apenas fase móvel no sistema cromatográfico.

Figura 29 - Cromatograma de intensidade de pico base (BPI) obtido por UPLC-ESI-MS da fração enriquecida em polimetoxiflavonas de *A. conyzoides* obtido a partir da coleta de 2016.



(I) ageconiflavona C; (II) 3'-hidroxi-5,6,7,8,4',5'-hexametoxiflavona; (III) 7-hidroxi-5,6,8,5'-tetrametoxi-3',4'-metilenedioxiflavona; (IV) sinensetina; (V) 5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavona; (VI) nobiletina; (VII) linderoflavona B; (VIII) 5'-metoxinobiletina; (IX) eupalestina.

Figura 30 - Cromatograma de intensidade de pico base (BPI) obtido por UPLC-ESI-MS da fração enriquecida em polimetoxiflavonas de *A. conyzoides* obtido a partir da coleta de 2018.



(I) ageconiflavona C; (II) 3'-hidroxi-5,6,7,8,4',5'-hexametoxiflavona; (III) 7-hidroxi-5,6,8,5'-tetrametoxi-3',4'-metilenedioxiflavona; (IV) sinensetina; (V) 5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavona; (VI) nobiletina; (VII) linderoflavona B; (VIII) 5'-metoxinobiletina; (IX) eupalestina.

O método analítico possibilitou a separação de nove sinais cromatográficos que foram identificados como PMF baseado nos valores de íon de m/z experimentais e fórmula molecular obtidos pela análise do EM, assim como a comparação dos dados disponíveis na literatura para a espécie e dos tempos de retenção obtidos com a injeção de padrões analíticos isolados no

mesmo método cromatográfico. Os dados experimentais obtidos e outros detalhes das substâncias caracterizadas estão disponíveis na Tabela 5.

Tabela 5 - Substâncias identificadas por *ESI(+)* Q-Tof na fração enriquecida em polimetoxiflavonas de *A. conyzoides*.

Pico	Substância	t _R (min)	Fórmula molecular	m/z [M+H] ⁺ (erro, ppm)
I	Ageconiflavona C	2,95	C ₂₀ H ₂₀ O ₈	389,1245 (2,3)
II	3'-hidroxi-5,6,7,8,4',5'-hexametoxiflavona	3,39	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	419,1343 (0,2)
III	7-hidroxi-5,6,8,5'-tetrametoxi-3',4'-metilenedioxiflavona	3,61	C ₂₀ H ₁₈ O ₉	403,1015 (-3,5)
IV	Sinensetina	4,01	C ₂₀ H ₂₀ O ₇	373,1281 (-1,6)
V	5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavona	4,42	C ₂₁ H ₂₂ O ₈	403,1377 (-4,0)
VI	Nobiletina	4,68	C ₂₁ H ₂₂ O ₈	403,1377 (-4,0)
VII	Linderoflavona B	4,82	C ₂₀ H ₁₈ O ₈	387,1101 (5,4)
VIII	5'-metoxinobiletina	5,23	C ₂₂ H ₂₄ O ₉	433,1494 (-1,2)
IX	Eupalestina	5,52	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	417,1187 (0,2)

t_R: tempo de retenção

Todas as PMF identificadas na FEPMF-*Ac* preparada já haviam sido caracterizadas no extrato aquoso de *A. conyzoides*, em relação ao seu perfil de fragmentação e ordem de eluição no cromatograma, em trabalhos anteriores realizados pelo grupo de pesquisa e desenvolvidos no mesmo equipamento de EM utilizado (FAQUETI, 2016; FAQUETI; SANDJO; BIAVATTI, 2017). Dessa forma, para a determinação da composição química da FEPMF-*Ac* por UPLC-MS não foram adquiridos os dados de fragmentação dos picos das PMF identificadas, na medida que essa informação já estava disponível.

Destaca-se que durante as análises qualitativas realizadas por EM não foram detectados os íons referentes aos alcaloides pirrolizidínicos e a cumarina na FEPMF-*Ac*, demonstrando que os métodos de extração e purificação foram eficientes em produzir a fração de PMF sem a presença destas substâncias tóxicas.

5.3.1 Parâmetros analíticos de mérito do método

5.3.1.1 Linearidade e limites de detecção e quantificação

A linearidade do método analítico desenvolvido foi avaliada por meio da curva de calibração construída a partir da análise de regressão linear dos valores de concentração e leitura das áreas obtidas. A curva de calibração do marcador 5'-MeONB (Figura 31) é representada

pela equação $y = 106059x + 4584,9$, com coeficiente de correlação (R) de 0,9984 e coeficiente de determinação (R^2) de 0,9968, dentro da faixa linear de 0,07 – 2,50 $\mu\text{g/g}$. A análise de variância demonstrou a significância do modelo linear, uma vez que para esta curva o valor de $F_{\text{calculado}}$ (5883,71) foi superior ao valor de $F_{\text{crítico}}$ (4,35). Os resíduos do modelo linear (Figura 32) foram dispersos de maneira aleatória, indicando a significância e a ausência de tendência do modelo linear.

Os limites de detecção e quantificação estabelecidos para o método analítico foram de 0,0112 e 0,0335 $\mu\text{g/g}$, respectivamente.

Figura 31 - Curva de calibração para 5'-metoxinobiletina em função da Área X Concentração.

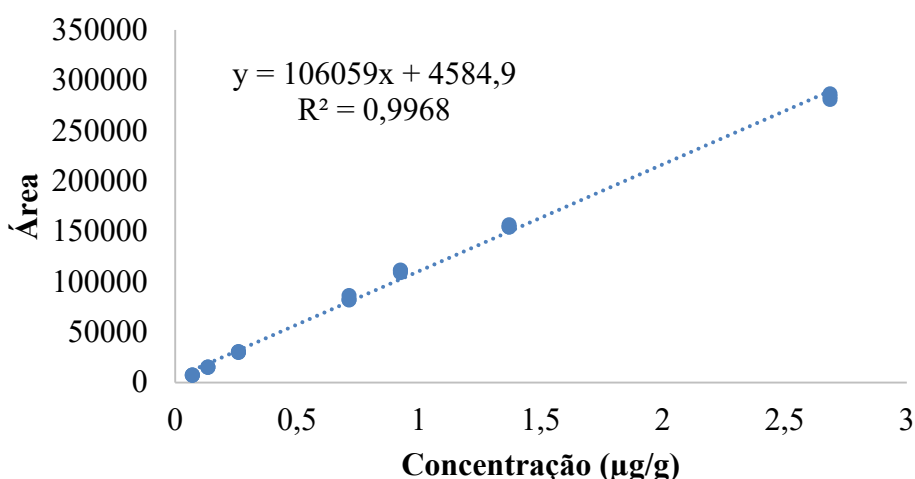
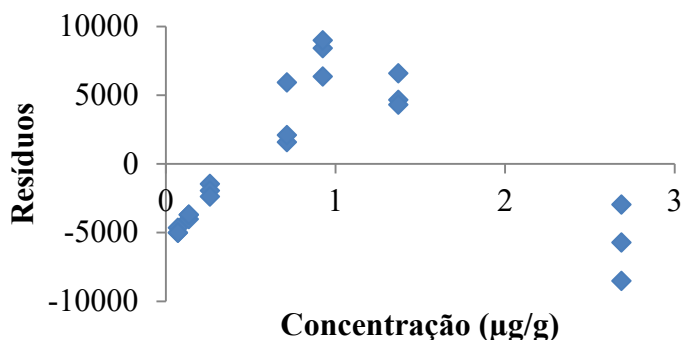


Figura 32 - Gráfico dos resíduos em função da concentração ($\mu\text{g/g}$) para o ajuste do modelo $y = 106059x + 4584,9$ para a substância 5'-metoxinobiletina.



5.3.1.2 Precisão

A análise de precisão do método foi mensurada a partir de seis determinações de soluções independentes da FEPMF-Ac, 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 4.6.1.2. Os resultados da concentração de 5'-MeONB (Tabela 6) são demonstrados em gramas do marcador por gramas de FEPMF-*Ac* e expressos em média, desvio padrão (σ) e desvio padrão relativo (DPR).

É notável que processos analíticos que avaliam a composição quantitativa de produtos naturais podem apresentar uma ampla variação intrínseca, devido à complexidade química das matrizes biológicas. Deste modo, os resultados encontrados na determinação da precisão do método estão em conformidade com a legislação internacional e de acordo com outros estudos analíticos em matrizes biológicas (DA SILVA *et al.*, 2015; SHI *et al.*, 2015; FRATONI *et al.*, 2018), uma vez que os desvios observados neste ensaio foram menores que 5%, indicando uma excelente repetibilidade e precisão intermediária.

Tabela 6 - Parâmetros de repetibilidade e precisão intermediária para o marcador 5'-metoxinobiletina na fração enriquecida em polimetoxiflavonas de *A. conyzoides*, 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	0,414			0,383				
2	0,405			0,383				
3	0,407	0,406	1,48	0,385	0,383	0,68	0,395	4,34
4	0,402	(0,011)		0,382	(0,013)		(0,017)	
5	0,396			0,378				
6	0,412			0,385				

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

5.3.1.3 Exatidão

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 a FEPMF-*Ac*. Segundo a legislação brasileira, a exatidão pode ser calculada como porcentagem de recuperação da quantidade de substância referência adicionada à matriz (BRASIL, 2017). Na Tabela 7 são apresentados os resultados obtidos no ensaio de exatidão para a substância 5'-MeONB.

Os guias internacionais que regulamentam os critérios de validação de métodos não estabelecem o intervalo de recuperação a ser cumprido, entretanto segundo a Associação

Internacional de Química Analítica o intervalo de recuperação recomendado para amostras de origem vegetal é de 90 - 108 %, para concentrações na faixa de 1,0 µg/g (AOAC, 2013). Apesar do intervalo de recuperação recomendado ser abrangente, os resultados obtidos no ensaio de exatidão do método analítico proposto demonstram a sua habilidade em quantificar com exatidão o padrão de 5'-MeONB, visto que o valor obtido é muito próximo a 100%.

Tabela 7 - Parâmetros de exatidão para o marcador 5'-metoxinobiletina na fração enriquecida em polimetoxiflavonas de *A. conyzoides*, 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		
0,937	0,035	1,029	98,86	102,27 ± 3,26
	0,255	1,217	102,11	
	0,738	1,656	105,84	

5.3.2 Quantificação do teor de polimetoxiflavonas totais por UPLC-MS

A partir dos parâmetros analíticos de mérito do método obtidos procedeu-se a quantificação dos teores de PMF totais para as duas FEPMF-Ac (coletas de 2016 e 2018) que foram produzidas. Estabeleceu-se o teor de PMF totais na fração enriquecida de *A. conyzoides* a partir da soma das determinações obtidas, sendo o resultado expresso em miligramas de PMF por grama de fração. O resultado da determinação dos teores das PMF identificadas nas FEPMF-Ac é apresentado nas Tabela 8 e 9.

Tabela 8 - Teores das polimetoxiflavonas majoritária e polimetoxiflavonas totais na fração enriquecida em polimetoxiflavonas de *A. conyzoides* obtida a partir da coleta em 2016.

Réplica	Polimetoxiflavonas majoritárias*						Teor Total*
	3'-HDX	HEXA	NOBI	LNFB	5'-MeONB	EUPA	
1	3,33	91,59	42,62	9,22	413,71	61,57	622,04
2	3,29	90,32	41,73	8,62	407,01	58,41	609,38
3	3,00	86,51	41,98	8,95	401,67	60,14	602,25
4	2,80	89,56	41,06	8,83	395,87	58,48	596,60
5	5,21	85,24	41,74	11,21	383,29	70,94	597,63
6	4,98	86,98	42,43	11,11	385,13	73,35	603,99
Média do teor total ± desvio padrão (DPR)							604,48 ± 9,26 (1,53%)

3'-HDX: 3'-hidroxi-5,6,7,8,4',5'-hexametoxiflavona; HEXA: 5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavona; NOBI: nobiletina; LNFB: linderoflavona B; 5'-MeONB: 5'-metoxinobiletina; EUPA: eupalestina; * Teor expresso em mg.g⁻¹; DPR: desvio padrão relativo.

A determinação do teor de 5'-MeONB, isoladamente, apresentou um conteúdo de $394,54 \pm 17,12$ mg/g na FEPMF-*Ac* obtida a partir da coleta em 2016, em comparação a $33,75 \pm 0,17$ mg/g quantificado no extrato bruto de *n*-hexano. Este resultado demonstra que o processo de enriquecimento das PMF em *A. conyzoides* possibilitou a obtenção de uma fração de cerca de dez vezes o teor de 5'-MeONB em relação ao extrato bruto de *n*-hexano obtido em 2016.

Tabela 9 - Teores das polimetoxiflavonas majoritária e polimetoxiflavonas totais na fração enriquecida em polimetoxiflavonas de *A. conyzoides* obtida a partir da coleta em 2018.

Réplica	Polimetoxiflavonas majoritárias*						Teor Total*
	3'-HDX	HEXA	NOBI	LNFB	5'-MeONB	EUPA	
1	15,47	136,08	89,10	10,93	507,48	32,53	791,60
2	15,73	132,83	87,56	11,34	496,25	33,04	776,75
3	16,36	136,23	89,22	12,18	505,69	34,16	793,83
4	15,77	136,84	89,90	12,35	504,23	33,96	793,05
5	16,17	138,34	90,03	12,35	512,73	34,24	803,85
6	15,69	137,85	90,85	11,75	519,60	33,14	808,87
Média do teor total \pm desvio padrão (DPR)							794,66 \pm 11,14 (1,40%)

3'-HDX: 3'-hidroxi-5,6,7,8,4',5'-hexametoxiflavona; **HEXA:** 5,6,7,3,'4',5'-hexametoxiflavona; **NOBI:** nobiletina; **LNFB:** linderoflavona B; **5'-MeONB:** 5'-metoxinobiletina; **EUPA:** eupalestina; * Teor expresso em mg.g⁻¹; **DPR:** desvio padrão relativo.

Em relação ao teor de PMF totais determinado na FEPMF-*Ac* obtida a partir da coleta em 2018, observa-se um aumento de aproximadamente 30% do teor desta FEPMF-*Ac* em relação à fração anterior. Visto que as coletas de matriz vegetal realizadas para a obtenção dos extratos que originaram essas frações foram executadas em intervalos de tempo e locais diferentes, atribui-se essas diferenças encontradas entre os teores de PMF ao teor das mesmas na matriz vegetal, uma vez que é esperada uma variabilidade nos teores de produtos naturais dependendo das condições ambientais as quais a planta se encontra, além dos fato que o processo de extração e fracionamento para a obtenção da FEPMF-*Ac* foi padronizado e executado da mesma forma em ambos os casos.

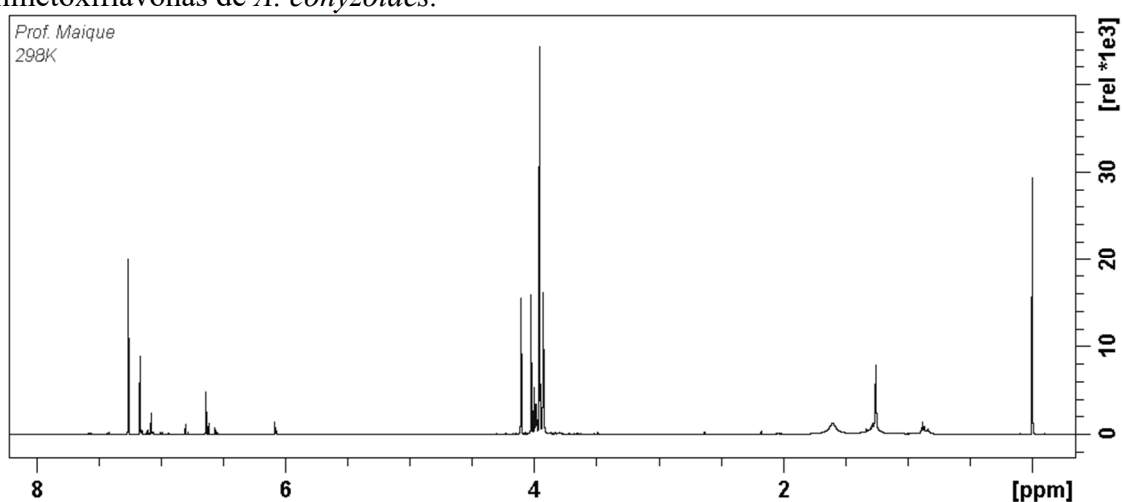
5.4 CARACTERIZAÇÃO DA FEPMF-*Ac* POR RMN ¹H

Além da caracterização da fração obtida por UPLC-MS, optou-se por realizar a caracterização por RMN ¹H. O espectro de ¹H obtido da FEPMF-*Ac* é apresentado na Figura 33. A análise do espectro da fração, mostra sinais na região de 7 ppm sugestivos de hidrogênios de anel aromático e simpletos altos entre 3,90 e 4,15 ppm característicos de grupos metoxilas,

condizentes com os sinais esperados em um espectro de ^1H para polimetoxiflavonas, além da ausência dos sinais da cumarina.

Adicionalmente, observa-se um tripleto entre δ 0,83 e δ 0,89 e um simpleto em δ 1,26 sugestivos de hidrogênios de uma metila terminal e metilenos, respectivamente, geralmente presentes em ácidos graxos contaminantes em espectros de ^1H (GOTTLIEB; KOTLYAR; NUDELMAN, 1997).

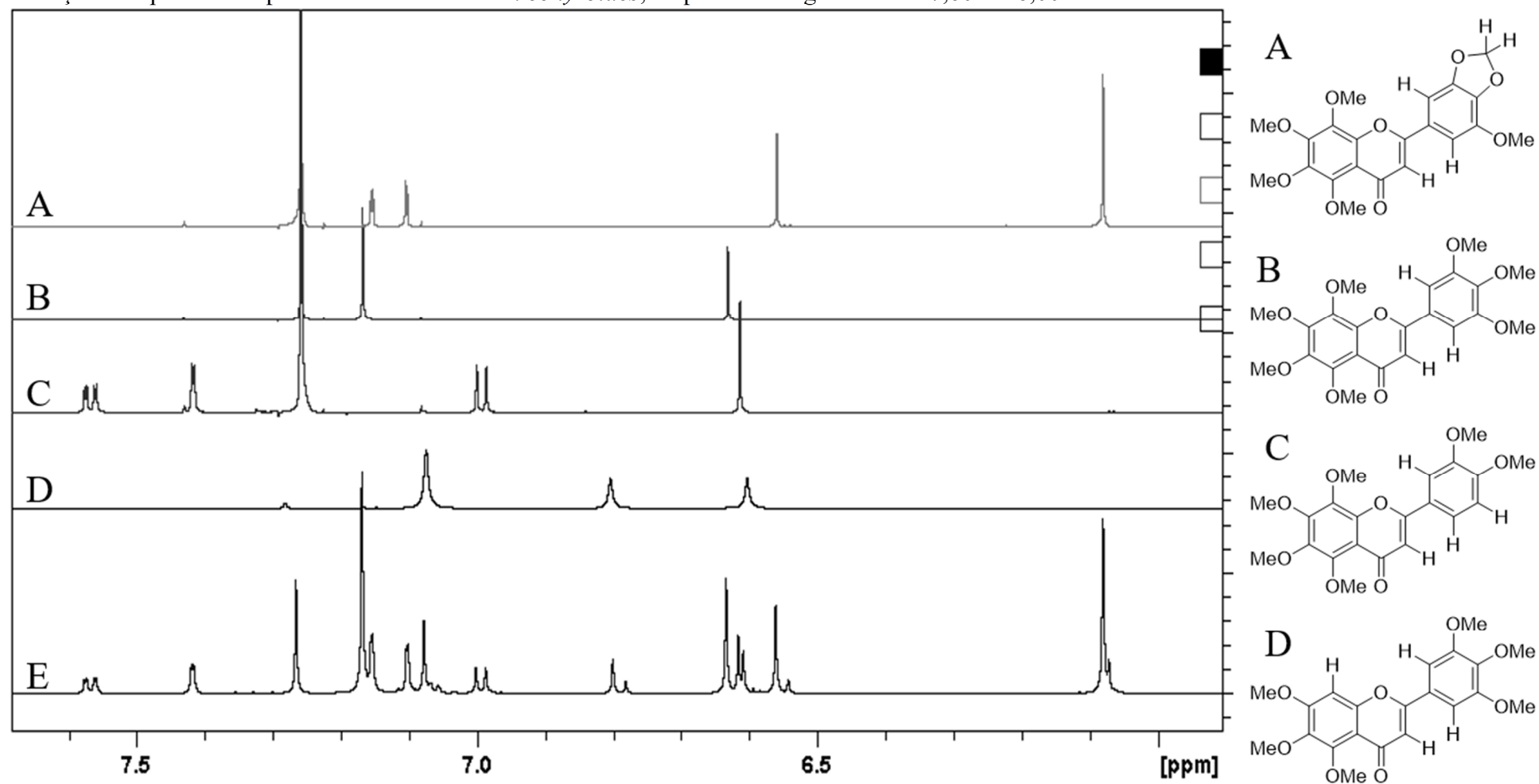
Figura 33 - Espectro de RMN ^1H (600 MHz, TMS, CDCl_3) para a fração enriquecida em polimetoxiflavonas de *A. conyzoides*.



Complementarmente, os deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN ^1H obtidos das PMF majoritárias foram comparados aos deslocamentos químicos detectados no espectro de ^1H da FEPMF-*Ac*. A análise comparativa entre os espectros, ampliada na região dos hidrogênios de anel aromático, é apresentada na Figura 34.

Comparando-se os sinais observados no espectro da fração entre aqueles presentes no espectro da substância isolada eupalestina (Figura 34-A), atribui-se os simpletos em 6,08 ppm (2H) característico da porção metilenodioxí e 6,53 ppm (1H; H-3 hidrogênio olefínico), além dos dupletos em 7,10 ppm (1H; $J=1,6$; H-2') e 7,15 ppm (1H; $J=1,6$; H-6') típicos de anel aromático com acoplamento de dois hidrogênios em posição meta, como o conjunto de sinais para a identificação da eupalestina na FEPMF-*Ac*. Em relação ao espectro da substância 5'-MeONB (Figura 34-B), atribui-se os simpletos em 6,63 ppm (1H; H-3 hidrogênio olefínico) e 7,17 ppm (2H, H-2' e H-6) característico de hidrogênios simétricos em um anel aromático, como o conjunto de sinais para a identificação da substância 5'-MeONB na FEPMF-*Ac*.

Figura 34 - Análise comparativa da expansão dos espectros de RMN ^1H (600 MHz, TMS, CDCl_3) dos padrões isolados de polimetoxiflavonas e da fração enriquecida em polimetoxiflavonas de *A. conyzoides*, ampliado na região entre δ 7,60 e δ 6,00.



(A) eupalestina; (B) 5'-metoxinobiletina; (C) nobiletina; (D) 5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavona; (E) fração enriquecida em polimetoxiflavonas de *A. conyzoides*.

Os sinais da substância nobiletina (Figura 34-C) foram identificados como sendo um conjunto de hidrogênios típicos de anel aromático formando por dois sinais de dupletos 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*. Adicionalmente, observa-se um simpleto em 6,61 ppm (1H, H-3) do hidrogênio olefínico. A estrutura da nobiletina é apresentada na Figura 34-C.

Por fim, atribuiu-se os simpletos em 7,08 ppm (2H, H-2' e H-6') e em 6,80 ppm (1H, H-8) característicos de hidrogênios de anel aromático, sendo o primeiro sinal atribuído aos hidrogênios do anel B em posição simétrica, além de outro simpleto em 6,60 ppm (1H, H-3) típico de hidrogênio olefínico, como o conjunto de sinais para a identificação da substância 5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavona na FEPMF-*Ac* (Figura 34-D).

5.5 AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO E ANTI-INFLAMATÓRIO DA FEPMF-*Ac*

5.5.1 Nociceção induzida pela administração intraplantar de formalina

5.5.1.1 Avaliação em camundongos *Swiss fêmeas*

Os primeiros ensaios farmacológicos realizados pelo nosso grupo de pesquisa com a FEPMF-*Ac* demonstraram a capacidade dessa fração em reduzir a resposta nociceptiva induzida pela formalina (FAQUETI *et al.*, 2016). Entretanto, como os processos de obtenção do extrato bruto e enriquecimento da fração foram diferentes daqueles realizados anteriormente e consequentemente observou-se diferenças quantitativas no teor das PMF entre as frações obtidas, os ensaios farmacológicos no modelo de formalina foram repetidos a fim de verificar se haveria diferença de efetividade farmacológica entre as mesmas.

O modelo de formalina costuma ser utilizado como uma triagem comportamental primária para avaliar a atividade antinociceptiva de substâncias em roedores (BARROT, 2012; LARSON; WILCOX; FAIRBANKS, 2019). Este modelo consiste na injeção intraplantar de solução de formalina (formaldeído) na pata posterior do animal, o qual induz dor intensa pela estimulação direta dos nociceptores, caracterizada por vigorosas lambidas, mordidas e batidas

na pata injetada com a substância, as quais são facilmente convertidas em valores numéricos (BATISTA *et al.*, 2016).

O teste da formalina diferencia-se da maioria dos modelos de nociceção, na medida em que é possível avaliar a forma como um animal responde à dor moderada e contínua gerada pela lesão tecidual. Devido a essa conexão com a lesão tecidual, acredita-se que o teste forneça um modelo mais válido para a dor clínica do que os testes com estímulos mecânicos ou térmicos (TJØLSEN *et al.*, 1992).

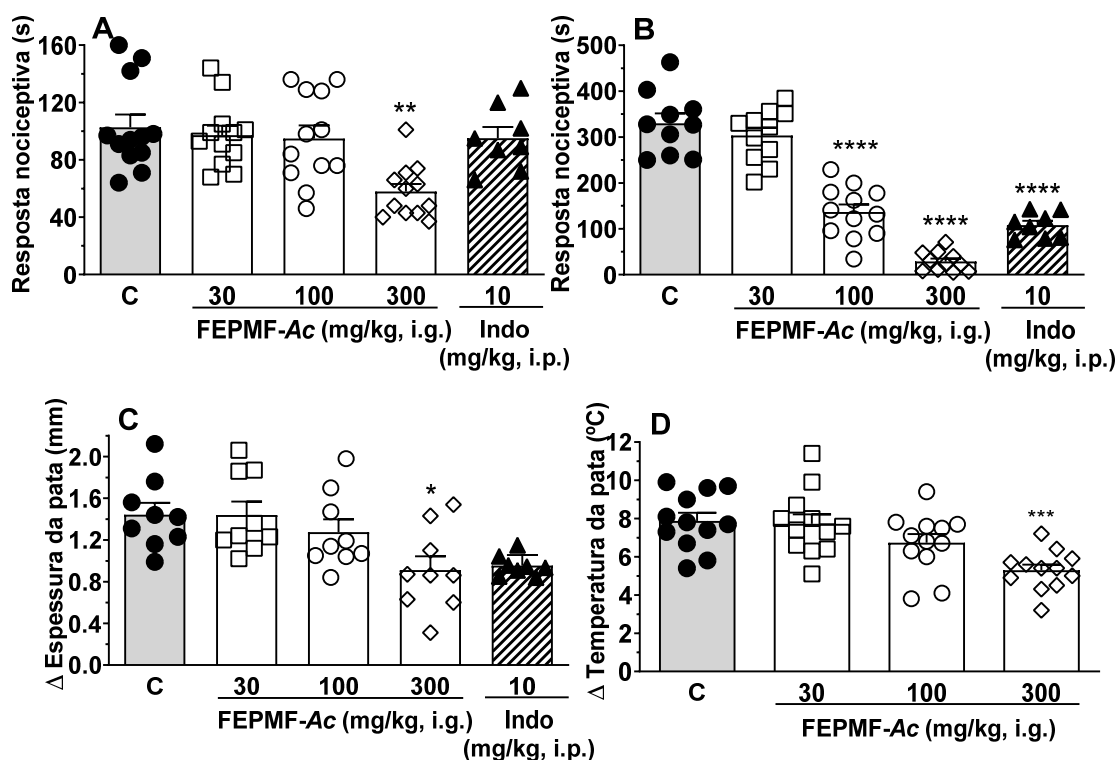
Ademais, as respostas comportamentais à formalina seguem um padrão bifásico, que parece envolver diferentes componentes. A primeira fase, denominada neurogênica, inicia-se imediatamente após a injeção de formalina, estendendo-se pelos primeiros 5 minutos e resulta da estimulação direta dos nociceptores das fibras aferentes do tipo C, sendo associada à liberação de aminoácidos excitatórios, óxido nítrico, bradicinina e substância P que produzem respostas locais. A segunda fase, conhecida como fase inflamatória, ocorre entre 15 e 30 minutos e está relacionada com a liberação de vários mediadores pró-inflamatórios, como histamina, bradicinina, prostaglandinas e serotonina (SILVA *et al.*, 2013; BATISTA *et al.*, 2016).

Os resultados de nociceção obtidos para a FEPMF-*Ac* nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg são apresentados nos gráficos da Figura 35. Observa-se que a administração intraplantar de formalina resultou em um típico comportamento nociceptivo bifásico. Os camundongos passaram aproximadamente 100 e 330 segundos exibindo o comportamento de resposta nociceptiva durante os primeiros 5 minutos (fase 1) e os 15-30 minutos seguintes (fase 2), respectivamente (Figura 35A e B). Além disso, a formalina induziu a formação de um edema na pata dos camundongos com 1,44 mm de espessura e o aumento de 7,9 °C na temperatura da pata, que estão associados à liberação de mediadores inflamatórios na segunda fase deste modelo.

O tratamento com a FEPMF-*Ac* reduziu ambas as fases neurogênica e inflamatória do comportamento nociceptivo induzido por formalina, com inibição máxima de $43 \pm 5\%$ na fase neurogênica e $91 \pm 2\%$ na fase inflamatória, quando comparados ao grupo controle. Entretanto, o efeito antinociceptivo foi significativamente maior na fase inflamatória, a curva dose-resposta da FEPMF-*Ac* para esta fase apresentou um valor de DI_{50} referente a 82,35 mg/kg, com seus limites de confiança de 95% entre 66,85 a 101,4 mg/kg. Adicionalmente, a dose de 300 mg/kg da FEPMF-*Ac* promoveu uma inibição significativa da formação de edema na pata desses

animais, com inibição de $37 \pm 9\%$ (Figura 35C) e inibição significativa do aumento da temperatura na pata, referente a $33 \pm 5\%$ (Figura 35D).

Figura 35 - Efeito da fração enriquecida em polimetoxiflavonas de *A. conyzoides* (30-300 mg/kg, i.g.) e indometacina (Indo, 10 mg/kg, i.p.) no comportamento nociceptivo induzido pela injeção intraplantar de formalina em camundongos *Swiss* fêmeas.



O total de tempo gasto lambendo a pata traseira foi medido durante a fase neurogênica (0-5 min, painel A) e a fase inflamatória (15-30 min, painel B). O painel C representa o edema na pata correspondente à diferença entre a espessura da pata antes e após o teste. O painel D representa a diferença de temperatura na pata antes e após o teste. Cada coluna representa o valor médio obtido de 8 a 12 animais, e as linhas verticais indicam o erro padrão. Os asteriscos denotam os níveis de significância quando comparados com o grupo controle (ANOVA uma via seguido pelo teste Bonferroni), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$. Os caracteres correspondem às observações individuais em cada grupo.

Em relação ao fármaco analgésico e anti-inflamatório indometacina utilizado como controle positivo neste teste, este foi capaz de reduzir a resposta nociceptiva apenas na fase inflamatória do modelo e a formação do edema, com inibição de $67 \pm 3\%$ e $34 \pm 3\%$, respectivamente, quando comparados ao grupo controle, não sendo capaz de reduzir a resposta nociceptiva da fase neurogênica no modelo da formalina. De fato, a literatura já demonstra que fármacos anti-inflamatórios não esteroideais, como a indometacina, são ineficazes em reduzir o comportamento nociceptivo da fase neurogênica deste modelo (TJØLSEN *et al.*, 1992).

Os resultados obtidos com a FEPMF-Ac preparada neste trabalho são muito similares aos resultados encontrados para a FEPMF-Ac obtida anteriormente, na qual foram observados

valores de inibição entre 14 – 42% na primeira fase e 15 – 68% para a segunda fase do modelo de nocicepção induzida por formalina, além da redução de $32 \pm 6\%$ da formação de edema na pata, nas mesmas doses testadas (FAQUETI *et al.*, 2016). Estes resultados indicam que apesar de haver pequenas mudanças nos teores de PMF entre as FEPMF-*Ac* obtidas, observou-se a mesma efetividade nos estudos farmacológicos utilizando o modelo de nocicepção induzida por formalina. Estas observações são importantes e desejável durante o desenvolvimento de novos fármacos, uma vez que confirmam que o material obtido em dois períodos distintos apresentou efeito farmacológico semelhante, confirmando a prova de conceitos para o efeito analgésico e anti-inflamatório da FEPMF-*Ac*.

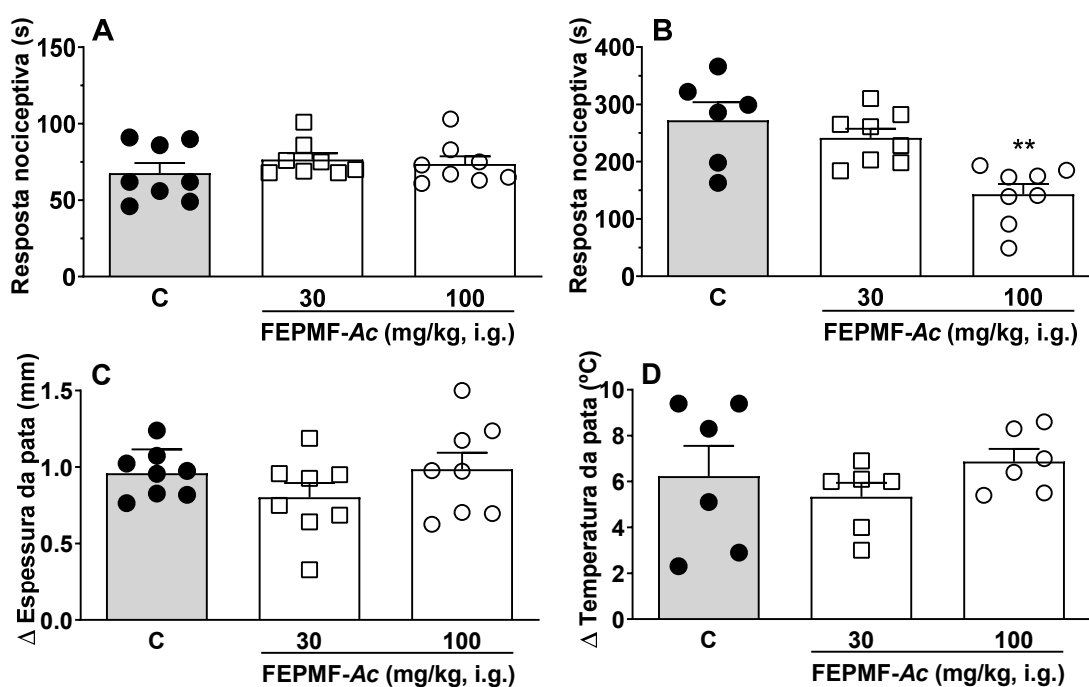
Outro aspecto interessante é que a FEPMF-*Ac* promoveu redução do comportamento nociceptivo provocado pela administração de formalina em camundongos, especialmente a segunda fase deste modelo na qual estão envolvidos a liberação de diversos mediadores inflamatórios. Entre esses, a prostaglandina E_2 que é um importante fator na mediação da dor inflamatória, podendo agir centralmente ou localmente na sensibilização da dor. De fato, este mediador tem demonstrado um papel importante no desenvolvimento dos sintomas inflamatórios de doenças como a artrite, haja vista o uso disseminado de tratamentos que inibem a produção de prostaglandinas (CROFFORD, 2002; FROLOV *et al.*, 2013; DE HAIR *et al.*, 2015).

A respeito da biodisponibilidade oral das PMF, o estudo desenvolvido por Manthey e colaboradores (2010) reporta que a administração por via oral de nobiletina em uma solução em óleo de milho produziu um rápido aparecimento dessa substância no plasma dos animais ($9,3 \mu\text{g/mL}$ com T_{max} 0,5 h), sendo detectado teores maiores que $3 \mu\text{g/mL}$ em até 8 horas após a administração. Em contrapartida, a administração por via oral da mesma dose de nobiletina em uma suspensão de óleo de milho resultou em uma absorção mais lenta dessa substância (T_{max} 2 h) e níveis séricos mais baixos ($3,56 \mu\text{g/mL}$), demonstrando que a solubilização prévia influencia fortemente a farmacocinética pela via oral, podendo influenciar o efeito farmacológico da nobiletina

Neste sentido, procurou avaliar-se a efetividade da FEPMF-*Ac* dissolvida em óleo de milho nas mesmas condições testadas no modelo de nocicepção induzida por formalina quando a mesma foi dissolvida em solução salina com 5% de *tween* 80, visto que não se obteve a completa dissolução da fração neste último veículo e, portanto, poderia ocorrer uma redução na biodisponibilidade oral das PMF da FEPMF-*Ac* e conseqüente redução da sua eficácia.

Contudo, não se obteve êxito em solubilizar completamente a FEPMF-*Ac* em óleo de milho, uma vez que se observou a presença de partículas suspensas também neste veículo. Os resultados de nocicepção obtidos para a FEPMF-*Ac* parcialmente dissolvida em óleo de milho são apresentados nos gráficos da Figura 36.

Figura 36 - Efeito da fração enriquecida em polimetoxiflavonas de *A. conyzoides* parcialmente dissolvida em óleo de milho (30 e 100 mg/kg, i.g.) no comportamento nociceptivo induzido pela injeção intraplantar de formalina em camundongos *Swiss* fêmeas.



O total de tempo gasto lambendo a pata traseira foi medido durante a fase neurogênica (0-5 min, painel A) e a fase inflamatória (15-30 min, painel B). O painel C representa o edema na pata correspondente à diferença entre a espessura da pata antes e após o teste. O painel D representa a diferença de temperatura na pata antes e após o teste. Cada coluna representa o valor médio obtido de 8 animais, e as linhas verticais indicam o erro padrão. Os asteriscos denotam os níveis de significância quando comparados com o grupo controle (ANOVA uma via seguido pelo teste Bonferroni), ** $p < 0,01$. Os caracteres correspondem às observações individuais em cada grupo.

Da mesma forma como observado no ensaio de formalina anterior, a administração intraplantar de formalina resultou em um típico comportamento nociceptivo bifásico, entretanto ocorreram reduções quantitativas na resposta nociceptiva exibida pelos animais do grupo controle, os camundongos passaram aproximadamente 68 e 270 segundos exibindo esse comportamento durante os primeiros 5 minutos (fase 1) e os 15-30 minutos seguintes (fase 2), respectivamente (Figura 36A e B), quando comparados aos animais do grupo controle que receberam o veículo salina (Figura 36A e B).

Em relação aos animais que receberam a FEPMF-*Ac* dissolvida em óleo de milho, observa-se a redução significativa da resposta nociceptiva apenas na fase inflamatória do modelo, com inibição de $47 \pm 7\%$ na dose de 100 mg/kg da fração quando comparado ao grupo controle, efeito similar ao observado para a FEPMF-*Ac* na mesma dose dissolvida em solução salina contendo 5% de *tween* 80. Optou-se por não administrar-se a dose de 300 mg/kg, uma vez que o perfil de inibição da nocicepção induzida por formalina da FEPMF-*Ac* dissolvida em óleo de milho foi similar ao observado para a FEPMF-*Ac* dissolvida em solução salina nas doses de 30 e 100 mg/kg, demonstrando que não há diferença na resposta nociceptiva para a fração neste modelo, quando compara-se os veículos utilizados.

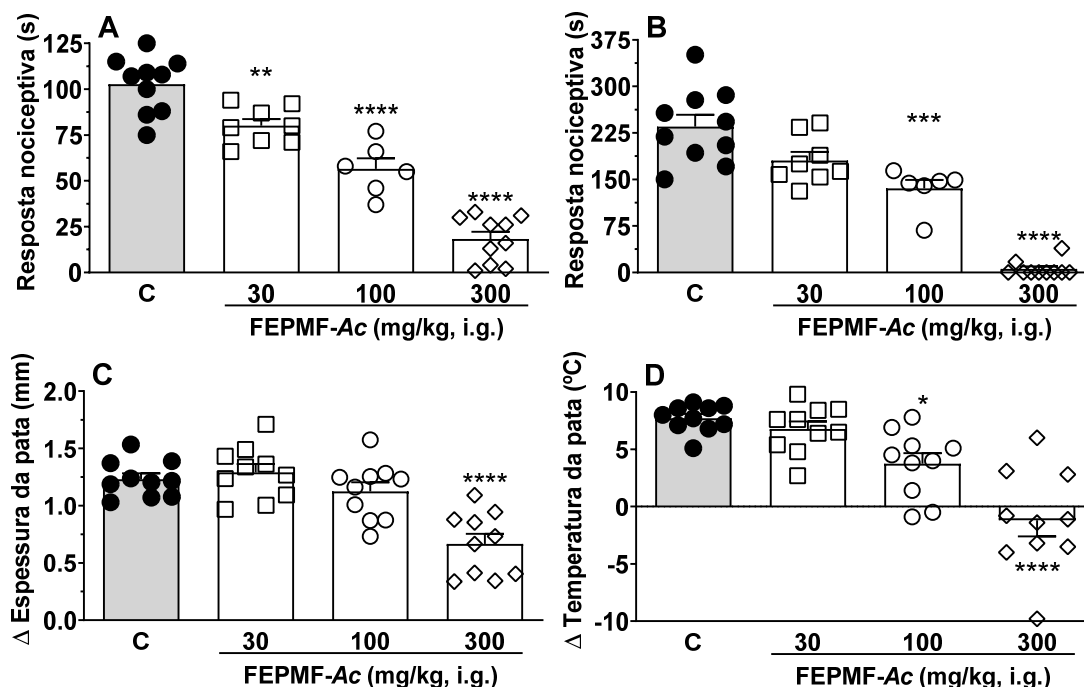
5.5.1.2 Avaliação em camundongos *Swiss machos*

Considerando a prevalência substancialmente maior de múltiplas condições clínicas de dor em mulheres versus homens e evidências crescentes de diferenças sexuais na sensibilidade à dor experimental e a analgésicos, recomenda-se que pesquisadores busquem avaliar suas hipóteses em ambos os sexos (HENDRICH *et al.*, 2012; FILLINGIM, 2017). Da mesma forma, é inválido presumir que dados obtidos em indivíduos do sexo masculino podem ser extrapolados para indivíduos do sexo feminino e o melhor modelo pré-clínico para avaliar uma dor humana prevalente em mulheres seja utilizando um animal fêmea (GREENSPAN *et al.*, 2007).

Com o intuito de comparar o potencial antinociceptivo e anti-inflamatório da FEPMF-*Ac* entre sexos, optou-se em realizar também a avaliação no modelo de nocicepção induzido por formalina em camundongos *Swiss machos*. Os resultados de nocicepção em camundongos *Swiss machos* obtidos para a FEPMF-*Ac*, dissolvida em solução salina contendo 5% de *tween* 80, são apresentados nos gráficos da Figura 37.

Assim como observou-se nos resultados anteriores, a administração intraplantar de formalina resultou em um típico comportamento nociceptivo bifásico. Os camundongos machos exibiram esse comportamento durante 102 segundos nos primeiros 5 minutos da fase 1 e durante 235 segundos dos 15-30 minutos seguintes da fase 2 (Figura 37A e B). Além disso, a formalina, em camundongos machos, induziu a formação de um edema na pata com 1,23 mm de espessura e o aumento de 7,7 °C na temperatura da pata.

Figura 37 - Efeito da fração enriquecida em polimetoxiflavonas de *A. conyzoides* (30-300 mg/kg, i.g.) no comportamento nociceptivo induzido pela injeção intraplantar de formalina em camundongos *Swiss* machos.



O total de tempo gasto lambendo a pata traseira foi medido durante a fase neurogênica (0-5 min, painel A) e a fase inflamatória (15-30 min, painel B). O painel C representa o edema na pata correspondente à diferença entre a espessura da pata antes e após o teste. O painel D representa a diferença de temperatura na pata antes e após o teste. Cada coluna representa o valor médio obtido de 10 animais, e as linhas verticais indicam o erro padrão. Os asteriscos denotam os níveis de significância quando comparados com o grupo controle (ANOVA uma via seguido pelo teste Bonferroni), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$. Os caracteres correspondem às observações individuais em cada grupo.

O tratamento com a FEPMF-*Ac*, em camundongos machos, reduziu significativamente ambas as fases neurogênica e inflamatória do comportamento nociceptivo induzido por formalina, com inibição máxima de $82 \pm 4\%$ na fase neurogênica e $98 \pm 2\%$ na fase inflamatória, quando comparados ao grupo controle. A curva dose-resposta da FEPMF-*Ac* para a fase inflamatória apresentou um valor de dose inibitória de 50% da nocicepção (DI_{50}) referente a $89,07$ mg/kg, com seus limites de confiança de 95% entre $68,54$ a $115,7$ mg/kg. Adicionalmente, a dose de 300 mg/kg da FEPMF-*Ac* promoveu uma inibição significativa da formação de edema na pata desses animais, com inibição de $46 \pm 7\%$ (Figura 37C). Em relação a temperatura na pata, a dose de 300 mg/kg promoveu uma redução drástica da temperatura na pata dos animais, observando-se um valor médio de temperatura inferior ao valor de temperatura anterior à indução do modelo, o que representa uma inibição de $115 \pm 18\%$ do aumento da temperatura na pata, além disso a dose de 100 mg/kg exibiu uma inibição significativa do aumento da temperatura na pata, referente a $51 \pm 12\%$ (Figura 37-D).

Quando comparados os resultados obtidos na resposta nociceptiva induzida por formalina e o efeito nociceptivo da FEPMF-*Ac* entre camundongos *Swiss* machos (Figura 37) e fêmeas (Figura 35) observa-se um efeito muito mais pronunciado da FEPMF-*Ac* na primeira fase deste modelo nos animais do sexo masculino, além de uma melhor resposta antiedematogênica e antitérmica. Desta forma, para a continuidade dos ensaios farmacológicos realizados optou-se por utilizar animais do sexo masculino.

5.5.2 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de mediadores químicos endógenos

Dando continuidade aos ensaios farmacológicos a fim de explorar o potencial analgésico da FEPMF-*Ac* e compreender os mecanismos farmacológicos envolvidos na sua ação, buscou-se avaliar o efeito da FEPMF-*Ac* sob a nocicepção induzida por mediadores químicos endógenos isoladamente. Como mencionado, o comportamento nociceptivo causado pela injeção intraplantar de formalina é dependente da liberação de mediadores inflamatórios endógenos, como por exemplo bradicinina, prostaglandinas, glutamato e histamina (SILVA *et al.*, 2013; BATISTA *et al.*, 2016).

Glutamato é um importante neurotransmissor excitatório encontrado no sistema nervoso central onde participa de um grande número de estados fisiológicos e patológicos, desempenhando um importante papel na transmissão da dor periférica para o cérebro (PEREIRA; GOUDET, 2019). O glutamato também está envolvido na indução e manutenção da sensibilização central da via da dor, através da hiperexcitabilidade do sistema glutamatérgico, o que leva ao desenvolvimento dos principais sintomas sensoriais observados em pessoas que sofrem de dor crônica (LATREMOLIERE; WOOLF, 2009).

A ação do glutamato é mediada através de receptores ionotrópicos e metabotrópicos. Os receptores ionotrópicos de glutamato (iGluR) são canais de íons ativados por ligantes envolvidos na resposta sináptica rápida ao glutamato, na qual N-metil-*D*-aspartato (NMDA), ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propiónico (AMPA) e caionato são conhecidos por ativar receptores de canal iônico que desencadeiam a permeabilidade de cálcio (Ca^{2+}), sódio (Na^+) ou potássio (K^+). Os receptores metabotrópico de glutamato (mGluR) são receptores acoplados à proteína G que são responsáveis pela resposta neuromodulatória lenta ao glutamato (FUNDYTUS, 2001). A nocicepção desencadeada pela injeção intraplantar de glutamato é atribuído principalmente à ativação dos receptores mGluR e iGluR, assim como da liberação

de neurocininas, cininas, CGRP e óxido nítrico no local da injeção (BEIRITH; SANTOS; CALIXTO, 2002; MEOTTI; COELHO; SANTOS, 2010).

A estimulação dos receptores de glutamato, após injeção intraplantar ou intratecal de glutamato, tem sido amplamente utilizada na investigação dos mecanismos de nocicepção e na busca de novos analgésicos, uma vez que fármacos que atuam no sistema glutamatérgico parecem ser promissores analgésicos no manejo de dores crônicas (PEREIRA; GOUDET, 2019).

A bradicinina é um peptídeo de baixo peso molecular da família das cininas vasoativas, formado a partir da clivagem de cininogênios de alto peso molecular após a ativação de proteases em locais de lesão do tecido, sendo um dos mais potentes agentes produtores de dor sob condições inflamatórias (RANG; BEVAN; DRAY, 1991). A atividade biológica da bradicinina é mediada por duas vias de receptores, os receptores B₁ e B₂. O receptor B₂ é constitutivamente expressado pelos tecidos periférico e central e responsável pelos efeitos a curto prazo da bradicinina, enquanto o receptor B₁ é induzido e regulado conforme a evolução de quadros infecciosos, inflamatórios ou traumáticos (CALIXTO *et al.*, 2000; FERREIRA *et al.*, 2002; OLIVEIRA JÚNIOR; PORTELLA JUNIOR; COHEN, 2016).

Demonstrou-se que a bradicinina atua estimulando e sensibilizando os nociceptores periféricos via proteína quinase C, mas também age estimulando fosfolipase A₂ e induzindo a formação dos produtos da cascata de ácido araquidônico-ciclooxigenase, como a PGE₂ (PETHÖ; DEROW; REEH, 2001). Interessantemente, demonstrou-se em ratos a inibição da hiperalgesia comportamental induzida pela bradicinina com o pré-tratamento com um inibidor da COX, a indometacina (SCHULIGOI; DONNERER; AMANN, 1994), assim como reduziu-se a liberação de PGE₂, estimulada por bradicinina, através da administração de inibidores de COX-1 ou COX-2 (MAYER *et al.*, 2007). Dessa forma, a inibição da nocicepção induzida por bradicinina pela FEPMF-*Ac* possui relação com a inibição da nocicepção induzida por PGE₂ demonstrada nos estudos prévios com a FEPMF-*Ac* (FAQUETI *et al.*, 2016).

Adicionalmente, a histamina, uma importante monoamina liberada em processos inflamatórios, parece estar envolvida nos modelos de dor inflamatória e neuropática, atuando de forma antinociceptiva no SNC e, inversamente, de forma nociceptiva no sistema nervoso periférico (SNP) (OBARA *et al.*, 2020). Quando liberada no SNP, por mastócitos estimulados, a histamina ativa fibras aferentes primárias-tipo C e subsequente liberação de várias moléculas relacionadas à dor, como por exemplo, substância P e glutamato, assim como a liberação de CGRP no SNC (ROSA; FANTOZZI, 2013). Esses eventos neurológicos periféricos

desencadeiam a excitação pós-sináptica de neurônios secundários na coluna vertebral corno dorsal e transdução de sinal no SNC.

A histamina age por meio de quatro subtipos distintos de receptores ligados à proteína G, designados de H1 a H4, que são expressos diferencialmente em vários tipos de células (AUSTIN; MOALEM-TAYLOR, 2013). O efeito analgésico de alguns antagonistas dos receptores H1 e H2 da histamina estão bem documentados em diferentes modelos de nocicepção (ZUO *et al.*, 2003; KHALILZADEH; AZARPEY; HAZRATI, 2017), assim como, estudos clínicos demonstraram seus efeitos analgésicos leves e uso potencial como adjuvantes para tratar dismenorreia, neuralgia do trigêmeo e síndrome da dor talâmica (RUMORE; SCHLICHTING, 1986). A descoberta dos receptores H3 e H4 demonstram que estes parecem estar envolvidos na mediação da nocicepção (MEDHURST *et al.*, 2008; HSIEH *et al.*, 2010).

Os resultados de nocicepção induzida pela administração intraplantar de glutamato, bradicinina e histamina e o efeito antinociceptivo para a FEPMF-*Ac* obtidos nesses modelos são apresentados nos gráficos da Figura 38. Observa-se que a injeção intraplantar de glutamato (20 μ mol/pata), bradicinina (3 nmol/pata) ou histamina (100 nmol/pata) induziu o comportamento nociceptivo em camundongos (Figura 38A-C). Os animais passaram aproximadamente 251, 38 e 145 segundos exibindo esse comportamento após a indução do estímulo nociceptivo com glutamato, bradicinina e histamina, respectivamente.

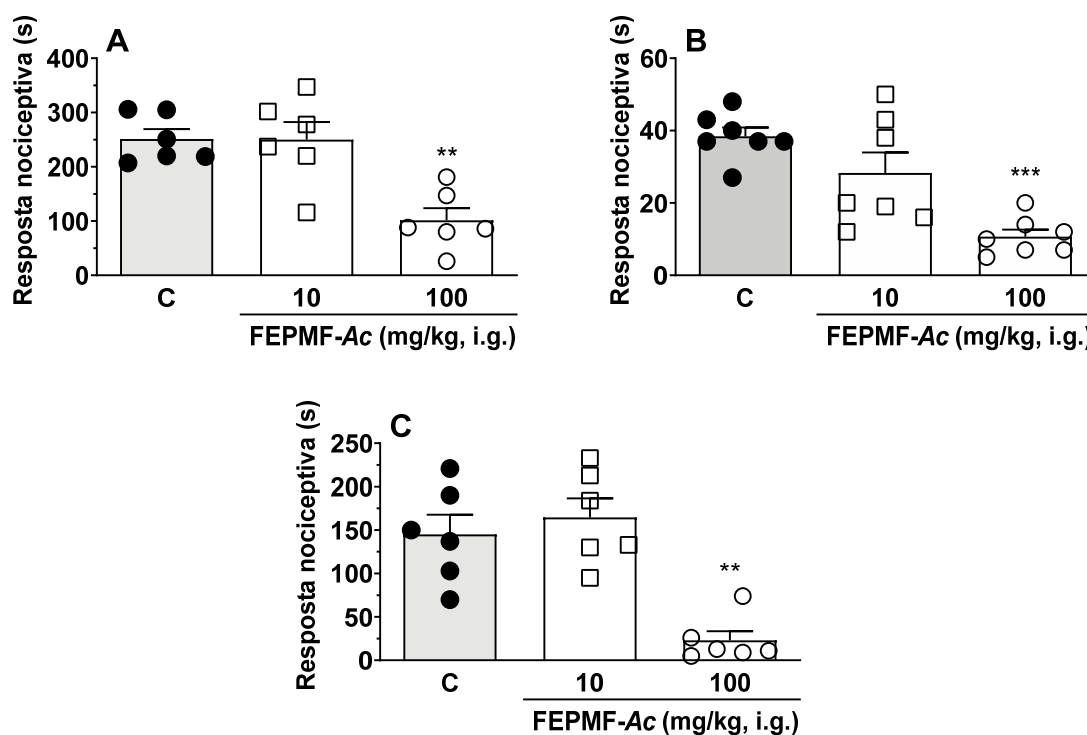
O tratamento por via oral com a FEPMF-*Ac* na dose de 100 mg/kg causou a inibição, quando comparado aos grupo controle, de $60 \pm 9\%$ ($p < 0,01$) da nocicepção induzida por glutamato (Figura 38A), inibição de $72 \pm 5\%$ ($p < 0,001$) da nocicepção induzida por bradicinina (Figura 38B) e uma inibição de $84 \pm 7\%$ ($p < 0,01$) da nocicepção induzida por histamina (Figura 38C), demonstrando que o efeito antinociceptivo da FEPMF-*Ac* pode estar associada, pelo menos em parte, com sua capacidade de inibir, direta ou indiretamente, a ação do glutamato, da bradicinina e histamina.

Ensaio anteriores já haviam sugerido a interação entre substâncias presentes no extrato de metanol da espécie *A. conyzoides* e o receptor B₂ de bradicinina, com percentual de ligação *in vitro* de $83 \pm 6\%$, posteriormente esta ligação foi interrompida após a adição de polivinilpirrolidona (PVP) no meio, indicando que substâncias fenólicas poderiam ser as responsáveis pela interação inicial observada (SAMPSON *et al.*, 2000).

Além dos efeitos discutidos para os receptores de bradicinina, estudos de nocicepção induzida por formalina demonstram a diminuição da resposta nociceptiva da primeira fase desse modelo (0-5 minutos) quando utilizadas substâncias antagonistas do receptor B₂ e B₁, bem

como a redução da formação de edema pelo antagonismo do receptor B₂ (DE CAMPOS *et al.*, 1996; DE CAMPOS *et al.*, 1999; PORRECA *et al.*, 2006). Esse conjunto de evidências sugerem que a inibição da primeira fase do modelo de formalina exibida pela FEPMF-Ac esteja envolvida, em partes, pela inibição dos receptores de bradicinina, uma vez que a FEPMF-Ac também foi capaz de inibir a resposta nociceptiva no modelo de nocicepção induzida por bradicinina.

Figura 38 - Efeito da fração enriquecida em polimetoxiflavonas de *A. conyzoides* (10 e 100 mg/kg, i.g.) no comportamento nociceptivo induzido pela injeção intraplantar de glutamato, bradicinina e histamina em camundongos *Swiss* machos.



O painel **A** representa a avaliação do comportamento nociceptivo induzido por glutamato (20 μmol/pata), o painel **B** representa a avaliação do comportamento nociceptivo induzido por bradicinina (3 nmol/sítio) e o painel **C** representa o comportamento nociceptivo induzido por histamina (100 nmol/sítio). Cada coluna representa o valor médio obtido de 6 a 7 animais, e as linhas verticais indicam o erro padrão da média. Os asteriscos denotam os níveis de significância quando comparados com o grupo controle (ANOVA uma via seguido pelo teste de Bonferroni) ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Os caracteres correspondem às observações individuais em cada grupo.

5.5.3 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de substâncias ativadoras de canais TRPs e ASICs

Receptores de potencial transitório (TRP) correspondem a uma família de canais de cátions não seletivos, com alta permeabilidade a Ca^{2+} , expressos nos terminais periféricos e

centrais de neurônios sensoriais, onde desempenham um papel crítico na percepção nociceptiva, mecânica e térmica (PREMKUMAR; ABOOJ, 2013). Após a ativação dos canais TRP, o Ca^{2+} entra nas células e gera a despolarização celular, levando à transdução do sinal sensorial. Baseado na homologia da sequência de aminoácidos, classificou-se essa família de receptores em seis subfamílias: TRPC (canônico), TRPV (vaniloide), TRPM (melastatina), TRPP (policistina), TRPML (mucolipina) e TRPA (anquirina) (LEVINE; ALESSANDRI-HABER, 2007).

É bem estabelecido que a administração intraplantar de capsaicina exerce seus efeitos ativando o receptor TRPV1 (BASBAUM *et al.*, 2009). Além desta, o receptor TRPV1 pode ser ativado por estímulos térmicos ($> 43^{\circ}\text{C}$); lipídios endógenos como endocanabinóides e eicosanóides, que são provenientes do metabolismo da LOX; e determinados mediadores inflamatórios, incluindo a bradicinina, adenosina trifosfato (ATP), prostaglandinas, serotonina e histamina (O'NEILL *et al.*, 2012; LUO *et al.*, 2015). A sensibilização de TRPV1 por mediadores inflamatórios geralmente envolve a fosforilação por proteínas quinases C e A (ROSENBAUM; SIMON, 2007). No que tange suas propriedades biológicas, evidências sugerem que os canais TRP, particularmente TRPV1, participam no estabelecimento da dor e inflamação, visto que se observou que animais *knockout* TRPV1 apresentam uma resposta reduzida ao calor e hiperalgesia térmica durante a inflamação (DAVIS *et al.*, 2000; LAPOINTE; ALTIER, 2011).

Outro membro da família de canais TRP, TRPA1, também tem recebido destaque nos processos neurológicos de transmissão da dor. A maioria dos nociceptores C e A δ que expressam TRPA1 também expressam TRPV1, levantando a questão da especificidade funcional. Estímulos físicos, como baixas temperaturas ($<18^{\circ}\text{C}$) e forças mecânicas são reconhecidos ativadores de receptores TRPA1 (LAPOINTE; ALTIER, 2011; PREMKUMAR; ABOOJ, 2013). Tal qual o TRPV1, o TRPA1 pode ser ativado por uma ampla variedade de substâncias, incluindo mediadores inflamatórios como bradicinina e ATP, produtos endógenos do estresse oxidativo e também agentes exógenos produzidos por plantas, como o cinamaldeído (LUO *et al.*, 2015). A ativação dos canais TRPV1 e TRPA1 promove o aumento do Ca^{2+} intracelular desencadeando a dor aguda e inflamação neurogênica por meio da liberação periférica de neuropeptídeos (substância P e CGRP), purinas e outros transmissores de terminações nervosas ativadas (BAUTISTA *et al.*, 2006).

Adicionalmente, sabe-se que durante a inflamação, os prótons estão entre os primeiros mediadores liberados por células lesionadas, e a acidose do tecido é um fator comum

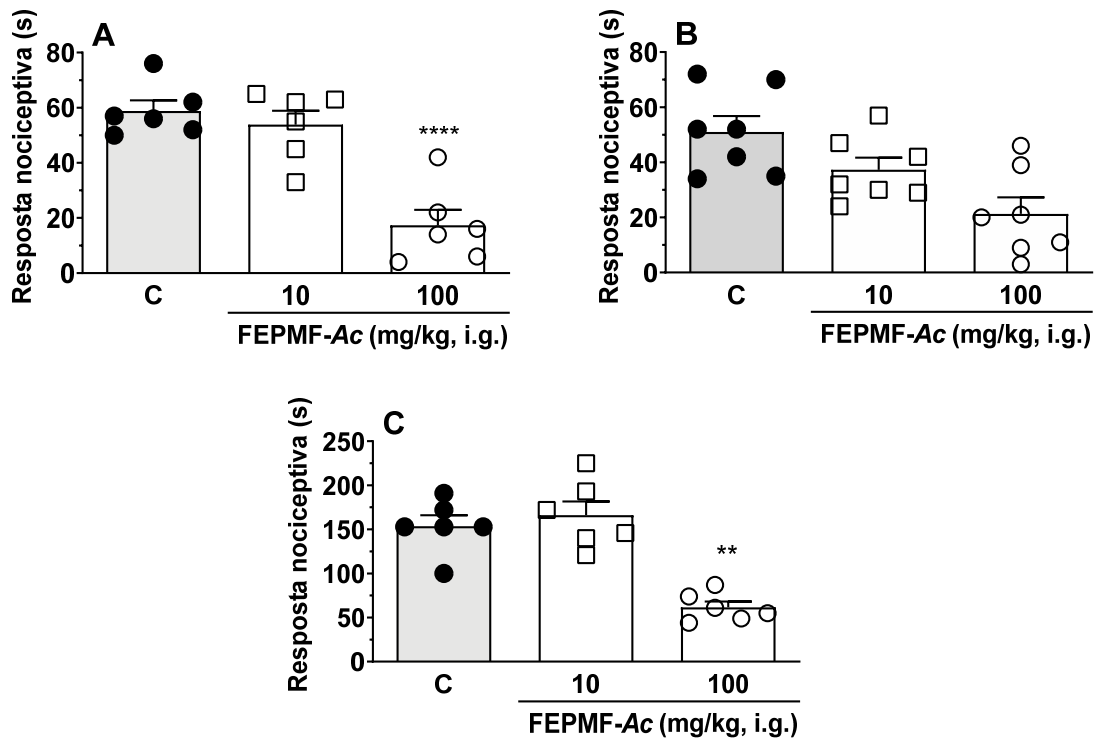
encontrado em várias condições dolorosas (DEVAL *et al.*, 2010). Em tais estados de acidose, os prótons extracelulares provocam a dor ativando canais de cátions nos nociceptores, especialmente TRPV1 e ASICs. Enquanto a ativação dos receptores TRPV1 requer condições mais ácidas (pH<5,9), os ASICs são ativados por pequenas modificações do pH, por exemplo, de pH fisiológico 7,4 para pH 7,2, gerando uma despolarização sustentada compatível com a detecção da dor não adaptativa (UGAWA *et al.*, 2002; DEVAL *et al.*, 2010). A identificação desses nociceptores polimodais e o envolvimento dos mesmos nos processos inflamatórios dolorosos estimularam a busca por substâncias que possam bloquear seletivamente os sinais de dor ao nível dos nociceptores, os quais tornaram-se alvos terapêuticos chave para o tratamento de distúrbios dolorosos.

Para verificar se os canais TRPV1, TRPA1 e ASICs estão envolvidos na atividade antinociceptiva de FEPMF-*Ac*, os efeitos da fração nas respostas nociceptivas induzidas por ativadores específicos de cada canal foram testados e os resultados apresentados na Figura 39. Observa-se que a injeção intraplantar de capsaicina (5,2 nmol/pata), cinamaldeído (10 nmol/pata) ou salina acidificada (pH 5,0) induziu o comportamento nociceptivo em camundongos (Figura 39A-C). Os animais passaram aproximadamente 58, 51 e 153 segundos exibindo esse comportamento após a indução do estímulo nociceptivo com capsaicina, cinamaldeído e salina ácida, respectivamente.

Os resultados demonstram que o tratamento prévio com a FEPMF-*Ac* (100 mg/kg, i. g.) foi capaz de inibir significativamente a resposta nociceptiva induzida pela injeção intraplantar de capsaicina e salina acidificada (Figura 39A e C), com inibições de $70 \pm 10\%$ ($p < 0,0001$) e $60 \pm 4\%$ ($p < 0,01$), respectivamente, quando comparados ao grupo controle. Dessa forma, os resultados obtidos neste estudo indicam que a inibição dos canais TRPV1 e ASICs como possíveis alvos da FEPMF-*Ac*.

Estudos anteriores demonstraram que a formalina também ativa os neurônios sensoriais periféricos por meio da ação em receptores TRPA1 (MCNAMARA *et al.*, 2007; MARTÍNEZ-ROJAS *et al.*, 2018), entretanto quando avaliou-se o papel de receptores TRPA1 no mecanismo antinociceptivo da FEPMF-*Ac*, observou-se que o tratamento com a FEPMF-*Ac* (10-100 mg/kg, i. g.) causou redução de $58 \pm 12\%$ da resposta nociceptiva causada pelo cinamaldeído, entretanto este efeito não foi significativo (Figura 39B). Esse resultado indica que, embora a FEPMF-*Ac* tenha um efeito antinociceptivo no modelo de formalina, esse efeito não está diretamente relacionado ao receptor TRPA1.

Figura 39 - Efeito da fração enriquecida em polimetoxiflavonas de *A. conyzoides* (10 e 100 mg/kg, i.g.) no comportamento nociceptivo induzido pela injeção intraplantar de capsaicina, cinamaldeído e salina acidificada em camundongos *Swiss* machos.



O painel A representa a avaliação do comportamento nociceptivo induzido por capsaicina (5,2 nmol/sítio), o painel B representa a avaliação do comportamento nociceptivo induzido por cinamaldeído (10 nmol/sítio) e o painel C representa o comportamento nociceptivo induzido por salina acidificada (pH 5,0). Cada coluna representa o valor médio obtido de 6 a 7 animais, e as linhas verticais indicam o erro padrão da média. Os asteriscos denotam os níveis de significância quando comparados com o grupo controle (ANOVA uma via seguido pelo teste de Bonferroni) ** $p < 0,01$ e **** $p < 0,0001$. Os caracteres correspondem às observações individuais em cada grupo.

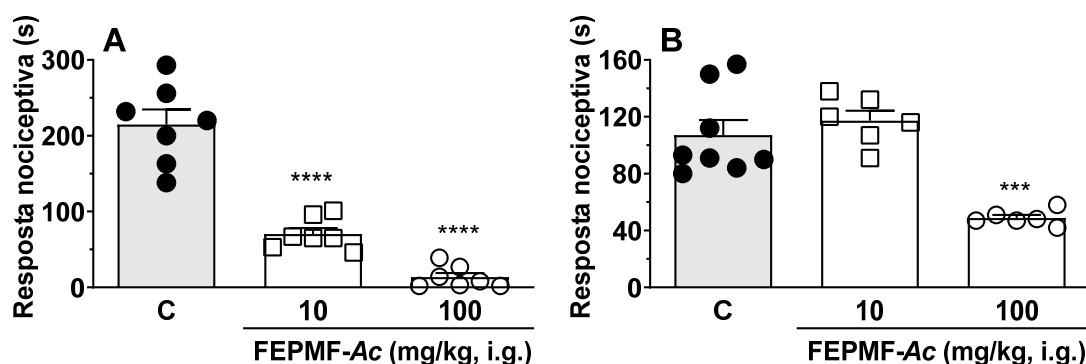
5.5.4 Nociceção induzida pela injeção intraplantar de substâncias ativadoras de proteína quinase C e adenilato ciclase

Como discutido anteriormente a sensibilização periférica a dor devido aos mediadores inflamatórios é dependente da ativação de receptores específicos nos nociceptores periféricos. Estudos eletrofisiológicos demonstraram que a ativação de receptores acoplados à proteína G de bradicinina, glutamato e histamina está relacionada a respostas intracelulares de enzimas fosfolipase C, fosfolipase A e adenilato ciclase (SOUZA *et al.*, 2002; BASBAUM *et al.*, 2009). Por sua vez, essas enzimas sinalizadoras geram mediadores que ativam proteínas quinase A e C, que fosforilam diferentes canais iônicos, como TRPV1 e ASICs, e conseqüentemente reduzem o limiar de ativação e aumentam a resposta dos terminais periféricos a estímulos

nociceptivos químicos, mecânicos e térmicos (BARON *et al.*, 2002; GOLD; GEBHART, 2010; PETHŐ; REEH, 2012).

Dessa forma, avaliou-se o efeito da FEPMF-*Ac* sobre o comportamento nociceptivo induzido por PMA, um ativador de proteínas quinase C (FERREIRA *et al.*, 2005), e forskolina, um ativador de adenilato ciclase, que aumenta os níveis intracelulares de adenosina 3',5'-monofosfato (AMP) cíclico e consequentemente ativa proteínas quinase A (BASBAUM *et al.*, 2009) e os resultados apresentados na Figura 40. Observa-se que a injeção intraplantar de PMA (500 nmol/pata) e forskolina (50 nmol/pata) induziu o comportamento nociceptivo em camundongos. Os animais passaram aproximadamente 214 e 107 segundos exibindo esse comportamento após a indução do estímulo nociceptivo com PMA e forskolina, respectivamente.

Figura 40 - Efeito da fração enriquecida em polimetoxiflavonas de *A. conyzoides* (10 e 100 mg/kg, i.g.) no comportamento nociceptivo induzido pela injeção intraplantar de forbol 12-miristato 13-acetato e forskolina em camundongos *Swiss* machos.



O painel **A** representa a avaliação do comportamento nociceptivo induzido por forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) (500 nmol/sítio), o painel **B** representa a avaliação do comportamento nociceptivo induzido por forskolina (50 nmol/sítio). Cada coluna representa o valor médio obtido de 6 a 7 animais, e as linhas verticais indicam o erro padrão da média. Os asteriscos denotam os níveis de significância quando comparados com o grupo controle (ANOVA uma via seguido pelo teste de Bonferroni) *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$. Os caracteres correspondem às observações individuais em cada grupo.

Por sua vez, o tratamento prévio com a FEPMF-*Ac* (100 mg/kg, i. g.) causou a inibição, quando comparado ao grupo controle, de $54 \pm 2\%$ ($p < 0,001$) da nocicepção induzida por forskolina (Figura 40B). Interessantemente, o tratamento prévio com a FEPMF-*Ac*, em ambas as doses testadas, foi mais potente e eficaz em inibir o comportamento nociceptivo induzido por PMA nos animais, com inibições de $67 \pm 4\%$ ($p < 0,0001$) e $94 \pm 3\%$ ($p < 0,0001$) para as doses de 10 e 100 mg/kg, respectivamente (Figura 40A). Os resultados encontrados sugerem que o tratamento com a FEPMF-*Ac* inibe fortemente a ativação proteínas quinases,

especialmente proteínas quinase C, visto que a menor dose de FEMPF-*Ac* também apresentou efeito antinociceptivo no modelo de nocicepção induzida por PMA.

Os promissores resultados de inibição da atividade antinociceptiva pela FEMPF-*Ac* exibidos no modelo de nocicepção por substâncias ativadoras de proteína quinase C, sugere que os efeitos benéficos da FEMPF-*Ac* demonstrados sobre outros quimiossensores endógenos (glutamato, histamina e bradicinina) e exógenos (dos canais TRPV1 e ASICs), podem estar associados, em partes, a eventos intracelulares de inibição da via de ativação de proteínas quinases C. Estudos adicionais visando analisar o conteúdo e ativação por *Western blot* ou outras técnicas deverão ser realizados para fornecer maiores subsídios sobre esta hipótese.

Estudos *in vitro* conduzidos com PMF isoladas do gênero *Citrus* observaram que a substância 5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavona (**26**) inibe a via da proteína quinase C, por meio da regulação negativa da tirosina quinase Syk, fosfolipase C e influxo intracelular de Ca²⁺ (ITOH *et al.*, 2008). Além desta, a nobiletina (**28**) demonstrou inibir em 51% a atividade da proteína quinase C em células RBL-2H3 estimuladas por PMA, assim como inibiu a ativação de fatores de transcrição NF-κB e AP-1, via proteína quinase C (JANG *et al.*, 2013). Interessantemente, ambas PMF fazem parte da composição da FEMPF-*Ac*.

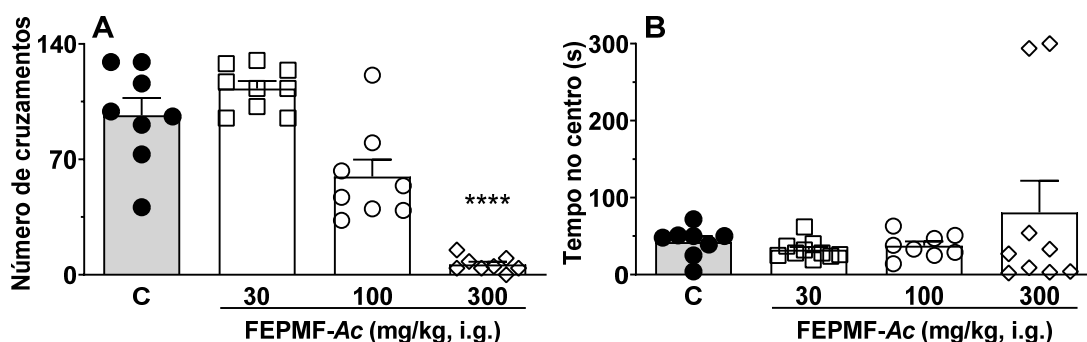
5.5.5 Avaliação locomotora: Teste do campo aberto (*open field*)

O modelo de avaliação em campo aberto é uma medida comum de comportamento exploratório e atividade geral em roedores, sendo usualmente empregado para avaliar efeitos tóxicos, sedativos ou estimulantes de substâncias. O interesse principal na realização deste modelo está relacionado a determinação da locomoção dos animais, expressa como a medida total da distância percorrida no aparato, entretanto outras medidas que podem ser tabuladas incluem tempo gasto em movimentação, criação e mudança em atividade ao longo do tempo e tempo de permanência no centro do aparato, sendo este último parâmetro costumeiramente associado à determinação da ansiedade nos animais (GOULD; DAO; KOVACSICS, 2009).

Os resultados obtidos na avaliação dos parâmetros de locomoção e comportamento tipo ansioso da FEMPF-*Ac* no ensaio do campo aberto são apresentados na Figura 41. A Figura 41A indica o número total de cruzamentos nos quadrantes do aparato, enquanto a Figura 41B apresenta o tempo de permanência dos animais no centro do aparato, considerado sugestivo de comportamento ansiolítico.

Observa-se que não existe diferença significativa entre os grupos controle e as doses de 30 e 100 mg/kg da FEPMF-Ac em ambos os parâmetros avaliados, demonstrando que essas doses não exercem efeitos significativos sobre a atividade locomotora e o comportamento de ansiedade dos animais. No entanto, a dose de 300 mg/kg da FEPMF-Ac ocasionou a diminuição de $82 \pm 12\%$ ($p < 0,0001$) do número de cruzamentos e conseqüentemente a diminuição da locomoção dos animais (Figura 41A), indicando que esta dose estaria relacionada possivelmente com a sedação dos animais. Por esta razão, a dose de 300 mg/kg da FEPMF-Ac não foi utilizada nos demais ensaios farmacológicos que foram realizados a fim de investigar o potencial antinociceptivo e anti-inflamatório da FEPMF-Ac, visto que não seria possível diferenciar a resposta dos animais nos modelos comportamentais, com a possibilidade de obter resultados falsos positivos.

Figura 41 - Efeito da fração enriquecida em polimetoxiflavonas de *A. conyzoides* (30-300 mg/kg, i.g.) no teste do campo aberto em camundongos Swiss machos.



O painel A representa o número de cruzamentos em cada quadrante do aparato, enquanto o painel B indica o tempo de permanência no centro do aparato. Cada coluna representa o valor médio obtido de 10 animais, e as linhas verticais indicam o erro padrão. Os asteriscos denotam os níveis de significância quando comparados com o grupo controle (ANOVA uma via seguido pelo teste Bonferroni), **** $p < 0,0001$. Os caracteres correspondem às observações individuais em cada grupo.

Resultados semelhantes foram encontrados no trabalho desenvolvido por Shajib e colaboradores (2018) que investigou os efeitos neurofarmacológicos de PMF isoladas da espécie *Nicotiana plumbaginifolia*. Os animais tratados pela via oral com as substâncias 3,3',4',5',5,6,7,8-octametoxiflavona e 6,7,4',5'-dimetilenodioxo-3,5,3'-trimetoxiflavona apresentaram diminuição significativa na função locomotora dos animais no modelo do campo aberto e uma versão adaptada do modelo de transição claro-escuro. Os resultados foram associados aos efeitos ansiolíticos observados no modelo do labirinto em cruz elevado, sugerindo o envolvimento dessas substâncias em receptores GABA_A semelhante aos fármacos benzodiazepínicos.

Interessantemente, durante a realização do estudo farmacocinético com a substância isolada 5'-MeONB (marcador da FEPMF-*Ac*), observou-se que os ratos que receberam a administração por via oral apresentaram o mesmo comportamento de diminuição da mobilidade e provável sedação. Entretanto, o mesmo efeito não foi observado nos animais que receberam a substância isolada pela via endovenosa (i.v.). Uma vez que a biodisponibilidade por via oral da 5'-MeONB é bastante inferior àquela por via i.v. (conforme os resultados no item 5.8.2), este efeito parece não estar relacionado a substância intacta e sim a algum produto da biotransformação da 5'-MeONB no trato gastrointestinal. Neste sentido, estudos adicionais necessitam ser realizados a fim de se identificar quais os mecanismos envolvidos na diminuição da locomoção dos animais e a(s) substância(s) responsáveis por este efeito, bem como a formação de metabólitos provenientes da administração pela via oral.

5.6 AVALIAÇÃO DA FARMACODINÂMICA E FARMACOCINÉTICA DO MARCADOR 5'-MeONB

5.6.1 Purificação do marcador 5'-MeONB por CPC

Visando a condução da investigação farmacodinâmica e farmacocinética do marcador 5'-MeONB, realizou-se a sua purificação utilizando a CPC.

A escolha do sistema bifásico de separação da PMF 5'-MeONB das demais PMF presentes na FEPMF-*Ac* foi baseada nos valores de K_D obtidos pelo teste de seleção de sistema conhecido como *shake flask*, descrito no item 4.4.3.1. Observando os valores de K_D obtidos para a substância 5'-MeONB frente ao sistema binário Hex-AcOEt-EtOH-H₂O (1:1:1) (v/v), apresentados na Tabela 10, é possível verificar que existe um grande diferença entre os valores de coeficiente de partição entre a substância de interesse 5'-MeONB e as PMF com tempo de retenção mais próximo, as substâncias nobiletina e eupalestina, conforme pode ser observado no cromatograma da Figura 17. Considerando que o fator de separação entre dois componentes deve ser superior à 1,5 para uma separação de linha de base, foram encontrados fatores de separação ($\alpha = K_{D2}/K_{D1}$) equivalentes à 2,28 entre as substâncias nobiletina e 5'-MeONB e 1,53 entre as substâncias 5'-MeONB e eupalestina, indicativos de uma boa separação (HU; PAN, 2012).

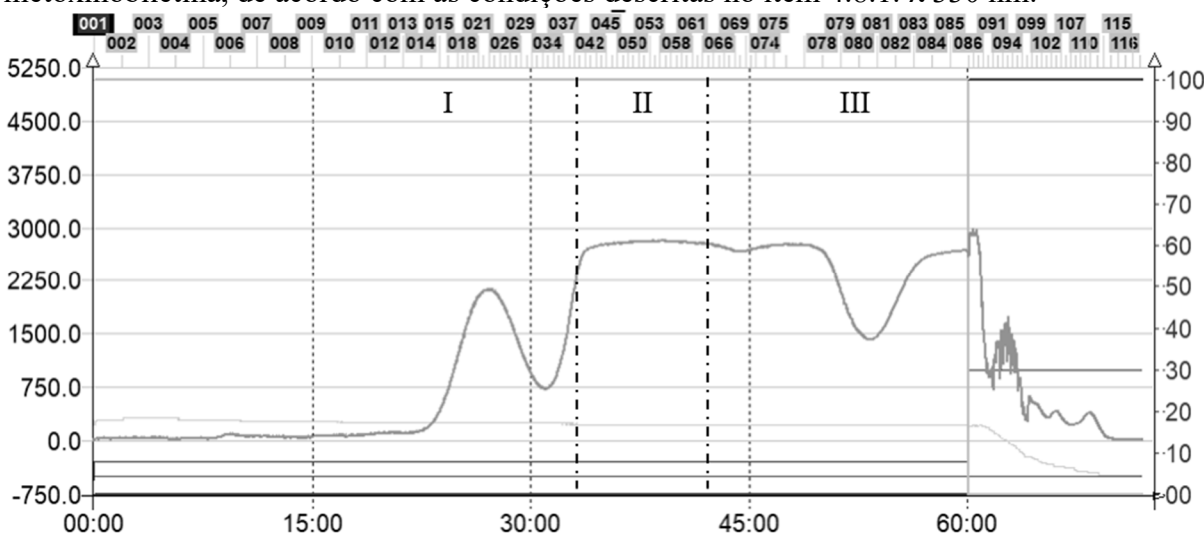
Tabela 10 - Valores de coeficiente de partição (K_D) obtidos para os modos de eluição ascendente (ASC) e descendente (DSC) para as polimetoxiflavonas nobiletina, 5'-metoxinobiletina e eupalestina presentes no extrato bruto de *n*-hexano de *A. conyzoides* frente ao sistema de Hex-AcOEt-EtOH-H₂O (1:1:1:1), determinados segundos as condições experimentais descritas no item 4.4.3.1.

Modo de eluição	Valores de K_D		
	NOBI	5'-MeONB	EUPA
ASC	3,94	1,72	1,12
DSC	0,25	0,58	0,89

Hex: *n*-hexano; AcOEt: acetato de etila; EtOH: etanol; H₂O: água; NOBI: nobiletina; 5'-MeONB: 5'-metoxinobiletina; EUPA: eupalestina.

Após a escolha do sistema bifásico Hex-AcOEt-EtOH-H₂O (1:1:1:1), em modo de eluição ascendente como também o mais adequado para o isolamento da substância 5'-MeONB, uma alíquota da FEPMF-*Ac* (370,3 mg) foi submetida ao fracionamento cromatográfico no sistema de CPC, conforme ilustrado no cromatograma da Figura 42.

Figura 42 - Cromatograma do fracionamento cromatográfico da fração enriquecida em polimetoxiflavonas de *A. conyzoides* em sistema de CPC para isolamento do marcador 5'-metoxinobiletina, de acordo com as condições descritas no item 4.8.1. λ 330 nm.



No cromatograma da FEPMF-*Ac* submetido ao processo de fracionamento por CPC para o isolamento do marcador 5'-MeONB foram coletadas 117 frações, as quais tiveram seu perfil cromatográfico avaliado por CCD a fim de identificar as frações que apresentavam apenas o marcador isoladamente. Neste processo foram reunidas três frações principais, estando a substância 5'-MeONB contida na fração II, com rendimento de 170,1 mg (45,93%).

5.6.2 Identificação e determinação da pureza do marcador 5'-MeONB

A partir dos dados obtidos de RMN ^1H e EM confirmou-se que a fração II, obtida por CPC, tratava-se da substância 5'-MeONB. O espectro de RMN ^1H obtido da substância é apresentado na Figura 43. Na ampliação do espectro de RMN ^1H (Figura 44) observa-se um simpleto em 7,21 ppm (2H, H-2' e H-6') demonstrando tratar-se de hidrogênios simétricos atribuídos como os hidrogênios de anel aromático. Observa-se também, outro simpleto em 7,06 ppm (1H, H-3) cujo valor mais desblindado foi atribuído ao hidrogênio olefínico, do anel C da flavona. Os dados foram comparados com a literatura e estão de acordo com a substância 5'-MeONB (27) (ADESOGAN; OKUNADE, 1979; MOREIRA *et al.*, 2007).

Figura 43 - Espectro de RMN ^1H (300 MHz, TMS, CDCl_3) da substância 5'-metoxinobiletina isolada por cromatografia de partição centrífuga.

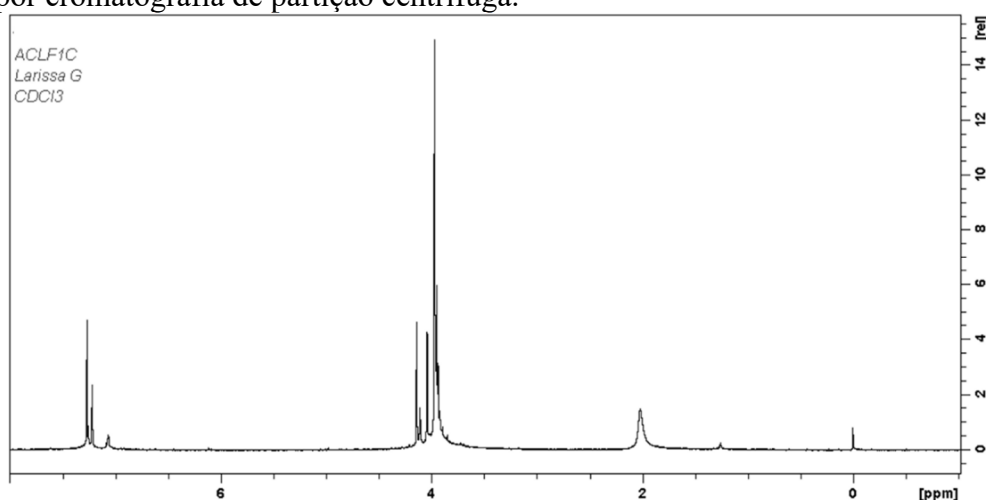
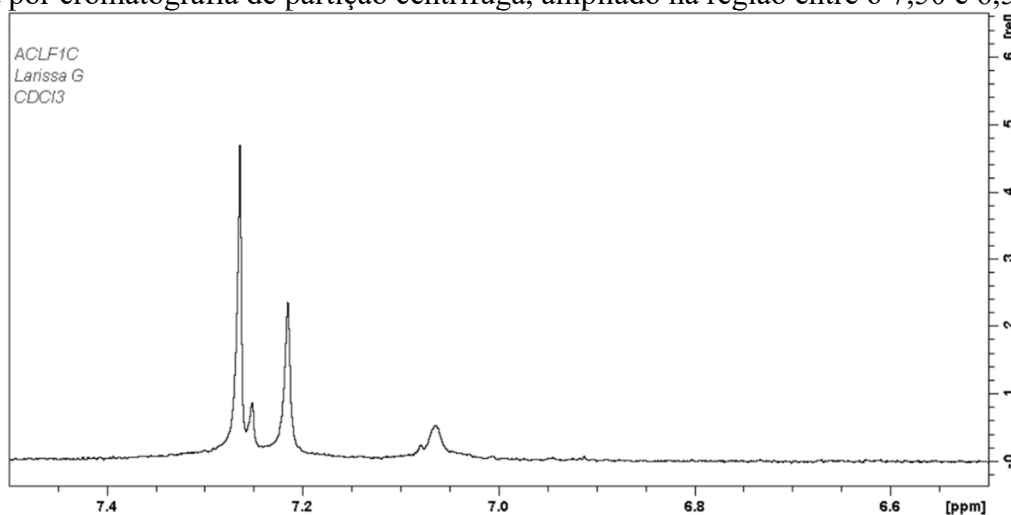
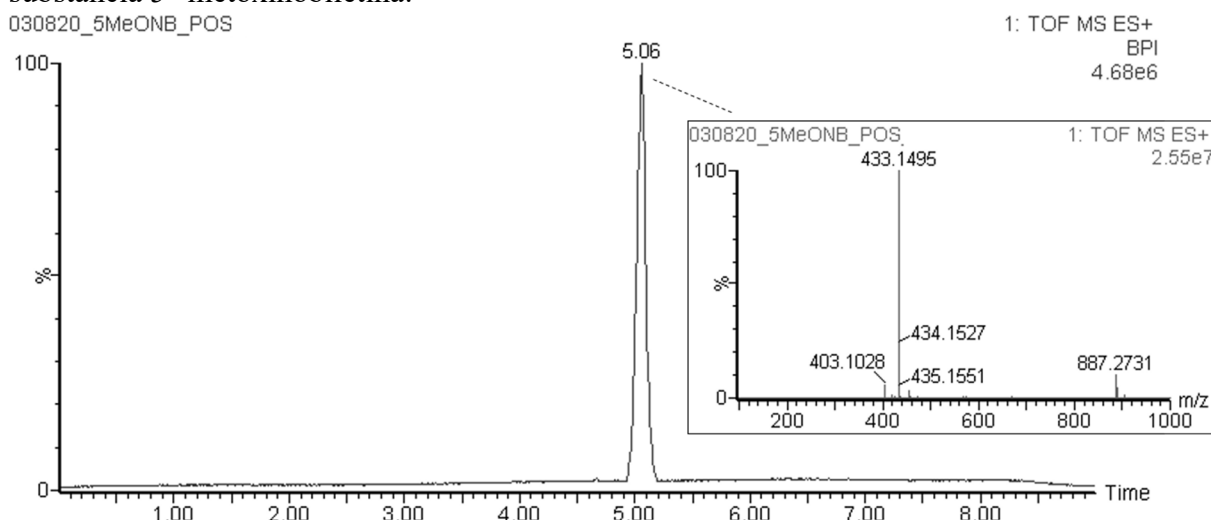


Figura 44 - Espectro de RMN ^1H (300 MHz, TMS, CDCl_3) da substância 5'-metoxinobiletina isolada por cromatografia de partição centrífuga, ampliado na região entre δ 7,50 e 6,50.



Em relação às análises de UPLC-MS da substância isolada, no cromatograma obtido da amostra observa-se a presença de um único sinal cromatográfico, com tempo de retenção equivalente a 5,06 minutos, conforme demonstrado na Figura 45. No espectro de massa obtido por *ESI(+)* é possível observar o valor de íon de *m/z* equivalente a 433,1495 $[M + H]^+$. A diferença entre o valor experimental obtido e o valor teórico calculado para esta substância (433,1499 Da) é de -0,9 ppm (valor de erro calculado), confirmando que a fração II se trata da substância 5'-MeONB. A determinação de pureza da substância por UPLC-MS demonstrou uma pureza superior a 99%.

Figura 45 - Cromatograma de intensidade de pico base (BPI) obtido por UPLC-ESI-MS da substância 5'-metoxinobiletina.



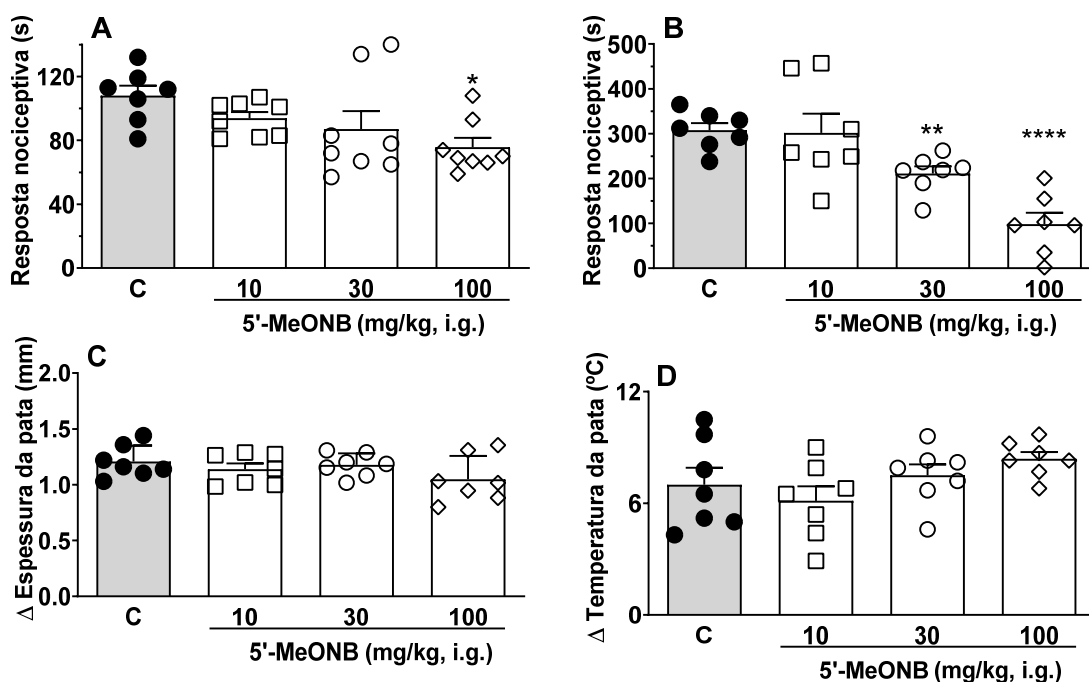
5.6.3 Efeito antinociceptivo do marcador 5'-MeONB

Adicionalmente a FEPMF-*Ac*, avaliou-se o potencial antinociceptivo da substância majoritária 5'-MeONB no mesmo modelo de formalina, a fim de correlacionar o papel deste marcador na resposta desempenhada pela FEPMF-*Ac*. Primeiramente optou-se em verificar o efeito do marcador em solução salina contendo 5% de *tween* 80, visto que o restante dos outros modelos farmacológicos com a FEPMF-*Ac* foram realizados utilizando este veículo.

Os resultados de nociceção obtidos para o marcador 5'-MeONB dissolvida em solução salina contendo 5% de *tween* 80 são apresentados nos gráficos da Figura 46. O tratamento reduziu ambas as fases neurogênica e inflamatória do comportamento nociceptivo induzido por formalina (Figura 46-A e B), com inibição máxima de $30 \pm 5\%$ na fase neurogênica e $62 \pm 9\%$ na fase inflamatória, quando comparados ao grupo controle. Como demonstrado pela FEPMF-

Ac, o efeito antinociceptivo foi significativamente maior na fase inflamatória, apresentando para esta fase um valor de dose inibitória de 50% da nocicepção (DI_{50}) referente a 63,42 mg/kg, com seus respectivos limites de confiança de 95% entre 34,24 a 117,5 mg/kg. Não foi observado um efeito inibitório significativo na formação de edema e aumento da temperatura na pata desses animais (Figura 46C e D).

Figura 46 - Efeito do marcador 5'-metoxinobiletina (10-100 mg/kg, i.g.) no comportamento nociceptivo induzido pela injeção intraplantar de formalina em camundongos *Swiss* fêmeas.



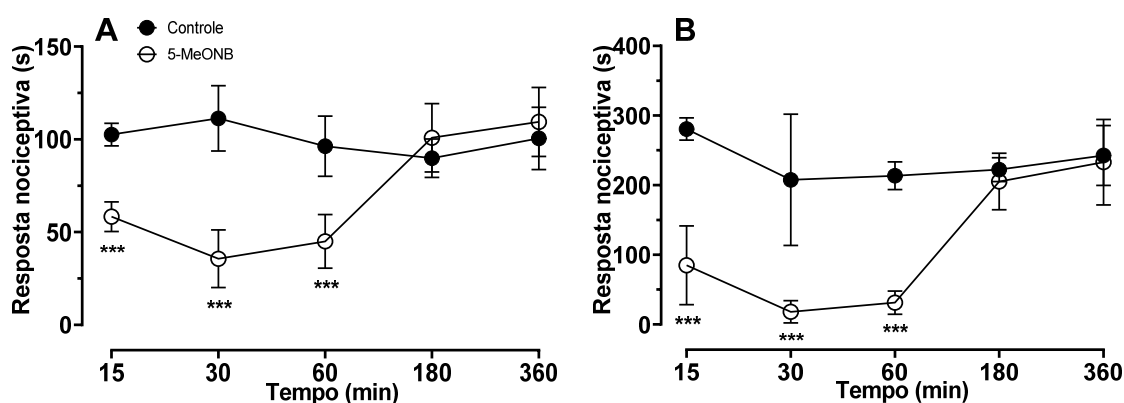
O total de tempo gasto lambendo a pata traseira foi medido durante a fase neurogênica (0-5 min, painel A) e a fase inflamatória (15-30 min, painel B). O painel C representa o edema na pata correspondente à diferença entre a espessura da pata antes e após o teste. O painel D representa a diferença de temperatura na pata antes e após o teste. Cada coluna representa o valor médio obtido de 7 animais, e as linhas verticais indicam o erro padrão. Os asteriscos denotam os níveis de significância quando comparados com o grupo controle (ANOVA uma via seguido pelo teste Bonferroni), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e **** $p < 0,0001$. Os caracteres correspondem às observações individuais em cada grupo.

O teor médio de 5'-MeONB na FEPMF-*Ac* é equivalente a 0,4 g/g, isso significa que a dose de 100 mg/kg da fração apresenta aproximadamente 40 mg/kg deste marcador. Consequentemente, conclui-se que a substância 5'-MeONB contribui eficientemente para a atividade antinociceptiva exibida pela FEPMF-*Ac*, entretanto, as outras substâncias presentes na fração também colaboram para este efeito, sugerindo um efeito sinérgico entre as PMF da FEPMF-*Ac*. Neste sentido, alguns trabalhos já demonstraram os benefícios da substância nobiletina, outra PMF identificada na FEPMF-*Ac*, no tratamento de condições inflamatórias

como artrite e colite (IMADA *et al.*, 2008; XIONG *et al.*, 2015), e o efeito anti-inflamatório da eupalestina, também identificada na fração, na resposta induzida por carragenina na cavidade pleural de camundongos (DE MELLO *et al.*, 2016). Além disso, os resultados demonstrados para 5'-MeONB

Aprofundando o conhecimento acerca do efeito da 5'-MeONB no comportamento nociceptivo induzido por formalina, verificou-se seu efeito após 15, 30, 60, 180 e 360 minutos de administração oral em um experimento de decurso temporal (Figura 47). Além disso, se avaliou o efeito utilizando como veículo PEG 400-DMSO (80:20) (v/v), que garantiu a completa solubilização da substância. Observa-se que o tratamento agudo com 5'-MeONB (100 mg/kg) reduziu significativamente ($p < 0,01$) ambas as fases do modelo de formalina após 15, 30 e 60 minutos da administração oral da substância, quando comparados aos seus respectivos grupos controle. Na fase neurogênica, foram observadas inibições significativas de $43 \pm 3\%$, $68 \pm 6\%$ e $53 \pm 5\%$ (Figura 47A) da resposta nociceptiva, enquanto que a resposta nociceptiva da fase inflamatória do modelo foi inibida em $70 \pm 8\%$, $91 \pm 3\%$ e $85 \pm 3\%$ (Figura 47B) após 15, 30 e 60 minutos da administração oral de 5'-MeONB, respectivamente.

Figura 47 - Efeito do decurso temporal do marcador 5'-metoxinobiletina (100 mg/kg, i.g.) no comportamento nociceptivo induzido pela injeção intraplantar de formalina em camundongos *Swiss* fêmeas.



O gráfico A representa os efeitos na fase neurogênica (0-5 min), enquanto o gráfico B representa os efeitos na fase inflamatória (15-30 min). Cada ponto representa a média dos valores obtidos de 6-8 animais, e as linhas verticais indicam o desvio padrão. Os asteriscos denotam os níveis de significância quando comparados com o grupo controle (teste t de Student), *** $p < 0,001$.

Os resultados encontrados demonstram o início rápido do efeito antinociceptivo de 5'-MeONB, quando administrado oralmente em camundongos indicando que essa substância é rapidamente absorvida pela via oral quando administrada em solução, mantendo seu efeito

antinociceptivo, pelo menos, até uma hora após a sua administração oral. Entre 15 e 30 minutos após a administração, observa-se o aumento significativo da resposta antinociceptiva ($p < 0,05$), em ambas as fases do modelo, com a maior inibição da resposta nociceptiva 30 minutos após a administração. Entretanto, não existe diferença significativa na inibição da resposta nociceptiva entre 30 e 60 minutos após a administração, em ambas as fases do modelo de formalina. Além disso, após 3 horas da administração oral a substância não foi capaz de inibir o comportamento nociceptivo dos animais, quando comparado ao grupo controle, sugerindo sua rápida eliminação em camundongos.

Adicionalmente, a comparação entre os valores de inibição obtidos uma hora após a administração oral da 5'-MeONB em ambos os ensaios (curva dose-resposta e decurso temporal) demonstram que PEG 400-DMSO (80:20) (v/v) provou ser um melhor veículo para o preparo da amostra, melhorando o efeito farmacológico devido a uma solubilização mais eficiente e consequente absorção do 5'-MeONB.

O conjunto de resultados farmacológicos obtidos demonstram pela primeira vez o efeito antinociceptivo do 5'-MeONB na resposta nociceptiva causada pela formalina, especialmente na fase inflamatória do modelo, corroborando com os relatos anteriores sobre seu potencial anti-inflamatório (DE MELLO *et al.*, 2016).

5.6.4 Método bioanalítico para quantificação de 5'-MeONB por UPLC-MS

5.6.4.1 Desenvolvimento do método bioanalítico e processamento da amostra biológica

As condições cromatográficas para a quantificação do marcador 5'-MeONB no plasma dos ratos foram sistematicamente otimizadas para reduzir o tempo de análise e obter um formato de pico apropriado para o marcador e o padrão interno. Nesse sentido, diferentes gradientes de fase móvel (combinando água acidificada com ácido fórmico 0,1% e acetonitrila) e temperatura da coluna (25 e 40 °C) foram testadas até serem obtidas as condições ideais de análise, apresentadas no item 4.9.1 da seção experimental. Da mesma forma, alterações nas condições de EM e nos parâmetros de aquisição foram testados a fim de melhorar a ionização e a detecção do marcador 5'-MeONB e do padrão interno e, conseqüentemente, aumentar a sensibilidade do método proposto. Em relação às condições de ionização, observou-se que a diminuição do fluxo de gás no cone e o aumento da temperatura de dessolvatação foram os parâmetros fundamentais para o aumento da sensibilidade do método.

Em relação ao método de processamento da amostra biológica, o procedimento de extração para a remoção de proteínas no plasma foi otimizado com o intuito de obter-se uma amostra limpa para a redução do efeito da matriz e a interferência de íons na análise por UPCL-EM. Diferentes volumes, tipos de solventes e proporções de misturas de solventes foram testadas quanto à precipitação de proteínas, incluindo acetonitrila, metanol e água, bem como a acidificação com os ácidos trifluoroacético (0,2 e 0,1%) ou tricloroacético (20, 10 e 5%) (POLSON *et al.*, 2003). As melhores condições, que demonstraram menor interferência na sensibilidade de 5'-MeONB e do padrão interno, além de maiores porcentagens de recuperação do marcador, foram obtidas utilizando 200 μ L de acetonitrila em 100 μ L da amostra (proporção de 2:1, v/v) associada à etapa de centrifugação.

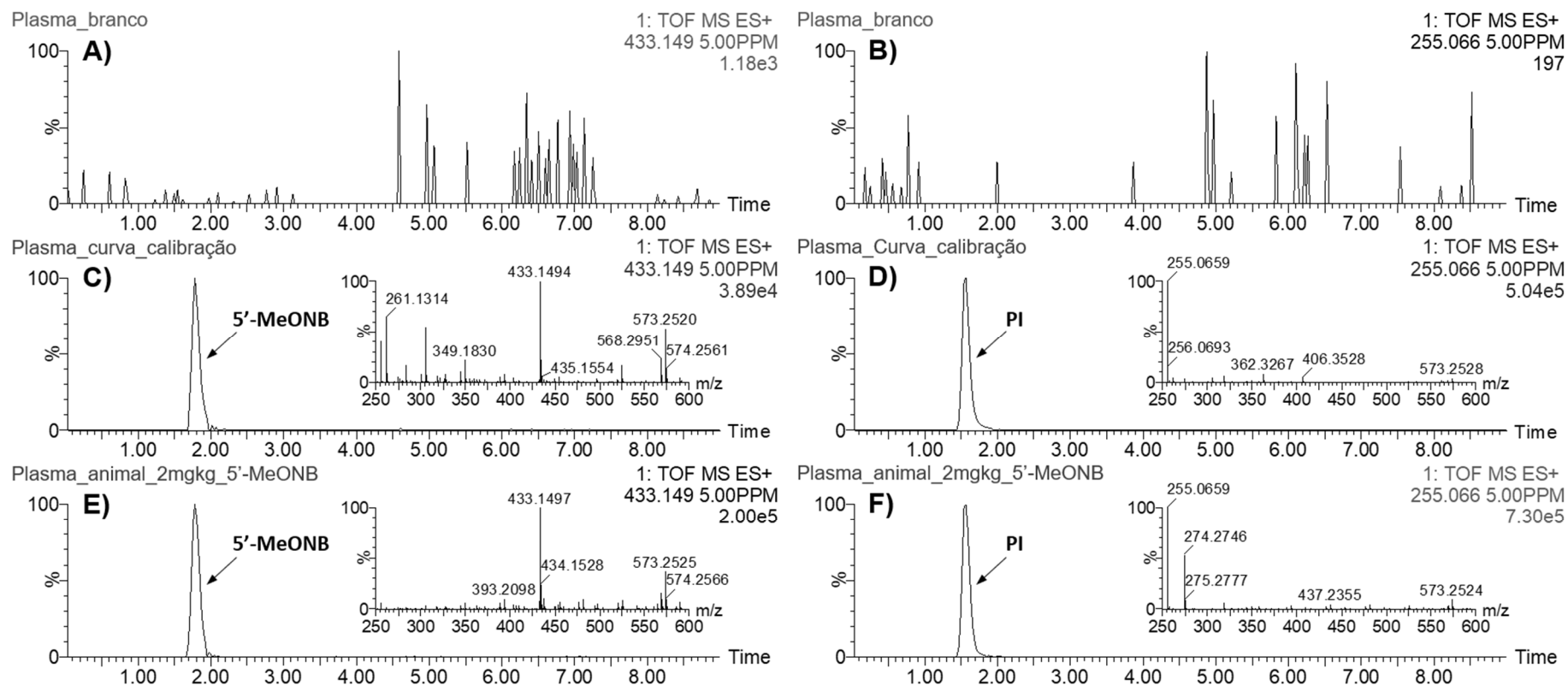
5.6.4.2 Parâmetros bioanalíticos de mérito do método

5.6.4.2.1 Seletividade

A comparação entre os cromatogramas obtidos após a injeção das amostras de plasma branco, da curva de calibração e do plasma dos animais tratados com 5'-MeONB (2 mg/kg) não revelou interferência por substâncias endógenas da matriz, permitindo a determinação seletiva de 5'-MeONB e crisina utilizando o método bioanalítico desenvolvido, conforme demonstrado na Figura 48.

Os cromatogramas apresentados na Figura 48A e 48B mostram que não houve a eluição de picos nos cromatogramas de íon extraído com m/z 433,1494 (para 5'-MeONB) e m/z 255,0657 (para crisina) da amostra de plasma livre de substâncias (em branco), indicando a ausência de substâncias interferentes com a mesma relação massa/carga e tempo de retenção (t_R) em seus respectivos cromatogramas. Além disso, os cromatogramas da Figura 48C e 48E apresentam os picos acentuados correspondentes a 5'-MeONB (t_R 1,78 min) nos cromatogramas da curva de calibração e do plasma dos animais tratados, respectivamente. O mesmo é observado na Figura 48D e 48F, para o pico correspondente ao padrão interno de crisina (PI, t_R 1,57 min). Além disso, os EM correspondentes desses picos em ambas as amostras também indicaram apenas um íon molecular com m/z 433 e m/z 255, comprovando a seletividade do método.

Figura 48 - Cromatogramas de íons extraído (*ESI+*) para 5'-metoxinobiletina (5'-MeONB, t_R : 1,78 min, m/z 433,1494) e crisina (IS, t_R :1,57 min, m/z 255,0657) em amostras de plasma.



(A) e (B) plasma branco; (C) e (D) plasma da curva de calibração com 5'-MeONB (30 ng/mL) e crisina (1000 ng/mL); (E) e (F) plasma da amostra processada após 1 hora da administração de 2 mg/kg de 5'-MeONB em rato *Wistar* pela via oral.

5.6.4.2.2 Linearidade e limite de quantificação

A linearidade do método analítico desenvolvido foi determinada por meio da curva de calibração construída a partir da análise de regressão linear dos valores de concentração versus a razão da leitura das áreas obtidas. A curva de calibração e análise de resíduos são apresentados nas Figuras 49 e 50, respectivamente. A curva de calibração do marcador 5'-MeONB é representada pela equação $y = 1,2538x + 0,022$, com coeficiente de correlação (R) de 0,9996 e coeficiente de determinação (R^2) de 0,9992, dentro da faixa linear de 30 – 750 ng/mL. Além disso, calculando-se a exatidão individual das amostras da curva de calibração, usando o modelo de regressão linear, os valores de concentração calculados diferem em até 5% das concentrações experimentais para todas as amostras, exceto para o LQ, que mostrou uma variação de até 19%. O LQ foi de 30 ng/mL, estabelecido com precisão e exatidão adequadas nas condições experimentais utilizadas neste método.

Figura 49 - Curva de calibração para 5'-metoxinobiletina em função da Razão das Área X Concentração.

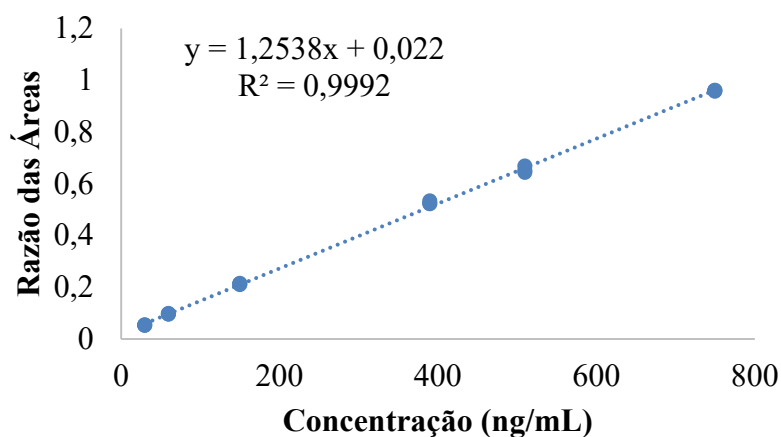
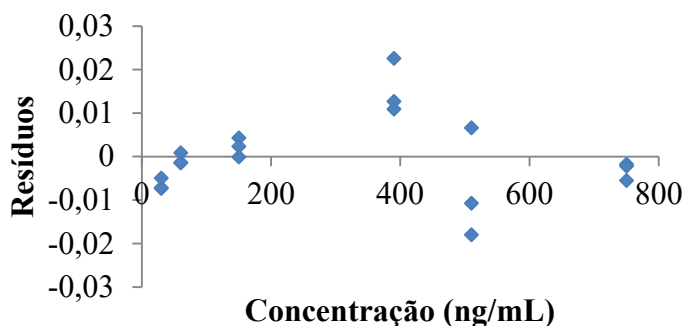


Figura 50 - Gráfico dos resíduos em função da concentração (ng/mL) para o ajuste do modelo $y = 1,2538x + 0,022$ para a substância 5'-metoxinobiletina.



A análise de variância demonstrou a significância do modelo linear, uma vez que para a curva de calibração o valor de $F_{\text{calculado}}$ (20886,09) foi superior ao valor de $F_{\text{crítico}}$ (4,75). Os resíduos do modelo linear (Figura 50) foram dispersos de maneira aleatória, indicando a ausência de tendência do modelo linear.

5.6.4.2.3 Precisão e exatidão

Os resultados de precisão e exatidão do método bioanalítico determinados nas amostras CQ e LQ são apresentados nas Tabela 11 e 12, respectivamente. Os desvios da repetibilidade do método encontram-se entre 1,13 a 10,8%, enquanto os DPR da precisão intermediária foram entre 2,16-7,54% (Tabela 11). A exatidão do método variou de 82,51 a 104,56% para o LQ e entre 86,59 e 109,44% para as amostras de CQ (Tabela 12). Esses resultados garantem que o método possui precisão e exatidão adequadas, de acordo com os critérios de aceitação do FDA (FDA, 2018).

Tabela 11- Parâmetros de repetibilidade e precisão intermediária para o marcador 5'-metoxinobiletina em plasma de rato, segundo as condições experimentais estabelecidas.

Concentração nominal (ng/mL)	Day	Concentração experimental	
		Média \pm desvio (ng/mL)	DPR (%)
Repetibilidade^a			
30 (LQ)	1	26,79 \pm 0,98	3,65
	2	26,95 \pm 2,91	10,80
	3	28,53 \pm 1,79	6,28
90	1	80,24 \pm 1,83	2,28
	2	85,02 \pm 4,72	5,55
	3	85,61 \pm 5,02	5,02
360	1	385,46 \pm 7,42	1,93
	2	373,98 \pm 7,82	2,10
	3	371,85 \pm 4,96	1,34
600	1	604,59 \pm 17,71	2,93
	2	59776 \pm 7,85	2,13
	3	614,35 \pm 6,94	1,13
Precisão intermediária^b			
30 (LQ)		27,43 \pm 2,07	7,54
90		83,63 \pm 4,55	5,44
360		377,10 \pm 8,86	2,35
600		605,57 \pm 13,06	2,16

^a: n = quintuplicata/dia; ^b: estabelecida pela média e desvio padrão das quinze réplicas relativas as quintuplicatas dos três dias da repetibilidade.).

Tabela 12 - Parâmetros de exatidão para o marcador 5'-metoxinobiletina em plasma de rato, segundo as condições experimentais estabelecidas.

Concentração nominal (ng/mL)	Arranjo da concentração experimental (ng/mL)	Exatidão (%)
30 (LQ)	24,75–31,37	82,51–104,56
90	77,98–90,84	86,59–100,93
360	362,54–394,00	100,71–109,44
600	584,63–626,78	97,44–104,46

5.6.4.2.4 Recuperação e efeito matriz

A recuperação de 5'-MeONB nas amostras investigadas variou de 85,97 a 102,43%, independentemente da concentração testada (Tabela 13), enquanto a recuperação de crisina variou entre 94,70 e 106,35% (Tabela 14), demonstrando que o método de extração tem influência mínima na determinação de 5'-MeONB e crisina, assim como amostras hemolisadas.

Em relação ao efeito matriz, os resultados mostraram variação inferior a 10%, tanto para 5'-MeONB quanto para crisina, conforme demonstrado nas Tabelas 13 e 14, estando de acordo os critérios para a validação de métodos bioanalítico (FDA, 2018).

Tabela 13 - Parâmetros de efeito matriz e recuperação para o marcador 5'-metoxinobiletina em plasma desproteínizado e hemolisado de rato, segundo as condições experimentais estabelecidas.

5'- MeONB (ng/mL)	Efeito matriz* (%)	Recuperação (%) em plasma branco desproteínizado*	Recuperação (%) em plasma hemolisado*
90	109,18 ± 2,13	92,87 ± 0,99	100,87 ± 3,98
360	105,25 ± 5,76	89,14 ± 2,80	102,43 ± 2,44
600	107,50 ± 4,57	85,97 ± 1,12	96,92 ± 2,29

*determinado em quintuplicata, expresso em média ± desvio padrão.

Tabela 14 - Parâmetros de efeito matriz e recuperação para o padrão interno crisina em plasma desproteínizado e hemolisado de rato, segundo as condições experimentais estabelecidas.

5'- MeONB (ng/mL)	Efeito matriz* (%)	Recuperação (%) em plasma branco desproteínizado*	Recuperação (%) em plasma hemolisado*
90	97,74 ± 0,43	100,09 ± 0,60	99,96 ± 0,69
360	95,75 ± 4,76	98,23 ± 2,16	106,35 ± 2,15
600	98,59 ± 4,44	94,70 ± 1,46	103,54 ± 1,56

*determinado em quintuplicata, expresso em média ± desvio padrão.

5.6.4.2.5 Estabilidade

Os resultados do ensaio de estabilidade demonstraram que a 5'-MeONB é estável nas condições preliminares testadas neste estudo. Após 30 dias armazenados a -80 ± 2 °C, as concentrações de 5'-MeOBN foram determinadas com $99,34 \pm 3,52\%$ e $106,48 \pm 3,01\%$ de exatidão, nas concentrações baixa e alta de QC (90 e 600 ng/mL), respectivamente. Da mesma forma, após a desproteíntização das amostras, o marcador manteve sua estabilidade por 12 h no amostrador automático a 8 ± 1 °C, com $94,95 \pm 7,49\%$ e $105,86 \pm 1,88\%$ de exatidão, nas concentrações 90 e 600 ng/mL do CQ, respectivamente.

Estes resultados demonstram a estabilidade do 5'-MeOBN sob as condições experimentais de armazenamento e análise das amostras biológicas avaliadas. As condições investigadas foram selecionadas com base no protocolo experimental utilizado neste estudo, em que o volume de sangue coletado é suficiente para um ponto de análise/tempo e o plasma foi congelado a -80 ± 2 °C até 30 dias após a separação do sangue. Como as amostras descongeladas foram imediatamente processadas e analisadas, nenhum extenso estudo de estabilidade envolvendo o ciclo de congelamento-descongelamento foi necessário.

5.6.4.2.6 Efeito residual

Com relação ao efeito residual (*carryover*) de substâncias no equipamento cromatográfico e no espectrômetro de massas, não foi observada a presença das substâncias avaliadas, 5'-MeONB e crisina, nos cromatogramas adquiridos com a injeção apenas de acetonitrila após injeções sucessivas da maior concentração da curva de calibração (750 ng/mL).

5.6.4.2.7 Diluição

Os resultados da avaliação da integridade da diluição são apresentados na Tabela 15. Observa-se que amostras diluídas na proporção 1:10 com acetonitrila confirmaram a integridade da diluição nessa proporção com exatidão equivalente a $108,02 \pm 2,56\%$. Dessa forma, garante-se que a diluição de amostras em concentrações acima do limite de quantificação superior da curva não interfere na correta determinação da concentração dessas amostras.

Tabela 15 - Integridade da diluição 1:10 de plasma de rato contendo 5'-MeONB, segundo as condições experimentais estabelecidas.

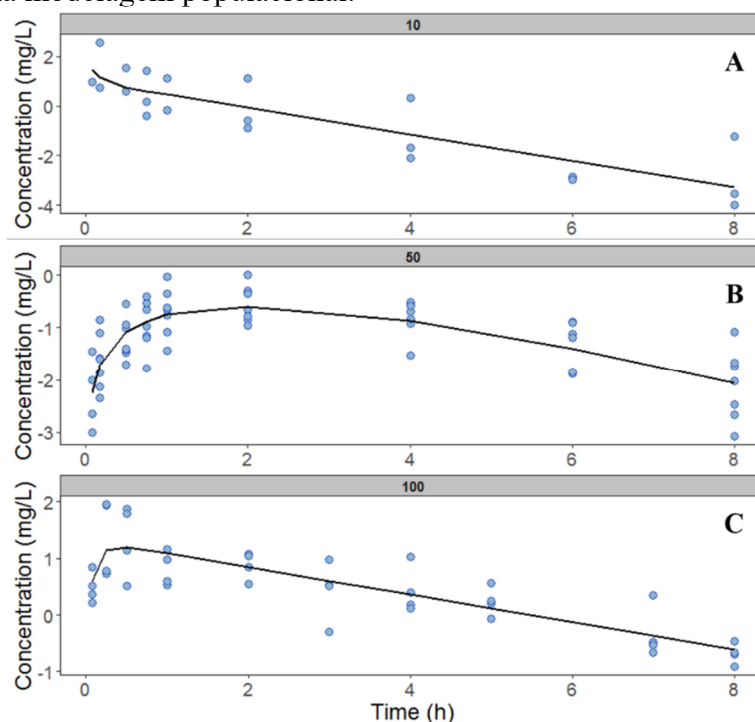
Concentração nominal (ng/mL)	Concentração experimental (ng/mL)	Exatidão (%)	Média ± DPR
300	328,80	109,60	108,02 ± 2,56
	322,26	107,42	
	310,33	103,44	
	328,24	109,41	
	330,71	110,24	

Em conjunto, os resultados obtidos nos ensaios de validação confirmam a seletividade, linearidade, precisão, exatidão e estabilidade apropriadas do método bioanalítico desenvolvido, permitindo sua utilização para determinar a 5'-MeONB no plasma de ratos.

5.6.5 Estudo farmacocinético pré-clínico

A farmacocinética pré-clínica de 5'-MeONB foi avaliada em ratos *Wistar* machos após a administração i.v. de 10 mg/kg e oral de 50 mg/kg. Os perfis de concentração plasmática de 5'-MeONB obtidos para ratos e camundongos são apresentados na Figura 51.

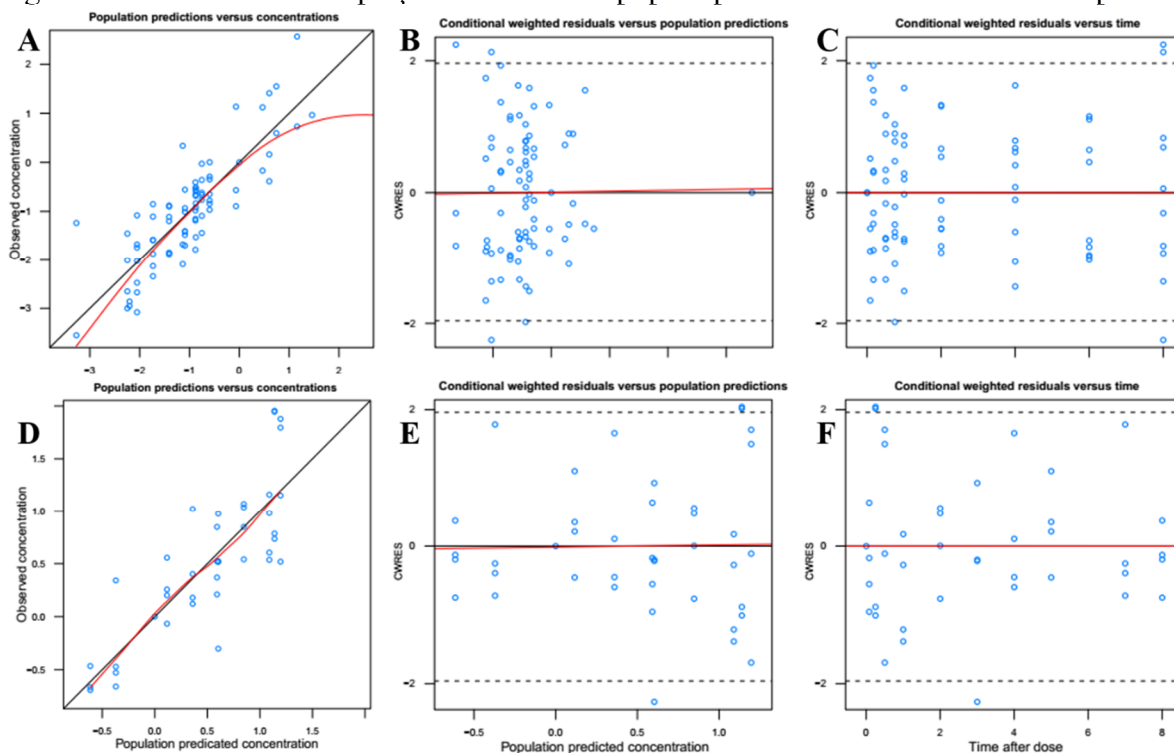
Figura 51 - Perfis de concentração plasmática de 5'-MeONB em ratos e camundongos estabelecidos pela modelagem populacional.



Perfis de concentração plasmática em ratos *Wistar* após administração intravenosa de 10 mg/kg (A) e oral de 50 mg/kg (B) e em camundongos *Swiss* após administração oral de 100 mg/kg (C). Os círculos azuis representam a concentração observada no plasma. Linha sólida = previsão com base na análise farmacocinética *naïve* média.

De acordo com os dados obtidos, o modelo de dois compartimentos foi considerado o melhor modelo para descrever as concentrações plasmáticas de 5'-MeONB em ratos durante o processo de discriminação do modelo, enquanto o modelo de um compartimento descreveu melhor os dados para os camundongos. O melhor modelo para ajustar os dados foi escolhido com base no diagnóstico visual do gráfico, incluindo a inspeção do modelo aos dados experimentais e a distribuição aleatória de resíduos, assim como a coerência dos parâmetros farmacocinéticos determinados. Os gráficos de adequação do modelo populacional final, demonstrando os resíduos ponderados versus as concentrações plasmáticas de 5'-MeONB determinadas são apresentados na Figura 52. Nenhuma tendência ou erro de especificação do modelo é observada na avaliação visual dos gráficos de adequação de ratos e camundongos, confirmando a capacidade dos modelos de prever bem os dados experimentais para ambas as espécies.

Figura 52 - Gráficos de adequação dos modelos popPK para 5'-MeONB em ambas espécies.



(A) Observações vs. previsões populacionais dos dados i.v. e orais de ratos; (B) Resíduos ponderados condicionais vs. previsões populacionais dos dados i.v. e orais de ratos; (C) Resíduos ponderados condicionais vs. tempo dos dados i.v. e orais de ratos; (D) Observações vs. previsões populacionais em dados orais de camundongos; (E) Resíduos ponderados condicionais vs. previsões populacionais dos dados orais de camundongos; (F) Resíduos ponderados condicionais vs. tempo dos dados orais de camundongos. Linhas tracejadas pretas representam a linha de unidade; linha lisa vermelha representa a tendência dos dados; pontos azuis claros representam os dados.

Os parâmetros farmacocinéticos médios obtidos pela ANC individual e os perfis plasmáticos modelados pela popPK após a administração i.v. a oral em ratos e camundongos são apresentados nas Tabelas 16 e 17, respectivamente.

Tabela 16 - Parâmetros farmacocinéticos estimados para 5'-MeONB pela abordagem não compartimental após administração de 10 mg/kg i.v. *bolus* e oral de 50 mg/kg a ratos *Wistar* e administração oral de 100 mg/kg em camundongos *Swiss*.

Parâmetros farmacocinéticos	Ratos		Camundongos
	10 mg/kg i.v. ^a	50 mg/kg i.g. ^b	100 mg/kg i.g. ^c
λ (h ⁻¹)	0,05 ± 0,03	0,4 ± 0,1	0,3
t _{1/2} eliminação (h)	1,6 ± 0,1	2,1 ± 0,9	2,5
AUC _{0-∞} (mg.h/L)	8,4 ± 5,1	3,5 ± 0,8	15,4
MRT _{iv} (h)	1,7 ± 0,3	-	3,77
MRT _{po} (h)	-	4,9 ± 1,3	3,89
MAT (h)	-	-	0,12
t _{1/2} absorção (h)	-	-	0,08
CL* or CL/F** (L/h)	0,67 ± 0,26	1,34 ± 0,29	0,20
Vd _{ss} * or Vd _{ss} /F** (L)	0,99 ± 0,32	-	0,75
F _{oral} (%)	-	8,32	-

^amédia ± E.P.M. (n = 3); ^bmédia ± E.P.M. (n = 7); ^cperfil médio de 4 camundongos/tempo; *parâmetros determinados para ratos; ** parâmetros determinados para camundongos; λ : taxa constante de eliminação; AUC_{0-∞}, área sob a curva; MRT, tempo de residência médio (iv) e oral (po); MAT, tempo de absorção médio; t_{1/2}, tempo de meia-vida; CL, *clearance*; CL/F, *clearance* aparente oral; Vd_{ss}, volume de distribuição no estado estacionário; Vd_{ss}/F, volume de distribuição aparente no estado estacionário; F_{oral}, biodisponibilidade oral.

Tabela 17 - Parâmetros farmacocinéticos estimados para 5'-MeONB pela abordagem populacional após administração de 10 mg/kg i.v. *bolus* e oral de 50 mg/kg a ratos *Wistar* e administração oral de 100 mg/kg em camundongos *Swiss*.

Parâmetros farmacocinéticos	Ratos	Camundongos
CL* or CL/F** (L/h)	0,55	0,20
V* or V/F** (L)	0,44	0,81
Q (L/h)	2,36	-
V2 (L)	0,52	-
ka (h ⁻¹)	0,41	8,55
F _{oral} (%)	11	-
σ 1 (mg/L)	0,90	-
σ 2 (mg/L)	0,46	0,39

*parâmetros determinados para ratos; ** parâmetros determinados para camundongos; CL: *clearance*; CL/F: *clearance* aparente oral; V e V2: volume de distribuição nos compartimentos central e periférico, respectivamente; V/F: volume de distribuição aparente; Q: *clearance* intercompartimental; ka: taxa constante de absorção; F_{oral}: biodisponibilidade oral; variabilidade residual: σ 1 erro aditivo dos dados i.v.; σ 2, variabilidade residual, erro aditivo dos dados oral.

Após a administração de 10 mg/kg i.v. de 5'-MeONB em ratos, foram observados um *clearance* de 0,67 ± 0,26 L/kg e um volume de distribuição de 0,99 ± 0,32 L, resultante em um

tempo de meia-vida de $1,6 \pm 0,1$ h. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre o CL e $t_{1/2}$ obtidos em comparação com os parâmetros orais determinados após a administração oral de 50 mg/kg. Considerando os perfis de concentração plasmática após a administração oral em ratos (Figura 51B), observa-se que a 5'-MeONB foi lentamente absorvida ($k_a = 0,41 \text{ h}^{-1}$), seguido por uma taxa de eliminação moderada, expressa em um $t_{1/2}$ de $2,1 \pm 0,9$ h com um MRT_{ns} de $4,9 \pm 1,3$ h.

Adicionalmente, os parâmetros farmacocinéticos determinados em ratos por ambas abordagens foram equivalentes, visto que o CL de 0,55 L/h e V_{dss} de 0,96 L estimados pela popPK são similares aos CL ($0,67 \pm 0,26$ L/h) e V_{dss} ($0,99 \pm 0,32$ L) obtidos pela ANC, confirmando que o modelo selecionado foi adequado para descrever os dados experimentais.

O *clearance* estimado para 5'-MeONB em ratos pela modelagem popPK de 0,55 L/h ou 1,82 L/h/kg é considerado intermediário/moderado de acordo com a literatura (MCINTYRE *et al.*, 2008; NAGILLA *et al.*, 2011). McIntyre e colaboradores (2008) classificam o *clearance* como alto ($CL > 70\%$ do fluxo sanguíneo no fígado), intermediário ($30\% < CL < 70\%$ do fluxo sanguíneo no fígado) ou baixo ($CL < 30\%$ do fluxo sanguíneo no fígado), normalizando com o fluxo sanguíneo do fígado. Baseado no fluxo sanguíneo no fígado de ratos, equivalente a 3.3 L/h/kg, o *clearance* obtido para 5'-MeONB corresponde a 55% do fluxo sanguíneo do fígado.

De acordo com Ward e Smith (2004), o V_{dss} pode ser categorizado como baixo (quando é menor que o volume total de água corporal), moderado (uma a quatro vezes maior que o volume total de água corporal) ou alto (maior que quatro vezes o volume total de água corporal). O V_{dss} estimado para 5'-MeONB pela modelagem popPK (0.96 L ou 3.2 L/kg) sugere um volume de distribuição de moderado a alto (WARD; SMITH, 2004; NAGILLA *et al.*, 2011), considerando que é quatro vezes acima do volume médio total de água corporal de ratos, equivalente a 0,7 L/kg (DAVIES; MORRIS, 1993). Este alto V_{dss} indica uma distribuição para o espaço extracelular e ampla distribuição tecidual (YADAV *et al.*, 2019a).

Embora nenhuma distribuição tecidual de 5'-MeONB tenha sido mensurada, estudos que demonstram o acúmulo nos tecidos de outros análogos de PMF, como a nobiletina e a tangeretina, mostraram que essas substâncias se acumulam em vários órgãos, incluindo cérebro, pulmão, rim, fígado, baço e estômago (MURAKAMI *et al.*, 2002; LI *et al.*, 2013; HUNG *et al.*, 2018).

Uma vez que a ligação às proteínas plasmáticas pode afetar a distribuição de fármacos, alterando a taxa na qual o medicamento é eliminado ou afetando o período de tempo durante o qual as concentrações eficazes são mantidas (KEEN, 1971) - extensa ligação a proteínas está

relacionada a baixos $V_{d_{ss}}$ (BOHNERT; GAN, 2013). O baixo valor de ligação às proteínas plasmáticas predito para 5'-MeONB (10,8%) por meio do experimento *in silico*, corrobora para o alto valor de $V_{d_{ss}}$ estimado pela modelagem popPK.

O experimento *in silico* sugere que a 5'-MeONB inibe os transportadores de fármacos glicoproteína P (P-gp, 78%) e bomba de exportação de sais biliares (BSEP, 36%), além de agir como substrato para a bomba de efluxo de fármacos, a proteína de resistência ao câncer de mama (BCRP, 60%). Considerando que a P-gp limita a absorção intestinal e distribuição tecidual de substâncias exógenas, bem como promove a eliminação para a bile e urina, enquanto a BCRP aumenta a eliminação renal e hepática (MCNAMARA; LEGGAS, 2009), a absorção, distribuição tecidual e eliminação da 5'-MeONB parece ser mediada pela ação de ambos os transportadores.

Interessantemente, a predição *in silico* indica que a 5'-MeONB pertence à classe 2 do *Extended Clearance Classification System* (ECCS), o que indica que o metabolismo é o mecanismo primário de depuração (VARMA *et al.*, 2015). Complementarmente, de acordo com a predição *in silico*, o metabolismo da 5'-MeONB parece ser mediado por três enzimas principais do citocromo P450 (CYP), a CYP1A2, CYP2C19 e CYP3A4, fornecendo derivados de PMF hidroxiladas por reações de *O*-desmetilação. Esta informação está de acordo com outros estudos de PMF relacionadas com a 5'-MeONB, incluindo nobiletina e tangeretina, que são metabolizados pelos mesmos CYPs (BREINHOLT *et al.*, 2003; KOGA *et al.*, 2011).

Além disso, a 5'-MeONB apresentou uma baixa biodisponibilidade oral (F_{oral}) em ratos, em torno de 8-11%, de acordo com a modelagem popPK e ANC. Esse achado está de acordo com os valores de F_{oral} observados para outros análogos de PMF em estudos farmacocinéticos realizados em ratos, que variaram entre 2,2 a 35,9% (KUMAR *et al.*, 2012; MEKJARUSKUL; JAY; SRIPANIDKULCHAI, 2012; WEI; HWANG; TSAI, 2014; ELHENNAWY; LIN, 2018; HUNG *et al.*, 2018; NIU *et al.*, 2020).

A F_{oral} determinada para a 5'-MeONB está provavelmente relacionada à sua baixa solubilidade aquosa e possível precipitação no trato gastrointestinal, semelhante a outras PMF (LI *et al.*, 2009). Nesse cenário, diferentes estratégias da tecnologia farmacêutica podem ser aplicadas para melhorar a sua biodisponibilidade oral. Além disso, a baixa biodisponibilidade oral de 5'-MeONB não é necessariamente uma grande desvantagem, uma vez que esta substância foi capaz de exercer um pronunciado efeito antinociceptivo quando administrada pela via oral.

Este trabalho demonstrou pela primeira vez os parâmetros farmacocinéticos pré-clínicos da 5'-MeONB, a PMF majoritária da FEPMF-*Ac*, após administração i.v. e oral em ratos. A 5'-MeONB mostrou propriedades semelhantes em comparação com os parâmetros farmacocinéticos bem descritos para a nobiletina, outra PMF presente na FEPMF-*Ac*. Enquanto os parâmetros farmacocinético da ANC obtidos para a 5'-MeONB em ratos mostraram um CL médio de 2,2 L/h kg e $t_{1/2}$ de 1,6 h, reporta-se para a nobiletina um CL de 2,13 L/h/kg e $t_{1/2}$ de 1,5 h (KUMAR *et al.*, 2012).

Em comparação com outras PMF já estudadas, o *clearance* e o tempo de meia-vida determinados neste estudo também estão de acordo com os reportados na literatura, variando de 0,32 a 5,65 L/h/kg (ELHENNAWY; LIN, 2018; NIU *et al.*, 2020) e de 1,16 a 2,77 h (ELHENNAWY; LIN, 2018; HUNG *et al.*, 2018; NIU *et al.*, 2020), respectivamente. Da mesma forma, foram encontrados na literatura valores de MRT_{iv} variando entre 1,22 e 1,39 h (ELHENNAWY; LIN, 2018; NIU *et al.*, 2020), semelhantes ao observado para a 5'-MeONB de 1,7 h. Além disso, o valor de V_{dss} de 3,3 L/kg calculado pela ANC para 5'-MeONB está dentro da ampla faixa de 0,69-33,4 L/kg de volume de distribuição relatados para PMF (KUMAR *et al.*, 2012; ELHENNAWY; LIN, 2018; NIU *et al.*, 2020).

Uma vez que os experimentos farmacológicos que demonstram os efeitos benéficos de 5'-MeONB foram desenvolvidos em camundongos, uma avaliação farmacocinética suplementar foi realizado em camundongos fêmeas *Swiss*, a fim de compreender melhor o comportamento da 5'-MeONB nesta espécie após a sua administração oral. A 5'-MeONB apresentou uma rápida absorção oral em camundongos (Figura 51C), com um pico de concentração plasmática de 15 minutos. Além disso, a 5'-MeONB exibiu um CL/F de 0,20 e 0,20 L/h, V_{dss}/F de 0,81 e 0,75 e $t_{1/2}$ de 2,9 e 2,5, respectivamente determinados pela modelagem popPK e ANC (Tabela 17 e 16). Todos os parâmetros farmacocinéticos determinados por ambas abordagens revelaram valores semelhantes, indicando a adequação do modelo popPK para descrever os dados experimentais.

6 CONCLUSÕES

- A partir da otimização das condições de extração para as PMF de *A. conyzoides*, estabeleceu-se como solvente extrator o *n*-hexano utilizando o aparato de extração tipo Soxhlet o método seletivo e com melhor rendimento, haja vista o teor de 5'-MeONB determinado no extrato obtido.

- Entre os métodos de fracionamento cromatográfico do extrato bruto obtido, a cromatografia de partição centrífuga demonstrou ser um método simples, rápido, econômico e efetivo para o desengorduramento e purificação da FEPMF-*Ac*. Entretanto, foi observado que a determinação do coeficiente de partição pelo método de *shake-flask* pode ser um método limitado para prever o comportamento das substâncias no sistema de CPC, na medida que a substância cumarina comportou-se diferentemente do esperado usando este modelo.

- A purificação por cromatografia em coluna clássica utilizando a resina de Sephadex[®] LH20 em eluente diclorometano-metanol 70:30 (v/v) mostrou ser uma abordagem eficiente para o enriquecimento da FEPMF-*Ac*, a partir da qual foram obtidos 1,71 g e 8,72 g de FEPMF-*Ac*, a partir das duas coletas, que correspondem a 5,1 % do extrato bruto de *n*-hexano de *A. conyzoides*.

- A caracterização por UPLC-MS possibilitou a identificação de nove PMF na FEPMF-*Ac*, das quais a substância 5'-MeONB aparece como a majoritária em quantidades muito superiores às outras PMF identificadas. Em contrapartida, a utilização da RMN para caracterização da FEPMF-*Ac* permitiu identificar apenas quatro substâncias na fração.

- Desenvolveu-se um método analítico por UPLC-MS para a quantificação do teor de PMF totais na FEPMF-*Ac* que apresentou ótima resolução entre os picos das substâncias de interesse em um rápido tempo de análise de nove minutos. A validação deste método apresentou resultados apropriados de linearidade, precisão e exatidão.

- Em relação ao efeito antinociceptivo da FEPMF-*Ac*, observou-se que a fração atua inibindo a nocicepção induzida por glutamato, bradicinina, histamina, assim como por substâncias ativadores dos canais TRPV1 e ASIC e proteínas quinases C e A. Interessantemente, a inibição da nocicepção causada pela ativação de proteínas quinases C

parece ser a maior contribuição para o efeito exibido pela FEPMF-*Ac*, entretanto estudos complementares necessitam ser realizados para confirmar esta hipótese.

- Demonstrou-se a contribuição da substância majoritária 5'-MeONB para a atividade antinociceptiva exercida pela FEPMF-*Ac*, contudo, sugere-se que outras PMF presentes na fração também estão envolvidas na ação antinociceptiva, visto que a 5'-MeONB não foi capaz de reduzir a formação de edema na pata dos animais e não houve correlação da atividade exibida nas doses testadas da substância isolada e o teor da mesma na FEPMF-*Ac*.

- O desenvolvimento e validação do método bioanalítico por UPLC-MS para quantificação da 5'-MeONB em amostras de plasma possibilitou, pela primeira vez, a determinação dos parâmetros farmacocinéticos pré-clínicos da 5'-MeONB em ratos e camundongos.

- A investigação da farmacocinética da 5'-MeONB em ratos revelou que a substância apresenta um alto volume de distribuição e *clearance*, entretanto uma baixa biodisponibilidade oral foi constatada, sugerindo uma baixa biodisponibilidade oral também para a FEPMF-*Ac* e demonstrando a necessidade de melhorias farmacotécnicas no desenvolvimento de produtos contendo a FEPMF-*Ac*. Adicionalmente, os resultados apresentados fornecem informações importantes para a compreensão da farmacocinética de 5'-MeONB após administração intravenosa e oral, servindo como suporte para futuros estudos de modelagem farmacocinética/farmacodinâmica pré-clínica.

- A combinação de resultados descritos neste estudo sugere que a FEPMF-*Ac* é potencialmente um bom candidato a medicamento analgésico e anti-inflamatório e estudos complementares farmacológicos e toxicológicos devem ser conduzidos a fim de permitir maiores evidências científicas do potencial das PMF de *A. conyzoides* para o tratamento de manifestações inflamatórias dolorosas, como por exemplo a osteoartrite, uma das indicações populares de *A. conyzoides*.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

O presente trabalho cumpriu com sua proposta fundamental, estruturada em três módulos principais, incluindo a I) produção e padronização de uma fração enriquecida em polimetoxiflavonas a partir do extrato das partes aéreas de *A. conyzoides* (FEPMF-*Ac*), seguida da II) avaliação farmacológica *in vivo* do efeito antinociceptivo e anti-inflamatório da FEPMF-*Ac*, além da III) caracterização dos parâmetros farmacocinéticos do marcador da FEPMF-*Ac*, a 5'-MeONB. Entretanto, devido à pandemia de COVID-19 e as medidas de isolamento adotadas em 2020, não foi possível cumprir os prazos previstos inicialmente para conclusão deste trabalho.

Os resultados obtidos estão sendo reunidos em manuscritos a serem submetidos à apreciação em revistas científicas da área. Neste âmbito, os dados provenientes do desenvolvimento e validação do método bioanalítico para quantificação de 5'-MeONB em amostras de plasma de ratos foram recentemente publicados no periódico *Journal of Chromatography B* (FAQUETI *et al.*, 2020). Além deste, o manuscrito detalhando o método otimizado de obtenção e padronização da FEPMF-*Ac*, assim como um segundo incluindo os efeitos farmacológicos da FEPMF-*Ac* nos modelos pré-clínicos estudados estão em vias de conclusão e submissão.

No que tange às propriedades farmacológicas da substância 5'-MeONB, está em andamento a aplicação de um modelo farmacocinético e farmacodinâmico (PK/PD), possibilitando a compreensão da relação entre efeito farmacológico e decurso temporal com os parâmetros farmacocinéticos determinados para a 5'-MeONB, bem como para prever sua eficácia pré-clínica modificando doses e tempos de administração. Estes resultados promissores estão igualmente sendo reunidos em um manuscrito científico.

Por fim, diante dos dados observados para a atividade farmacológica da FEPMF-*Ac*, e visando ampliar o conhecimento a respeito dos seus efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório, experimentos complementares poderão ser realizados no intuito de melhor compreender a inibição da via de ativação de proteínas quinases C como principal mecanismo de ação da FEPMF-*Ac*.

Ainda em relação ao potencial biológico da FEPMF-*Ac*, a baixa biodisponibilidade oral da 5'-MeONB sugere a necessidade de explorar vias alternativas de administração da FEPMF-*Ac*. Neste sentido, a via tópica mostra-se uma importante e potencial via de administração de fármacos para o tratamento das desordens inflamatórias na pele ou articulares. A incorporação

da FEPMF-*Ac* em uma forma farmacêutica tópica que aperfeiçoe a sua administração e absorção através das camadas dérmicas, propiciando a liberação das PMF diretamente no local da inflamação, contribuirá substancialmente para a melhor investigação de sua atividade farmacológica tendo em vista o desenvolvimento de uma produto farmacêutico de origem vegetal como alternativa para o tratamento da dor e inflamação.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, K.; WÖHRLIN, F.; LINDTNER, O.; HEINEMEYER, G.; LAMPEN, A. Toxicology and risk assessment of coumarin: focus on human data. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 54, n. 2, p. 228-239, 2010.
- 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). **Pharmacognosy Magazine**, 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.
- ALESSANDRI, A.L.; SOUSA, L.P.; LUCAS, C.D.; ROSSI, A.G.; PINHO, V.; TEIXEIRA, M.M. Resolution of inflammation: mechanisms and opportunity for drug development. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 139, n. 2, p. 189-212, 2013.
- ANDISSA, N.O.; MOUSSOUNGOU, A.S.; KOLOUNGOUS, B.C.; ABENA, A.A. Topical anti-inflammatory effect of aqueous extract ointment of *Ageratum conyzoides* L. In rat wistar. **International Journal of Phytopharmacy**, v. 5, n. 3, p. 37-41, 2015.
- AOAC. Appendix K: guidelines for dietary supplements and botanicals. **Association of Official Analytical Chemists International**, 2013.
- APKARIAN, A.V.; BUSHNELL, M.C.; TREEDE, R.-D.; ZUBIETA, J.-K. Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. **European Journal of Pain**, v. 9, n. 4, p. 463-484, 2005.
- ASHLEY, N.T.; WEIL, Z.M.; NELSON, R.J. Inflammation: mechanisms, costs, and natural variation. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 43, n., p. 385-406, 2012.
- AUSTIN, P.J.; MOALEM-TAYLOR, G. Pathophysiology of neuropathic pain: inflammatory mediators. in TOOTH, C.; MOULIN, D. E. **Neuropathic Pain** Nova Iorque, Cambridge University Press, 7, p. 77-89, 2013.
- 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. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 9, n. 3, p. 2126-2134, 2013.
- BAGGIO, C.H.; FREITAS, C.S.; MARCON, R.; DE PAULA WERNER, M.F.; RAE, G.A.; SMIDERLE, F.R.; SASSAKI, G.L.; IACOMINI, M.; MARQUES, M.C.A.; SANTOS, A.R.S. Antinociception of β -d-glucan from *Pleurotus pulmonarius* is possibly related to protein kinase C inhibition. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, n. 3, p. 872-877, 2012.
- BARON, A.; DEVAL, E.; SALINAS, M.; LINGUEGLIA, E.; VOILLEY, N.; LAZDUNSKI, M. Protein kinase C stimulates the acid-sensing ion channel ASIC2a via the PDZ domain-containing protein PICK1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 52, p. 50463-50468, 2002.

BARROT, M. Tests and models of nociception and pain in rodents. **Neuroscience**, v. 211, n., p. 39-50, 2012.

BASBAUM, A.I.; BAUTISTA, D.M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267-284, 2009.

BASBAUM, A.I.; JESSELL, T. The Perception of Pain. in KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J.; JESSELL, T. **Principles of Neural Science** New York, Appleton and Lange, p. 472-491, 2000.

BATISTA, E.K.F.; TRINDADE, H.I.; LIRA, S.R.S.; MULLER, J.B.B.S.; SILVA, L.L.B.; BATISTA, M.C.S. Atividades antinociceptiva e antiinflamatória do extrato etanólico de *Luehea divaricata*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 2, p. 433-441, 2016.

BAUTISTA, D.M.; JORDT, S.-E.; NIKAI, T.; TSURUDA, P.R.; READ, A.J.; POBLETE, J.; YAMOA, E.N.; BASBAUM, A.I.; JULIUS, D. TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. **Cell**, v. 124, n. 6, p. 1269-1282, 2006.

BEIRITH, A.; SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. **Brain Research**, v. 924, n. 2, p. 219-228, 2002.

BFR. Consumers, who eat a lot of cinnamon, currently have an overly high exposure to coumarin. **Federal Institute for Risk Assessment**, Berlim, BfR Health Assessment No. 043/2006 2006.

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. **Journal of Pharmacology and Toxicology**, v. 6, n. 8, p. 664-678, 2011.

BOHNERT, T.; GAN, L.-S. Plasma protein binding: from discovery to development. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 102, n. 9, p. 2953-2994, 2013.

BOJCZUK, M.; ŻYŻELEWICZ, D.; HODUREK, P. Centrifugal partition chromatography—A review of recent applications and some classic references. **Journal of Separation Science**, v. 40, n. 7, p. 1597-1609, 2017.

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*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 3, p. 425-432, 2013.

BOTTING, R.M.; BOTTING, J.H. Pathogenesis and mechanisms of inflammation and pain. **Clinical Drug Investigation**, v. 19, n. 2, p. 1-7, 2000.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 25 de julho 2017.

BREINHOLT, V.M.; RASMUSSEN, S.E.; BRØSEN, K.; FRIEDBERG, T.H. In vitro metabolism of genistein and tangeretin by human and murine cytochrome P450s. **Pharmacology & Toxicology**, v. 93, n. 1, p. 14-22, 2003.

BREIVIK, H.; COLLETT, B.; VENTAFRIDDA, V.; COHEN, R.; GALLACHER, D. Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life, and treatment. **European Journal of Pain**, v. 10, n. 4, p. 287-333, 2006.

BRUSH, D.E. Complications of long-term opioid therapy for management of chronic pain: the paradox of opioid-induced hyperalgesia. **Journal of Medical Toxicology**, v. 8, n. 4, p. 387-392, 2012.

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

CALIXTO, J.B.; CABRINI, D.A.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M.M. Kinins in pain and inflammation. **Pain**, v. 87, n. 1, p. 1-5, 2000.

CALVINO, B.; GRILO, R.M. Central brain control. **Joint Bone Spine**, v. 73, n., p. 10-16, 2006.

CHEN, T.; MEI, N.; FU, P.P. Genotoxicity of pyrrolizidine alkaloids. **Journal of Applied Toxicology**, v. 30, n. 3, p. 183-196, 2010.

CHEN, Z.; HUO, J.-R. Hepatic veno-occlusive disease associated with toxicity of pyrrolizidine alkaloids in herbal preparations. **The Netherlands Journal of Medicine**, v. 68, n. 6, p. 252-260, 2010.

CÓRDOVA, M.M.; DE PAULA WERNER, M.F.; DA SILVA, M.D.; RUANI, A.P.; PIZZOLATTI, M.G.; SANTOS, A.R.S. Further antinociceptive effects of myricitrin in chemical models of overt nociception in mice. **Neuroscience Letters**, v. 495, n. 3, p. 173-177, 2011.

CORREA, A.F.; GRASSI, L.T.; MEYRE-SILVA, C.; MORA, T.C.; BARROS, D.M.; DALMARCO, E.M.; SOUZA, M.M.D. Evaluation of anti-inflammatory potential of *Ageratum conyzoides* (AC) extracts *in vivo* and *in vitro* models: confirmation of popular use. **International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research**, v. 6, n. 2, p. 69-77, 2015.

COUTAUX, A.; ADAM, F.; WILLER, J.-C.; LE BARS, D. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint Bone Spine**, v. 72, n. 5, p. 359-371, 2005.

CROFFORD, L.J. Is there a place for non-selective NSAIDs in the treatment of arthritis? **Joint Bone Spine**, v. 69, n. 1, p. 4-7, 2002.

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

DA SILVA, L.A.L.; FAQUETI, L.G.; REGINATTO, F.H.; DOS SANTOS, A.D.C.; BARISON, A.; BIAVATTI, M.W. Phytochemical analysis of *Vernonanthura tweedieana* and a validated UPLC-PDA method for the quantification of eriodictyol. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 4, p. 375-381, 2015.

DAHLHAMER, J.; LUCAS, J.; ZELAYA, C.; NAHIN, R.; MACKEY, S.; DEBAR, L.; KERNS, R.; VON KORFF, M.; PORTER, L.; HELMICK, C. Prevalence of chronic pain and high-impact chronic pain among adults - United States, 2016. **Centers for Disease Control and Prevention - Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 67, n. 36, p. 1001, 2018.

DAVIES, B.; MORRIS, T. Physiological parameters in laboratory animals and humans. **Pharmaceutical Research**, v. 10, n. 7, p. 1093-1095, 1993.

DAVIS, J.B.; GRAY, J.; GUNTHORPE, M.J.; HATCHER, J.P.; DAVEY, P.T.; OVEREND, P.; HARRIES, M.H.; LATCHAM, J.; CLAPHAM, C.; ATKINSON, K. Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. **Nature**, v. 405, n. 6783, p. 183-187, 2000.

DE CAMPOS, R.O.P.; ALVES, R.V.; FERREIRA, J.; KYLE, D.J.; CHAKRAVARTY, S.; MAVUNKEL, B.J.; CALIXTO, J.B. Oral antinociception and oedema inhibition produced by NPC 18884, a non-peptidic bradykinin B₂ receptor antagonist. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 360, n. 3, p. 278-286, 1999.

DE CAMPOS, R.O.P.; ALVES, R.V.; KYLE, D.J.; CHAKRAVARTY, S.; MAVUNKEL, B.J.; CALIXTO, J.B. Antioedematogenic and antinociceptive actions of NPC 18521, a novel bradykinin B₂ receptor antagonist. **European Journal of Pharmacology**, v. 316, n. 2-3, p. 277-286, 1996.

DE CASTRO, M.L.; GARCIA-AYUSO, L. Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. **Analytica Chimica Acta**, v. 369, n. 1-2, p. 1-10, 1998.

DE HAIR, M.J.; LECLERC, P.; NEWSUM, E.C.; MAIJER, K.I.; VAN DE SANDE, M.G.; RAMWADHDOEBE, T.H.; VAN SCHAARDENBURG, D.; VAN BAARSEN, L.G.; KOROTKOVA, M.; GERLAG, D.M. Expression of prostaglandin E₂ enzymes in the synovium of arthralgia patients at risk of developing rheumatoid arthritis and in early arthritis patients. **PloS One**, v. 10, n. 7, p. e0133669, 2015.

DE MELLO, S.V.G.V.; DA ROSA, J.S.; FACCHIN, B.M.; LUZ, A.B.G.; VICENTE, G.; FAQUETI, L.G.; ROSA, D.W.; BIAVATTI, M.W.; FRÖDE, T.S. Beneficial effect of *Ageratum conyzoides* Linn (Asteraceae) upon inflammatory response induced by carrageenan into the mice pleural cavity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 194, n., p. 337-347, 2016.

DEVAL, E.; GASULL, X.; NOËL, J.; SALINAS, M.; BARON, A.; DIOCHOT, S.; LINGUEGLIA, E. Acid-sensing ion channels (ASICs): pharmacology and implication in pain. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 128, n. 3, p. 549-558, 2010.

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

DIALLO, A.; EKLUGADEGBEKU, 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). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, n. 2, p. 1214-1218, 2014.

DIALLO, A.; EKLUGADEGKEKU, K.; AGBONO, A.; AKLIKOKOU, K.; CREPPY, E.E.; GBEASSOR, M. Acute and sub-chronic (28-day) oral toxicity studies of hydroalcohol leaf extract of

Ageratum conyzoides L (Asteraceae). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 9, n. 5, p., 2010.

DIAS, T.; LATORRE, M.R.D.O.; APPOLINARIO, J.; SILVA, A.; FERREIRA, K.; TEIXEIRA, M. The prevalence of chronic pain in são paulo (brazil): A population-based study using telephone interview: Pb81. **Pain Practice**, v. 9, n., p. 115-116, 2009.

DOWELL, D.; HAEGERICH, T.M.; CHOU, R. CDC guideline for prescribing opioids for chronic pain—United States, 2016. **Jama**, v. 315, n. 15, p. 1624-1645, 2016.

DUBIN, A.E.; PATAPOUTIAN, A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 11, p. 3760-3772, 2010.

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

EFSA. Regulation (EC) no 1334/2008 of the European Parliament and of the council of 16 December 2008 on flavourings and certain food ingredients with flavouring properties for use in and on foods and amending council regulation (EEC) no 1601/91, regulations (EC) no 2232/96 and (EC) no 110/2008 and directive 2000/13/EC. **Official Journal of the European Union**, v. 1354, n., p. 34-50, 2008.

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

ELHENNAWY, M.G.; LIN, H.-S. Determination of Tangeretin in Rat Plasma: Assessment of Its Clearance and Absolute Oral Bioavailability. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 1, p. 3, 2018.

FAQUETI, L.G. Quantificação por cromatografia líquida de ultra eficiência de marcadores presentes no extrato aquoso de *Ageratum conyzoides* L. (Asteracea). **Dissertação de Mestrado**, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis/SC. Brasil, 2016.

FAQUETI, L.G.; BRIEDES, V.; HALABALAKI, M.; SKALTSOUNIS, A.L.; NASCIMENTO, L.F.; BARROS, W.M.; SANTOS, A.R.; BIAVATTI, M.W. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of standardized extract of polymethoxyflavones from *Ageratum conyzoides*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 194, n., p. 369-377, 2016.

FAQUETI, L.G.; DA SILVA, L.A.L.; MOREIRA, G.S.G.; HONORATO, L.A.; DOS SANTOS, A.R.S.; DALLA COSTA, T.; BIAVATTI, M.W. Simple and fast UPLC-MS method for quantifying the anti-inflammatory candidate 5'-methoxynobiletin in rat plasma: validation and application in a preliminary pharmacokinetic study. **Journal of Chromatography B**, v. 1158, n., p. 122387, 2020.

FAQUETI, L.G.; SANDJO, L.P.; BIAVATTI, M.W. Simultaneous identification and quantification of polymethoxyflavones, coumarin and phenolic acids in *Ageratum conyzoides* by UPLC-ESI-QToF-MS and UPLC-PDA. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 145, n., p. 621-628, 2017.

FDA. U.S. Department of Health and Human Services. Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry. **Food and Drug Administration**, Disponível em: <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf>, Maio 2018.

FELTER, S.P.; VASSALLO, J.D.; CARLTON, B.D.; DASTON, G.P. A safety assessment of coumarin taking into account species-specificity of toxicokinetics. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 4, p. 462-475, 2006.

FERREIRA, J.; CAMPOS, M.M.; ARAÚJO, R.; BADER, M.; PESQUERO, J.B.; CALIXTO, J.B. The use of kinin B1 and B2 receptor knockout mice and selective antagonists to characterize the nociceptive responses caused by kinins at the spinal level. **Neuropharmacology**, v. 43, n. 7, p. 1188-1197, 2002.

FERREIRA, J.; TRICHÊS, K.M.; MEDEIROS, R.; CALIXTO, J.B. Mechanisms involved in the nociception produced by peripheral protein kinase c activation in mice. **Pain**, v. 117, n. 1-2, p. 171-181, 2005.

FILLINGIM, R.B. Sex, Gender, and Pain. in LEGATO, M. J. **Principles of Gender-Specific Medicine** Cambridge, Academic Press, p. 792, 2017.

FRATONI, E.; DE ATHAYDE, A.E.; DA SILVA MACHADO, M.; ZERMIANI, T.; VENTURI, I.; DOS SANTOS, M.C.; LOBATO, F.; CECHINEL FILHO, V.; FRANCHI, G.C.; NOWILL, A.E. Antiproliferative and toxicological properties of drimanes obtained from *Drimys brasiliensis* stem barks. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 103, n., p. 1498-1506, 2018.

FRIESEN, J.B.; AHMED, S.; PAULI, G.F. Qualitative and quantitative evaluation of solvent systems for countercurrent separation. **Journal of Chromatography A**, v. 1377, n., p. 55-63, 2015.

FRIESEN, J.B.; PAULI, G.F. GUESS - A generally useful estimate of solvent systems for CCC. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 28, n. 17, p. 2777-2806, 2005.

FROLOV, A.; YANG, L.; DONG, H.; HAMMOCK, B.D.; CROFFORD, L.J. Anti-inflammatory properties of prostaglandin E2: deletion of microsomal prostaglandin E synthase-1 exacerbates non-immune inflammatory arthritis in mice. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 89, n. 5, p. 351-358, 2013.

FUNDYTUS, M.E. Glutamate receptors and nociception. **CNS drugs**, v. 15, n. 1, p. 29-58, 2001.

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

GARCÍA-LAFUENTE, A.; GUILLAMÓN, E.; VILLARES, A.; ROSTAGNO, M.A.; MARTÍNEZ, J.A. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. **Inflammation Research**, v. 58, n. 9, p. 537-552, 2009.

- GATCHEL, R.J.; MCGEARY, D.D.; MCGEARY, C.A.; LIPPE, B. Interdisciplinary chronic pain management: past, present, and future. **American Psychologist**, v. 69, n. 2, p. 119, 2014.
- GILRON, I.; JENSEN, T.S.; DICKENSON, A.H. Combination pharmacotherapy for management of chronic pain: from bench to bedside. **The Lancet Neurology**, v. 12, n. 11, p. 1084-1095, 2013.
- GOLD, M.S.; GEBHART, G.F. Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. **Nature Medicine**, v. 16, n. 11, p. 1248-1257, 2010.
- 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.
- GOTTLIEB, H.E.; KOTLYAR, V.; NUDELMAN, A. NMR chemical shifts of common laboratory solvents as trace impurities. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 62, n. 21, p. 7512-7515, 1997.
- GOULD, T.D.; DAO, D.T.; KOVACSICS, C.E. The open field test. *in* GOULD, T. D. **Mood and anxiety related phenotypes in mice: Characterization using behavioral tests** Baltimore, Maryland, Humana Press, p. 1-20, 2009.
- GREENSPAN, J.D.; CRAFT, R.M.; LERESCHE, L.; ARENDT-NIELSEN, L.; BERKLEY, K.J.; FILLINGIM, R.B.; GOLD, M.S.; HOLDCROFT, A.; LAUTENBACHER, S.; MAYER, E.A. Studying sex and gender differences in pain and analgesia: a consensus report. **Pain**, v. 132, n., p. S26-S45, 2007.
- GROESCH, S.; NIEDERBERGER, E.; GEISSLINGER, G. Investigational drugs targeting the prostaglandin E2 signaling pathway for the treatment of inflammatory pain. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 26, n. 1, p. 51-61, 2017.
- GUMISIRIZA, H.; SESAAZI, C.D.; OLET, E.A.; KEMBABAZI, O.; BIRUNGI, G. Medicinal plants used to treat "African" diseases by the local communities of Bwambara sub-county in Rukungiri District, Western Uganda. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 268, n., p. 113578, 2021.
- GUPTA, M.P. **270 plantas medicinales iberoamericanas** Santa Fe de Bogotá, Talleres de Editorial Presencia, 1995.
- GUREJE, O.; VON KORFF, M.; SIMON, G.E.; GATER, R. Persistent pain and well-being: a World Health Organization study in primary care. **Jama**, v. 280, n. 2, p. 147-151, 1998.
- HARADA, S.; TOMINARI, T.; MATSUMOTO, C.; HIRATA, M.; TAKITA, M.; INADA, M.; MIYAURA, C. Nobiletin, a polymethoxy flavonoid, suppresses bone resorption by inhibiting NF- κ B-dependent prostaglandin e synthesis in osteoblasts and prevents bone loss due to estrogen deficiency. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 115, n. 1, p. 89-93, 2011.
- 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. **International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research**, v. 1, n. 5, p. 234-241, 2012.

HENDRICH, J.; ALVAREZ, P.; JOSEPH, E.K.; FERRARI, L.F.; CHEN, X.; LEVINE, J.D. In vivo and in vitro comparison of female and male nociceptors. **The Journal of Pain**, v. 13, n. 12, p. 1224-1231, 2012.

HERRÁIZ, I. Chemical pathways of corticosteroids, industrial synthesis from sapogenins. in BARREDO, J.-L.; HERRÁIZ, I. **Microbial Steroids**, Springer, p. 15-27, 2017.

HO, C.-T.; PAN, M.; LAI, C.; LI, S. Polymethoxyflavones as food factors for the management of inflammatory diseases. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 20, n. 1, p. 337-341, 2012.

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. **Pharmaceutical Biology**, v. 51, n. 7, p. 893-898, 2013.

HOWES, M.-J.R. Phytochemicals as anti-inflammatory nutraceuticals and phytopharmaceuticals. in CHATTERJEE, S.; JUNGRAITHMAYR, W.; BAGCHI, D. **Immunity and Inflammation in Health and Disease**, Academic Press, p. 363-388, 2017.

HSIEH, G.C.; CHANDRAN, P.; SALYERS, A.K.; PAI, M.; ZHU, C.Z.; WENSINK, E.J.; WITTE, D.G.; MILLER, T.R.; MIKUSA, J.P.; BAKER, S.J. H4 receptor antagonism exhibits anti-nociceptive effects in inflammatory and neuropathic pain models in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 95, n. 1, p. 41-50, 2010.

HU, R.; PAN, Y. Recent trends in counter-current chromatography. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 40, n., p. 15-27, 2012.

HUNG, W.-L.; CHANG, W.-S.; LU, W.-C.; WEI, G.-J.; WANG, Y.; HO, C.-T.; HWANG, L.S. Pharmacokinetics, bioavailability, tissue distribution and excretion of tangeretin in rat. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 26, n. 2, p. 849-857, 2018.

HUNSKAAR, S.; FASMER, O.B.; HOLE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, n. 1, p. 69-76, 1985.

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

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

IMADA, K.; LIN, N.; LIU, C.; LU, A.; CHEN, W.; YANO, M.; SATO, T.; ITO, A. Nobiletin, a citrus polymethoxy flavonoid, suppresses gene expression and production of aggrecanases-1 and-2 in collagen-induced arthritic mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 373, n. 2, p. 181-185, 2008.

ISHIWA, J.; SATO, T.; MIMAKI, Y.; SASHIDA, Y.; YANO, M.; ITO, A. A citrus flavonoid, nobiletin, suppresses production and gene expression of matrix metalloproteinase 9/gelatinase B in rabbit synovial fibroblasts. **The Journal of Rheumatology**, v. 27, n. 1, p. 20-25, 2000.

ISOBE, T.; DOE, M.; MORIMOTO, Y.; NAGATA, K.; OHSAKI, A. The anti-Helicobacter pylori flavones in a Brazilian plant, *Hyptis fasciculata*, and the activity of methoxyflavones. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 5, p. 1039-1041, 2006.

ITO, Y. Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1065, n. 2, p. 145-168, 2005.

ITOH, T.; OHGUCHI, K.; IINUMA, M.; NOZAWA, Y.; AKAO, Y. Inhibitory effects of polymethoxy flavones isolated from *Citrus reticulata* on degranulation in rat basophilic leukemia RBL-2H3: Enhanced inhibition by their combination. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 16, p. 7592-7598, 2008.

IWATA, N.; KAINUMA, M.; KOBAYASHI, D.; KUBOTA, T.; SUGAWARA, N.; UCHIDA, A.; OZONO, S.; YAMAMURO, Y.; FURUSYO, N.; UEDA, K. The relation between hepatotoxicity and the total coumarin intake from traditional Japanese medicines containing cinnamon bark. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, n., p. 174, 2016.

JACK, D.B. One hundred years of aspirin. **The Lancet**, v. 350, n. 9075, p. 437-439, 1997.

JANG, S.-E.; RYU, K.-R.; PARK, S.-H.; CHUNG, S.; TERUYA, Y.; HAN, M.J.; WOO, J.-T.; KIM, D.-H. Nobiletin and tangeretin ameliorate scratching behavior in mice by inhibiting the action of histamine and the activation of NF- κ B, AP-1 and p38. **International Immunopharmacology**, v. 17, n. 3, p. 502-507, 2013.

JESUS, M.; MARTINS, A.P.; GALLARDO, E.; SILVESTRE, S. Diosgenin: recent highlights on pharmacology and analytical methodology. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2016, n., p. 1-16, 2016.

JI, R.-R.; CHAMESSIAN, A.; ZHANG, Y.-Q. Pain regulation by non-neuronal cells and inflammation. **Science**, v. 354, n. 6312, p. 572-577, 2016.

JI, R.-R.; XU, Z.-Z.; GAO, Y.-J. Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain. **Nature Reviews Drug discovery**, v. 13, n. 7, p. 533-548, 2014.

JOHNSON, M.F. A monograph of the genus *Ageratum* L. (Compositae-Eupatorieae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 58, n. 1, p. 6-88, 1971.

KAMBOJ, A.; SALUJA, A.K. Isolation of stigmasterol and β -sitosterol from petroleum ether extract of aerial parts of *Ageratum conyzoides* (Asteraceae). **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 1, p. 94-96, 2011.

KASTURI, T.; MANITHOMAS, T. Essential oil of *Ageratum conyzoides* - isolation and structure of two new constituents. **Tetrahedron Letters**, v. 8, n. 27, p. 2573-2575, 1967.

KEEN, P. Effect of binding to plasma proteins on the distribution, activity and elimination of drugs. in BRODIE, B. B.; GILLETTE, J. R.; ACKERMAN, H. S. **Concepts in Biochemical Pharmacology**, Springer, p. 213-233, 1971.

KHALILZADEH, H.; AZARPEY, F.; HAZRATI, R. The effect of histamine h1 receptor antagonists on the morphine-induced antinociception in the acute trigeminal model of nociception in rats. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 10, n. 1, p. 76-80, 2017.

KIM, M.J.; LEE, H.H.; JEONG, J.W.; SEO, M.J.; KANG, B.W.; PARK, J.U.; KIM, K.-S.; CHO, Y.-S.; SEO, K.-I.; KIM, G.-Y. Anti-inflammatory effects of 5-hydroxy-3, 6, 7, 8, 3', 4'-hexamethoxyflavone via NF- κ B inactivation in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophage. **Molecular Medicine Reports**, v. 9, n. 4, p. 1197-1203, 2014.

KOGA, N.; OHTA, C.; KATO, Y.; HARAGUCHI, K.; ENDO, T.; OGAWA, K.; OHTA, H.; YANO, M. In vitro metabolism of nobiletin, a polymethoxy-flavonoid, by human liver microsomes and cytochrome P450. **Xenobiotica**, v. 41, n. 11, p. 927-933, 2011.

KUMAR, A.; DEVARAJ, V.; GIRI, K.C.; GIRI, S.; RAJAGOPAL, S.; MULLANGI, R. Development and validation of a highly sensitive LC-MS/MS-ESI method for the determination of nobiletin in rat plasma: application to a pharmacokinetic study. **Biomedical Chromatography**, v. 26, n. 12, p. 1464-1471, 2012.

KUNER, R.; FLOR, H. Structural plasticity and reorganisation in chronic pain. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 18, n. 1, p. 20, 2017.

LAPOINTE, T.K.; ALTIER, C. The role of TRPA1 in visceral inflammation and pain. **Channels**, v. 5, n. 6, p. 525-529, 2011.

LARSON, C.M.; WILCOX, G.L.; FAIRBANKS, C.A. The study of pain in rats and mice. **Comparative Medicine**, v. 69, n. 6, p. 555-570, 2019.

LATREMOLIERE, A.; WOOLF, C.J. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. **The Journal of Pain**, v. 10, n. 9, p. 895-926, 2009.

LEVINE, J.D.; ALESSANDRI-HABER, N. TRP channels: targets for the relief of pain. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1772, n. 8, p. 989-1003, 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. **Journal of Functional Foods**, v. 1, n. 1, p. 2-12, 2009.

LI, S.; SANG, S.; PAN, M.-H.; LAI, C.-S.; LO, C.-Y.; YANG, C.S.; HO, C.-T. Anti-inflammatory property of the urinary metabolites of nobiletin in mouse. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, n. 18, p. 5177-5181, 2007.

LI, S.; WANG, Y.; DUSHENKOV, S.; HO, C.-T. Bioavailability of polymethoxyflavones. *in* HO, C.-T.; SIMON, J. E.; SHAHIDI, F.; SHAO, Y. **Dietary Supplements**, ACS Publications, 987, p. 233-245, 2008.

LI, T.; YAN, Z.; ZHOU, C.; SUN, J.; JIANG, C.; YANG, X. Simultaneous quantification of paeoniflorin, nobiletin, tangeretin, liquiritigenin, isoliquiritigenin, liquiritin and formononetin from Si-Ni-San extract in rat plasma and tissues by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Biomedical Chromatography**, v. 27, n. 8, p. 1041-1053, 2013.

LIN, N.; SATO, T.; TAKAYAMA, Y.; MIMAKI, Y.; SASHIDA, Y.; YANO, M.; ITO, A. Novel anti-inflammatory actions of nobiletin, a citrus polymethoxy flavonoid, on human synovial fibroblasts and mouse macrophages. **Biochemical Pharmacology**, v. 65, n. 12, p. 2065-2071, 2003.

LINLEY, J.E.; ROSE, K.; OOI, L.; GAMPER, N. Understanding inflammatory pain: ion channels contributing to acute and chronic nociception. **European Journal of Physiology**, v. 459, n. 5, p. 657-669, 2010.

LIU, Y.; KUANG, P.; GUO, S.; SUN, Q.; XUE, T.; LI, H. An overview of recent progress in solvent systems, additives and modifiers of counter current chromatography. **New Journal of Chemistry**, v. 42, n. 9, p. 6584-6600, 2018.

LOESER, J.D.; MELZACK, R. Pain: an overview. **The Lancet**, v. 353, n. 9164, p. 1607-1609, 1999.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais**. 2 ed., Nova Odessa, SP, Editora Plantarum, 1991.

LUO, J.; FENG, J.; LIU, S.; WALTERS, E.T.; HU, H. Molecular and cellular mechanisms that initiate pain and itch. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 17, p. 3201-3223, 2015.

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. **Phytotherapy Research**, v. 11, n. 3, p. 183-188, 1997.

MANTHEY, J.A.; BENDELE, P. Anti-inflammatory activity of an orange peel polymethoxylated flavone, 3', 4', 3, 5, 6, 7, 8-heptamethoxyflavone, in the rat carrageenan/paw edema and mouse lipopolysaccharide-challenge assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 20, p. 9399-9403, 2008.

MANTHEY, J.A.; CESAR, T.B.; JACKSON, E.; MERTENS-TALCOTT, S. Pharmacokinetic study of nobiletin and tangeretin in rat serum by high-performance liquid chromatography– electrospray ionization– mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 1, p. 145-151, 2010.

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. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 28, n. 4, p. 109-114, 1988.

MARTÍNEZ-ROJAS, V.A.; GARCÍA, G.; NORIEGA-NAVARRO, R.; GUZMÁN-PRIEGO, C.G.; TORRES-LÓPEZ, J.E.; GRANADOS-SOTO, V.; MURBARTIÁN, J. Peripheral and spinal TRPA1 channels contribute to formalin-induced long-lasting mechanical hypersensitivity. **Journal of Pain Research**, v. 11, n., p. 51, 2018.

MAYER, S.; IZYDORCZYK, I.; REEH, P.W.; GRUBB, B.D. Bradykinin-induced nociceptor sensitisation to heat depends on COX-1 and COX-2 in isolated rat skin. **Pain**, v. 130, n. 1-2, p. 14-24, 2007.

MCDOWELL, T.S. Peripheral Mechanisms of Pain Transmission and Modulation. *in* ABD-ELSAIED, A. **Pain: a reviewer guide** Suiça, Springer, p. 37-40, 2019.

MCINTYRE, T.; HAN, C.; XIANG, H.; BAMBAL, R.; DAVIS, C. Differences in the total body clearance of lead compounds in the rat and mouse: Impact on pharmacokinetic screening strategy. **Xenobiotica**, v. 38, n. 6, p. 605-619, 2008.

MCMAMARA, C.R.; MANDEL-BREHM, J.; BAUTISTA, D.M.; SIEMENS, J.; DERANIAN, K.L.; ZHAO, M.; HAYWARD, N.J.; CHONG, J.A.; JULIUS, D.; MORAN, M.M. TRPA1 mediates formalin-induced pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 33, p. 13525-13530, 2007.

MCMAMARA, P.J.; LEGGAS, M. Drug distribution. *in* HACKER, M.; MESSER, W.; BACHMANN, K. **Pharmacology**, Elsevier, p. 113-129, 2009.

MEDHURST, S.J.; COLLINS, S.D.; BILLINTON, A.; BINGHAM, S.; DALZIEL, R.G.; BRASS, A.; ROBERTS, J.C.; MEDHURST, A.D.; CHESSELL, I.P. Novel histamine H3 receptor antagonists GSK189254 and GSK334429 are efficacious in surgically-induced and virally-induced rat models of neuropathic pain. **Pain**, v. 138, n. 1, p. 61-69, 2008.

MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 771-776, 2010.

MEKJARUSKUL, C.; JAY, M.; SRIPANIDKULCHAI, B. Pharmacokinetics, bioavailability, tissue distribution, excretion, and metabolite identification of methoxyflavones in *Kaempferia parviflora* extract in rats. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 40, n. 12, p. 2342-2353, 2012.

MELNIKOVA, I. Pain market. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, n., p. 589-590, 2010.

MEOTTI, F.C.; COELHO, I.D.S.; SANTOS, A.R.S. The nociception induced by glutamate in mice is potentiated by protons released into the solution. **The Journal of Pain**, v. 11, n. 6, p. 570-578, 2010.

MOBASHERI, A.; BATT, M. An update on the pathophysiology of osteoarthritis. **Annals of Physical and Rehabilitation Medicine**, v. 59, n. 5-6, p. 333-339, 2016.

MOREIRA, M.D.; PIKANÇO, 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 Management Science**, 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.

MULEY, M.M.; KRUSTEV, E.; MCDUGALL, J.J. Preclinical assessment of inflammatory pain. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, v. 22, n. 2, p. 88-101, 2016.

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

MURAKAMI, A.; KOSHIMIZU, K.; OHIGASHI, H.; KUWAHARA, S.; KUKI, W.; TAKAHASHI, Y.; HOSOTANI, K.; KAWAHARA, S.; MATSUOKA, Y. Characteristic rat tissue accumulation of

nobiletin, a chemopreventive polymethoxyflavonoid, in comparison with luteolin. **Biofactors**, v. 16, n. 3-4, p. 73-82, 2002.

MURAKAMI, A.; KUWAHARA, S.; TAKAHASHI, Y.; ITO, C.; FURUKAWA, H.; JU-ICHI, M.; KOSHIMIZU, K.; OHIGASHI, H. In vitro absorption and metabolism of nobiletin, a chemopreventive polymethoxyflavonoid in citrus fruits. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 65, n. 1, p. 194-197, 2001.

MURAKAMI, A.; NAKAMURA, Y.; TORIKAI, K.; TANAKA, T.; KOSHIBA, T.; KOSHIMIZU, K.; KUWAHARA, S.; TAKAHASHI, Y.; OGAWA, K.; YANO, M. Inhibitory effect of citrus nobiletin on phorbol ester-induced skin inflammation, oxidative stress, and tumor promotion in mice. **Cancer Research**, v. 60, n. 18, p. 5059-5066, 2000.

MURAKAMI, A.; SONG, M.; KATSUMATA, S.-I.; UEHARA, M.; SUZUKI, K.; OHIGASHI, H. Citrus nobiletin suppresses bone loss in ovariectomized ddY mice and collagen-induced arthritis in DBA/1J mice: possible involvement of receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL)-induced osteoclastogenesis regulation. **Biofactors**, v. 30, n. 3, p. 179-192, 2007.

NADIPELLY, J.; SAYELI, V.; KADHIRVELU, P.; SHANMUGASUNDARAM, J.; CHERIYAN, B.V.; SUBRAMANIAN, V. Anti-nociceptive activity of a few structurally related trimethoxy flavones and possible mechanisms involved. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, v. 27, n. 2, p. 109-119, 2016.

NAGATA, S.; GOLSTEIN, P. The Fas death factor. **Science**, v. 267, n. 5203, p. 1449-1456, 1995.

NAGILLA, R.; NORD, M.; MCATEE, J.J.; JOLIVETTE, L.J. Cassette dosing for pharmacokinetic screening in drug discovery: comparison of clearance, volume of distribution, half-life, mean residence time, and oral bioavailability obtained by cassette and discrete dosing in rats. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 9, p. 3862-3874, 2011.

NAIR, A.G.; KOTIYAL, J.P.; SUBRAMANIAN, S.S. Chemical constituents of the leaves of *Ageratum conyzoides*. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 39, n., p. 108-112, 1977.

NETEA, M.G.; BALKWILL, F.; CHONCHOL, M.; COMINELLI, F.; DONATH, M.Y.; GIAMARELLOS-BOURBOULIS, E.J.; GOLENBOCK, D.; GRESNIGT, M.S.; HENEKA, M.T.; HOFFMAN, H.M. A guiding map for inflammation. **Nature Immunology**, v. 18, n. 8, p. 826, 2017.

NICHOLAS, M.; VLAEYEN, J.W.; RIEF, W.; BARKE, A.; AZIZ, Q.; BENOLIEL, R.; COHEN, M.; EVERS, S.; GIAMBERARDINO, M.A.; GOEBEL, A. The IASP classification of chronic pain for ICD-11: chronic primary pain. **Pain**, v. 160, n. 1, p. 28-37, 2019.

NIU, C.; SUN, J.; ZHENG, Y.; WANG, L.; ZHANG, J.; CHEN, R.; YE, W. Determination of isosinensetin in rat plasma by UHPLC-MS/MS: application to oral and intravenous pharmacokinetic study in healthy rats. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 184, n., p. 113210, 2020.

O'NEILL, J.; BROCK, C.; OLESEN, A.E.; ANDRESEN, T.; NILSSON, M.; DICKENSON, A.H. Unravelling the mystery of capsaicin: a tool to understand and treat pain. **Pharmacological Reviews**, v. 64, n. 4, p. 939-971, 2012.

OBARA, I.; TELEZHKIN, V.; ALRASHDI, I.; CHAZOT, P.L. Histamine, histamine receptors, and neuropathic pain relief. **British Journal of Pharmacology**, v. 177, n. 3, p. 580-599, 2020.

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

OLIVEIRA JÚNIOR, J.O.D.; PORTELLA JUNIOR, C.S.A.; COHEN, C.P. Inflammatory mediators of neuropathic pain. **Revista Dor**, v. 17, n., p. 35-42, 2016.

OTTESTAD, E.; ANGST, M.S. Nociceptive physiology. in HEMMINGS, H. C.; EGAN, T. D. **Pharmacology and Physiology for Anesthesia**, Saunders, p. 235-252, 2013.

PALMER, P.A.; BRYSON, J.A.; CLEWELL, A.E.; ENDRES, J.R.; HIRKA, G.; VÉRTESI, A.; BÉRES, E.; GLÁVITS, R.; SZAKONYINÉ, I.P. A comprehensive toxicological safety assessment of an extract of *Ageratum conyzoides*. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 103, n., p. 140-149, 2019.

PANDURANGAN, K.; KRISHNAPPAN, V.; SUBRAMANIAN, V.; SUBRAMANYAN, R. Antinociceptive effect of certain dimethoxy flavones in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 727, n., p. 148-157, 2014.

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.

PARI, K.; SUBRAHMANYAM, B.; RASTOGI, J.; DEVAKUMAR, C.; RAO, P. Insecticidal (Z)-6-methyl-12-heptadecenoic acid from the essential oil of *Ageratum conyzoides*. **Indian Journal of Chemistry - Section B**, v. 39B, n., p. 451-454., 2000.

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

PEREIRA, V.; GOUDET, C. Emerging trends in pain modulation by metabotropic glutamate receptors. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 11, n. 464, p. 1-23, 2019.

PETHŐ, G.; DEROW, A.; REEH, P.W. Bradykinin-induced nociceptor sensitization to heat is mediated by cyclooxygenase products in isolated rat skin. **European Journal of Neuroscience**, v. 14, n. 2, p. 210-218, 2001.

PETHŐ, G.; REEH, P.W. Sensory and signaling mechanisms of bradykinin, eicosanoids, platelet-activating factor, and nitric oxide in peripheral nociceptors. **Physiological Reviews**, v. 92, n., p. 1699-1775, 2012.

PIGATTO, G.R.; COELHO, I.S.; AQUINO, R.S.; BAUERMANN, L.F.; SANTOS, A.R.S. Light-emitting diode phototherapy reduces nocifensive behavior induced by thermal and chemical noxious stimuli in mice: evidence for the involvement of capsaicin-sensitive central afferent fibers. **Molecular Neurobiology**, v. 54, n. 5, p. 3205-3218, 2017.

POLSON, C.; SARKAR, P.; INCLEDON, B.; RAGUVARAN, V.; GRANT, R. Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid

chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 785, n. 2, p. 263-275, 2003.

PORRECA, F.; VANDERAH, T.W.; GUO, W.; BARTH, M.; DODEY, P.; PEYROU, V.; LUCCARINI, J.; JUNIEN, J.-L.; PRUNEAU, D. Antinociceptive pharmacology of N-[[4-(4, 5-dihydro-1H-imidazol-2-yl) phenyl] methyl]-2-[2-[[4-methoxy-2, 6-dimethylphenyl) sulfonyl] methylamino] ethoxy]-N-methylacetamide, fumarate (LF22-0542), a novel nonpeptidic bradykinin B₁ receptor antagonist. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 318, n. 1, p. 195-205, 2006.

PREMKUMAR, L.S.; ABOOJ, M. TRP channels and analgesia. **Life Sciences**, v. 92, n. 8-9, p. 415-424, 2013.

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. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 6, n. 20, p. 1469-1476, 2012.

RANG, H.; BEVAN, S.; DRAY, A. Chemical activation of nociceptive peripheral neurones. **British Medical Bulletin**, v. 47, n. 3, p. 534-548, 1991.

REID, M.C.; ECCLESTON, C.; PILLEMER, K. Management of chronic pain in older adults. **BMJ**, v. 350, n., p. h532, 2015.

ROSA, A.C.; FANTOZZI, R. The role of histamine in neurogenic inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v. 170, n. 1, p. 38-45, 2013.

ROSENBAUM, T.; SIMON, S.A. TRPV1 receptors and signal transduction. *in* LIEDTKE, W. B.; HELLER, S. **TRP ion channel function in sensory transduction and cellular signaling cascades** Boca Raton, CRC Press, p. 69-84, 2007.

ROTELLI, A.E.; GUARDIA, T.; JUÁREZ, A.O.; DE LA ROCHA, N.E.; PELZER, L.E. Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. **Pharmacological Research**, v. 48, n. 6, p. 601-606, 2003.

RUMORE, M.M.; SCHLICHTING, D.A. Clinical efficacy of antihistaminics as analgesics. **Pain**, v. 25, n. 1, p. 7-22, 1986.

SÁ, K.N.; BAPTISTA, A.F.; MATOS, M.A.; LESSA, Í. Chronic pain and gender in Salvador population, Brazil. **Pain**, v. 139, n. 3, p. 498-506, 2008.

SALIM, E.; KUMOLOSASI, E.; JANTAN, I. Inhibitory effect of selected medicinal plants on the release of pro-inflammatory cytokines in lipopolysaccharide-stimulated human peripheral blood mononuclear cells. **Journal of Natural Medicines**, 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. **Phytotherapy Research**, v. 14, n. 1, p. 24-29, 2000.

SANTOS, F.A.A.; SOUZA, J.B.D.; ANTES, D.L.; D'ORSI, E. Prevalência de dor crônica e sua associação com a situação sociodemográfica e atividade física no lazer em idosos de Florianópolis, Santa Catarina: estudo de base populacional. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 18, n., p. 234-247, 2015.

SCHLOSSER, P.M.; BALE, A.S.; GIBBONS, C.F.; WILKINS, A.; COOPER, G.S. Human health effects of dichloromethane: key findings and scientific issues. **Environmental Health Perspectives**, v. 123, n. 2, p. 114-119, 2015.

SCHULIGOI, R.; DONNERER, J.; AMANN, R. Bradykinin-induced sensitization of afferent neurons in the rat paw. **Neuroscience**, v. 59, n. 1, p. 211-215, 1994.

SHAJIB, S.; RASHID, R.B.; MING, L.C.; ISLAM, S.; SARKER, M., R; NAHAR, L.; SARKER, S.D.; DATTA, B.K.; RASHID, M.A. Polymethoxyflavones from *Nicotiana plumbaginifolia* (Solanaceae) exert antinociceptive and neuropharmacological effects in mice. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n., p. 85, 2018.

SHALAPOUR, S.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer: an eternal fight between good and evil. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 125, n. 9, p. 3347-3355, 2015.

SHARGEL, L.; ANDREW, B.; WU-PONG, S. **Applied biopharmaceutics & pharmacokinetics** 6th, New York, NY, McGraw-Hill Book Co, 2012.

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

SHEKHAR, T.C.; ANJU, G. A comprehensive review on *Ageratum conyzoides* Linn.(Goat weed). **International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research**, 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. **Journal of Chromatography B**, v. 986, n., p. 100-107, 2015.

SILVA, J.C.; LIMA-SARAIVA, S.; OLIVEIRA-JUNIOR, R.; ALMEIDA, J. Modelos experimentais para avaliação da atividade antinociceptiva de produtos naturais: uma revisão. **Brazilian Journal of Pharmacy**, v. 94, n., p. 18-23, 2013.

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

SIMÕES, R.R.; KRAUS, S.I.; COELHO, I.S.; DAL-SECCO, D.; SIEBERT, D.A.; MICKE, G.A.; ALBERTON, M.D.; SANTOS, A.R.S. *Eugenia brasiliensis* leaves extract attenuates visceral and somatic inflammatory pain in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 217, n., p. 178-186, 2018.

- SKALICKA-WOŹNIAK, K.; GARRARD, I. Counter-current chromatography for the separation of terpenoids: a comprehensive review with respect to the solvent systems employed. **Phytochemistry Reviews**, v. 13, n. 2, p. 547-572, 2014.
- SOEHNLEIN, O.; STEFFENS, S.; HIDALGO, A.; WEBER, C. Neutrophils as protagonists and targets in chronic inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 4, p. 248, 2017.
- SOUZA, A.L.; MOREIRA, F.A.; ALMEIDA, K.R.; BERTOLLO, C.M.; COSTA, K.A.; COELHO, M.M. In vivo evidence for a role of protein kinase C in peripheral nociceptive processing. **British Journal of Pharmacology**, v. 135, n. 1, p. 239-247, 2002.
- SUR, N.; POI, R.; BHATTACHARYYA, A.; ADITYACHOU DHURY, N. Isolation of aurantiamide acetate from *Ageratum conyzoids*. **Indian Journal of Chemical Society**, v. 74, n., p. 249, 1997.
- TEAF, C.M. Properties and effects of organic solvents. in WILLIAMS, P. L.; JAMES, R. C.; ROBERTS, S. M. **Principles of toxicology: environmental and industrial applications** 2 ed., New York, John Wiley & Sons, p. 367 - 408, 2000.
- THIRUGNANASAMBANTHAM, P.; VISWANATHAN, S.; RAMASWAMY, S.; KRISHNAMURTY, V.; MYTHIRAYEE, C.; KAMESWARAN, L. Analgesic activity of certain flavone derivatives: a structure-activity study. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 20, n. 1, p. 59-63, 1993.
- TJØLSEN, A.; BERGE, O.-G.; HUNSKAAR, S.; ROSLAND, J.H.; HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v. 51, n. 1, p. 5-17, 1992.
- TROPICOS.ORG, (2019). **Missouri Botanical Garden *Ageratum conyzoides* L.**, Acessado em: 28/01/2019, 2019, disponível em: <http://tropicos.org/Name/2700026>
- UCKOO, R.M.; JAYAPRAKASHA, G.K.; PATIL, B.S. Rapid separation method of polymethoxyflavones from citrus using flash chromatography. **Separation and Purification Technology**, v. 81, n. 2, p. 151-158, 2011.
- UGAWA, S.; UEDA, T.; ISHIDA, Y.; NISHIGAKI, M.; SHIBATA, Y.; SHIMADA, S. Amiloride-blockable acid-sensing ion channels are leading acid sensors expressed in human nociceptors. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 110, n. 8, p. 1185-1190, 2002.
- UPSHUR, C.C.; BACIGALUPE, G.; LUCKMANN, R. "They don't want anything to do with you": Patient views of primary care management of chronic pain. **Pain Medicine**, v. 11, n. 12, p. 1791-1798, 2010.
- VARMA, M.V.; STEYN, S.J.; ALLERTON, C.; EL-KATTAN, A.F. Predicting clearance mechanism in drug discovery: extended clearance classification system (ECCS). **Pharmaceutical Research**, v. 32, n. 12, p. 3785-3802, 2015.
- VELÁZQUEZ, K.T.; MOHAMMAD, H.; SWEITZER, S.M. Protein kinase C in pain: involvement of multiple isoforms. **Pharmacological Research**, v. 55, n. 6, p. 578-589, 2007.
- VERA, R. Chemical composition of the essential oil of *Ageratum conyzoides* L.(Asteraceae) from Réunion. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 8, n. 5, p. 257-260, 1993.

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

WALLE, T.; TA, N.; KAWAMORI, T.; WEN, X.; TSUJI, P.A.; WALLE, U.K. Cancer chemopreventive properties of orally bioavailable flavonoids—methylated versus unmethylated flavones. **Biochemical Pharmacology**, v. 73, n. 9, p. 1288-1296, 2007.

WANG, L.; WANG, J.; FANG, L.; ZHENG, Z.; ZHI, D.; WANG, S.; LI, S.; HO, C.-T.; ZHAO, H. Anticancer activities of citrus peel polymethoxyflavones related to angiogenesis and others. **BioMed Research International**, v. 2014, n. 1-10, p., 2014.

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. **Journal of Chromatography A**, v. 1090, n. 1, p. 188-192, 2005.

WARD, K.W.; SMITH, B.R. A comprehensive quantitative and qualitative evaluation of extrapolation of intravenous pharmacokinetic parameters from rat, dog, and monkey to humans. II. volume of distribution and mean residence time. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 32, n. 6, p. 612-619, 2004.

WEI, G.-J.; HWANG, L.S.; TSAI, C.-L. Absolute bioavailability, pharmacokinetics and excretion of 5, 7, 3', 4'-tetramethoxyflavone in rats. **Journal of Functional Foods**, v. 7, n., p. 136-141, 2014.

WEN, X.; WALLE, T. Methylated flavonoids have greatly improved intestinal absorption and metabolic stability. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 34, n. 10, p. 1786-1792, 2006.

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

WIEDENFELD, H.; EDGAR, J. Toxicity of pyrrolizidine alkaloids to humans and ruminants. **Phytochemistry Reviews**, v. 10, n. 1, p. 137-151, 2011.

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

WU, X.; SONG, M.; WANG, M.; ZHENG, J.; GAO, Z.; XU, F.; ZHANG, G.; XIAO, H. Chemopreventive effects of nobiletin and its colonic metabolites on colon carcinogenesis. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 59, n. 12, p. 2383-2394, 2015.

WU, Y.-Q.; ZHOU, C.-H.; TAO, J.; LI, S.-N. Antagonistic effects of nobiletin, a polymethoxyflavonoid, on eosinophilic airway inflammation of asthmatic rats and relevant mechanisms. **Life Sciences**, v. 78, n. 23, p. 2689-2696, 2006.

XIONG, Y.; CHEN, D.; YU, C.; LV, B.; PENG, J.; WANG, J.; LIN, Y. Citrus nobiletin ameliorates experimental colitis by reducing inflammation and restoring impaired intestinal barrier function. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 59, n. 5, p. 829-842, 2015.

YADAV, K.S.; MISHRA, D.K.; DESHPANDE, A.; PETHE, A.M. Levels of Drug Targeting. *in* TEKADE, R. K. **Basic Fundamentals of Drug Delivery**, Academic Press, p. 269-305, 2019a.

YADAV, N.; GANIE, S.A.; SINGH, B.; CHHILLAR, A.K.; YADAV, S.S. Phytochemical constituents and ethnopharmacological properties of *Ageratum conyzoides* L. **Phytotherapy Research**, v. 33, n. 9, p. 2163-2178, 2019b.

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

YANG, G.; LI, S.; YUAN, L.; YANG, Y.; PAN, M.-H. Effect of nobiletin on the MAPK/NF- κ B signaling pathway in the synovial membrane of rats with arthritis induced by collagen. **Food & Function**, v. 8, n. 12, p. 4668-4674, 2017.

YING, S. C-C chemokine expression in atopic and nonatopic asthma. in ROBINSON, D. S. **Immunological Mechanisms in Asthma and Allergic Diseases**, Karger Publishers, 78, p. 178-188, 2000.

ZAKY, S.; ZAKY, C.S.; ABD-ELSAIED, A. Anatomy of the nervous system. in ABD-ELSAIED, A. **Pain: a reviewer guide** Suíça, Springer, p. 3-8, 2019.

ZUO, Y.; PERKINS, N.M.; TRACEY, D.J.; GECZY, C.L. Inflammation and hyperalgesia induced by nerve injury in the rat: a key role of mast cells. **Pain**, v. 105, n. 3, p. 467-479, 2003.