

Cristiane Fracari Bosi

**PRESENÇA DE ALCALOIDES PIRROLIZIDÍNICOS EM**  
*Ageratum conyzoides* L., ASTERACEAE

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do Grau de Mestre em Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Maique Weber Biavatti

Florianópolis  
2012

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

Bosi, Cristiane Fracari

PRESENÇA DE ALCALOIDES PIRROLIZIDÍNICOS EM *Ageratum conyzoides* L., ASTERACEAE [dissertação] / Cristiane Fracari Bosi ; orientadora, Maíque Weber Biavatti - Florianópolis, SC, 2012.

184 p. ; 21cm

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

Inclui referências

1. Farmácia. 2. *Ageratum conyzoides*. 3. Alcalóides pirrolizidínicos. 4. Fitoquímica. I. Biavatti, Maíque Weber. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

**“Presença de alcalóides pirrolizidínicos em *Ageratum conyzoides* L., Asteraceae”**

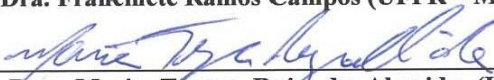
**POR**


**Cristiane Fracari Bosi**

**Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelo(a) Orientador(a) e membros da Banca Examinadora, composta pelos Professores Doutores:**

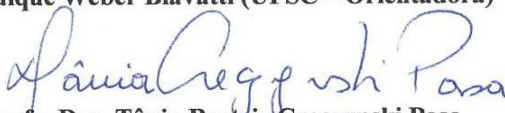
**Banca Examinadora:**

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Francinete Ramos Campos (UFPR – Membro Titular)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Maria Tereza Rojo de Almeida (UFSC – Membro Titular)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Lilian Sibelle Campos Bernardes (UFSC - Membro Titular)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Maique Weber Biavatti (UFSC – Orientadora)

  
Prof. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da  
UFSC

**Florianópolis, 06 de junho de 2012.**



A Deus  
Por seu amor.

Aos meus pais Aristeu e Cleusa,  
Pelo apoio, carinho e incentivo.

A minha irmã Greice,  
Pela amizade e companheirismo.

Aos meus avós Marildo e Luíza,  
Pelo incentivo.



## AGRADECIMENTOS

A Deus, que esteve presente em todos os momentos, dando-me força, coragem e persistência, iluminando meus pensamentos, me protegendo e conduzindo para conquistar esta vitória.

Aos familiares e amigos, agradeço a compreensão quando estive ausente em momentos importantes, o incentivo, o apoio e as orações, sem os quais seria impossível realizar este trabalho.

A Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski-Pasa, agradeço por ter me recebido nesta universidade com atenção e carinho, e ter me apresentado à minha orientadora.

A Profa. Dra. Maique Weber Biavatti, agradeço por ter aceitado ser minha orientadora e pela confiança, disposição, atenção e ensinamentos em todos os momentos da execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel, por todo o auxílio, disponibilidade e incentivo sempre que necessitei.

Ao Prof. Dr. Raphaël Grougnet, agradeço pela disposição, ajuda, conselhos, ensinamentos e amizade.

Aos professores Dr. Andersson Barison e Dra. Francinete Ramos Campos e ao Pedro Pablo Perez Netto, que gentilmente contribuíram obtendo os espectros de RMN e MS.

A todos os professores que me apoiaram e colaboraram para que este trabalho fosse realizado.

A todos os colegas e ex-colegas de laboratório, pela amizade e colaboração na realização deste trabalho.

Aos funcionários da UFSC, pela cooperação nos momentos que precisei.

A UFSC, em especial ao Programa de Pós-graduação em Farmácia e seus professores pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao CNPq, pelo financiamento desta pesquisa.

A todos que colaboraram direta ou indiretamente na execução deste trabalho.





Ho'Omaluhia

O Senhor fez a terra produzir os medicamentos: o homem sensato não os despreza. O farmacêutico deles se serve para acalmar as dores e curá-las; compõe unguentos úteis à saúde, e seu trabalho não terminará, até que a paz divina se estenda sobre a face da terra (ECLESIÁSTICO).



## RESUMO

*Ageratum conyzoides* L. é conhecida popularmente como “mentrasto” e pertence à família Asteraceae. Frequentemente é utilizada como analgésica, tendo sido recentemente incluída na RDC 10 da ANVISA, a qual autoriza sua comercialização na forma de droga vegetal utilizada em infusão para tratar dores articulares e reumatismo. Estudos publicados até o momento não estabelecem a presença de alcaloides pirrolizidínicos na infusão das partes aéreas de *A. conyzoides*. Considerando a demanda de uso popular desta espécie em tratamentos prolongados, justifica-se a importância de pesquisar a presença destes alcaloides. Para tanto, estudou-se as infusões das partes aéreas de *A. conyzoides* coletadas em Florianópolis, Santa Catarina e da droga vegetal adquirida em uma farmácia. Também foram estudadas as macerações das partes aéreas de *A. conyzoides* com os solventes *n*-hexano, diclorometano, acetato de etila e etanol. As macerações foram fracionadas através de cromatografia e analisadas por RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ . Foram identificadas 13 substâncias pertencentes às classes dos cromenos, flavonoides, cumarinas, lignanas e esteroides. As infusões das partes aéreas de *A. conyzoides* foram analisadas por EM e RMN de  $^1\text{H}$ , sendo observada a presença de licopsamina e da sua forma *N*-óxido.

**Palavras-chave:** *Ageratum conyzoides*. Chá. Alcaloides pirrolizidínicos.



## ABSTRACT

*Ageratum conyzoides* L. is popularly known as “mentrasto” and belongs to Asteraceae family. This plant is often used as analgesic and was recently included in ANVISA RDC 10 that authorizes its commercialization as infusion to treat articular pain and rheumatism. Pyrrolizidine alkaloids in infusion of aerial parts of *A. conyzoides* are not described. Considering the popular use of this species in long-term treatments, studies to investigate the presence of these alkaloids are important. Infusions of aerial parts of *A. conyzoides* collected in Florianopolis, Santa Catarina and of the plant drug purchased in a pharmacy were evaluated. Macerations with *n*-hexane, dichloromethane, ethyl acetate and ethanol solvents were studied. Macerations were fractionated by chromatography and analyzed by  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR. Were identified 13 substances of chromenes, flavonoids, coumarins, lignans and steroids classes. Infusions of aerial parts of *A. conyzoides* were analyzed by MS and  $^1\text{H}$  NMR being observed the presence of the licopsamine and the *N*-oxide form of this alkaloid.

**Keywords:** *Ageratum conyzoides*. Tea. Pyrrolizidine alkaloids.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Ageratum conyzoides</i> L.....	32
Figura 2 - Hirsutos de um talo de <i>A. conyzoides</i> , em detalhe.....	32
Figura 3 - Folhas opostas de <i>A. conyzoides</i> , em detalhe.....	32
Figura 4 - Pecíolo hirsuto de <i>A. conyzoides</i> , em detalhe.....	32
Figura 5 - Face adaxial de uma folha de <i>A. conyzoides</i> .....	33
Figura 6 - Face abaxial de uma folha de <i>A. conyzoides</i> .....	33
Figura 7 - Capítulos de <i>A. conyzoides</i> .....	33
Figura 8 - Cimas corimbiformes terminais de <i>A. conyzoides</i> .....	33
Figura 9 - Aquênios e papus de <i>A. conyzoides</i> .....	34
Figura 10 - Raiz de <i>A. conyzoides</i> .....	34
Figura 11 - Raízes adventícias de <i>A. conyzoides</i> .....	34
Figura 12 - Localização geográfica da espécie <i>A. conyzoides</i> .....	35
Figura 13 - Estrutura básica de alcaloides pirrolizidínicos.....	52
Figura 14 - Estrutura da equinatina, exemplo de AP mono-éster.....	52
Figura 15 - Estrutura da senecionina, exemplo de AP macrocíclico....	52
Figura 16 - Estrutura da licopsamina N-óxido.....	52
Figura 17 - AP 1,2-insaturado.....	53
Figura 18 - Derivado pirrólico.....	53
Figura 19 - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da infusão das partes aéreas de <i>A. conyzoides</i> , D <sub>2</sub> O, 400 MHz.....	88
Figura 20 - Espectro de Massas <i>Full scan</i> , modo negativo, da infusão das partes aéreas de <i>A. conyzoides</i> liofilizada em MeCN-H <sub>2</sub> O (50:50) com 1% de HCOOH (c = 100 µg/mL).....	91
Figura 21 - Espectro de EM/EM (íons produtos) do íon de m/z 300 da infusão das partes aéreas de <i>A. conyzoides</i> .....	92
Figura 22 - Espectro de EM/EM (íons produtos) do íon de m/z 316 da infusão das partes aéreas de <i>A. conyzoides</i> .....	93
Figura 23 - Análise por CLAE-EM da infusão das partes aéreas de <i>A. conyzoides</i> .....	94
Figura 24 - Espectro de massas extraído do cromatograma (CLAE-EM) da infusão das partes aéreas de <i>A. conyzoides</i> no Tr = 18,7 min.....	95
Figura 25 - Estrutura molecular da <u>licopsamina (14)</u> .....	96
Figura 26 - Estrutura molecular da <u>licopsamina N-óxido (15)</u> .....	96
Figura 27 - Fragmentos importantes observados no (-)ESI-EM/EM da licopsamina.....	96





Figura 28 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da fração 48 do extrato com etanol, acetona, 400 MHz.....	102
Figura 29 - Estrutura molecular do <u>ácido <i>o</i>-hidróxi-cinâmico (1)</u> .....	103
Figura 30 - Estrutura molecular do <u>ácido 3-(2-hidroxifenil)propanoico (2)</u> .....	103
Figura 31 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da fração J4, $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz.....	105
Figura 32 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da fração J4, $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz.....	107
Figura 33 - Estrutura molecular do <u>precoceno II (3)</u> .....	108
Figura 34 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da fração L1, $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz.....	110
Figura 35 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da fração H5, $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz.....	111
Figura 36 - Estrutura molecular do <u>estigmasterol (4)</u> .....	113
Figura 37 - Estrutura molecular do <u><math>\beta</math>-sitosterol (5)</u> .....	113
Figura 38 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da fração M1, $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz.....	114
Figura 39 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da fração M1, $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz.....	116
Figura 40 - Estrutura molecular da <u>cumarina (6)</u> .....	117
Figura 41 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da fração P5, $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz.....	118
Figura 42 - Estrutura molecular do <u>6-(1'-hidroxietil)-7-metoxi-2,2-dimetilcromeno (7)</u> .....	119
Figura 43 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da fração H7, $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz.....	121
Figura 44 - Estrutura molecular do <u>6-(1'-hidroxietil)-2,2-dimetilcromeno (8)</u> .....	123
Figura 45 - Estrutura molecular da <u>sesamina (9)</u> .....	123
Figura 46 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da fração P7, $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz.....	125
Figura 47 - Estrutura molecular da <u>linderoflavona B (10)</u> .....	127
Figura 48 - Estrutura molecular da <u>3'-hidroxí-4',5,5',6,7,8-hexametoxiflavona (11)</u> .....	127
Figura 49 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da fração O7, $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz.....	129
Figura 50 - Estrutura molecular da <u>5'-metoxinobiletina (12)</u> .....	130
Figura 51 - Estrutura molecular da <u>eupalestina (13)</u> .....	130



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Atividades analgésica, anti-inflamatória, relaxante muscular e toxicidade de <i>A. conyzoides</i> .....	38
Tabela 2	- Atividade antimicrobiana de <i>A. conyzoides</i> .....	45
Tabela 3	- Relação entre as extrações utilizadas na pesquisa de alcaloides pirrolizidínicos.....	86
Tabela 4	- Deslocamentos químicos de RMN de $^1\text{H}$ da <u>licopsamina (14)</u> comparados com a literatura.....	89
Tabela 5	- Deslocamentos químicos de RMN de $^1\text{H}$ do <u>ácido o-hidróxi-cinâmico (1)</u> e do <u>ácido 3-(2-hidroxifenil)propanoico (2)</u> .....	103
Tabela 6	- Deslocamentos químicos de RMN de $^{13}\text{C}$ do <u>precoceno II (3)</u> comparados com a literatura.....	106
Tabela 7	- Deslocamentos químicos de RMN de $^1\text{H}$ do <u>precoceno II (3)</u> comparados com a literatura.....	108
Tabela 8	- Deslocamentos químicos de RMN de $^{13}\text{C}$ do <u>estigmasterol (4)</u> e do <u><math>\beta</math>-sitosterol (5)</u> comparados com a literatura.....	112
Tabela 9	- Deslocamentos químicos de RMN de $^{13}\text{C}$ da <u>cumarina (6)</u> comparados com a literatura.....	115
Tabela 10	- Deslocamentos químicos de RMN de $^1\text{H}$ da <u>cumarina (6)</u> comparados com a literatura.....	117
Tabela 11	- Deslocamentos químicos de RMN de $^{13}\text{C}$ do <u>6-(1'-hidroxietil)-7-metoxi-2,2-dimetilcromeno (7)</u> comparados com a literatura.....	119
Tabela 12	- Deslocamentos químicos de RMN de $^1\text{H}$ do <u>6-(1'-hidroxietil)-2,2-dimetilcromeno (8)</u> .....	122
Tabela 13	- Deslocamentos químicos de RMN de $^1\text{H}$ da <u>sesamina (9)</u> comparados com a literatura.....	122
Tabela 14	- Deslocamentos químicos de RMN de $^1\text{H}$ da <u>3'-hidroxi-4',5',6,7,8-hexametoxiflavona (11)</u> e da <u>linderoflavona B (10)</u> comparados com a literatura.....	126
Tabela 15	- Deslocamentos químicos de RMN de $^1\text{H}$ da <u>5'-metoxinobiletina (12)</u> e da <u>eupalestina (13)</u> comparados com a literatura.....	130



## LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1	- Extrações realizadas neste trabalho.....	58
Fluxograma 2	- Extratos utilizados na pesquisa de alcaloides pirrolizidínicos.....	59
Fluxograma 3	- Extração em Soxhlet (processo A).....	62
Fluxograma 4	- Maceração em metanol (processo B).....	66
Fluxograma 5	- Decocção em água ácida (processo C).....	69
Fluxograma 6	- Maceração em água (processo D).....	70
Fluxograma 7	- Análise da infusão com as partes aéreas de <i>A. conyzoides</i> preparada de acordo com a RDC 10/10 da ANVISA (processo E).....	71
Fluxograma 8	- Extração seletiva para alcaloides com a infusão das partes aéreas de <i>A. conyzoides</i> (processo E-1).....	72
Fluxograma 9	- Fracionamento cromatográfico da infusão com as partes aéreas de <i>A. conyzoides</i> .....	74
Fluxograma 10	- Extratos orgânicos preparados.....	76
Fluxograma 11	- Resultado da pesquisa fitoquímica com a infusão das partes aéreas de <i>A. conyzoides</i> .....	98



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMP - Adenosina monofosfato  
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
AP - Alcaloide pirrolizidínico  
BK II - Bradicinina  
c - Concentração  
CBM - Concentração bacteriana mínima  
CCD - Cromatografia em camada delgada  
CDCl<sub>3</sub> - Clorofórmio deuterado  
CGRP - Peptídeo relacionado ao gene calcitonina  
CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> - Diclorometano  
CIM - Concentração inibitória mínima  
CLAE-EM - Cromatografia líquida de alta eficiência com espectrômetro de massas  
CLAE-EM/EM - Cromatografia líquida de alta eficiência com espectrômetro de massas triploquadropolo  
cm - Centímetro  
*d* - Dupleto  
*dd* - Duplo dupleto  
*ddd* - Duplo dupleto de dupleto  
DPPH - 2,2-difenil-1-picrilhidrazila  
D<sub>2</sub>O - Óxido de deutério  
EC50 - Concentração efetiva média  
EM - Espectrometria de massa  
FRAP - Poder antioxidante de redução do ferro  
g - Grama  
HCl - Ácido clorídrico  
HCOOH - Ácido fórmico  
H<sub>2</sub>O - Água  
J - Constante de acoplamento  
kg - Quilograma  
KOH - Hidróxido de potássio  
L - Litro  
*m* - Multiplete  
MeCN - Acetonitrila  
mg - Miligrama  
MHz - Megahertz  
min - Minuto  
mL - Mililitro  
mm - Milímetro





NK 1 - Neuroquinina 1  
NH<sub>4</sub>OH - Hidróxido de amônia  
nm - Nanômetro  
pH - Potencial hidrogeniônico  
ppm - Partes por milhão  
PVP - Polivinilpirrolidona  
RDC - Resolução da Diretoria Colegiada  
RMN - Ressonância magnética nuclear  
RMN de <sup>1</sup>H - Ressonância magnética nuclear de hidrogênio  
RMN de <sup>13</sup>C - Ressonância magnética nuclear de carbono  
*s* - Singleto  
SNC - Sistema nervoso central  
*t* - Tripleto  
Tr - Tempo de retenção  
UHPLC(+)<sup>ESI</sup>-HR/MS - Cromatografia líquida de ultra alta eficiência  
acoplada a espectrometria de massa de alta resolução com ionização  
eletrospray  
*v* - Volume  
μL - Microlitro  
δ - Deslocamento químico  
°C - Graus Celsius  
° GL - Graus Gay Lussac  
*m/z* - Relação massa/carga  
[M]<sup>+</sup> - Íon molecular  
[M+H]<sup>+</sup> - Molécula protonada



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	31
1.1. A tradição do uso de chás medicinais.....	31
1.2. <i>Ageratum conyzoides</i> .....	31
1.2.1. Classificação taxonômica.....	31
1.2.2. Descrição botânica.....	32
1.2.3. Nomenclatura vernacular.....	34
1.2.4. Localização geográfica.....	35
1.2.5. Uso popular.....	35
1.2.6. Atividades biológicas.....	36
1.3. Produtos naturais.....	51
1.3.1. Alcaloides pirrolizidínicos.....	51
2. OBJETIVOS.....	55
2.1. Objetivo geral.....	55
2.2. Objetivos específicos.....	55
3. METODOLOGIA.....	57
3.1. Material vegetal utilizado neste estudo.....	57
3.1.1. Coleta da planta e identificação da espécie.....	57
3.1.2. Obtenção da droga vegetal.....	57
3.1.3. Preparação da planta para análise fitoquímica.....	57
3.2. Obtenção dos extratos.....	57
3.2.1. Pesquisa de alcaloides pirrolizidínicos.....	58
3.2.1.1. Extração em Soxhlet (processo A).....	61
3.2.1.2. Maceração em metanol (processo B).....	65
3.2.1.3. Decocção ácida (processo C).....	68
3.2.1.4. Maceração em água (processo D).....	70
3.2.1.5. Infusão em água (processo E).....	70
3.2.1.5.1. Extração seletiva para alcaloides (processo E-1).....	71
3.2.2. Pesquisa fitoquímica de outros metabólitos secundários.....	72
3.2.2.1. Infusão.....	72
3.2.2.2. Extratos orgânicos.....	74
3.2.2.2.1. Fracionamento cromatográfico dos extratos orgânicos.....	78
3.2.2.2.1.1. Extrato com <i>n</i> -hexano.....	78
3.2.2.2.1.2. Extrato com diclorometano.....	80
3.2.2.2.1.3. Extrato com acetato de etila.....	80
3.2.2.2.1.4. Extrato com etanol.....	80
3.3. Análise por EM.....	81
3.4. Análise por RMN.....	81



4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	83
4.1. Análise dos extratos utilizados na pesquisa de alcaloides pirrolizidínicos.....	83
4.1.1. Relação entre os diferentes métodos extrativos utilizados na pesquisa de alcaloides pirrolizidínicos.....	83
4.1.2. Análise da infusão das partes aéreas de <i>A. conyzoides</i> por RMN de $^1\text{H}$ .....	87
4.1.3. Análise da infusão das partes aéreas de <i>A. conyzoides</i> por EM.....	89
4.2. Análise fitoquímica e identificação das substâncias presentes na infusão das partes aéreas de <i>A. conyzoides</i> .....	97
4.3. Análise fitoquímica e identificação das substâncias presentes nos extratos orgânicos das partes aéreas de <i>A. conyzoides</i> .....	100
4.3.1. Extrato com <i>n</i> -hexano.....	100
4.3.2. Extrato com diclorometano.....	100
4.3.3. Extrato com etanol.....	100
4.3.4. Análise dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ e de $^{13}\text{C}$ .....	101
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	131
REFERÊNCIAS.....	133
APÊNDICE A – FLUXOGRAMA GERAL DO TRABALHO.....	151
APÊNDICE B – ESTRUTURAS DAS SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS.....	153
ANEXO – ARTIGO SUBMETIDO PARA A REVISTA FOODCHEMISTRY.....	157



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. A tradição do uso de chás medicinais

As plantas são recursos permanentes de compostos biologicamente ativos, utilizados por cerca de 80% da população mundial, tanto na forma natural de chás, como de fitoterápicos (HORN & VARGAS, 2008).

Os chás são amplamente utilizados na medicina popular, especialmente em países do Terceiro Mundo. Esse conhecimento é passado de geração em geração. Estimativas sugerem que, em muitos países em desenvolvimento, uma proporção considerável da população depende fortemente das plantas medicinais para atender os cuidados primários com a saúde. Apesar dos medicamentos modernos estarem disponíveis nesses países, frequentemente a população prefere utilizar as plantas por razões culturais e históricas. Ao mesmo tempo, muitas pessoas que habitam em países desenvolvidos utilizam plantas medicinais como terapia alternativa (WHO, 1999).

As infusões caseiras, ou “chá de ervas”, tornaram-se populares no Brasil. Em todo o país uma grande porcentagem da população, por meio da cultura popular, atribui a muitas ervas propriedades medicinais (PAGANINI-COSTA & DA-SILVA, 2011). Porém, existem poucos estudos sobre os efeitos desses extratos aquosos na saúde humana (HORN & VARGAS, 2008).

### 1.2. *Ageratum conyzoides*

#### 1.2.1. Classificação taxonômica

Classe: Equisetopsida C. Agardh

Subclasse: Magnoliidae Novák ex Takht.

Subordem: Asterales Takht.

Ordem: Asterales Link

Família: Asteraceae Bercht. & J. Presl

Gênero: *Ageratum* L.

Tribo: Eupatorieae Cass.

Espécie: *Ageratum conyzoides* L. (TROPICOS).

Excicatas depositadas no Herbarium Musei Parisiensis (MNHN) e no ANTHOS Image Database (ANTHOS) estão disponíveis para consulta online.

### 1.2.2. Descrição botânica

*Ageratum conyzoides* (Figura 1) é uma erva anual de 50-100 cm de altura, com talos eretos, pouco ramosos e hirsutos (Figura 2) (REITZ, 1989).



Figura 1 - *Ageratum conyzoides* L.

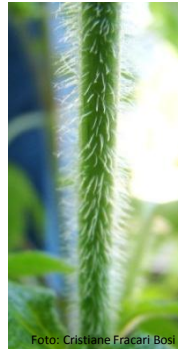


Figura 2 - Hirsutos de um talo de *A. conyzoides*, em detalhe.

*Ageratum conyzoides* possui folhas opostas (Figura 3), pecioladas, com pecíolos hirsutos (Figura 4) de 1-2,5 cm de comprimento e lâminas ovadas, agudas ou quase obtusas no ápice e arredondadas ou cordadas na base, crenadas na margem, trinervadas, hirsutas em ambas as faces (face adaxial - Figuras 5 e face abaxial – Figura 6), de 3-6 cm de comprimento por 2-4 cm de largura (REITZ, 1989).



Figura 3 – Folhas opostas de *A. conyzoides*, em detalhe.



Figura 4 – Pecíolo hirsuto de *A. conyzoides*, em detalhe.





Figura 5 – Face adaxial de uma folha de *A. conyzoides*.



Figura 6 – Face abaxial de uma folha de *A. conyzoides*.

*Ageratum conyzoides* possui capítulos numerosos (Figura 7), dispostos em cimas corimbiformes terminais mais ou menos densas (Figura 8). Invólucro hemisférico, de 4 mm de altura por 5-6 mm de diâmetro. Flores numerosas, lilases, violáceas ou brancas (REITZ, 1989).



Figura 7 – Capítulos de *A. conyzoides*.



Figura 8 – Cimas corimbiformes terminais de *A. conyzoides*.

Aquênios escuros de 1,5 mm de comprimento. Pappus formado por 5 palhinhas lanceoladas, de comprimento semelhante a corola (Figura 9) (REITZ, 1989).



Figura 9 – Aquênios e papus de *A. conyzoides*.

A raiz de *A. conyzoides* é pivotante, com abundantes raízes secundárias distribuídas superficialmente no solo (Figura 10). Podem surgir raízes adventícias de nós bem como de entrenós em contato com o solo úmido (Figura 11) (KISSMANN & GROYPH, 1992).



Figura 10 – Raiz de *A. conyzoides*.



Figura 11 – Raízes adventícias de *A. conyzoides*.

### 1.2.3. Nomenclatura vernacular

*Ageratum conyzoides* é conhecido popularmente no Brasil como mentrasto, catinga-de-bode, catinga-de-borrão, erva-de-são-joão, maria-preta, celestina, picão-roxo, erva-de-santa-luzia e camará-opela (REITZ, 1989). Essa espécie encontra-se disseminada como planta daninha de difícil controle em diversos países, tendo seus nomes populares locais citados nas seguintes bases de dados: Global Invasive Species Database (ISSG), Pacific Island Ecosystems at Risk (PIER), Plant Invasion (PLANTNET), Plants of the Eastern Caribbean (ECFLORA), Crop Protection Compendium (CABI), JSTOR Plant Science (JSTOR), CARIB Fruits (CIRAD) e Global Information Hub On Integrated Medicine (GLOBINMED).

#### 1.2.4. Localização geográfica

*Ageratum conyzoides* encontra-se disseminada por regiões tropicais e subtropicais do mundo (KISSMANN & GROTH, 1992) (Figura 12), incluindo as áreas agrícolas de todos os estados brasileiros, onde infesta principalmente as lavouras de soja, feijão, milho, tabaco, cana-de-açúcar, parreirais e café (REITZ, 1989).

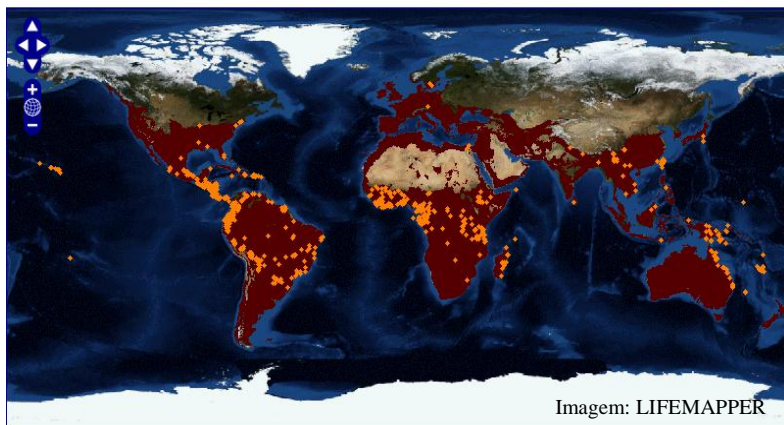


Figura 12 – Localização geográfica da espécie *A. conyzoides*.

#### 1.2.5. Uso popular

*Ageratum conyzoides* possui uma longa história de uso na medicina tradicional em diversos países do mundo, sendo utilizada principalmente como analgésica, anti-inflamatória, antibacteriana, depurativa e febrífuga (SOARES et al., 2004). No Congo, *A. conyzoides* faz parte da formulação do Tetra<sup>®</sup>, uma suspensão oral comercializada com indicação analgésica e anti-inflamatória e pertencente à Farmacopéia Tradicional Congolês. Ainda é utilizada como anti-infecciosa em doenças oculares, otites e dermatoses (MAKAMBILA-KOUBEMBA et al., 1997). Em Trindade-Tobago, esta espécie é utilizada no tratamento de problemas de próstata (LANS, 2007), em El Salvador, é utilizada no tratamento de doenças venéreas e na Colômbia, como hemostática (HIRSCHHORN, 1982).

O chá das partes aéreas de *A. conyzoides* é utilizado popularmente no tratamento de diversas doenças (MUSTAFA et al., 2005). A

população de Criciúma, Santa Catarina, utiliza esta espécie no tratamento de reumatismo, dores articulares, edemas, depressão, cólicas menstruais, analgésico, anti-inflamatório, combate à tosse e no tratamento de psoríase (ESCOBAR, 2007).

*Ageratum conyzoides* foi recentemente citada no anexo I da RDC 10, de 9 de março de 2010, onde está indicado o uso de suas partes aéreas sem as flores, na forma de infusão com 2-3 g (2-3 colheres de chá) em 150 mL (xícara de chá), na posologia de uma xícara de chá de duas a três vezes por dia, para o tratamento de dores articulares (artrite e artrose) e reumatismo, sendo contra-indicado o uso por pessoas com problemas hepáticos e não devendo ser utilizada por mais de três semanas consecutivas (ANVISA, 2010).

#### 1.2.6. Atividades biológicas

O “chá” de *A. conyzoides* apresentou atividade analgésica nas dores crônicas do aparelho locomotor em 66% dos pacientes observados com artrose. O efeito analgésico iniciou na segunda semana de uso e perdurou após a suspensão do chá. Também, foi observado que a mobilidade articular não foi diretamente influenciada pelo chá. Ainda, não foram observados quaisquer efeitos colaterais clínicos e laboratoriais (NETO et al., 1988).

A revisão dos testes farmacológicos pré-clínicos publicados até o momento com a espécie *A. conyzoides* está apresentada na forma de tabelas, sendo que na Tabela 1 estão os trabalhos encontrados com as atividades analgésica, anti-inflamatória, relaxante muscular e toxicidade e na Tabela 2 estão os resultados encontrados com as atividades antimicrobianas. Além desses resultados, foram encontrados diversos trabalhos testando as atividades inseticida (LIMA et al., 2010), (SHARMA et al., 2009), (MOREIRA et al., 2007), (DE MENDONÇA et al., 2005), (PRAJAPATI et al., 2003), (AYINDE & ODIGIE, 2001), (BOUDA et al., 2001), (PARI et al., 2001), (GBOLADE et al., 1999), (BHATHAL et al., 1994), (SAXENA et al., 1992), (SAXENA & SAXENA, 1992), (FAGOONEE & UMRIT, 1981), (VYAS & MULCHANDANI, 1980), repelente (SOARES et al., 2010), (DAS et al., 2007), (TRONGTOKIT et al., 2005), larvicida (MACEDO et al., 1997), (GONZALEZ et al., 1991), (CALLE et al., 1990), (SUJATHA et al., 1988), antiparasitária (NOUR et al., 2010), antiprotozoária (NOUR et al., 2006), anticoccidiana (NWEZE et al., 2008), moluscicida (MENDES et al., 1999), nematocídica (NISAR & HUSAIN, 1990), anti-helmíntica (SHARMA et al., 1979a), antitumoral (ADEBAYO et al.,

2010a), (MOMESSO et al., 2009), (ROSANGKIMA & PRASAD, 2004), (JAGETIA et al., 2003), alelopática (KONG, 2010), (KONG et al., 2005), (SINGH et al., 2003), (KONG et al., 2002), (KATONOGUCHI, 2001), (KONG et al., 1999), (XU et al., 1999), hipoglicêmica (NYUNAĪ et al., 2009), (NYUNAĪ et al., 2006), antiulcerogênica e protetora gástrica (SALMAH et al., 2005), (SHIRWAIKAR et al., 2003), potencial hematopoiético (ITA et al., 2007) e hemostática (ACHOLA et al., 1994) de *A. conyzoides*.

Tabela 1 – Atividades analgésica, anti-inflamatória, relaxante muscular e toxicidade de *A. conyzoides*.

Referência, em ordem decrescente de data	Modelo	Atividade	Metodologia	Resultado
ANTAI et al., 2009.	Ratos Wistar albinos.	Toxicidade.	Extrato etanólico das folhas. Dose oral: 200, 400 e 600 mg/kg.	Não ocorreu alteração significativa nos níveis séricos e no tecido hepático de proteínas totais, alanina, transaminase, aspartato transaminase e fosfatase alcalina. A ingestão do extrato não é tóxica nas doses testadas.
IGBOASOYI et al., 2007.	Ratos.	Toxicidade.	Extrato etanólico. Dose: 500 e 1000 mg/kg.	Nenhuma das doses afetou significativamente os níveis séricos das aminotransferases alanina e aspartato, fosfatase alcalina, amilase, creatinina, glicose e proteínas totais. Ambas as doses reduziram significativamente os níveis séricos de colesterol e das lipoproteínas de alta densidade. Na dose de 1000 mg/kg foi observado aumento de peso dos animais. As doses testadas administradas não resultaram em efeitos tóxicos.

Tabela 1 – Continuação...

Referência, em ordem decrescente de data	Modelo	Atividade	Metodologia	Resultado
OKEMY-ANDISSA et al., 2006.	Camundongos.	Analgésica.	Extrato aquoso das folhas.	Redução significativa das cólicas abdominais induzidas por ácido acético e aumento do limiar da dor no teste de placa quente.
MOURA et al., 2005.	Ratos.	Anti-inflamatória (subaguda e crônica) e toxicidade crônica.	Extrato hidroalcoólico das folhas. Dose oral: 250 e 500 mg/kg. Atividade anti-inflamatória subaguda: granuloma induzido com <i>pellet</i> de algodão. Atividade anti-inflamatória crônica: artrite induzida com formaldeído.	A dose de 250 mg/kg reduziu a inflamação subaguda em 38, 7% e também inibiu significativamente a inflamação crônica. Além disso, não foram encontrados parâmetros bioquímicos e hematológicos de toxicidade. A dose de 500 mg/kg reduziu a glutamato-piruvato-transaminase sérica.

Tabela 1 – Continuação...

Referência, em ordem decrescente de data	Modelo	Atividade	Metodologia	Resultado
GALATI et al., 2001.	Ratos.	Anti-inflamatória.	Extrato em metanol das partes aéreas e fração com flavonoides.	O extrato em metanol e a fração dos flavonoides inibiram significativamente o edema induzido por carragenina. A fração com flavonoides inibiu fortemente a atividade do radical DPPH. O efeito anti-inflamatório do extrato em metanol depende da fração dos flavonoides, a qual protege as células e os tecidos dos danos causados pelos radicais livres.
SAMPSON et al., 2000.	Receptores envolvidos na mediação da dor aguda no SNC de mamíferos: BK II, NK 1 e CGRP.	Analgésica.	Extrato em metanol da planta inteira.	O extrato apresentou resultado positivo no teste inicial com BK II (83%), mas foi eliminado pela adição de PVP (4%) e não apresentou efeito positivo nos testes com NK 1 e CGRP.



Tabela 1 – Continuação...

Referência, em ordem decrescente de data	Modelo	Atividade	Metodologia	Resultado
SILVA et al., 2000.	Útero e músculos de intestino liso isolados de ratos.	Espasmolítica.	Fração do extrato hidroalcoólico solúvel em água.	0,2 – 0,4 mg/mL: aumentou os valores de EC50 e diminuiu as respostas máximas à acetilcolina (prevenida com teofilina) e ao cloreto de cálcio. 0,5 – 3,3 mg/mL: produziu efeito miorelaxante direto nos músculos lisos (potencializado por teofilina). Esses resultados aparentemente estão ligados à mobilização do cálcio e sugerem que o extrato pode atuar sinergicamente com a teofilina na inibição da fosfodiesterase do AMP cíclico.
ACHOLA & MUNENGE, 1998.	Traquéia e útero isolados de ratos.	Relaxante traqueal e inibidora das contrações uterinas.	Extrato e metanólico das partes aéreas e das raízes.	Ambos os extratos induziram o relaxamento da traquéia. Inibiu contrações uterinas induzidas por 5-hidroxitriptamina sugerindo que o extrato possui atividade antiserotonérgica específica em útero isolado, mas não atuou nas contrações uterinas induzidas por acetilcolina. Estes resultados sustentam o uso como espasmolítica.

Tabela 1 – Continuação...

Referência, em ordem decrescente de data	Modelo	Atividade	Metodologia	Resultado
MAGALHÃES et al., 1997.	Ratos.	Analgésica e anti-inflamatória.	Fração do extrato hidroalcoólico solúvel em água.	<p>20 – 50 mg/kg: reduziu a incapacitação articular induzida por carragenina.</p> <p>O efeito antinoceptivo do extrato não foi alterado pela naloxona, sugerindo que os opióides endógenos não estão envolvidos no efeito antinoceptivo do extrato.</p> <p>30 – 50 mg/kg: a migração neutrofílica induzida por carragenina intra-peritoneal e o edema induzido por carragenina foram inibidos.</p> <p>O edema induzido por dextrana não foi alterado.</p> <p>30 mg/kg: bloqueou significativamente o aumento da permeabilidade vascular cutânea. Duplicou a permeabilidade vascular induzida por histamina.</p> <p>Os extratos podem inibir reações inflamatórias induzidas por estímulos que mobilizam neutrófilos</p>

Tabela 1 – Continuação...

Referência, em ordem decrescente de data	Modelo	Atividade	Metodologia	Resultado
ACHOLA & MUNENGE, 1997.	Nervo frênico isolado de diafragmas de ratos.	Bloqueador neuromuscular.	Extrato metanólico das partes aéreas e das raízes.	Bloqueou a atividade neuromuscular de nervos frênicos isolados de diafragmas. A fisostigmina não reverteu este bloqueio. Bloqueou a atividade do canal de cálcio.
MAKAMBILA-KOUBEMBA et al., 1997.	Ratos.	Analgésica.	Sumo das folhas frescas. Dose oral de 125 mg/kg. Teste de Koster, utilizando ácido acético como indutor de cólicas.	O número de cólicas sofridas pelos animais controle foi de $41,66 \pm 9,96$ e, pelos animais tratados com <i>A. conyzoides</i> foi de $12,5 \pm 1,08$ .
ABENA et al., 1996.	Camundongos e ratos.	Anti-inflamatória, analgésica e antipirética.	Óleo essencial.	Apresentou significantes atividades anti-inflamatória e analgésica, e alívio das contrações sem toxicidade gástrica.

Tabela 1 – Continuação...

Referência, em ordem decrescente de data	Modelo	Atividade	Metodologia	Resultado
TANDON et al., 1994.	Camundongos e ratos.	Analgésica e anti-inflamatória.	Extrato etanólico das raízes. Dose: 100 e 300 mg/kg.	Reduziu significativamente o edema de pata induzido por carragenina em ratos. O extrato possui propriedades anti-inflamatórias e analgésicas. Sem efeitos tóxicos agudos em camundongos.
ABENA et al., 1993.	Ratos Wistar.	Analgésica.	Sumo das folhas. Atividade motora espontânea e analgésica.	50 e 100 mg/kg: causou ataxia precoce, sedação e leve ptose. 6 horas após a injeção, os efeitos desapareceram e ocorreu redução da atividade motora espontânea. Todas as doses iguais ou superiores a 125 mg/kg causaram mortalidade.
YAMAMOTO et al., 1991.	Ratos e camundongos.	Analgésica e anti-inflamatória.	Extrato aquoso. Administração oral.	0,1 a 5 g/kg: induziu sedação e reduziu a motilidade espontânea. 2 g/kg: não influenciou o edema de pata induzido por carragenina ou dextransa, nem reduziu o edema de pata crônico induzido por adjuvante de Freud completo ou formaldeído e não afetou as contrações induzidas por ácido acético.

Tabela 2 – Atividade antimicrobiana de *A. conyzoides*.

Referência, em ordem decrescente de data	Metodologia	Resultado
PATIL et al., 2010.	<p>Óleo essencial: antiaflatoxina (difusão em disco).  Óleo essencial e extrato em metanol: antioxidante (FRAP, DPPH, inibição da peroxidação lipídica).</p> <p>Atividade antibacteriana forte contra <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Bacillus subtilis</i>.</p> <p>O extrato em metanol apresentou maior atividade antioxidante nos ensaios FRAP e DPPH, enquanto o óleo essencial apresentou maior inibição da peroxidação lipídica.</p>	<p>O crescimento e a produção de aflatoxina por cepas toxigênicas de <i>Aspergillus parasiticus</i> foram completamente inibidos.</p>
KUMAR et al., 2010.	<p>Óleo essencial das folhas.  Antifúngica contra <i>Aspergillus flavus</i> nkdhv8.  Concentração: 1,0 µL/mL.</p>	<p>Inibição do crescimento: <math>85,85 \pm 2,87</math>.</p>
NOGUEIRA et al., 2009.	<p>Óleo essencial (0,0 – 30 µg/mL).  Antifúngica (aflatoxina – <i>Aspergillus flavus</i>).</p>	<p>Nas concentrações superiores a 0,1 µg/mL, ocorreu inibição completa da aflatoxina.</p>

Tabela 2 – Continuação...

Referência, em ordem decrescente de data	Metodologia	Resultado
SINGH et al., 2009.	Óleo essencial das folhas. Antifúngico contra cepas toxigênicas de <i>Aspergillus flavus</i> navjot 4nst e saktiman 3nst). Concentração: 1000 µL/L.	Inibição do crescimento: 32,5 ± 0,86 e 46,4 ± 1,01.
KUMAR et al., 2008.	Óleo essencial. Antifúngica contra cepas toxigênicas de <i>Aspergillus flavus</i> . Concentração: 1,0 e 1,5 µL/mL.	Inibição do crescimento: 1,0 µL/mL: 83,93 ± 3,05 1,5 µL/mL: 95,30 ± 2,02.
DAYIE, 2008.	Flores, folhas e raízes extraídas em Soxhlet com éter de petróleo, diclorometano e metanol, sucessivamente. Extrato aquoso. Antimicrobiana contra <i>Staphylococcus aureus</i> nctc 6571 e <i>Staphylococcus aureus</i> nctc 12493 resistente a meticilina e contra cepas resistentes, isoladas clinicamente, de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Escherichia coli</i> .	O extrato metanólico inibiu o crescimento de todas as cepas de <i>S. aureus</i> com diâmetro de zona de inibição variando entre 26 e 28 mm, foi fracamente ativo contra <i>E. coli</i> e não inibiu <i>P. aeruginosa</i> . O extrato aquoso e o extrato em 40-60% de éter de petróleo não apresentou atividade inibitória para os microrganismos testados.

Tabela 2 – Continuação...

Referência, em ordem decrescente de data	Metodologia	Resultado
AMADI et al., 2007.	<p>Extratos aquoso e etanólico. Antimicrobiana contra <i>Streptococcus mutans</i> isolada de pacientes com cárie.</p>	Não inibiu <i>S. mutans</i> .
NDIP et al., 2007.	<p>Extrato metanólico. <i>H. pylori</i> isolado de amostras de biópsia gástrica de pacientes que apresentavam complicações gastroduodenais.</p>	Atividade antibacteriana potente, com diâmetro de zona de inibição variando de 0 a 30 mm.
OKWORI et al., 2007.	<p>Extratos em hexano das folhas, ramos e raízes. <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Yersinia enterocolitica</i>, <i>Salmonella gallinarum</i> e <i>Escherichia coli</i>.</p>	<p>Todos os extratos em hexano tiveram eficiência de 100% em todas as bactérias testadas.</p> <p>Os extratos inibiram o crescimento das bactérias isoladas, de maneira concentração dependente.</p> <p>As CIM variaram entre 6,25 e 100 mg/mL e a CBM variou entre 3,13 e 50 mg/mL.</p>
CHAH et al., 2006.	<p>Extrato metanólico. Método de difusão. <i>S. aureus</i> (4 cepas), <i>E. coli</i> (2 cepas), <i>P. aeruginosa</i> (1 cepa), <i>Proteus spp.</i> (3 cepas) e <i>Shigella spp.</i> (1 cepa).</p>	Não inibiu o crescimento de nenhum microorganismo testado.

Tabela 2 – Continuação...

Referência, em ordem decrescente de data	Metodologia	Resultado
AKINYEMI et al., 2005.	Extrato etanólico e aquoso. <i>S. aureus</i> NCIB 8588.	CIM: 55,4 (etanólico) e 71,0 µg/mL (aquoso).
HOFFMAN et al., 2004.	Extrato em hexano.	Eficiente contra <i>S. aureus</i> , <i>S. aureus</i> resistente a meticilina, <i>Aspergillus fumigatus</i> e <i>Candida spp.</i>
MOODY et al., 2004.	Incorporação do extrato em sabonete.	Ineficiente para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Candida albicans</i> .
FIORI et al., 2000.	Extrato bruto e óleo essencial. Antifúngica para <i>Didymella bryoniae</i> .	O extrato bruto foi mais eficaz na inibição do crescimento enquanto o óleo essencial proporcionou inibição total do crescimento e germinação de esporos de <i>D. bryoniae</i> .
PERUMAL et al., 1999.	Resíduo aquoso. Difusão em disco.	Controle significativo do crescimento de <i>Alkaligenes viscolactis</i> , <i>Klebsiella aerogenas</i> , <i>Bacillus cereus</i> e <i>Streptococcus pyogenes</i> .
GANESAN & KRISHNARAJU, 1995.	Extrato das folhas.	Não inibiu a germinação de esporos de <i>D. oryzae</i> .



Tabela 2 – Continuação...

Referência, em ordem decrescente de data	Metodologia	Resultado
MISHRA & DUBEY, 1994.	Óleo essencial.	Inibiu 90% do crescimento do fungo <i>A. flavus</i> em 3000 ppm.
EKUNDAYO et al., 1988.	Óleo essencial das folhas.	Apresentou atividade moluscicida.
SINGH et al., 1986.	Óleo essencial. Concentração: 2000 ppm.	Atividade antifúngica contra: <i>E. floccosum</i> , <i>M. canis</i> e <i>T. mentagrophytes</i> .
ASTHANA et al., 1982.	Óleo essencial e extrato etanólico. Difusão em disco.	O óleo essencial inibiu o crescimento de <i>A. flavus</i> , enquanto o extrato etanólico não inibiu. O óleo essencial também inibiu os fungos: <i>H. turcicum</i> , <i>H. oryzae</i> , <i>C. capsici</i> , <i>P. setariae</i> e <i>F. moniliforme</i> .
PANDEY et al., 1981.	Óleo essencial.	O óleo essencial não apresentou atividade contra bactérias patogênicas de batata: <i>B. polymyxa</i> , <i>E. carotovora</i> var. <i>atroseptica</i> , <i>E. carotovora</i> , <i>P. putida</i> , <i>P. solanacearum</i> e <i>X. vesicatoria</i> .

Tabela 2 – Continuação...

Referência, em ordem decrescente de data	Metodologia	Resultado
SHARMA et al., 1979b.	Óleo essencial.	Apresentou atividade contra <i>V. cholerae</i> , <i>S. shigae</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>C. diphtheriae</i> e <i>S. typhi</i> .
DURODOLA, 1977.	Extrato bruto das folhas.	Atividade antibacteriana contra <i>Staphylococcus aureus</i> .
RAO, 1976.	Óleo essencial.	Inibiu completamente o crescimento dos fungos <i>C. albicans</i> SP-14, <i>C. neoformans</i> SP-16, <i>S. rolfsii</i> SP-5 e <i>T. mentagrophytes</i> SP-12.

### 1.3. Produtos Naturais

A ciência, especialmente diversas áreas da química, tem usado, copiado e modificado moléculas sintetizadas por seres vivos com o objetivo de inovação em diversas áreas, especialmente na produção de fármacos (COSTA-LOTUFO et al., 2009). Estima-se que 80% dos fármacos em uso são produtos naturais ou foram inspirados pela natureza (HARVEY, 2009).

O estudo de metabólitos secundários produzidos por plantas tem proporcionado a descoberta de novas moléculas bioativas. Os produtos naturais distinguem-se dos sintéticos pela diversidade molecular e funcionalidade biológica (NISBET & MOORE, 1997).

#### 1.3.1. Alcaloides pirrolizidínicos

Os alcaloides pirrolizidínicos (AP) e as plantas que os contém são objeto de investigações científicas porque muitas destas plantas são utilizadas medicinalmente (WIEDENFELD & RÖDER, 1984). Os AP são encontrados principalmente em plantas das famílias Asteraceae (tribos Senecioneae e Eupatorieae), Boraginaceae e Fabaceae (WIEDENFELD & RÖDER, 1991). O primeiro relato da presença de alcaloides pirrolizidínicos no gênero *Ageratum* foi feito com a espécie *A. conyzoides* por WIEDENFELD & RÖDER (1991), sendo encontrados licopsamina e equinatina. Porém, POPP et al. (1967) já haviam descoberto a presença de alcaloides em extrato etanólico dos ramos e folhas de *A. conyzoides* em Soxhlet, utilizando teste rápido com os reagentes Sonnenschein, Mayer, Dragendorff e Scheibler.

A ingestão de AP por seres humanos ocorre através de contaminação acidental de alimentos, como grãos, mel, ovos, leite ou através do uso de plantas medicinais (MOLINEUX et al., 2011).

A estrutura básica dos AP (Figura 13) é chamada de necina e consiste em um sistema de anel bicíclico de 5 membros, ligados através de um átomo de nitrogênio (WIEDENFELD & RÖDER, 1984). A necina pode estar saturada ou possuir uma ligação dupla na posição 1-2. Podem existir 1 ou 2 grupos hidroxila nos carbonos C-2, C-6 ou C-7 resultando na formação de estereoisômeros. As necinas estão esterificadas com ácidos nécicos, incluindo ácidos mono e dicarboxílicos com cadeias de carbono ramificadas que suportam como substituintes os grupos hidróxi, metóxi, epóxi, carboxi, acetóxi, e outros grupos alcoxi, resultando em uma grande diversidade estrutural (ROEDER, 1995).

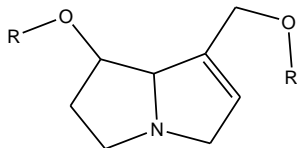


Figura 13 – Estrutura básica de alcaloides pirrolizídnicos.

Os efeitos tóxicos e cancerígenos dos AP estão relacionados com a sua estrutura química. Apenas os alcaloides 1,2-insaturados são capazes de serem metabolizados a intermediários hepatotóxicos, enquanto os alcaloides saturados não são hepatotóxicos (WIEDENFELD & RÖDER, 1984). Os AP derivados de 1-hidroximetil-1,2-dehidropirrolizidina e esterificados com no mínimo um ácido carboxílico na ramificação do C-5 são ainda mais tóxicos (MOLINEUX et al., 2011).

Os AP ocorrem naturalmente como mono-ésteres (Figura 14) e di-ésteres, ou di-ésteres macrocíclicos (Figura 15). Sua forma *N*-óxido (Figura 16) frequentemente predomina. Os *N*-óxidos são mais hidrossolúveis e apresentam propriedades físicas e vias metabólicas diferentes (MOLINEUX et al., 2011).

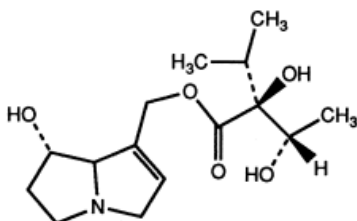


Figura 14 – Estrutura da equinatina, exemplo de AP mono-éster.



Figura 15 – Estrutura da senecionina, exemplo de AP macrocíclico.

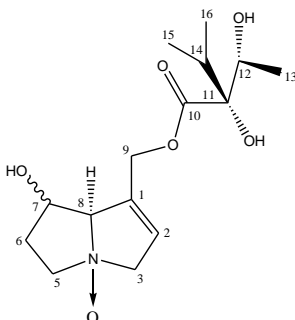


Figura 16 – Estrutura da licopsamina *N*-óxido.

Os AP 1,2-insaturados são produzidos nas raízes e transportados para as folhas e flores como *N*-óxidos, onde se acumulam tanto na forma de *N*-óxido como de base terciária. A proporção entre estas duas formas pode variar com a parte da planta e com a fase de crescimento (JOHNSON et al., 1985).

Nos mamíferos, os AP 1,2-insaturados (Figura 17) ingeridos são oxidados no fígado por oxidases de função mista (citocromo P450s) a derivados pirrólicos (Figura 18). O anel pirrolizidínico torna o carbono C-7 e/ou C-9 altamente eletrofílico e capaz de reagir com nucleófilos de tecidos, concomitante com a clivagem dos substituintes ésteres, ocorrendo a ligação com proteínas e/ou ácidos nucleicos. Esta ligação a proteínas pode alterar a função celular e causar dano ou morte celular. Os metabólitos iniciais são tão reativos que causam dano hepático, no mesmo local onde são formados (MOLINEUX et al., 2011).

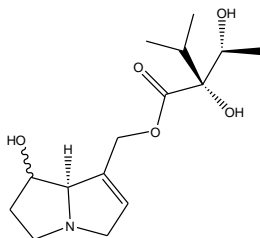


Figura 17 – AP 1,2-insaturado.

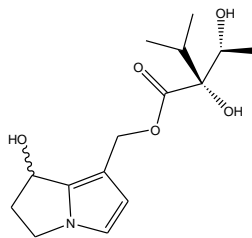


Figura 18 – Derivado pirrólico.

Como os *N*-óxidos não podem ser diretamente oxidados a metabólitos pirrólicos no fígado, mas são frequentemente detectados na urina eles são equivocadamente considerados não tóxicos. Porém, eles são previamente reduzidos pelas redutases da flora bacteriana intestinal (MOLINEUX et al., 2011).

Na análise de AP, a principal vantagem de utilizar EM é a possibilidade de analisar ao mesmo tempo a base livre e as formas *N*-óxido e ser mais sensível que RMN. Por outro lado, RMN apresenta excelente especificidade para AP 1,2-insaturados porque o próton H-2 encontra-se numa região do espectro (aproximadamente 5,8 ppm), onde existe pouca interferência de outros sinais (MOLINEUX et al., 2011).

Apesar de a planta *Ageratum conyzoides* ser quimicamente estudada, existem poucos trabalhos investigando a composição fitoquímica da infusão das partes aéreas desta espécie, inclusive quanto a presença de alcaloides pirrolizidínicos.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Pesquisar a existência de alcaloides pirrolizidínicos no chá de *Ageratum conyzoides* preparado de acordo com a RDC 10 (ANVISA) e isolar as substâncias majoritárias da espécie *Ageratum conyzoides*.

### 2.2. Objetivos específicos

1) Pesquisar a existência de alcaloides pirrolizidínicos no chá de *A. conyzoides* através de espectrometria de massas e espectroscopia de ressonância magnética nuclear.

2) Isolar as substâncias majoritárias presentes na infusão das partes aéreas de *A. conyzoides* por meio de coluna cromatográfica com resina do tipo Amberlite XAD-4 e XAD-7 e sílica.

3) Isolar as substâncias majoritárias presentes nos extratos das partes aéreas de *A. conyzoides* preparados com os solventes orgânicos *n*-hexano, diclorometano, acetato de etila e etanol por meio de coluna cromatográfica com sílica.

4) Identificar as substâncias isoladas por meio de espectroscopia de ressonância magnética nuclear.





### 3. METODOLOGIA

Os extratos foram preparados e as substâncias foram isoladas no Laboratório da Central Analítica no Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Catarina. As análises de espectroscopia de ressonância magnética nuclear foram realizadas na Universidade do Vale do Itajaí e na Universidade Federal do Paraná. As análises de espectrometria de massas foram realizadas na Universidade Federal do Paraná e na Universidade de Atenas (em anexo).

#### 3.1. Material vegetal utilizado neste estudo

##### 3.1.1. Coleta da planta e identificação da espécie

A espécie vegetal em estudo foi coletada de abril até novembro de 2010 no campus Trindade da Universidade Federal de Santa Catarina, próximo ao Horto de Plantas Medicinais do Hospital Universitário (48° 31,018' O e 27° 35,855' S) e em agosto de 2011 no Morro do Rapa, à esquerda da rampa de vôo livre, próximo à Praia Brava (48° 25,157' O e 27° 23,492' S), em Florianópolis, Santa Catarina (2011). A espécie foi identificada pelo botânico Prof. Dr. Renato Záchia e a excicata (No. SMDB 13.138) encontra-se depositada no Herbário da Universidade Federal de Santa Maria.

##### 3.1.2. Obtenção da droga vegetal

A droga vegetal foi adquirida em uma farmácia de Ouro Preto, Minas Gerais (2011).

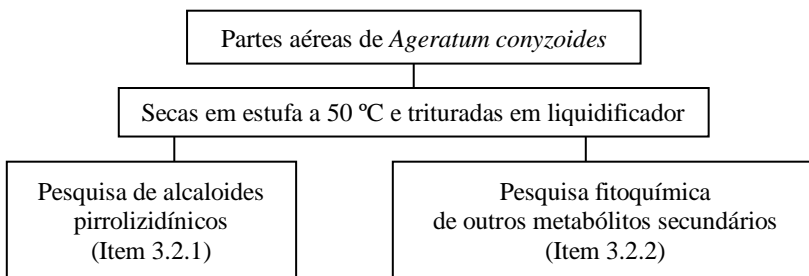
##### 3.1.3. Preparação da planta para análise fitoquímica

As partes aéreas de *A. conyzoides* foram inicialmente secas em estufa com circulação de ar e temperatura controlada de 50 °C por 6 dias. Após, foram trituradas em liquidificador e armazenadas em geladeira até o momento do uso.

#### 3.2. Obtenção dos extratos

Os extratos utilizados neste trabalho foram divididos em duas etapas, sendo a primeira etapa constituída dos extratos utilizados na pesquisa de alcaloides pirrolizidínicos e a segunda etapa constituída dos

extratos utilizados na pesquisa fitoquímica de outros metabólitos secundários (Fluxograma 1).

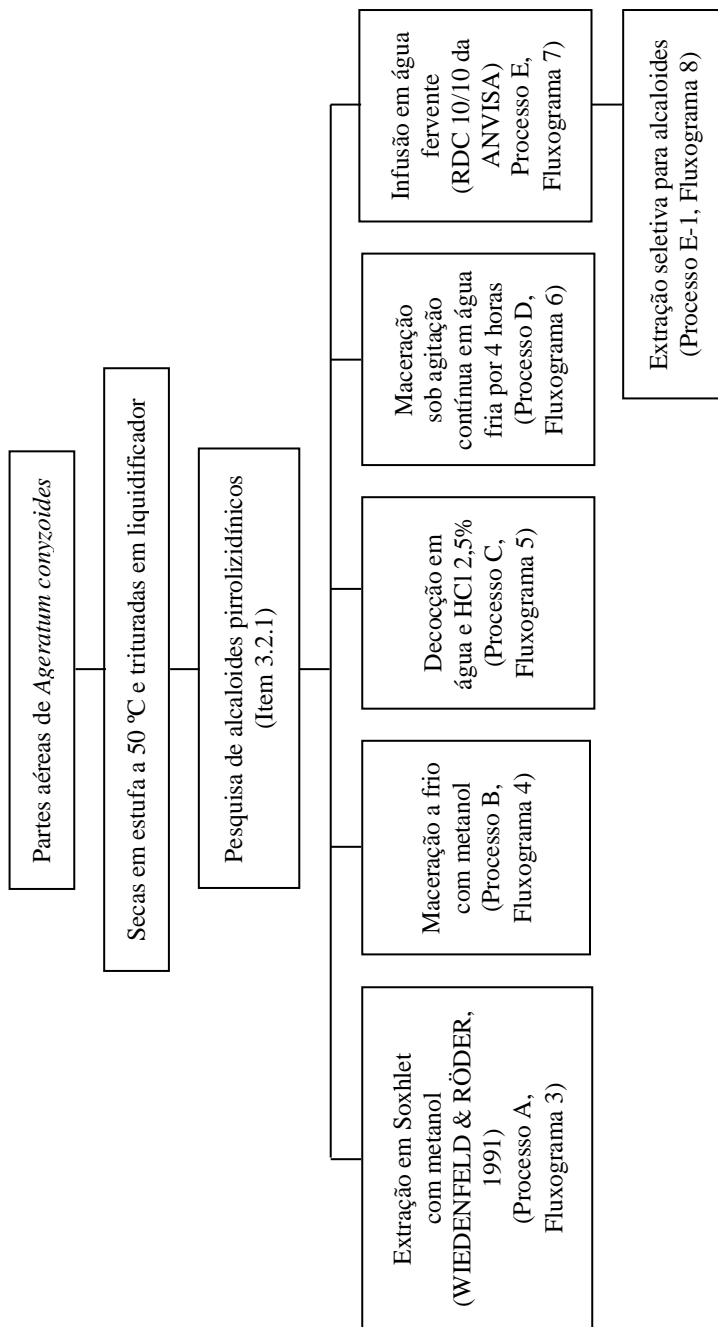


Fluxograma 1 – Extrações realizadas neste trabalho.

### 3.2.1. Pesquisa de alcaloides pirrolizidínicos

Os extratos visando o isolamento de alcaloides pirrolizidínicos (Fluxograma 2) foram obtidos por meio de extração em Soxhlet (Processo A, Fluxograma 3), maceração em metanol (Processo B, Fluxograma 4), decocção em água (Processo C, Fluxograma 5), maceração em água (Processo D, Fluxograma 6) e infusão em água (Processo E, Fluxograma 7).

Foram preparados diversos extratos para pesquisar a presença de alcaloides pirrolizidínicos em *A. conyzoides* coletado em Florianópolis, Santa Catarina.

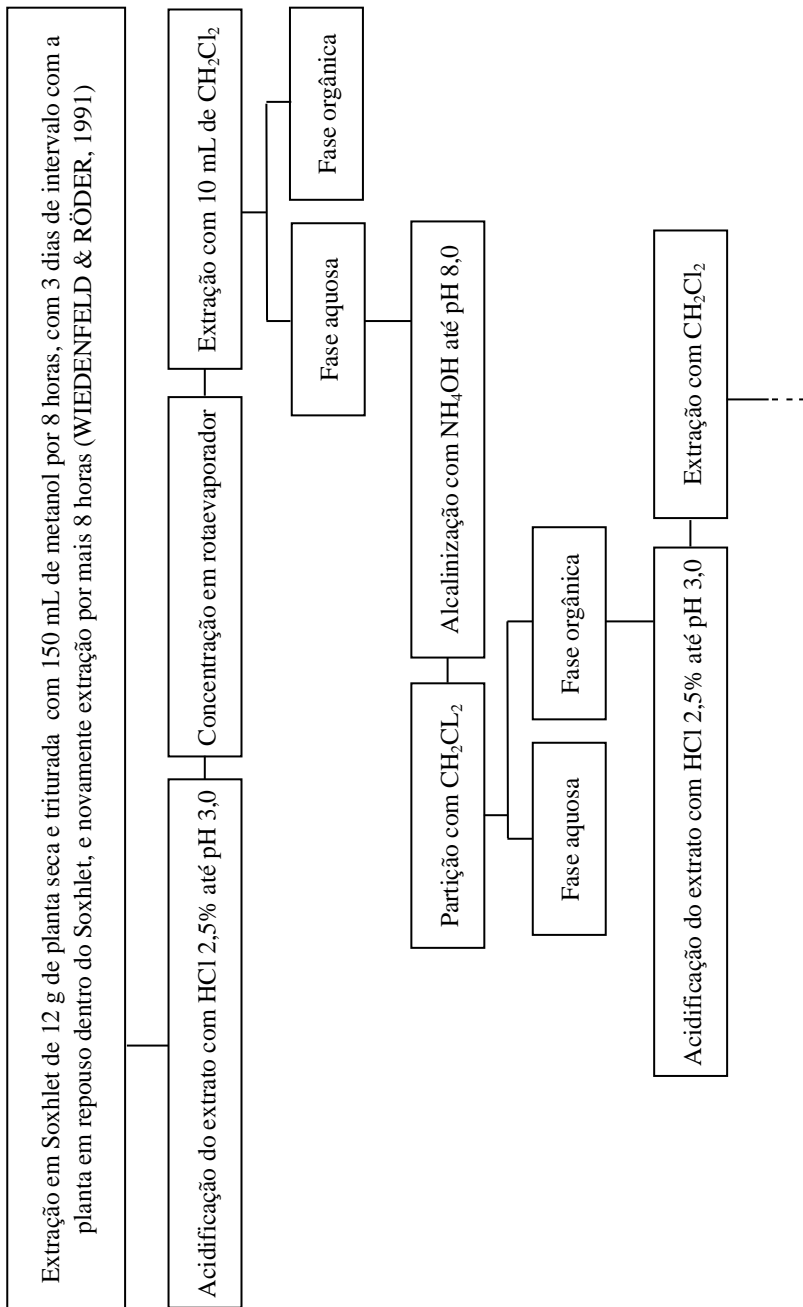


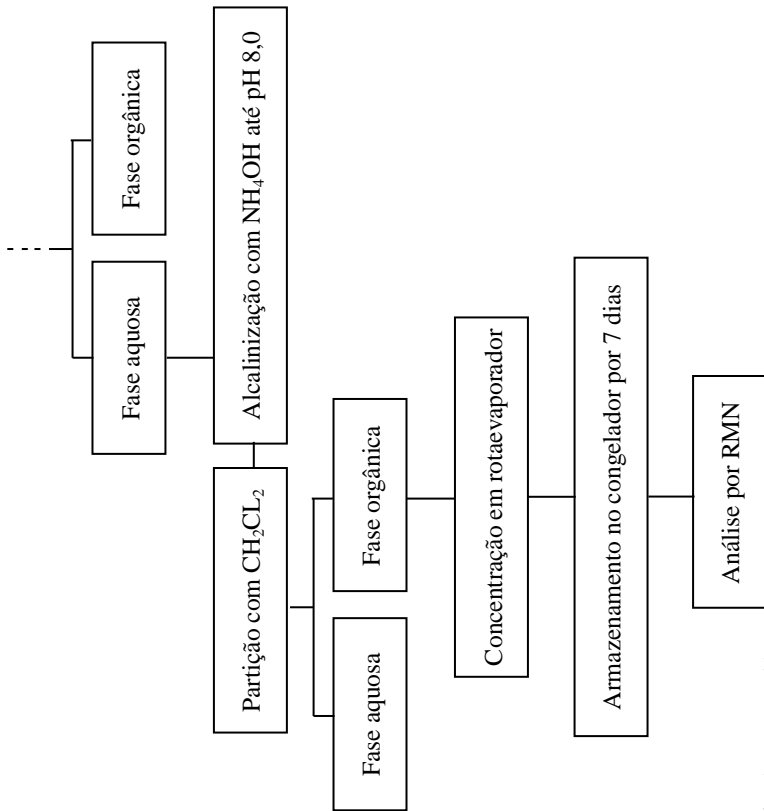
Fluxograma 2 – Extratos utilizados na pesquisa de alcaloides pirrolizidínicos.



### 3.2.1.1. Extração em Soxhlet (processo A)

Doze gramas de planta seca e moída foram extraídos em Soxhlet com 50 mL de metanol, durante 8 horas. Permaneceram em repouso durante 3 dias dentro do Soxhlet e foram novamente extraídos por 8 horas (WIEDENFELD & RÖDER, 1991). Esse extrato obtido em Soxhlet foi acidificado com 10 mL de HCl 2,5% até pH 3,0 e concentrado em rotaevaporador. Após, foi extraído com 100 mL de diclorometano, resultando em uma fase orgânica e uma fase aquosa. Esta fase aquosa foi alcalinizada com  $\text{NH}_4\text{OH}$  diluída até pH 8,0 e particionada com diclorometano, resultando em uma fase aquosa e uma fase orgânica. Esta fase orgânica foi acidificada com HCl 2,5% até pH 3,0 e extraída novamente com diclorometano, resultando em uma fase orgânica e uma fase aquosa. Esta fase aquosa foi alcalinizada com  $\text{NH}_4\text{OH}$  diluída até pH 8,0 e extraída com diclorometano, resultando em uma fase aquosa e uma fase orgânica. Esta fase orgânica foi concentrada em rotaevaporador, armazenada no congelador por 7 dias e foi analisada por RMN (Fluxograma 3).





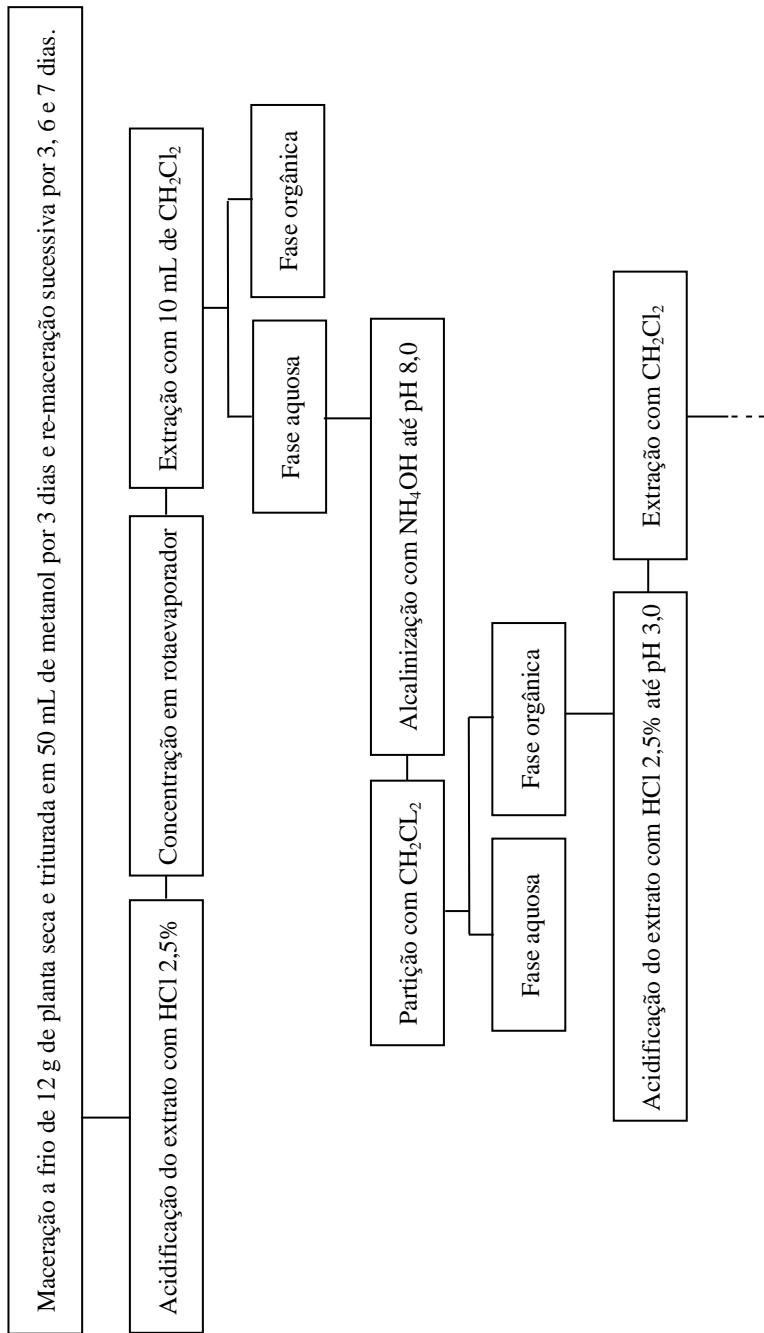
Fluxograma 3 – Extração em Soxhlet (processo A).

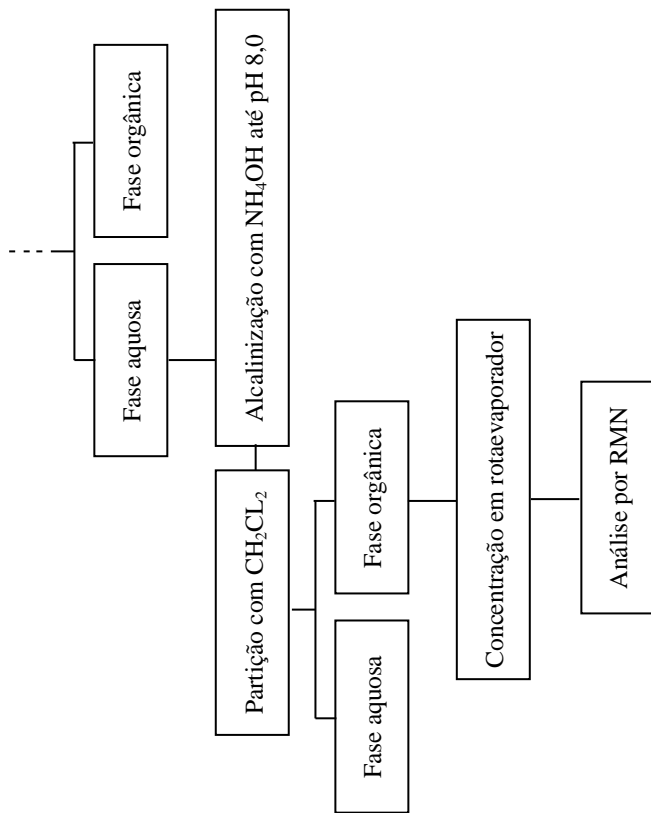




### 3.2.1.2. Maceração em metanol (processo B)

Doze gramas de planta seca e triturada foram macerados a frio em 50 mL de metanol por 3 dias e re-macerados sucessivamente por 3, 6 e 7 dias. O extrato foi acidificado com 20 mL de HCl 2,5%. Após, foi realizada partição líquido-líquido com diclorometano, resultando em 75 mL de fase orgânica e 350 mL de fase aquosa. Esta fase aquosa foi alcalinizada com  $\text{NH}_4\text{OH}$  diluído e particionada com diclorometano, resultando em 350 mL de fase aquosa e 125 mL de fase orgânica. Esta fase orgânica foi acidificada com 20 mL de HCl 2,5% e particionada com diclorometano, resultando em 120 mL de fase orgânica e 130 mL de fase aquosa. Esta fase aquosa foi alcalinizada com  $\text{NH}_4\text{OH}$  diluído e particionada com diclorometano, resultando em 175 mL de fase aquosa e 50 mL de fase orgânica. Esta fase orgânica que foi seca em rotaevaporador e analisada por RMN (Fluxograma 4).

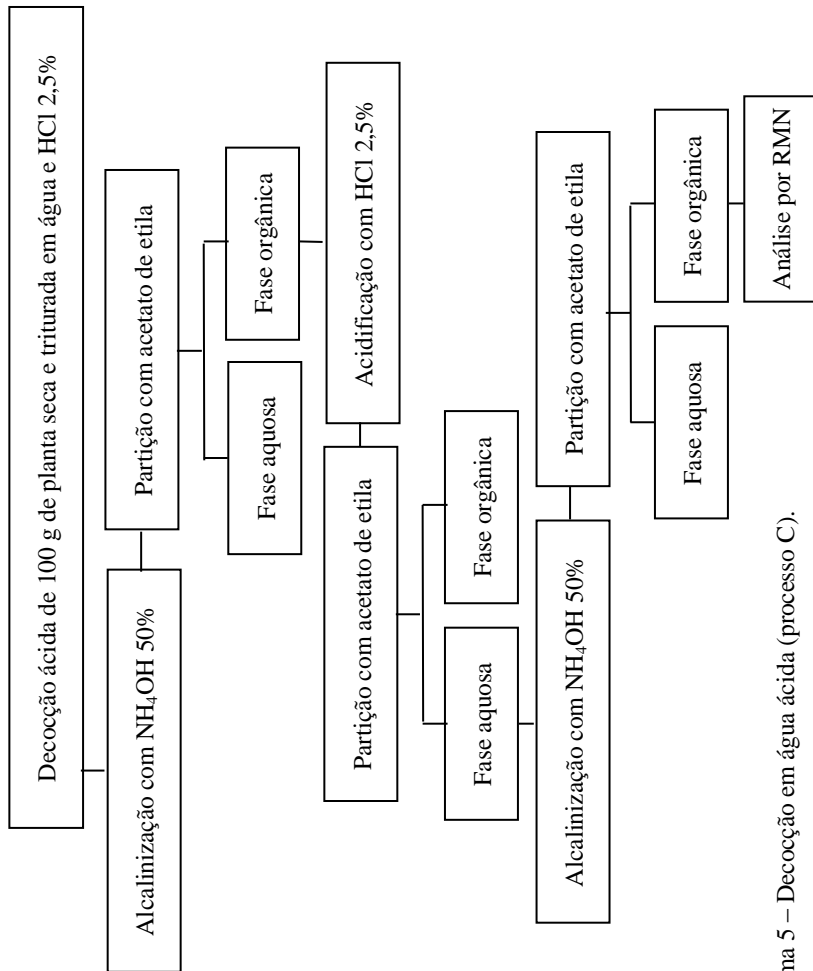




Fluxograma 4 – Maceração em metanol (processo B).

### 3.2.1.3. Decocção ácida (processo C)

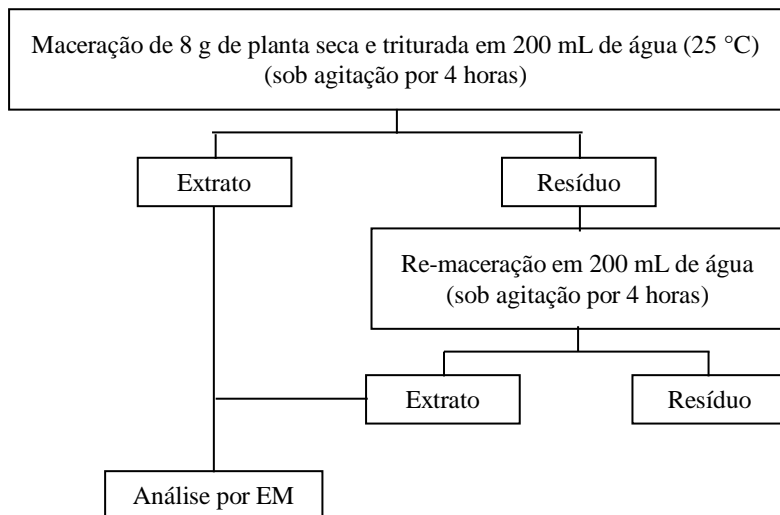
Cem gramas de planta seca e triturada foram usados em uma decocção com 200 mL de água e HCl 2,5%. Este extrato aquoso foi basificado com  $\text{NH}_4\text{OH}$  50% e particionado 3 vezes com acetato de etila, resultando em uma fase aquosa e uma fase orgânica. Esta fase orgânica foi acidificada com HCl 2,5% e re-particionada 3 vezes com acetato de etila, resultando em uma fase orgânica e uma fase aquosa. Esta fase aquosa foi basificada com  $\text{NH}_4\text{OH}$  50% e particionada 3 vezes com acetato de etila, resultando em uma fase aquosa e uma fase orgânica. Esta fase orgânica foi analisada por RMN (Fluxograma 5).



Fluxograma 5 – Decocção em água ácida (processo C).

### 3.2.1.4. Maceração em água (processo D)

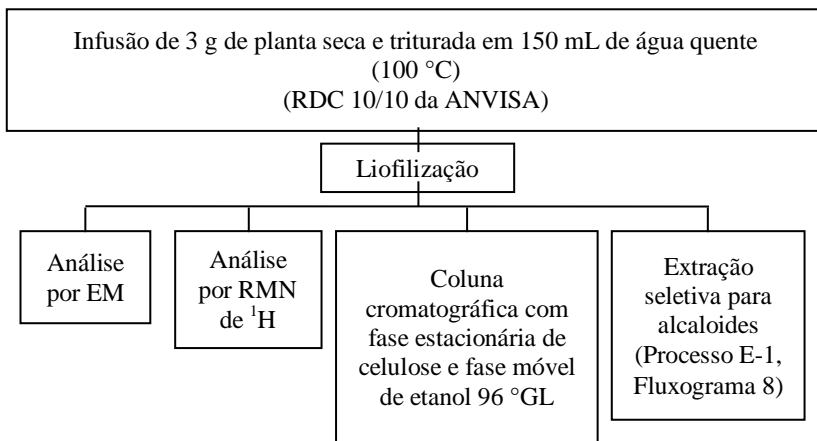
Oito gramas de planta seca e triturada foram macerados em 200 mL de água fria (25 °C) sob agitação magnética contínua por 4 horas. Este procedimento foi repetido 2 vezes. O extrato foi analisado por EM (Fluxograma 6).



Fluxograma 6 – Maceração em água (processo D).

### 3.2.1.5. Infusão em água (processo E)

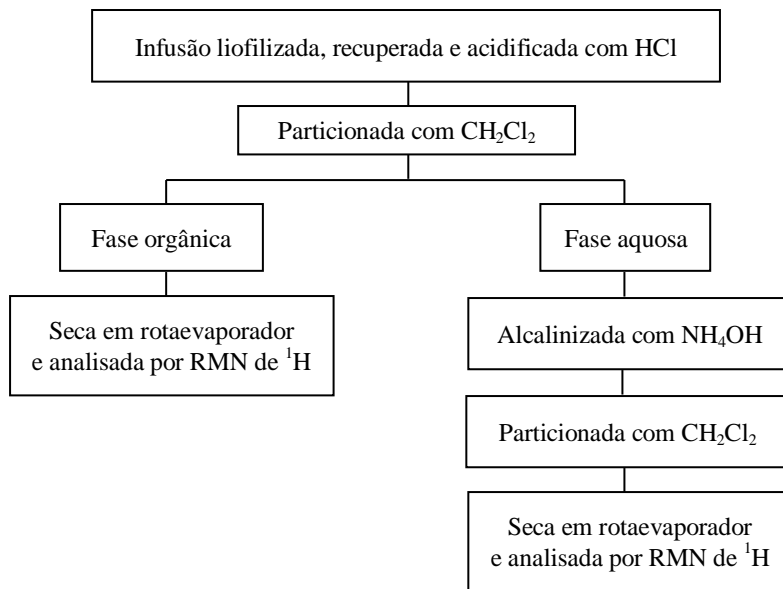
Todas as infusões utilizadas neste estudo foram preparadas de acordo com a RDC 10/10 da ANVISA, sendo utilizados 3 g de planta para cada 150 mL de água quente (Fluxograma 7). A infusão foi liofilizada e analisada por EM e RMN. A infusão liofilizada foi utilizada em extração seletiva para alcaloides (Processo E-1, Fluxograma 8).



Fluxograma 7 – Análise da infusão com as partes aéreas de *A. conyzoides* preparada de acordo com a RDC 10/10 da ANVISA (processo E).

#### 3.2.1.5.1. Extração seletiva para alcaloides (processo E-1)

A infusão liofilizada, recuperada e acidificada com HCl 2 N foi utilizada na extração seletiva para alcaloides, sendo inicialmente particionada 3 vezes com diclorometano. Este procedimento resultou em (1) fase orgânica, que foi seca em rotaevaporador e analisada por RMN de  $^1\text{H}$ , (2) fase aquosa, a qual foi alcalinizada com  $\text{NH}_4\text{OH}$ , particionada 5 vezes com diclorometano e metanol 1:1 v/v, seca em rotaevaporador e analisada por RMN de  $^1\text{H}$  (Fluxograma 8).



Fluxograma 8 – Extração seletiva para alcaloides com a infusão das partes aéreas de *A. conyzoides* (processo E-1).

### 3.2.2. Pesquisa fitoquímica de outros metabólitos secundários

#### 3.2.2.1. Infusão

Três litros de infusão das partes aéreas de *A. conyzoides* foram liofilizados e cromatografados em uma coluna com fase estacionária de celulose e eluente etanol 96 °GL, porém, não ocorreu separação cromatográfica eficiente.

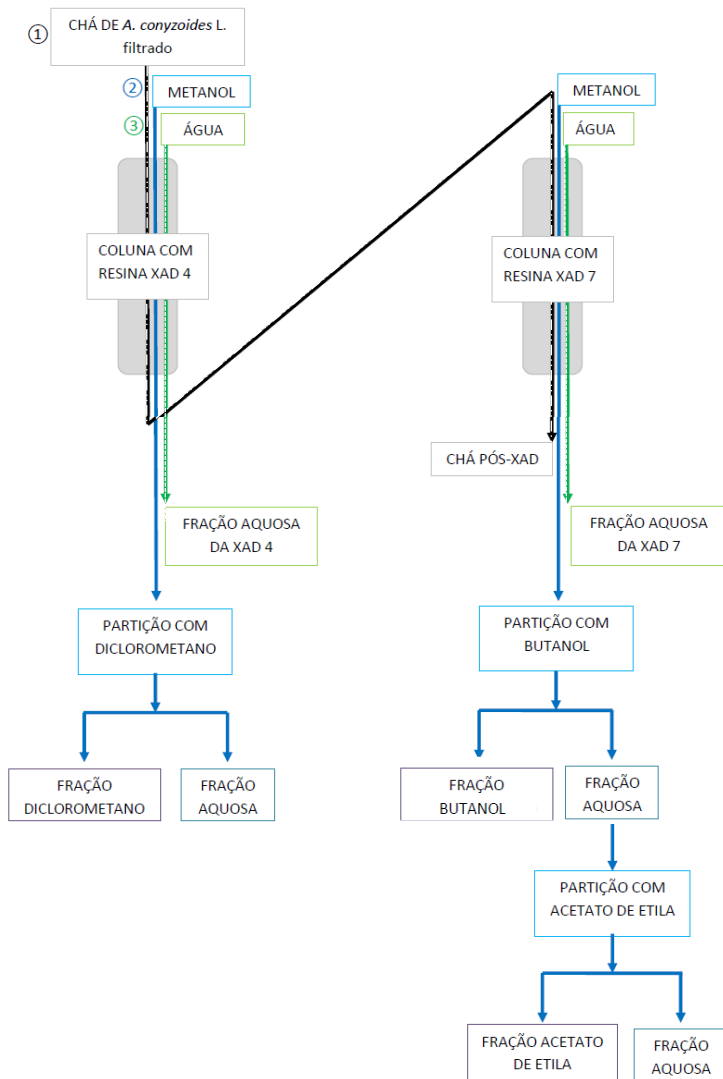
Dez litros de infusão das partes aéreas de *A. conyzoides* foram cromatografados em colunas cromatográficas com resinas de Amberlite, do tipo XAD-4 e XAD-7, seguidas por cromatografia em coluna com fase estacionária sílica gel. A infusão foi eluída gota a gota em uma coluna com Amberlite XAD-4 como fase estacionária e, após, em outra coluna com XAD-7 como fase estacionária. Metanol foi utilizado após a infusão para eluir as frações da infusão que foram retidas pelas resinas XAD-4 e XAD-7, isoladamente.

A fração metanólica eluída da coluna com XAD-4 foi seca resultando em 3,6 g. Esta fração foi solubilizada em água e particionada com diclorometano (7 vezes). A fração diclorometano foi seca



resultando em 68,8 mg. Esta fração foi cromatografada em coluna com fase estacionária de sílica gel e eluente em gradiente linear de hexano – acetato de etila – metanol, resultando na mistura de 5,3 mg da substância (1) e da substância (2) e no isolamento de 8,5 mg da substância (3).

A fração metanólica eluída da coluna com XAD-7 foi seca resultando em 21,2 g. Após, foi solubilizada em água e particionada com 200 mL de butanol (7 vezes) resultando em uma fração de 1,7 g, onde foram identificadas a substância (1) e a substância (2) na fração butanólica. A fração aquosa resultante da partição com butanol foi particionada com acetato de etila, porém a fração acetato de etila resultante desta partição apresentou apenas 3 g e após análise por CCD foi observada a presença de diversas substâncias. A fração acetato de etila não foi cromatografada em coluna devido a pequena quantidade obtida (Fluxograma 9).



Fluxograma 9 – Fracionamento cromatográfico da infusão com as partes aéreas de *A. conyzoides*.

### 3.2.2.2. Extratos orgânicos

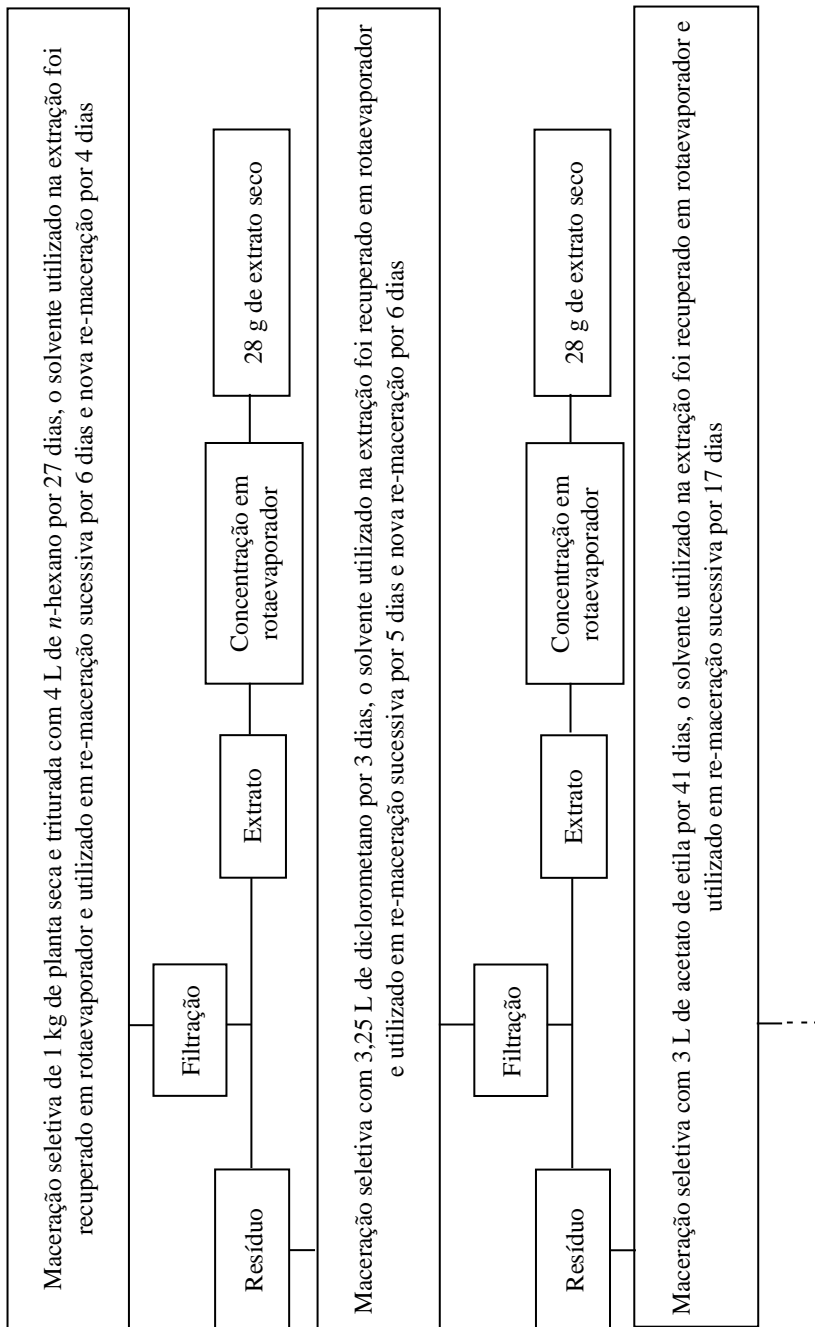
Os extratos orgânicos visando o isolamento fitoquímico (Fluxograma 10) das substâncias presentes nas partes aéreas da planta *A.*

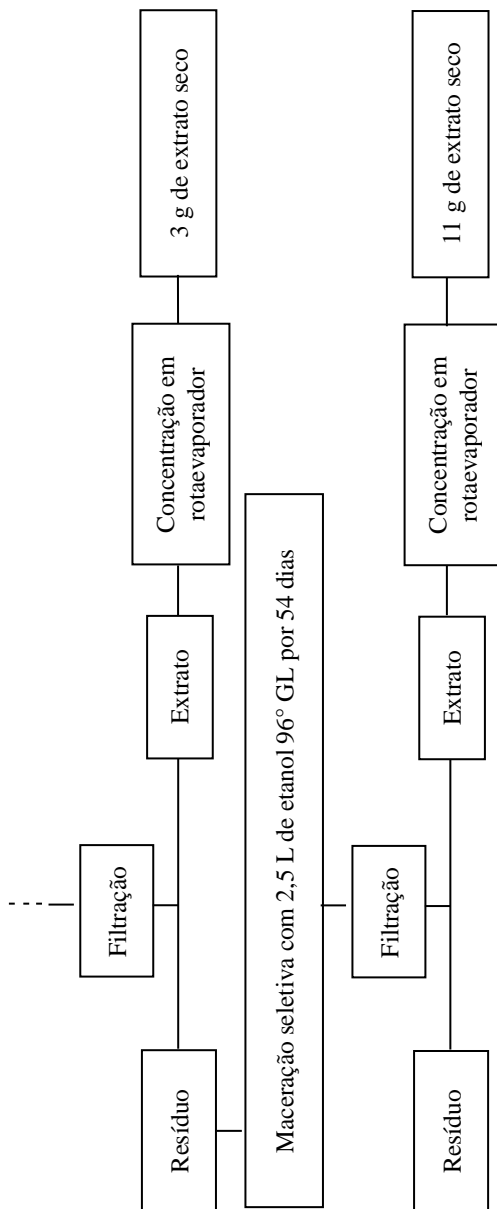
*conyzoides* foram preparados por maceração seletiva de 1 kg de planta seca e moída com 4,5 L de hexano por 27 dias. Re-maceração com o solvente recuperado do rotaevaporador por 6 dias. Re-maceração com o solvente recuperado do rotaevaporador por 4 dias. Após, o extrato foi filtrado e concentrado em rotaevaporador, totalizando 28 g de extrato em *n*-hexano seco.

O resíduo de planta da extração com *n*-hexano foi utilizado em maceração seletiva com 3,25 L de diclorometano por 3 dias. Re-maceração com solvente recuperado do rotaevaporador por 5 dias. Re-maceração com solvente recuperado do rotaevaporador por 6 dias. Após, o extrato foi filtrado e concentrado em rotaevaporador, totalizando 34 g de extrato em diclorometano seco.

O resíduo de planta da extração com diclorometano foi utilizado em maceração seletiva com 3 L de acetato de etila por 41 dias e re-maceração com solvente recuperado do rotaevaporador por 17 dias. Após, o extrato foi filtrado e concentrado em rotaevaporador, totalizando 3 g de extrato em acetato de etila seco.

O resíduo de planta da extração com acetato de etila foi utilizado em maceração com 2,5 L de etanol 96 °GL por 54 dias. Após, o extrato foi filtrado e concentrado em rotaevaporador, totalizando 11 g de extrato em etanol seco.





Fluxograma 10 – Extratos orgânicos preparados.

### 3.2.2.2.1. Fracionamento cromatográfico dos extratos orgânicos

O fracionamento cromatográfico foi feito em colunas cromatográficas utilizando como eluentes os solventes *n*-hexano, diclorometano, acetona, acetato de etila, etanol e metanol.

Nas separações cromatográficas em coluna foi utilizada sílica gel 60 como fase estacionária. A coluna Lobar utilizada foi do tipo 310-25 Lichroprep Si 60 (40-63 µm) – Merck. Nas análises cromatográficas em camada delgada (CCD), utilizadas para acompanhar a separação das substâncias nas frações obtidas, foram utilizadas placas preparadas com sílica gel 60 com indicador de fluorescência (F<sub>254</sub>).

Para cada separação cromatográfica foi feita a seleção prévia do solvente ou da mistura de solventes, em CCD, que proporcionasse a melhor separação dos constituintes. As frações foram agrupadas por comparação das manchas em placas de CCD. Os reveladores utilizados foram solução de anisaldeído sulfúrico, reagente natural, ácido fosfomolibdico, iodo, dragendorff, KOH e observação sob luz ultravioleta a 254 e 360 nm.

As frações das quais não foi isolado nenhum composto ou não sofreram fracionamentos posteriores foram agrupadas em intervalos.

#### 3.2.2.2.1.1. Extrato com *n*-hexano

Vinte gramas do extrato das partes aéreas de *A. conyzoides* com *n*-hexano foram cromatografados em uma coluna clássica do tipo flash (6 cm de diâmetro e 25 cm de altura), com fase estacionária sílica-gel e fase móvel de hexano (300 mL), hexano-diclorometano 2:1 v/v (600 mL), diclorometano (375 mL) e acetato de etila (100 mL). Foram coletadas frações de 50 mL. Estas frações foram analisadas por CCD e as frações que apresentavam perfil cromatográfico semelhante foram reunidas em 15 frações denominadas A1 (1,596 g), B1 (122 mg), C1 (65 mg), D1 (19 mg), E1 (560 mg), F1 (20 mg), G1 (2,334 g), H1 (957 mg), I1 (369 mg), J1 (4,134 g), K1 (4,02 g), L1 (6,7 mg), M1 (233 mg), N1 (7,057 g) e O1 (1,18 g).

As frações D1 e F1 foram escolhidas para serem analisadas por RMN de <sup>1</sup>H. A fração L1 foi escolhida para ser analisada por RMN de <sup>13</sup>C e a fração M1 foi escolhida para ser analisada por RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C.

As frações G1, H1, I1, J1, K1 e N1 foram re-cromatografadas em coluna clássica com 3 cm de diâmetro e 30 cm de altura.

A fração G1 foi re-cromatografada em coluna com sílica gel 60 e fase móvel de hexano (100 mL), hexano-acetona 8:2 v/v (100 mL), hexano-acetona 6:4 v/v (100 mL) acetona (100 mL) e etanol (50 mL). Foram coletadas frações de 40 mL. Estas frações foram analisadas por CCD e as frações que apresentavam perfil cromatográfico semelhante foram reunidas em 6 frações denominadas A2 (8 mg), B2 (1,664 g), C2 (17 mg), D2 (3 mg), E2 (48 mg) e F2 (36 mg).

A fração B2 foi re-cromatografada. Porém, não ocorreu separação cromatográfica eficiente das substâncias presentes na fração.

A fração J1 foi re-cromatografada com sílica gel 60 e fase móvel de hexano (100 mL), hexano-diclorometano 9:1 v/v (100 mL), hexano-acetona 9:1 v/v (150 mL), hexano-acetona 1:1 v/v (150 mL), acetona (100 mL) e etanol (100 mL). Foram coletadas frações de 40 mL. Estas frações foram analisadas por CCD e as frações que apresentavam perfil cromatográfico semelhante foram reunidas em 10 frações denominadas A3 (29 mg), B3 (4 mg), C3 (535 mg), D3 (1,949 g), E3 (793 mg), F3 (107 mg), G3 (76 mg), H3 (227 mg), I3 (548 mg) e J3 (24 mg).

A fração D3 foi re-cromatografada com sílica gel 60 e gradiente de hexano-acetona até etanol. Foram coletadas frações de 30 mL. Estas frações foram analisadas por CCD e as frações que apresentavam perfil cromatográfico semelhante foram reunidas em 9 frações denominadas A4 (988,6 mg), B4 (19,9 mg), CD4 (12 mg), E4 (1 mg), FG4 (8 mg), H4 (7 mg), I4 (13 mg), J4 (7 mg), KLM4 (2 mg). As frações CD4, FG4, H4, I4 e J4 foram analisadas por RMN de  $^1\text{H}$ . A fração J4 também foi analisada por RMN de  $^{13}\text{C}$ . A fração K4 foi re-cromatografada, porém não ocorreu separação cromatográfica eficiente das substâncias presentes na fração.

A fração E3 foi re-cromatografada, porém não ocorreu separação cromatográfica eficiente das substâncias presentes na fração.

A fração K1 foi re-cromatografada em coluna Lobar 310-25 Lichroprep Si 60 (40-63  $\mu\text{m}$ ) - Merck com gradiente de hexano-acetona. Foram coletadas frações de 20 mL. Estas frações foram analisadas por CCD e as frações que apresentavam perfil cromatográfico semelhante foram reunidas em 14 frações denominadas A5 (8 mg), B5 (7 mg), C5 (25 mg), DE5 (8 mg), FG5 (10 mg), H5 (50,5 mg), I5 (4 mg), J5 (7 mg), K5 (7 mg), L5 (4 mg), M5 (9 mg), N5 (33 mg), O5 (27,7 mg) e P5 (11,7 mg). As frações H5 e P5 foram analisadas por RMN de  $^{13}\text{C}$  e a fração O5 foi analisada por RMN de  $^1\text{H}$ .

A fração N1 foi re-cromatografada em coluna Lobar 310-25 Lichroprep Si 60 (40-63  $\mu\text{m}$ ) - Merck com gradiente de hexano-acetona. Foram coletadas frações de 20 mL. Estas frações foram analisadas por

CCD e as frações que apresentavam perfil cromatográfico semelhante foram reunidas em 20 frações denominadas A7 (14 mg), B7 (210 mg), C7 (80 mg), D7 (107 mg), E7 (32 mg), F7 (26 mg), G7 (86 mg), H7 (40 mg), I7 (42 mg), J7 (25 mg), K7 (79 mg), L7 (36 mg), M7 (12 mg), N7 (2 mg), O7 (106 mg), P7 (259 mg), Q7 (43 mg), R7 (72 mg), S7 (116 mg) e T7 (21 mg). As frações H7, J7, L7, N7, P7 e O7 foram analisadas por RMN de  $^1\text{H}$ .

As frações H1 e I1 foram re-cromatografadas, mas não ocorreu separação cromatográfica eficiente.

#### 3.2.2.2.1.2. Extrato com diclorometano

Trinta gramas de extrato das partes aéreas de *A. conyzoides* com diclorometano foram cromatografados em coluna de 6 cm de diâmetro e 25 cm de altura do tipo flash com fase estacionária de sílica gel 60 recuperada e eluente hexano (100 mL), diclorometano (200 mL), acetato de etila (200 mL) e etanol (100 mL). Foram coletadas frações de 50 mL. Estas frações foram analisadas por CCD e as frações que apresentavam perfil cromatográfico semelhante foram reunidas em 20 frações denominadas A9 (3,317 g), B9 (62 mg), C9 (1,467 g), D9 (925 mg), E9 (1,638 g), F9 (512 mg), G9 (1,689 g), H9 (511 mg), I9 (460 mg), J9 (353 mg), K9 (869 mg), L9 (156 mg), M9 (46 mg), N9 (51 mg), O9 (22 mg), P9 (5,319 g), Q9 (8,8 g), R9 (1,055 g), S9 (279 mg) e T9 (112 mg). A fração Q9 foi re-cromatografada, mas não resultou numa separação efetiva das substâncias.

#### 3.2.2.2.1.3. Extrato com acetato de etila

Dois gramas do extrato das partes aéreas de *A. conyzoides* com acetato de etila foram cromatografados em coluna flash com sílica gel recuperada e eluente hexano (50 mL), diclorometano (100 mL), acetato de etila (300 mL) e etanol (150 mL), resultando em 4 frações de 100 mL. Porém, após análise das frações por CCD, nenhuma se demonstrou potencial para re-cromatografia.

#### 3.2.2.2.1.4. Extrato com etanol

O extrato das partes aéreas de *A. conyzoides* com etanol foi cromatografado em uma coluna do tipo flash com sílica gel recuperada com eluente 300 mL de acetona, 1,5 L de etanol e 300 mL de metanol,



resultando em 88 frações de 25 mL, as quais foram analisadas por CCD. A fração 48 foi analisada por RMN de  $^1\text{H}$ .

### 3.3. Análise por EM

A infusão foi liofilizada e submetida à análise por EM acoplada a cromatógrafo líquido, utilizando equipamento Triplo Quadrupolo API 3200, AB Sciex Instruments, equipado com bomba de infusão Harvard 22 Apparatus e fonte de ionização *electrospray* (ESI). O sistema foi acoplado a um cromatógrafo líquido Agilent 1200, bomba binária SL G1312B, forno de coluna TCC SL G1316B e injetor automático CTC Waters 2777 Sample Manager, pré-coluna e coluna XBridge C18 (5  $\mu\text{m}$ , Waters<sup>®</sup>). Os dados obtidos por EM e CLAE-EM/EM foram processados através do software Analyst<sup>®</sup>, versão 1.4.2. A amostra foi preparada usando solução diluente MeCN-H<sub>2</sub>O (50:50) contendo 1% HCOOH (c = 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) para as análises de infusão direta no EM.

### 3.4. Análise por RMN

As substâncias tiveram suas estruturas elucidadas por análise de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  e os dados espectrais obtidos foram comparados com dados disponíveis na literatura.



## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Análise dos extratos utilizados na pesquisa de alcaloides pirrolizidínicos

Processo A (Fluxograma 3): após a fase orgânica final, resultante da partição com diclorometano, ser concentrada em rotaevaporador e armazenada no congelador por 7 dias, não ocorreu formação de cristais (como era esperado, de acordo com a metodologia utilizada por WIEDENFELD & RÖDER, 1991). RMN de  $^1\text{H}$  foi utilizado para investigar esta amostra, porém não foram encontrados sinais que caracterizam a presença de alcaloides pirrolizidínicos.

Processo B (Fluxograma 4): na análise por RMN de  $^1\text{H}$  da fase orgânica final, resultante da partição com diclorometano, não foram encontrados sinais que caracterizam a presença de alcaloides pirrolizidínicos.

Processo C (Fluxograma 5): na análise por RMN de  $^1\text{H}$  da fase orgânica final, resultante da partição com acetato de etila, não foram encontrados sinais que caracterizam a presença de alcaloides pirrolizidínicos.

Processo D (Fluxograma 6): o extrato resultante da maceração da planta seca com água fria, sob agitação foi analisado por EM, sendo encontrados alcaloides pirrolizidínicos.

Processo E (Fluxograma 7): o extrato aquoso (infusão) preparado conforme as especificações da RDC 10/10 da ANVISA foi liofilizado e analisado por EM, sendo encontrados alcaloides pirrolizidínicos e por RMN de  $^1\text{H}$ , sendo encontrados indícios da presença de alcaloides pirrolizidínicos.

Processo E-1 (Fluxograma 8): A fase orgânica (1) e a fase aquosa (2) foram analisadas por RMN de  $^1\text{H}$ . Não foram encontrados alcaloides pirrolizidínicos na fase orgânica. Foram encontrados flavonoides polimetoxilados e não foram encontrados alcaloides livres na fase aquosa.

#### 4.1.1. Relação entre os diferentes métodos extrativos utilizados na pesquisa de alcaloides pirrolizidínicos

A Tabela 3 relaciona as diferentes extrações utilizadas na pesquisa de AP e os resultados encontrados através de análises por EM e RMN de  $^1\text{H}$ , sendo observado:

- Relação entre os processos A e B: independente da extração ser a quente (em aparelho de Soxhlet) ou a frio (maceração), a fase orgânica ácida, resultante da extração com metanol e partição com diclorometano, não apresentou sinais diagnósticos para alcaloides pirrolizidínicos na análise por RMN de  $^1\text{H}$ .

- Relação entre os processos A e C: independente do solvente quente utilizado (metanol ou água), a fase orgânica ácida não apresentou claros sinais diagnósticos para alcaloides pirrolizidínicos na análise por RMN de  $^1\text{H}$ .

- Relação entre os processos B e D: maceração foi utilizada nos 2 processos. Porém, no processo B o solvente utilizado foi metanol e a fase orgânica ácida resultante da partição com diclorometano foi analisada por RMN de  $^1\text{H}$ , enquanto que no processo D o solvente utilizado foi água e o extrato bruto foi analisado por EM. Possivelmente, água seja o melhor solvente extrator para os alcaloides pesquisados. Além disso, a técnica de EM é bem mais sensível que a de RMN de  $^1\text{H}$ .

- Relação entre os processos C e D: apesar da água ter sido utilizada como líquido extrator nos 2 processos, no processo C foi utilizado calor e meio ácido, o qual foi basificado logo após a extração e a fase orgânica ácida resultante da partição com acetato de etila foi analisada por RMN de  $^1\text{H}$ . Por outro lado, no processo D, não foi utilizado nem calor, nem meio básico e o extrato bruto aquoso foi analisado por EM.

Provavelmente, não foram encontrados sinais diagnósticos para AP nos processos A, B e C porque estes alcaloides podem estar em uma concentração muito pequena para serem detectadas por RMN de  $^1\text{H}$ .

- Relação entre os processos D e E: independente da metodologia utilizada na extração, tanto na maceração com água fria, quanto na infusão com água quente, após análise por EM (e por RMN de  $^1\text{H}$ , no processo E), foram encontrados sinais que caracterizam a presença de alcaloides pirrolizidínicos. Notável, que esses foram os únicos processos que a análise foi feita diretamente com o extrato e como não foram feitas análises por EM das fases orgânicas ácidas obtidas nos processos anteriores, fica difícil afirmar que não foram extraídos alcaloides pirrolizidínicos nos processos A, B e C. Mas, sim apenas que não foram observados sinais diagnósticos para tais metabólitos nos espectros obtidos.

Diante desses resultados, foi realizado o processo E-1, onde o extrato aquoso resultante da infusão com água foi acidificado e particionado com diclorometano. Dessa partição, resultou uma fase aquosa e uma fase orgânica, as quais foram analisadas por RMN de  $^1\text{H}$ ,

não sendo encontrados sinais que caracterizam a presença de alcaloides pirrolizidínicos.

Comparando a metodologia utilizada e os resultados encontrados no processo A com aqueles obtidos por WIEDENFELD & RÖDER (1991), que utilizaram a metodologia descrita em detalhes em RÖDER & WIEDENFELD (1977), é perceptível que neste trabalho foram utilizados apenas 12 g de *A. conyzoides*, enquanto naquele foram utilizados 300 g de planta. Outro parâmetro observado foi que o tempo de extração em Soxhlet foi bem inferior aos 7 dias utilizados por WIEDENFELD & RÖDER (1991). Através dessa mesma metodologia, licopsamina foi isolada de *Ageratum houstonianum* por WIEDENFELD & ANDRADA-CETTO (2001) e de *Eupatorium maculatum* (Eupatorieae - Asteraceae) por WIEDENFELD et al. (2009).

De acordo com a relação estrutura-toxicidade dos AP descrita por WIEDENFELD & RÖDER (1984), a ligação dupla na posição 1-2 do anel de 5 membros (necina) na estrutura da licopsamina lhe confere uma certa toxicidade. Sendo assim, a infusão utilizada pela população como tratamento alternativo de dores, principalmente articulares e a inclusão desta espécie vegetal na lista de drogas vegetais recomendadas pela RDC 10/10 da ANVISA precisa ser analisada com cautela, devido à presença desta substância que pode oferecer risco à saúde. Ainda, merece atenção especial testes de toxicidade com a infusão preparada desta maneira.

Tabela 3 – Relação entre as extrações utilizadas na pesquisa de alcaloides pirrolizidínicos.

Processo	A	B	C	D	E
	(WIEDENFELD & RÖDER, 1991)				
Extração	Aparelho de Soxhlet	Maceração	Decocção	Maceração	Infusão
Solvente	Metanol quente	Metanol frio	Água quente ácida	Água fria	Água quente
Pós-extração	Acidificação e partição com diclorometano	Acidificação e partição com diclorometano	Basificação e partição com acetato de etila	-	-
Análise	Fase orgânica ácida RMN de <sup>1</sup> H	Fase orgânica ácida RMN de <sup>1</sup> H	Fase orgânica ácida RMN de <sup>1</sup> H	Extrato EM	Extrato RMN de <sup>1</sup> H e EM
Resultado	-	-	-	+	+

#### 4.1.2. Análise da infusão das partes aéreas de *A. conyzoides* por RMN de $^1\text{H}$

Os dados espectrais de RMN de  $^1\text{H}$  obtidos da infusão com as partes aéreas de *A. conyzoides* (Figura 19) foram comparados com dados disponíveis na literatura para o AP licopsamina e estão apresentados na Tabela 4.

Analisando o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da infusão das partes aéreas de *A. conyzoides*, é possível observar que o multipletto em  $\delta$  1,96 corresponde aos dois hidrogênios ligados ao carbono C-6. O multipletto em  $\delta$  4,15 corresponde ao hidrogênio ligado ao carbono C-8. Como o melhor solvente para a infusão foi água deuterada, o singletto resultante em  $\delta$  4,75, correspondente ao sinal do solvente, impossibilitou a visualização dos sinais em  $\delta$  4,74 e em  $\delta$  4,85 correspondentes aos hidrogênios ligados ao carbono C-9 de acordo com WIEDENFELD & RÖDER (1991). O dubleto em  $\delta$  1,35 ( $J=7$  Hz) corresponde aos três hidrogênios ligados ao carbono C-13. O dubleto em  $\delta$  1,07 ( $J=6,5$  Hz) corresponde aos dois hidrogênios ligados ao carbono C-15. O dubleto em  $\delta$  1,02 ( $J=6,5$  Hz) corresponde aos dois hidrogênios ligados ao carbono C-16. O singletto em  $\delta$  3,30 corresponde às três hidroxilas da estrutura, ligadas aos carbonos C-7, C-11 e C-12.

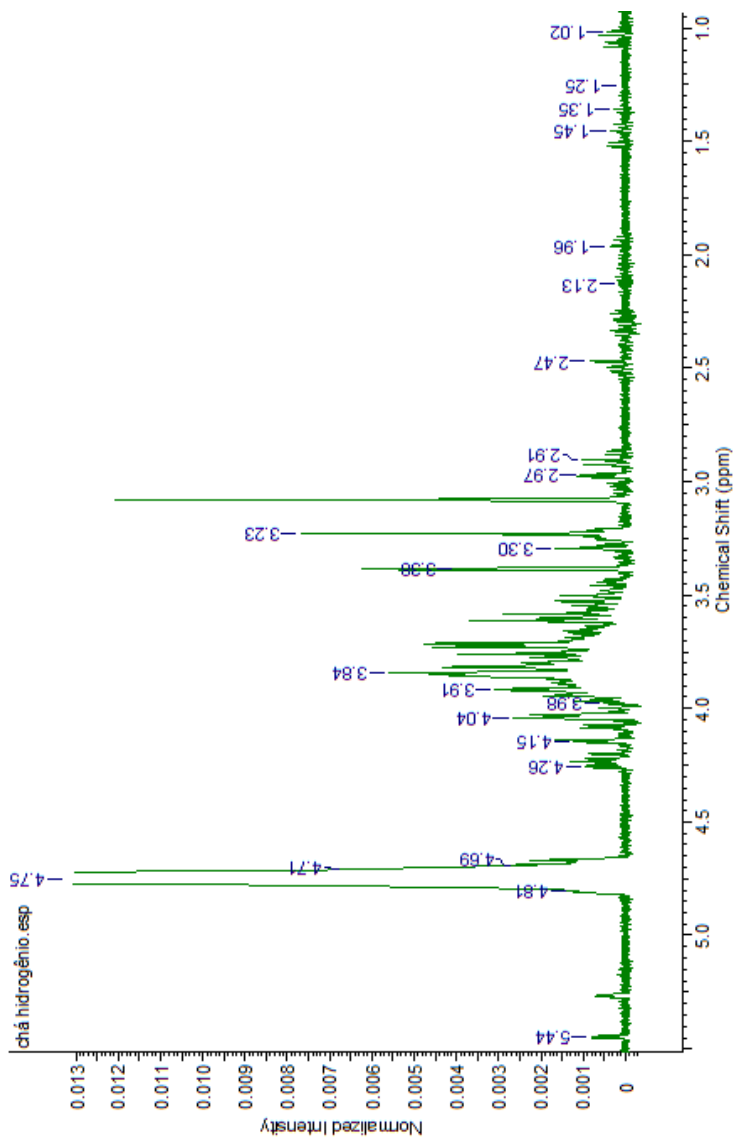


Figura 19 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da infusão das partes aéreas de *A. conyzoides*,  $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz.



Tabela 4 - Deslocamentos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  da licopsamina (**14**) comparados com a literatura.

Posição	Infusão de <i>A. conyzoides</i> , $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz	Licopsamina, WIEDENFELD & RÖDER, 1991, $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz
2	5,44	5,86
3	3,89	3,89
	3,38	3,38
5	3,24	3,24
	2,97	2,72
6 ( $\text{H}_2$ )	1,96	1,93
7	4,26	4,26
8	4,15	4,15
9 ( $\text{H}_2$ )	-	4,85 e 4,74
12	3,98	3,98
13	-	1,25
14	2,91	2,13
15 ( $\text{H}_3$ )	-	0,90
16 ( $\text{H}_3$ )	-	0,85
OH (7, 11 e 12)	3,30	3,35

Como os dados espectrais de RMN de  $^1\text{H}$  da infusão com as partes aéreas de *A. conyzoides* sugeriam a presença de licopsamina, foi realizada análise por EM, onde foi possível confirmar a presença deste AP.

#### 4.1.3. Análise da infusão das partes aéreas de *A. conyzoides* por EM

As análises por EM (infusão direta) e CLAE-EM/EM do chá de *A. conyzoides* evidenciaram a presença dos APs licopsamina (**14**, Figura 25) e seu N-óxido (**15**, Figura 26), através das moléculas protonadas de  $m/z$  300 e 316  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , respectivamente (Figuras 20, 23 e 24).

O experimento de íons produtos para o íon de  $m/z$  300 reforça esta evidência através do perfil de fragmentação característico observado, íons de  $m/z$  94, 120, 138, 156 (Figuras 21 e 27) (LIU et al., 2009) (RUAN et al., 2012) e para o íon de  $m/z$  316, através do perfil de fragmentação característico observado, íons  $m/z$  94, 111, 138, 172 (Figura 22) (RUAN et al., 2012).

Na análise por CLAE-EM (Figura 23), existe um pico com tempo de retenção 18,42 minutos. O espectro de massas obtido deste cromatograma (Figura 24) apresenta os picos moleculares 300,9 [M]<sup>+</sup> e 316,9 [M]<sup>+</sup>, correspondentes a licopsamina e a sua forma *N*-óxido.

Estes estudos foram confirmados posteriormente, através de UHPLC(+)-ESI-HR/MS na Universidade de Atenas (manuscrito submetido para Food Chemistry, em anexo).

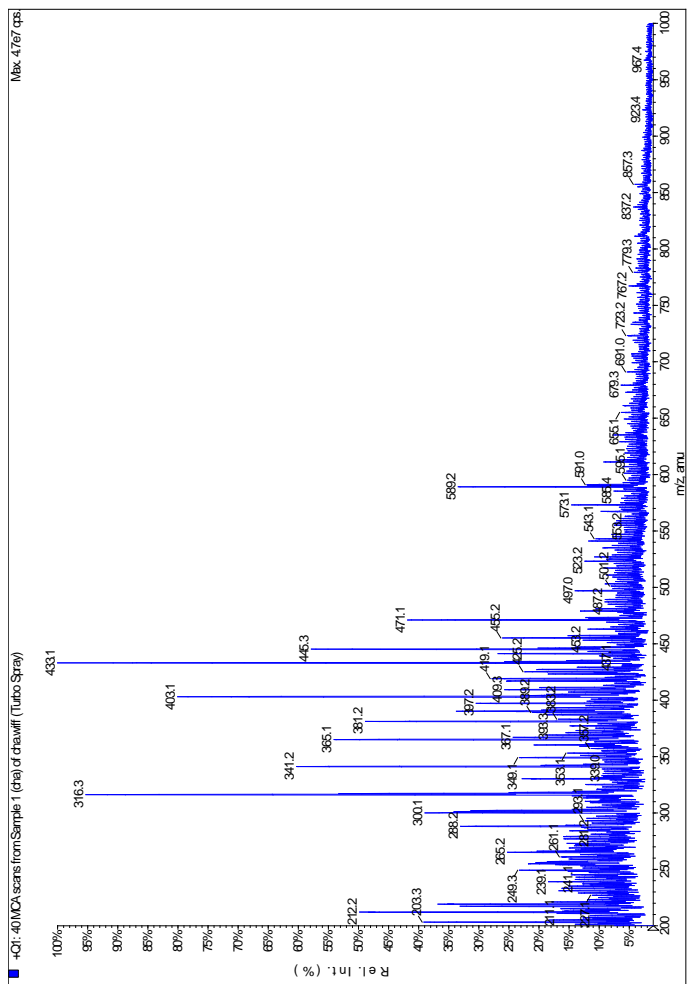


Figura 20 – Espectro de Massas *Full scan*, modo negativo, da infusão das partes aéreas de *A. conyzoides* liofilizada em MeCN-H<sub>2</sub>O (50:50) com 1% de HCOOH (*c* = 100 µg/mL).

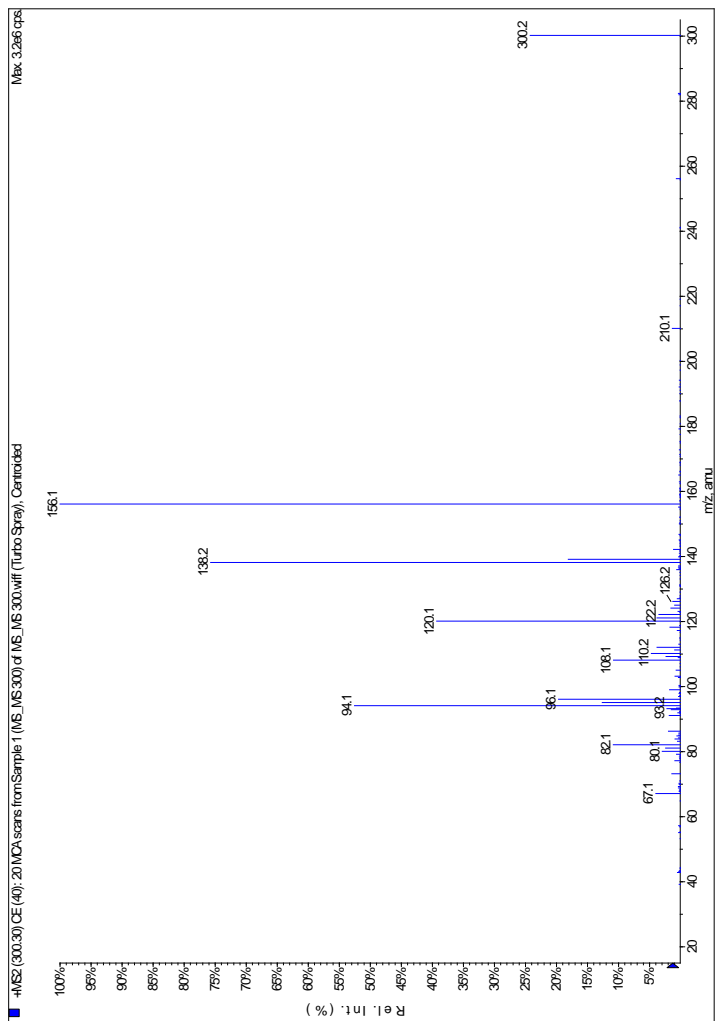


Figura 21 – Espectro de EM/EM (íons produtos) do íon de  $m/z$  300 da infusão das partes aéreas de *A. conyzoides*.

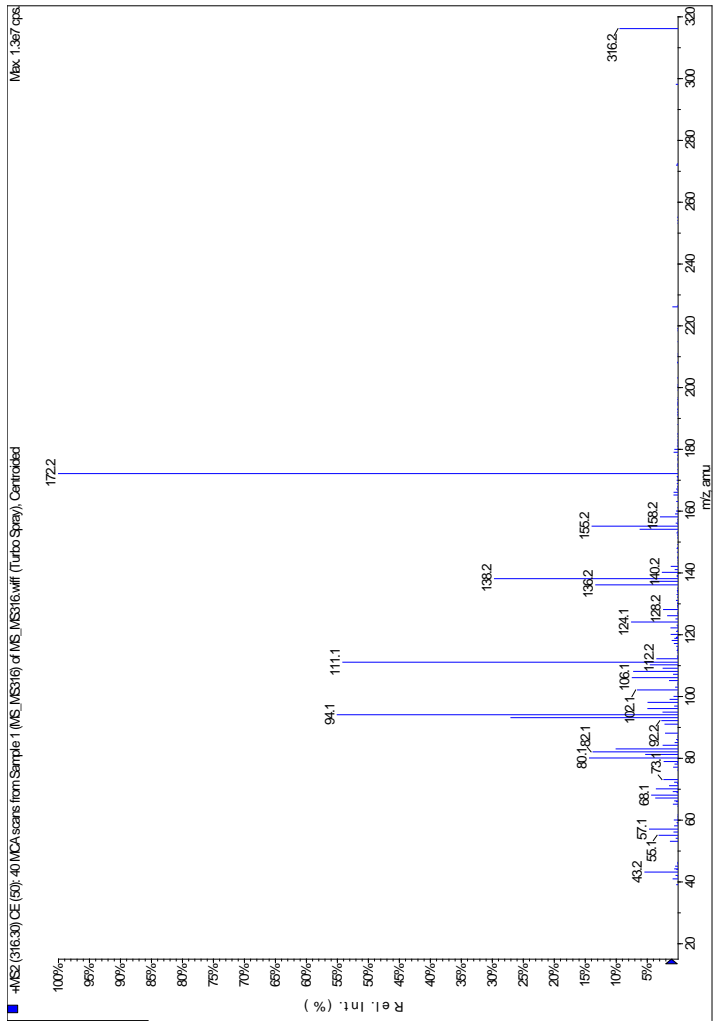


Figura 22 – Espectro de EM/EM (íons produtos) do íon de  $m/z$  316 da infusão das partes aéreas de *A. conyzoides*.

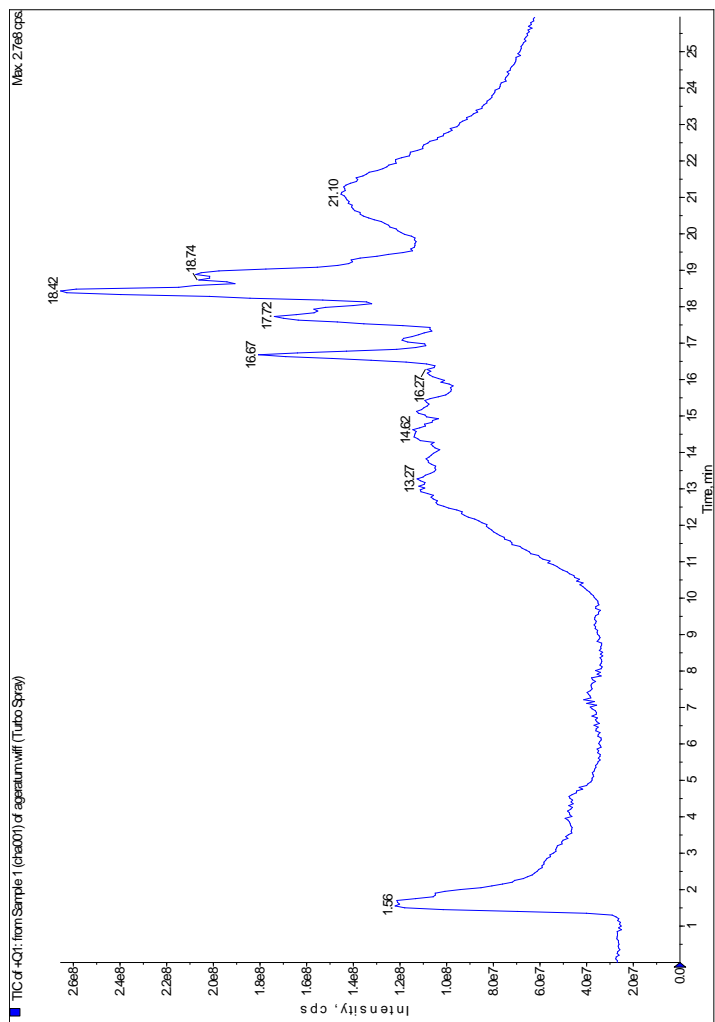


Figura 23 – Análise por CLAE-EM da infusão das partes aéreas de *A. conyzoides*.

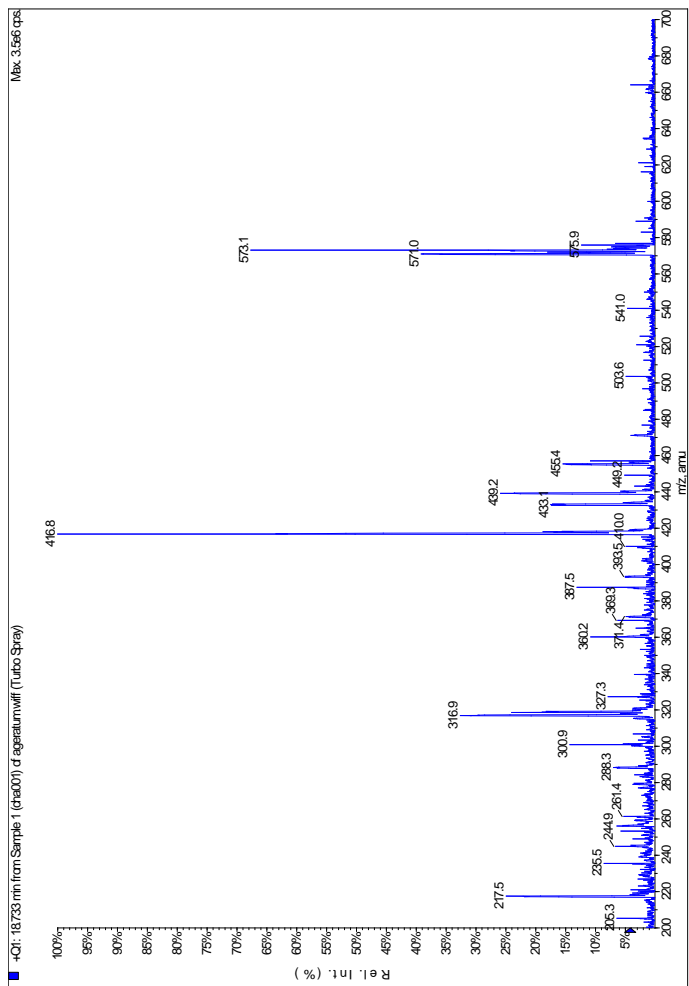


Figura 24 – Espectro de massas extraído do cromatograma (CLAE-EM) da infusão das partes aéreas de *A. conyzoides* no Tr = 18,7 min.

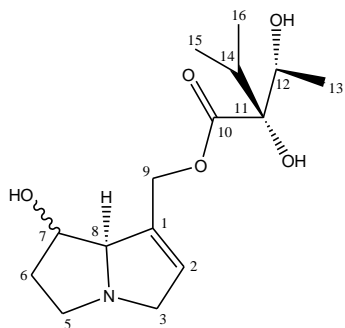


Figura 25 – Estrutura molecular da licopsamina (**14**).

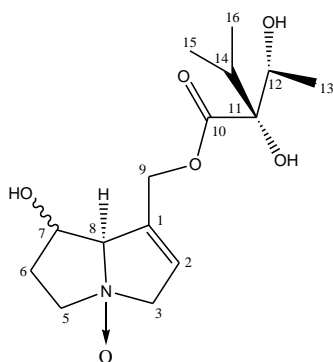
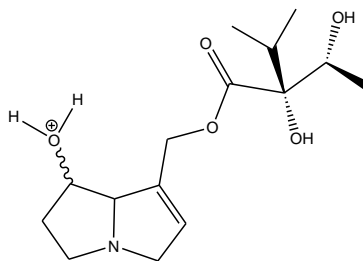
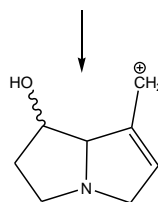


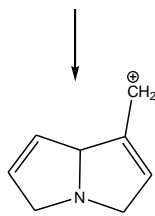
Figura 26 – Estrutura molecular da licopsamina N-óxido (**15**).



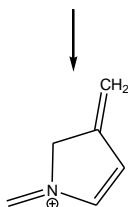
$m/z = 300$  [M+H]



$m/z = 138$



$m/z = 120$



$m/z = 94$

Figura 27 – Fragmentos importantes observados no (-)ESI-EM/EM da licopsamina.



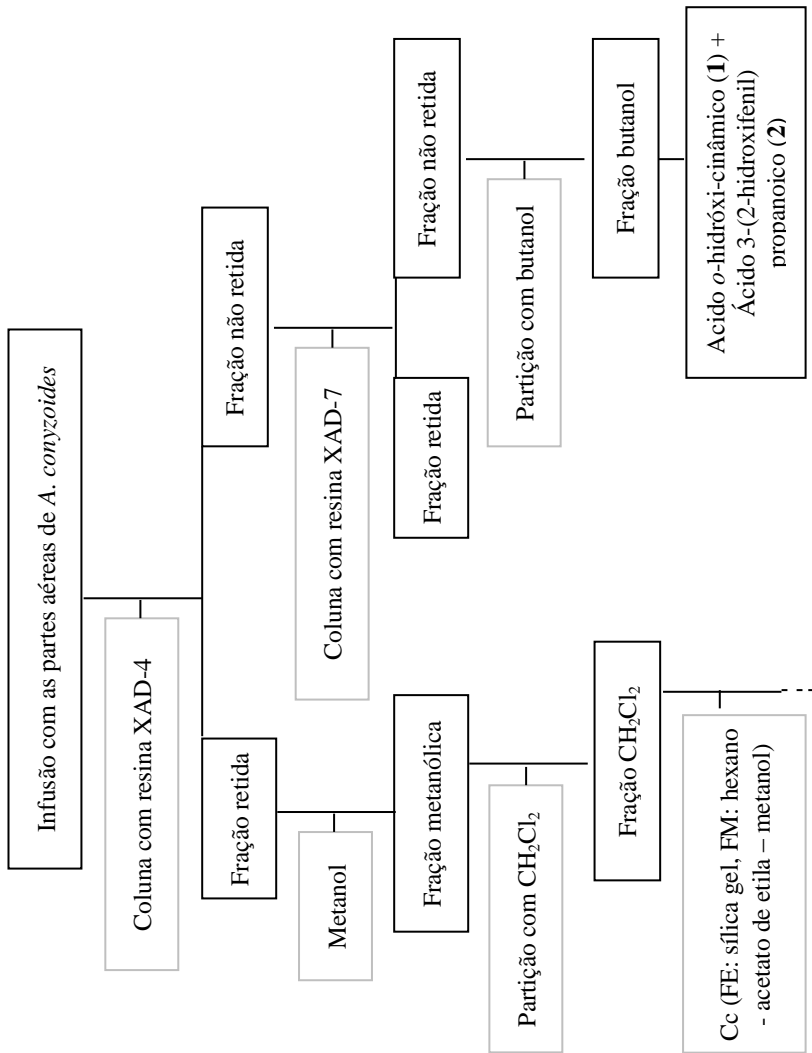
Foram identificados AP na infusão das partes aéreas de *A. conyzoides*, preparado de acordo com as recomendações da RDC 10, de 9 de março de 2010 (ANVISA). Sendo assim, a infusão utilizada pela população como tratamento alternativo de dores, principalmente articulares e a inclusão desta espécie vegetal na lista de drogas vegetais recomendadas pela RDC 10/10 da ANVISA precisa ser analisada com cautela, devido à presença destas substâncias que podem oferecer risco à saúde.

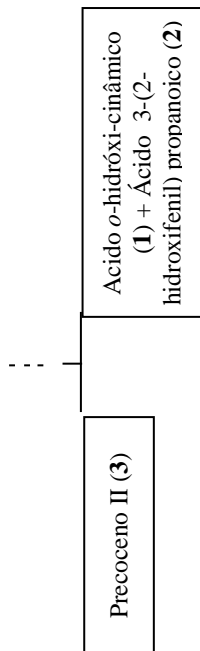
#### 4.2. Análise fitoquímica e identificação das substâncias presentes na infusão das partes aéreas de *A. conyzoides*

Sabendo da existência dos alcaloides pirrolizidínicos após análise da infusão das partes aéreas de *A. conyzoides* por RMN de  $^1\text{H}$  e EM, cromatografia com resina Amberlite foi utilizada para tentar isolar os alcaloides pirrolizidínicos da infusão. Porém, nem na cromatografia com resina Amberlite XAD-4, nem com a resina Amberlite XAD-7 os alcaloides pirrolizidínicos foram isolados. Mas, as substâncias (1) e (2) foram identificadas em mistura e a substância (3) foi isolada da infusão das partes aéreas de *A. conyzoides* (Fluxograma 11).

As substâncias (1) e (2) foram identificadas em mistura na fração butanólica após partição da fração metanólica eluída da coluna com resina XAD-7 com butanol. E também na fração 34 da coluna cromatográfica com sílica-gel da fração diclorometano resultante da partição da fração metanólica da coluna com resina XAD-4 com diclorometano. Estas frações foram analisadas por RMN de  $^1\text{H}$ , sendo identificadas como ácido *o*-hidróxi-cinâmico (1) e ácido 3-(2-hidroxifenil) propanoico (2).

A substância (3), que foi isolada na coluna cromatográfica com sílica-gel com a fração diclorometano resultante da partição da fração metanólica da coluna com resina XAD-4 com diclorometano, foi analisada por RMN de  $^1\text{H}$ , sendo identificada como precoceno II (3).





Fluxograma 11 – Resultado da pesquisa fitoquímica com a infusão das partes aéreas de *A. conyzoides*.

### 4.3. Análise fitoquímica e identificação das substâncias presentes nos extratos orgânicos das partes aéreas de *A. conyzoides*

#### 4.3.1. Extrato com *n*-hexano

Após análise por CCD, as frações D1, F1, L1, M1, CD4, FG4, H4, I4, J4, H5, P5, O5, H7, J7, L7, N7, P7 e O7 foram escolhidas para serem analisadas por RMN de  $^1\text{H}$  e/ou de  $^{13}\text{C}$ . As frações D1 e F1 não mostraram sinais de interesse nem no RMN de  $^1\text{H}$  nem no de  $^{13}\text{C}$ , por serem caracterizadas como ácidos graxos esterificados por glicerol. Na fração L1 foram identificadas as substâncias estigmasterol (4) e  $\beta$ -sitosterol (5) em mistura. Na fração M1 foi identificada a cumarina (6).

A fração CD4 não demonstrou sinais de interesse no RMN de  $^1\text{H}$ . As frações FG4, H4, I4 e N7 foram analisadas por RMN de  $^1\text{H}$  e a fração J4 foi analisada por RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ . Assim, o precoceno II (3) foi identificado nestas frações. A fração H5 foi analisada por RMN de  $^1\text{H}$ , sendo identificado o estigmasterol (4).

A fração P5 foi analisada por RMN de  $^{13}\text{C}$ , sendo identificado o cromeno 6-(1'-hidroxietil)-7-metoxi-2,2-dimetilcromeno (7). A fração O5 não apresentou sinais de interesse no RMN de  $^1\text{H}$ . A fração H7 foi analisada por RMN de  $^1\text{H}$ , sendo identificadas as substâncias 6-(1'-hidroxietil)-7-metoxi-2,2-dimetilcromeno (7), 6-(1'-hidroxietil)-2,2-dimetilcromeno (8) e sesamina (9) em mistura.

As frações J7 e L7 foram analisadas por RMN de  $^1\text{H}$ , sendo identificada a linderoflavona B (10). A fração P7 foi analisada por RMN de  $^1\text{H}$ , sendo identificadas as substâncias 3'-hidroxi-4',5,5',6,7,8-hexametoxiflavona (11), 5'-metoxinobiletina (12) e linderoflavona B (10) em mistura. A fração O7 foi analisada por RMN de  $^1\text{H}$ , sendo identificadas as substâncias 5'-metoxinobiletina (12) e eupalestina (13) em mistura.

#### 4.3.2. Extrato com diclorometano

As frações F9 e G9 foram analisadas através de CCD comparativa com a fração M1, sendo observado a presença da cumarina (6) nestas frações.

#### 4.3.3. Extrato com etanol

Das 88 frações resultantes da coluna cromatográfica com o extrato com etanol, apenas a fração 48 foi analisada por RMN de  $^1\text{H}$ ,

sendo identificada a presença de ácido *o*-hidróxi-cinâmico (1) e ácido 3-(2-hidroxifenil) propanoico (2) em mistura.

#### 4.3.4. Análise dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ e de $^{13}\text{C}$

Os dados espectrais do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da fração 48 resultante da cromatografia em coluna com o extrato com etanol (Figura 28) estão apresentados na Tabela 5. O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da fração 48 revelou sinais em  $\delta$  6,75; 6,84; 6,89; 6,98; 7,03; 7,13; 7,24 e 7,59. Estes sinais correspondem aos hidrogênios ligados aos carbonos C-3, C-4, C-5 e C-6 do anel aromático dos ácidos *o*-hidróxi-cinâmico (1), Figura 29) e 3-(2-hidroxifenil) propanoico (2), Figura 30).

A presença de dois dubletos em  $\delta$  6,60 e em  $\delta$  8,01 ( $J=16,1$  Hz) indica uma ligação dupla entre os carbonos C-8 e C-7, respectivamente no ácido *o*-hidróxi-cinâmico. Enquanto isso, a presença de dois tripletos em  $\delta$  2,61 ( $J=7,9$  Hz) e em  $\delta$  2,89 ( $J=7,8$  Hz) indica a presença de uma ligação simples entre os carbonos C-8 e C-7, respectivamente do ácido 3-(2-hidroxifenil) propanoico.

O ácido *o*-hidróxi-cinâmico, sob condições adequadas, se transforma em cumarina (ROCHA et al., 2008).

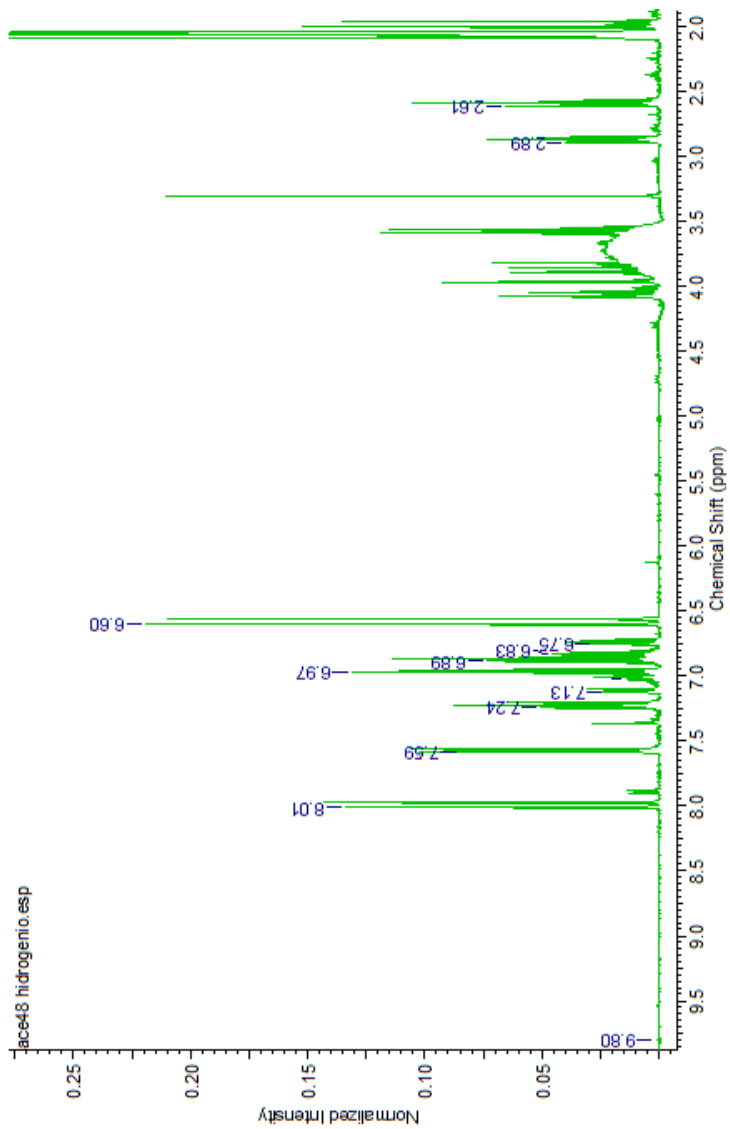


Figura 28 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da fração 48 do extrato com etanol, acetona, 400 MHz.

Tabela 5 - Deslocamentos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  do ácido *o*-hidróxi-cinâmico (1) e do ácido 3-(2-hidroxifenil) propanoico (2).

Posição	Ácido <i>o</i> -hidróxi-cinâmico (1), acetona, 400 MHz	Ácido 3-(2-hidroxifenil) propanoico (2), acetona, 400 MHz
3	6,98 ( <i>dd</i> , J=8,2 Hz; 1,0 Hz)	6,84 ( <i>dd</i> )
4	7,24 ( <i>ddd</i> , J=8,2 Hz; 7,3 Hz; 1,3 Hz)	7,03 ( <i>ddd</i> )
5	6,89 ( <i>ddd</i> , J=7,8 Hz; 7,3 Hz; 1,0 Hz)	6,75 ( <i>ddd</i> )
6	7,59 ( <i>dd</i> , J=7,8 Hz; 1,3 Hz)	7,13 ( <i>dd</i> )
7	8,01 ( <i>d</i> , J=16,1 Hz)	2,89 ( <i>t</i> , J=7,8 Hz)
8	6,60 ( <i>d</i> , J=16,1 Hz)	2,61 ( <i>t</i> , J=7,9 Hz)
9	9,55 ( <i>s</i> )	-

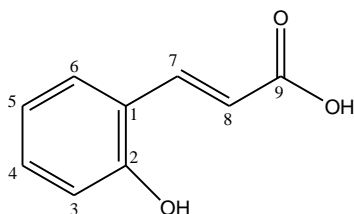


Figura 29 – Estrutura molecular do ácido *o*-hidróxi-cinâmico (1).

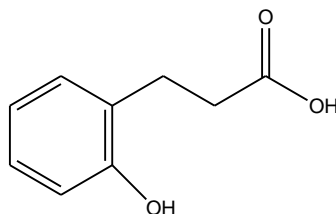


Figura 30 – Estrutura molecular do ácido 3-(2-hidroxifenil) propanoico (2).

Os dados espectrais de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 31) e de  $^1\text{H}$  (Figura 32) da fração J4 estão apresentados nas Tabelas 6 e 7, respectivamente. Onde estão comparados com os dados espectrais encontrados por ADEBAYO et al. (2010b) e assim, a substância presente na fração J4 foi identificada como precoceno II (3), (Figura 33).

O sinal em  $\delta$  1,41 no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da fração J4 corresponde aos hidrogênios ligados aos carbonos das metilas ligadas ao carbono C-2. O sinal em  $\delta$  75,9 no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da fração J4 corresponde ao carbono C-2 da estrutura do precoceno II e o sinal em  $\delta$  27,6 corresponde ao carbono das metilas que estão ligadas ao carbono C-2 da estrutura do precoceno II.

Os singletos em  $\delta$  3,84 e 3,82 no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da fração J4 correspondem as metoxilas ligadas aos carbonos C-6 e C-7. Os sinais em  $\delta$  143,0 e em  $\delta$  147,1 no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da fração J4

correspondem aos carbonos C-6 e C-7 da estrutura do precoceno II, respectivamente e os sinais em  $\delta$  55,8 e  $\delta$  56,5 correspondem aos carbonos das metoxilas que estão ligadas aos carbonos C-6 e C-7 da estrutura do precoceno II.

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da fração J4, a presença de dois dubletos em  $\delta$  5,48 e em  $\delta$  6,24 ( $J=9,8$  Hz) indica uma ligação dupla entre os carbonos C-3 e C-4, respectivamente. Os dois singletos em  $\delta$  6,53 e em  $\delta$  6,42 correspondem aos hidrogênios ligados aos carbonos C-5 e C-8, respectivamente.

Analisando o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da fração J4, é possível observar que os sinais em  $\delta$  128, 7 e em  $\delta$  121, 9 correspondem aos carbonos C-3 e C-4, respectivamente. Os sinais em  $\delta$  109,6 e em  $\delta$  100,9 correspondem aos carbonos C-5 e C-8, respectivamente e os sinais em  $\delta$  149,5 e em  $\delta$  113,0 correspondem aos carbonos C-4a e C-8a, respectivamente.

Precoceno II foi isolado de *A. conyzoides* por VYAS & MULCHANDANI (1980) e por ADEBAYO et al. (2011) e de *Ageratum houstonianum* por RANDRIAMINAHY et al. (1992).

2,2-dimetilcromenos são comuns em plantas da família Asteraceae, principalmente aquelas pertencentes às tribos Astereae, Eupatorieae, Heliantheae, Inuleae e Senecioneae (SIEBERTZ et al., 1990).

Precoceno II (principal componente do óleo essencial de *A. conyzoides*) é antifúngico contra *P. chrysogenum* e *P. javanicum* (RAO, 1976). O crescimento dos fungos *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii* foi completamente inibido pelo extrato de *A. conyzoides* em *n*-hexano e por 80-100 ppm de precoceno II. Os dois fungos foram completamente suprimidos por 150 ppm de precoceno II (IQBAL et al, 2004). Esta substância também apresenta atividade inseticida (PROKSCH & RODRIGUEZ, 1983).

Precoceno II apresentou hepatotoxicidade *in vitro* e em ratos (HAMMOND & FRY, 1997) (HAMMOND et al., 1995) (DUDDY & HSIA, 1989) e nefrotoxicidade em ratos (SCHRANKEL et al., 1982).



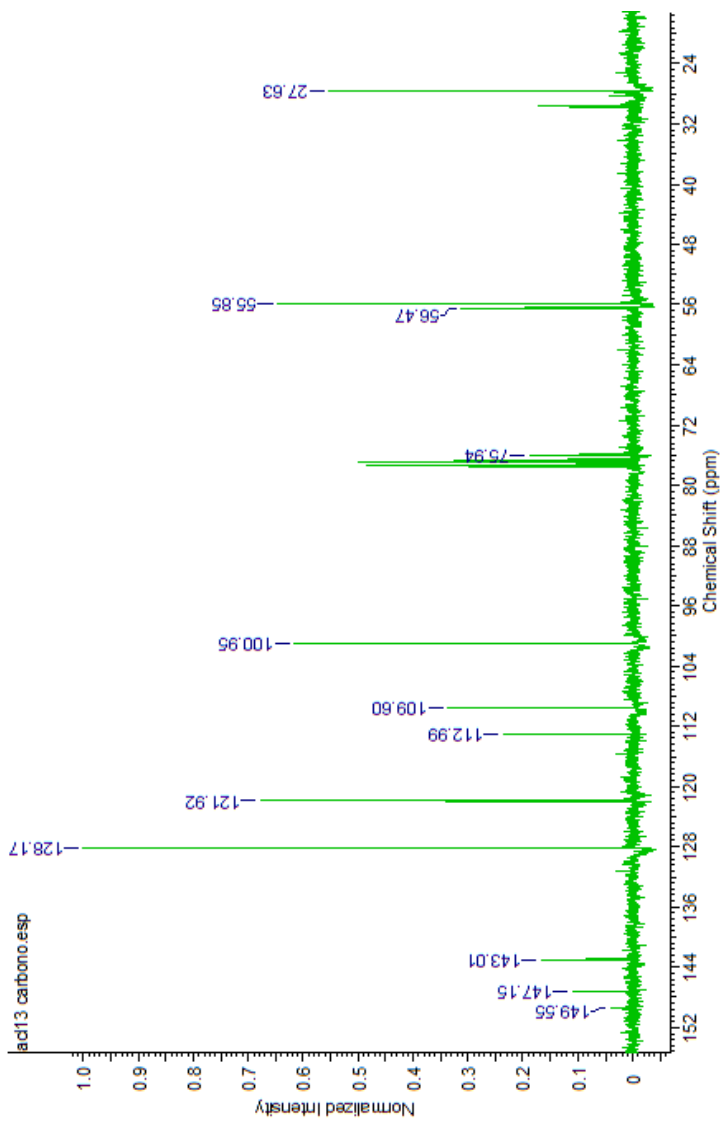


Figura 31 – Espectro de RMN de <sup>13</sup>C da fração J4, CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz.

Tabela 6 - Deslocamentos químicos de RMN de  $^{13}\text{C}$  do precoceno II (3) comparados com a literatura.

Posição	J4, CDCl <sub>3</sub> , 75 MHz	Precoceno II, ADEBAYO et al, 2010b, CD <sub>3</sub> OD, 125 MHz
2	75,9	75,9
3	128,7	128,2
4	121,9	121,9
4a	149,5	149,6
5	109,6	109,7
6	143,0	143,0
7	147,1	147,2
8	100,9	101,0
8a	113,0	113,0
CH <sub>3</sub>	27,6	27,6
OCH <sub>3</sub>	55,8 e 56,5	55,8 e 56,5

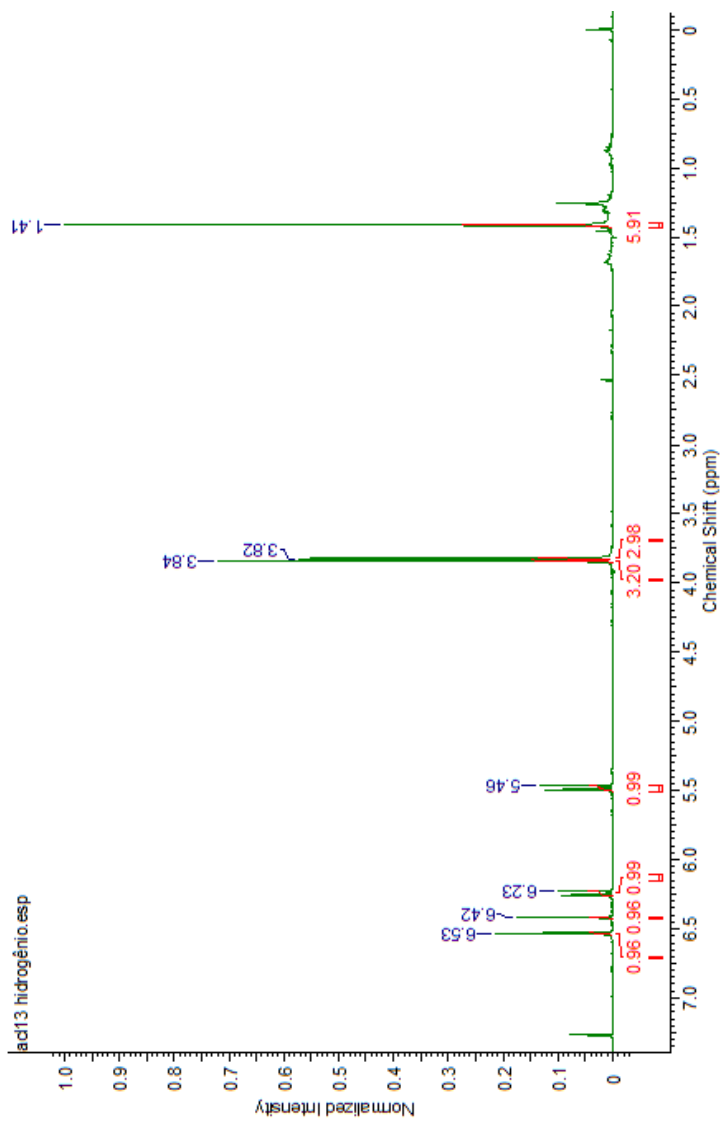
Figura 32 – Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da fração J4, CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz.

Tabela 7 - Deslocamentos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  do precoceno II (3) comparados com a literatura.

Posição	J4, CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz	Precoceno II, ADEBAYO et al, 2010b, CD <sub>3</sub> OD, 500 MHz
CH3	1,41 (6H, s)	1,41 (6H, s)
3	5,48 (1H, d, J=9,8 Hz)	5,47 (1H, d, J=9,7 Hz)
4	6,24 (1H, d, J=9,8 Hz)	6,24 (1H, d, J=9,7 Hz)
5	6,53 (1H, s)	6,53 (1H, s)
OCH3	3,84 (3H, s) e 3,82 (3H, s)	3,77 (6H, s)
8	6,42 (1H, s)	6,41 (1H, s)

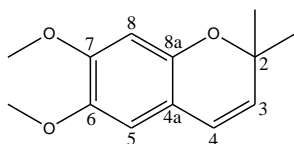


Figura 33 - Estrutura molecular do precoceno II (3).

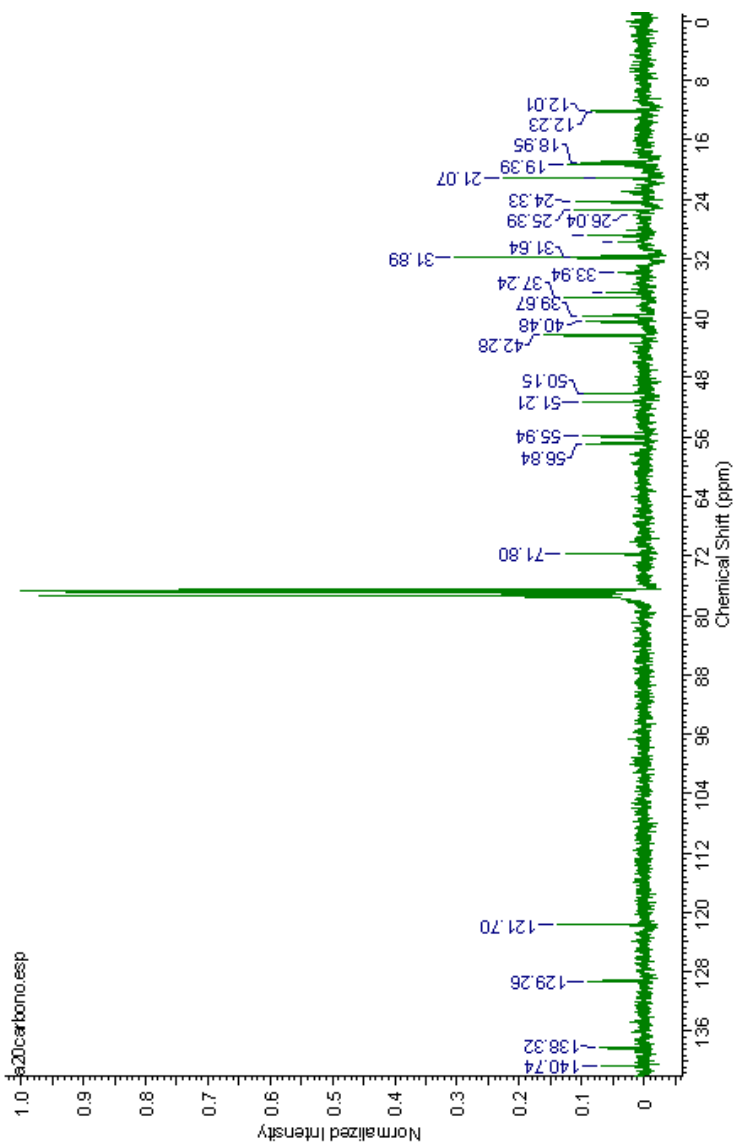
Os dados espectrais de RMN de  $^{13}\text{C}$  extraídos dos espectros das frações L1 (Figura 34) e H5 (Figura 35) estão apresentados na Tabela 8, onde estão comparados com os dados espectrais encontrados por KONGDUANG et al. (2008) e assim, as substâncias presentes nas frações L1 foram identificadas como estigmasterol (4), Figura 36) e  $\beta$ -sitosterol (5), Figura 37) e a substância presente na fração H5 foi identificada como estigmasterol.

Analisando o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da fração L1, pode-se observar que os sinais em  $\delta$  138,3 e em  $\delta$  129,3 correspondem aos carbonos C-22 e C-23 do estigmasterol, respectivamente e que os sinais em  $\delta$  33,9 e em  $\delta$  26,0 correspondem aos sinais dos carbonos C-22 e C-23 do  $\beta$ -sitosterol, respectivamente. Todos os outros deslocamentos químicos são idênticos tanto para o estigmasterol quanto para o  $\beta$ -sitosterol porque a diferença estrutural entre o estigmasterol e o  $\beta$ -sitosterol consiste em os carbonos C-22 e C-23 serem CH no estigmasterol e CH<sub>2</sub> no  $\beta$ -sitosterol.

Estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol são fitoesteróis. Essa classe de substâncias tem apresentado diversos efeitos fisiológicos e farmacológicos em animais. KAUR et al. (2011), em um trabalho de

revisão bibliográfica, citou que o estigmasterol apresenta atividade anti-osteoartrítica, antihipercolesterolêmica semelhante ao  $\beta$ -sitosterol, citotóxica, antitumoral, hipoglicêmica, antimutagênica, antioxidante e anti-inflamatória.

Estigmasterol foi isolado pela primeira vez em 1906 por Sdolf Wind Form e A. Hauth. (KAUR et al., 2011), e foi isolado de *A. conyzoides* por HORN et al. (1976), DUBEY et al. (1989), HU & KONG (1997). Tanto estigmasterol, como  $\beta$ -sitosterol foram identificados em tecidos *in vivo* e *in vitro* de *A. conyzoides* por RENU & NIDHI (2011) e foram isolados das partes aéreas de *A. conyzoides* extraídas com éter de petróleo por KAMBOJ & SALUJA (2011).

Figura 34 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da fração L.1,  $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz.

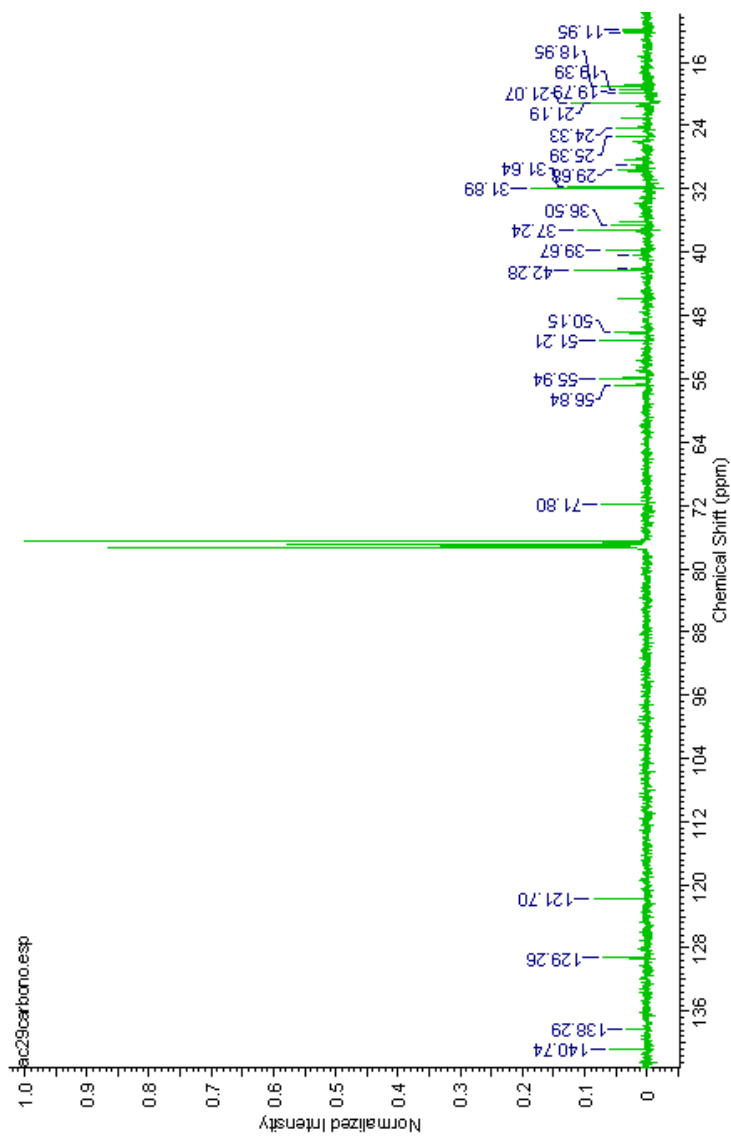
Figura 35 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da fração H5,  $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz.

Tabela 8 - Deslocamentos químicos de RMN de  $^{13}\text{C}$  do estigmasterol (4) e do  $\beta$ -sitosterol (5) comparados com a literatura.

Posição	L1, CDCl <sub>3</sub> , 75 MHz	Estigmasterol, KONGDUANG et al, 2008,CDCl <sub>3</sub> , 125 MHz	H5, CDCl <sub>3</sub> , 75 MHz	$\beta$ -sitosterol, KONGDUANG et al, 2008,CDCl <sub>3</sub> , 125 MHz
1	37,2	37,2	37,2	37,2
2	31,6	31,6	31,6	31,6
3	71,8	71,8	71,8	71,8
4	42,3	42,3	42,2	42,2
5	140,7	140,7	140,7	140,7
6	121,7	121,7	121,7	121,7
7	31,9	31,9	31,9	31,9
8	31,9	31,9	31,6	31,9
9	50,1	50,1	50,1	50,1
10	36,5	36,5	36,5	36,5
11	21,2	21,1	21,2	21,1
12	39,7	39,6	39,7	39,7
13	42,3	42,3	42,3	42,3
14	56,8	56,8	56,8	56,7
15	24,3	24,3	24,3	24,3
16	28,9	28,9	28,9	28,2
17	55,9	55,9	55,9	56,0
18	12,0	12,0	11,9	11,8
19	19,4	19,4	19,4	19,4
20	40,5	40,5	40,5	36,1
21	21,1	21,0	21,1	18,7
22	138,3 e 33,9	138,3	33,9	33,9
23	129,3 e 26,0	129,2	26,0	26,0
24	51,2	51,2	51,2	45,8
25	29,6	31,9	29,7	29,1
26	19,4	21,2	19,8	19,8
27	18,9	18,9	18,9	19,0
28	25,4	25,4	25,4	23,0
29	12,2	12,2	12,2	12,0



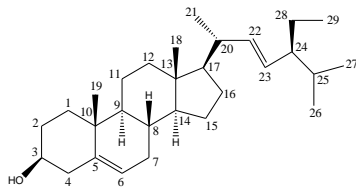


Figura 36 – Estrutura molecular do estigmasterol (4).

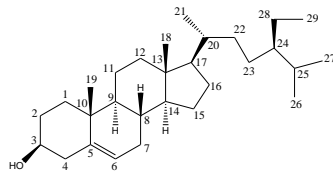


Figura 37 – Estrutura molecular do  $\beta$ -sitosterol (5).

Os dados espectrais de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 38) e de  $^1\text{H}$  (Figura 39) da fração M1 estão apresentados nas Tabelas 9 e 10, respectivamente. Onde estão comparados com os dados espectrais encontrados por KUPRIYANOVA (1997) e com a base de dados on-line Spectral Database For Organic Compounds e assim, a substância presente na fração M1 foi identificada como cumarina (6, Figura 40).

A análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da fração M1 permitiu observar que todos os sinais estão na região de absorção do próton aromático ( $\delta$  6,42;  $\delta$  7,27;  $\delta$  7,29;  $\delta$  7,33;  $\delta$  7,48 e  $\delta$  7,54). Os dois dubletos em  $\delta$  7,71 e em  $\delta$  6,42 ( $J=9,6$  Hz) são referentes aos hidrogênios da dupla ligação entre os carbonos C-4 e C-3, respectivamente. Estas características encontradas são semelhantes as características descritas para a cumarina por DA SILVA et al. (2008), sendo que estes autores descrevem dois dubletos em  $\delta$  7,64 e em  $\delta$  6,18 ( $J=9,3$  Hz) para a ligação dupla entre os carbonos C-4 e C-3, respectivamente.

A cumarina, facilmente encontrada em diversas espécies vegetais, foi identificada anteriormente no extrato de *A. conyzoides* em hexano por MOREIRA (2001) e foi isolada das partes aéreas de *Eupatorium coelestinum* por LEVAN & PHAM (1979).

MOREIRA (2001) observou que a cumarina apresenta alta atividade inseticida para *T. absoluta*, *D. hyalinata*, *S. zeamais*, *R. dominica* e *M. domestica*, sendo a ordem crescente de susceptibilidade: *R. dominica* < *S. zeamais* < *D. hyalinata* < *M. domestica* < *T. absoluta*.

WIDODO et al. (2008) observou que a cumarina isolada da fração acetona das folhas de *A. conyzoides* apresenta ação antifúngica contra *Aspergillus Níger* (contaminante de alimentos, como uva, cebola e amendoim), através de difusão em disco, encontrando CIM igual a 62,5  $\mu\text{g/mL}$ .

MIRUNALINI & KRISHNAVENI (2011), em um trabalho de revisão bibliográfica, descrevem as atividades antioxidante, analgésica, anti-inflamatória e antimutagênica para a cumarina.

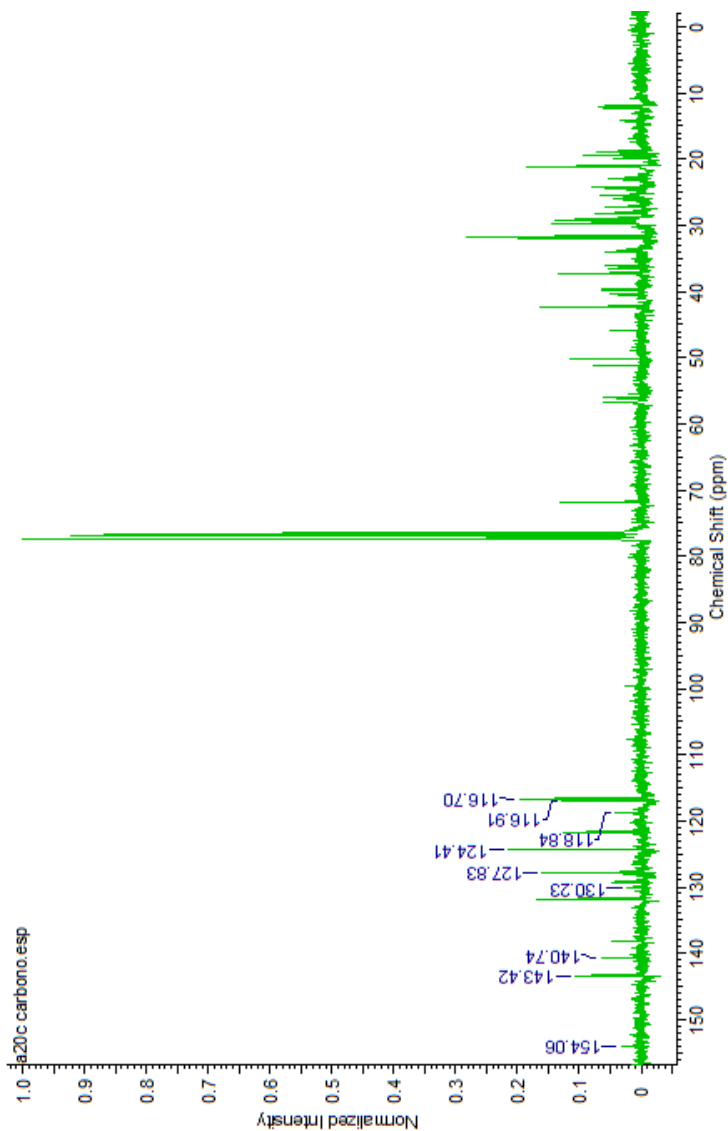


Figura 38 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da fração M1,  $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz.

Tabela 9 - Deslocamentos químicos de RMN de  $^{13}\text{C}$  da cumarina (6) comparados com a literatura.

Posição	M1, CDCl <sub>3</sub> , 75 MHz	Cumarina, KUPRIYANOVA, 1997, CDCl <sub>3</sub> , 50 MHz
2	154,0	160,4
3	116,9	116,4
4	140,7	143,6
5	127,8	128,1
6	124,4	124,4
7	130,2	131,4
8	116,7	116,4
9	143,4	153,9
10	118,8	118,8

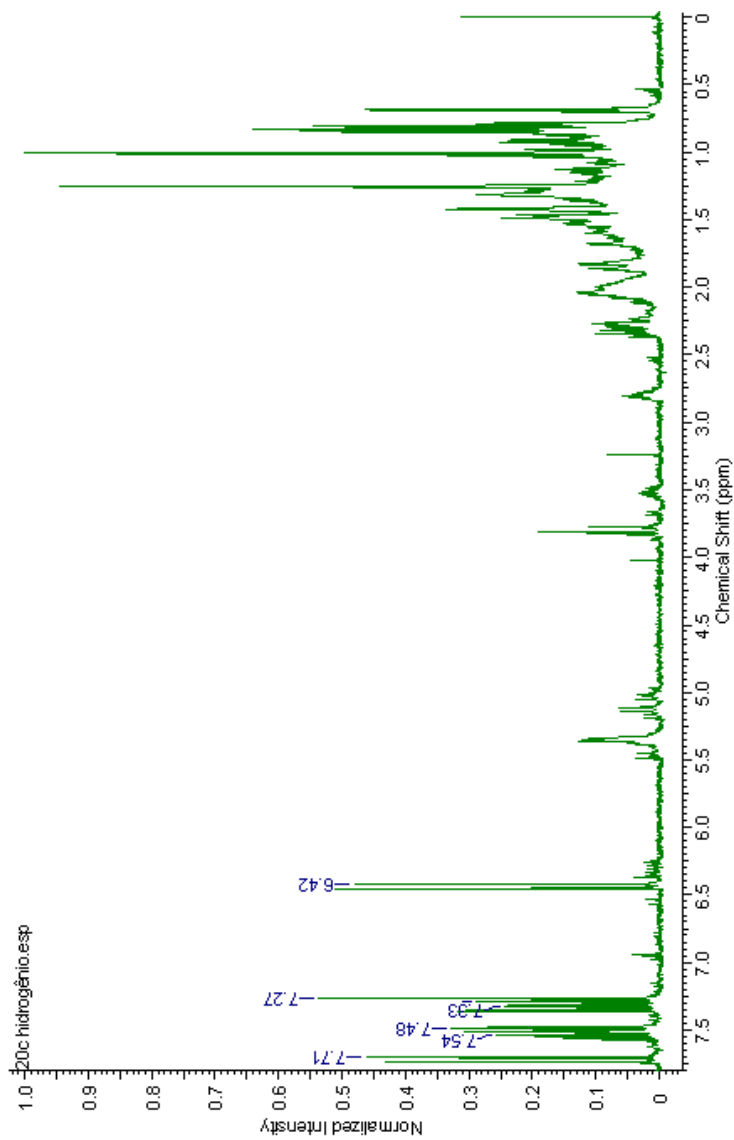


Figura 39 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da fração M1,  $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz.

Tabela 10 - Deslocamentos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  da cumarina (6) comparados com a literatura.

Posição	M1, CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz	Cumarina, SDBS, CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz
4	7,71 ( <i>d</i> , J=9,6 Hz)	7,73
7	7,54	7,53
5	7,48	7,50
8	7,33	7,32
6	7,29	7,28
3	6,42 ( <i>d</i> , J=9,6 Hz)	6,42

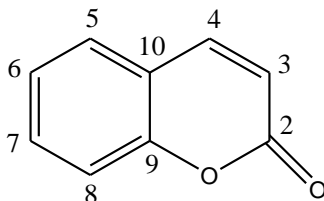


Figura 40 - Estrutura molecular da cumarina (6).

Os dados espectrais de RMN de  $^{13}\text{C}$  da fração P5 (Figura 41) estão apresentados na Tabela 11, onde estão comparados com os dados espectrais encontrados por GONZALEZ et al. (1991). Assim, a substância presente na fração P5 foi identificada como 6-(1'-hidroxietil)-7-metoxi-2,2-dimetilcromeno (7), Figura 42).

Observando o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da fração P5, é possível observar a seguinte relação entre os sinais encontrados no espectro com os carbonos correspondentes a cada um desses sinais:  $\delta$  76,4 (carbono C-2),  $\delta$  123,9 (carbono C-3),  $\delta$  121,9 (carbono C-4),  $\delta$  127,8 (carbono C-5),  $\delta$  99,6 (carbono C-8),  $\delta$  113,8 (carbono C-4'),  $\delta$  157,4 (carbono C-8'),  $\delta$  125,7 (carbono C-6),  $\delta$  153,3 (carbono C-7),  $\delta$  28,0 (carbonos das duas metilas ligadas ao carbono C-2),  $\delta$  55,4 (carbono da metoxila ligada ao carbono C-7),  $\delta$  65,8 (carbono do CH ligado ao carbono C-6) e  $\delta$  22,7 (carbono da metila ligada ao CH que está ligado ao carbono C-6).

6-(1'-hidroxietil)-7-metoxi-2,2-dimetilcromeno foi isolado anteriormente por KASALI et al. (2002).

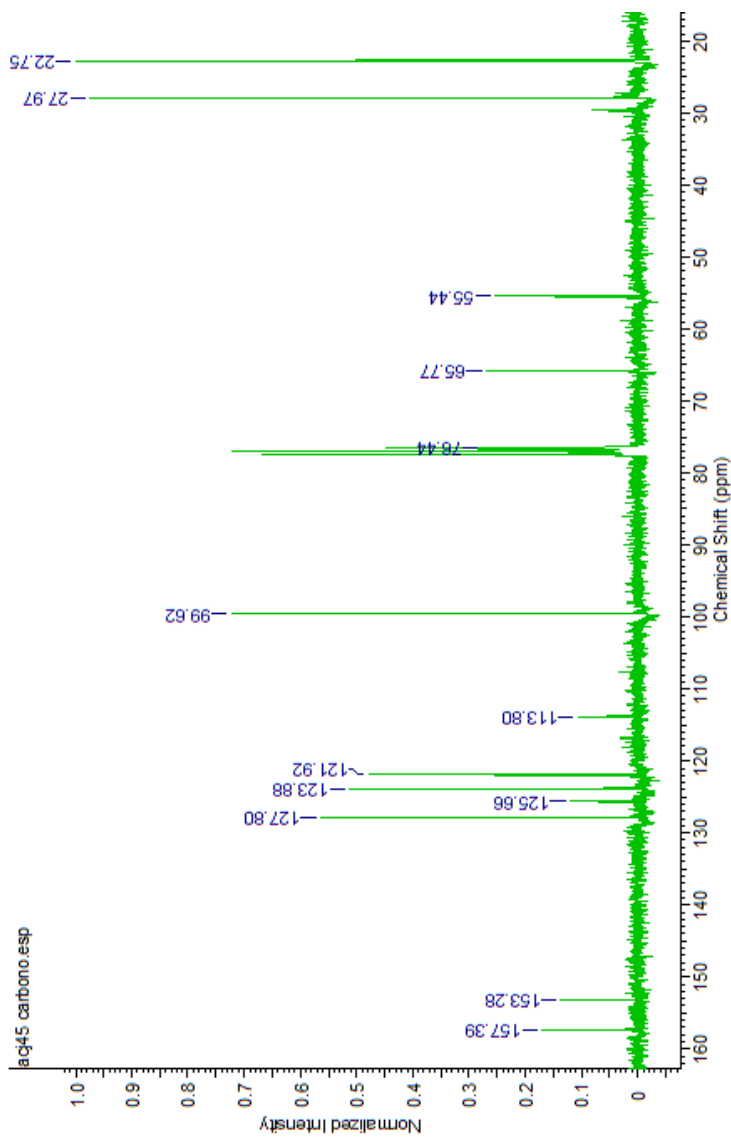
Figura 41 – Espectro de RMN de <sup>13</sup>C da fração P5, CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz.

Tabela 11 - Deslocamentos químicos de RMN de  $^{13}\text{C}$  do 6-(1'-hidroxietil)-7-metoxi-2,2-dimetilcromeno (7) comparados com a literatura.

Posição	P5, $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz	6-(1'-hidroxietil)-7-metoxi-2,2-dimetilcromeno, GONZÁLEZ et al, 1991, $\text{CDCl}_3$
2	76,4	76,4
3	123,9	123,9
4	121,9	121,9
5	127,8	127,8
6	125,7	125,9
7	153,3	153,4
8	99,6	99,8
8'	157,4	157,5
4'	113,8	113,9
6(CH)	65,8	65,7
6(CH <sub>3</sub> )	22,7	22,9
2(CH <sub>3</sub> )	28,0	28,0
2(CH <sub>3</sub> )	28,0	28,0
7(OMe)	55,4	55,4

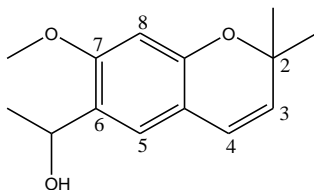


Figura 42 - Estrutura molecular do 6-(1'-hidroxietil)-7-metoxi-2,2-dimetilcromeno (7).

Os dados espectrais de RMN de  $^1\text{H}$  da fração H7 (Figura 43) correspondentes ao 6-(1'-hidroxietil)-2,2-dimetilcromeno estão apresentados na Tabela 12. Enquanto que os dados espectrais de RMN de  $^1\text{H}$  da fração H7 que correspondem a sesamina estão apresentados na Tabela 13 e foram comparados com Weber (2005). As substâncias presentes na fração H7 foram identificadas como 6-(1'-hidroxietil)-7-metoxi-2,2-dimetilcromeno (7), 6-(1'-hidroxietil)-2,2-dimetilcromeno (8), Figura 44) e sesamina (9), Figura 45).

Analisando os sinais do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da fração H7 correspondentes ao 6-(1'-hidroxietil)-2,2-dimetilcromeno, é possível observar que o dubleto em  $\delta$  1,31 ( $J=6,4$  Hz) corresponde as duas metilas ligadas ao carbono C-2. O singlete em  $\delta$  1,29 corresponde a metila ligada ao CH que está ligado no carbono C-6. Os dois dubletos em  $\delta$  6,24 e em  $\delta$  5,54 ( $J=9,7$  Hz) indicam uma ligação dupla entre os carbonos C-4 e C-3, respectivamente. O dubleto em  $\delta$  7,03 ( $J=2,2$  Hz) corresponde ao hidrogênio ligado ao carbono C-5. O multipletos em  $\delta$  4,60 corresponde ao CH ligado ao carbono C-6. O duplo dubleto em  $\delta$  7,04 ( $J=2,2$  Hz) corresponde ao hidrogênio ligado ao carbono C-7. O dubleto em  $\delta$  6,67 ( $J=8,4$  Hz) corresponde ao hidrogênio ligado ao carbono C-8.

Analisando os sinais do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da fração H7 que correspondem a sesamina, é possível observar que o multipletos em  $\delta$  3,24 corresponde ao hidrogênio ligado ao carbono C-1. O multipletos em  $\delta$  4,68 corresponde ao hidrogênio ligado ao carbono C-2. Os multipletos em  $\delta$  4,21 e em  $\delta$  3,85 corresponde aos dois hidrogênios ligados ao carbono C-4. O singlete em  $\delta$  6,90 corresponde ao hidrogênio ligado ao carbono C-2'. O dubleto em  $\delta$  6,80 ( $J=7,7$  Hz) corresponde ao hidrogênio ligado ao carbono C-5'. O dubleto em  $\delta$  6,88 ( $J=7,6$  Hz) corresponde ao hidrogênio ligado ao carbono C-6'. O singlete em  $\delta$  5,97 corresponde aos dois hidrogênios ligados ao carbono C-7'.

6-(1'-hidroxietil)-2,2-dimetil cromeno foi identificado pela primeira vez no óleo essencial das folhas de *A. conyzoides* por KASALI et al. (2002).

O tratamento crônico de ratos diabéticos com sesamina melhora a permeabilidade aórtica de forma dose-dependente, devido a atenuação do estresse oxidativo em tecido aórtico (ROGHANI et al., 2011).



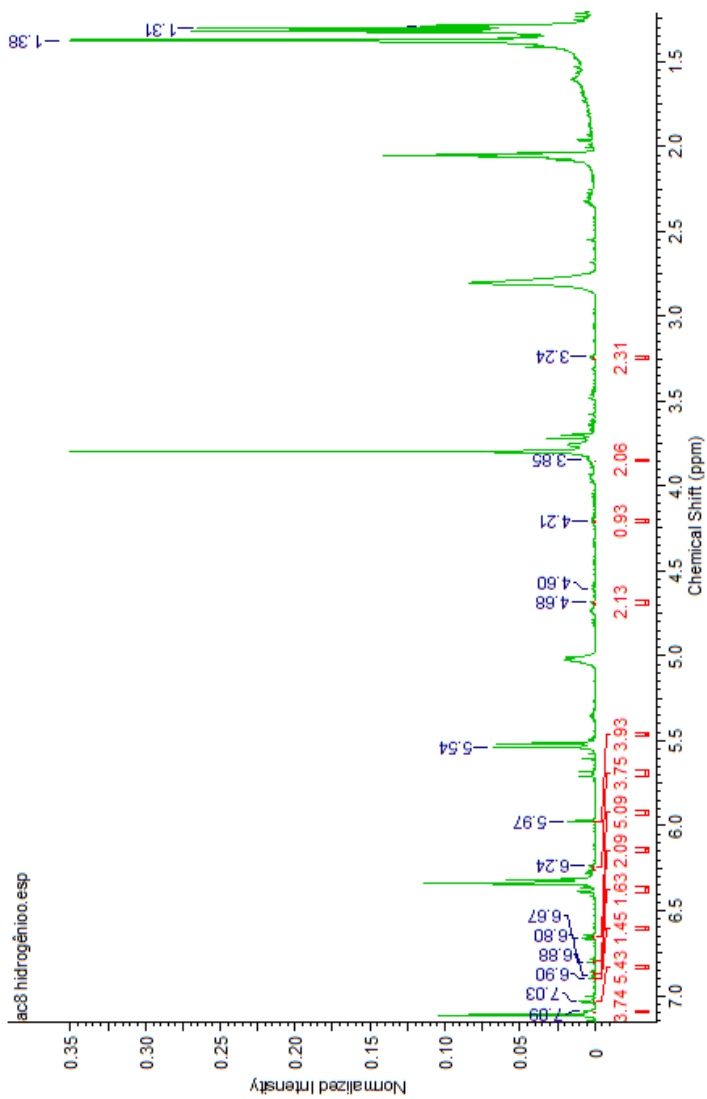


Figura 43 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da fração H7,  $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz.

Tabela 12 - Deslocamentos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  do 6-(1'-hidroxietil)-2,2-dimetilcromeno (8).

Posição	H7, acetona, 400 MHz
7	7,04 ( <i>dd</i> , J=2,2 Hz)
8	6,67 ( <i>d</i> , J=8,4 Hz)
2(CH <sub>3</sub> )	1,31 ( <i>d</i> , J=6,4 Hz)
6(CH <sub>3</sub> )	1,29 ( <i>s</i> )
6(CH)	4,60 ( <i>m</i> )
5	7,03 ( <i>d</i> , J=2,2 Hz)
4	6,24 ( <i>d</i> , J=9,7 Hz)
3	5,54 ( <i>d</i> , J=9,7 Hz)

Tabela 13 - Deslocamentos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  da sesamina (9) comparados com a literatura.

Posição	H7, acetona, 400 MHz	Sesamina, Weber, 2005, CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz
7'	5,97 ( <i>s</i> )	5,98 ( <i>s</i> )
5'	6,80 ( <i>d</i> , J=7,7 Hz)	6,81 ( <i>d</i> , J=8,0 Hz)
2'	6,90 ( <i>s</i> )	6,88 ( <i>s</i> )
6'	6,88 ( <i>d</i> , J=7,6 Hz)	6,84 ( <i>d</i> , J=8,0 Hz)
2	4,68 ( <i>m</i> )	4,75 ( <i>d</i> )
4	4,21 ( <i>m</i> ) e 3,85 ( <i>m</i> )	4,27 ( <i>dd</i> ) e 3,90 ( <i>dd</i> )
1	3,24 ( <i>m</i> )	3,08 ( <i>dd</i> )
	-	

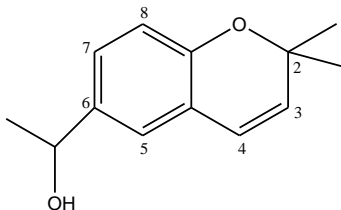


Figura 44 – Estrutura molecular do 6-(1'-hidroxietil)-2,2-dimetilcromeno (8).

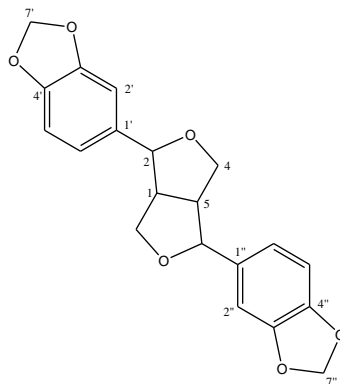


Figura 45 – Estrutura molecular da sesamina (9).

Os dados espectrais de RMN de  $^1\text{H}$  da fração P7 (Figura 46) estão apresentados na Tabela 14, onde estão comparados com os dados espectrais encontrados por HERZ & KULANTHAIVEL (1982) e SAXENA & SHRIVASTAVA (1994) e assim, as substâncias presentes na fração P7 foram identificadas como linderoflavona B (10, Figura 47) e 3'-hidroxi-4',5,5',6,7,8-hexametoxiflavona (11, Figura 48).

Analisando os dados do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da fração P7 correspondentes à substância linderoflavona B, é possível observar que o singlete em  $\delta$  6,65 corresponde ao hidrogênio ligado ao carbono C-3. O dubleto em  $\delta$  7,49 ( $J=1,6$  Hz) corresponde ao hidrogênio ligado ao carbono C-2'. O duplo dubleto em  $\delta$  7,61 ( $J=8,5$  Hz, 1,5 Hz) corresponde ao hidrogênio ligado ao carbono C-6'. Os singletos em  $\delta$  3,95,  $\delta$  4,03 e  $\delta$  4,07 correspondem as metoxilas. O sinal em  $\delta$  6,13 corresponde ao metilenodióxi.

Analisando os dados do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da fração P7 correspondentes a substância 3'-hidroxi-4',5,5',6,7,8-hexametoxiflavona, é possível observar que o dubleto em  $\delta$  7,13 ( $J=1,2$  Hz) corresponde aos hidrogênios ligados aos carbonos C-2' e C-6'. O sinal em  $\delta$  6,70 corresponde ao hidrogênio ligado ao carbono C-3.

Linderoflavona B foi isolada do extrato etéreo das raízes de *Lindera lúcida* por LEE & TAN (1965), do extrato metanólico das frutas de *Citrus reticulata* por SAXENA & SHRIVASTAVA (1994), das partes aéreas de *Ageratum tomentosum* por VAZQUEZ et al. (1988),

das partes aéreas de *Ageratum houstonianum* por QUIJANO et al. (1982) e das partes aéreas de *Eupatorium coelestinum* por LE-VAN & PHAM (1979).

3'-hidroxi-4',5,5',6,7,8-hexametoxiflavona é uma monohidroxihexametoxiflavona que foi isolada anteriormente por HERZ & KULANTHAIVEL (1982) da espécie *Eupatorium leucolepis* extraída com clorofórmio.

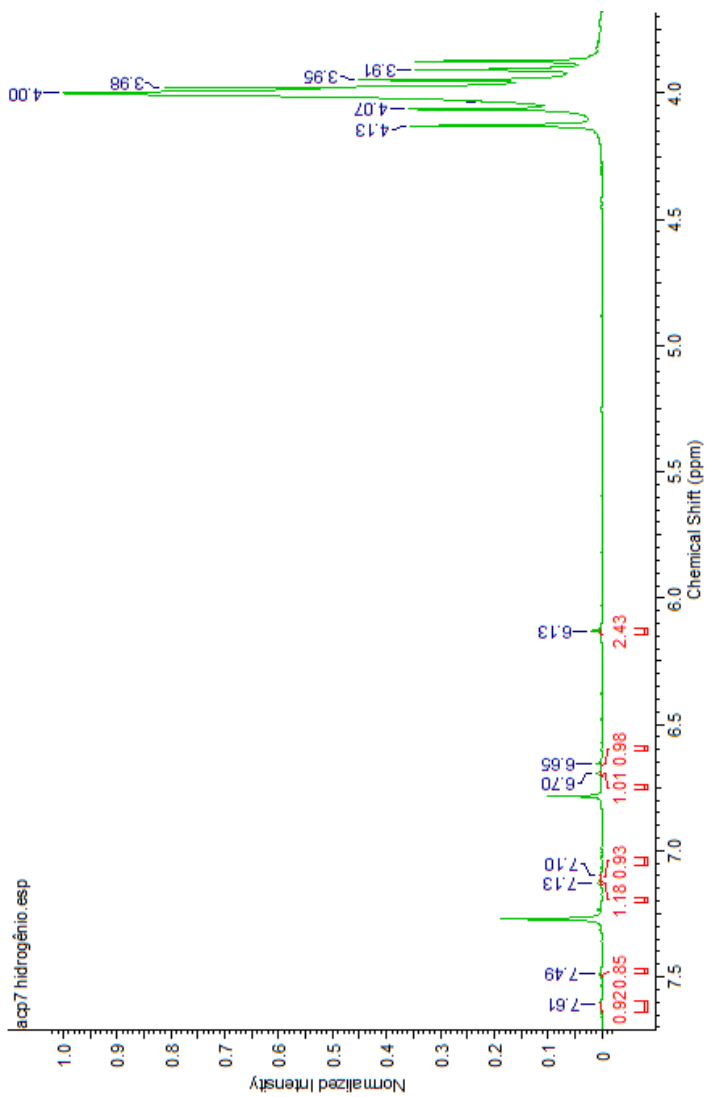
Figura 46 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da fração P7,  $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz.

Tabela 14 – Deslocamentos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  da 3'-hidroxi-4',5',5',6,7,8-hexametoxiflavona (**11**) e da linderoflavona B (**10**) comparados com a literatura.

Posição	P7, CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz	3'-hidroxi-4',5',5',6,7,8- hexametoxiflavona, HERZ & KULANTHAIVEL, 1982, 270 MHz, CDCl <sub>3</sub>	Linderoflavona B, SAXENA & SHRIVASTAVA, 1994, 270 MHz, CDCl <sub>3</sub>
2' e 6'	7,13 ( <i>d</i> , 1,2 Hz)	7,13 ( <i>d</i> , 1,5 Hz)	-
3	6,70	6,61	-
	4,13; 4,02; 4,00; 3,98; 3,98;	4,10; 4,02; 3,99; 3,95; 3,95; 3,95	-
3	6,65 ( <i>s</i> )	-	6,58 ( <i>s</i> )
2'	7,49 ( <i>d</i> , J=1,6 Hz)	-	7,36 ( <i>d</i> , J=1,5 Hz)
6'	7,61 ( <i>dd</i> , J=8,5 Hz; 1,5 Hz)	-	7,48 ( <i>dd</i> , J=8,5 Hz; 1,5 Hz)
OMe	3,95 ( <i>s</i> ), 4,03 ( <i>s</i> ), 4,07 ( <i>s</i> )	-	3,96 ( <i>s</i> ), 4,02 ( <i>s</i> ), 4,08 ( <i>s</i> )
OCH <sub>2</sub> O	6,13 ( <i>s</i> )	-	6,05 ( <i>s</i> )

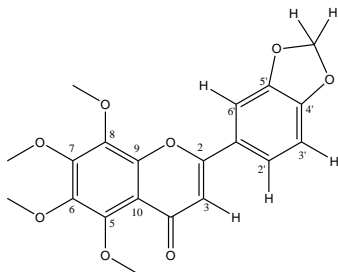


Figura 47 – Estrutura molecular da linderoflavona B (10).

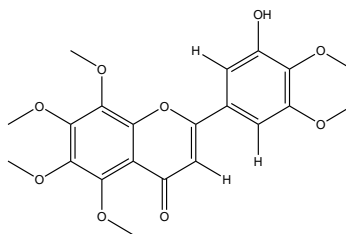


Figura 48 – Estrutura molecular da 3'-hidroxi-4',5,5',6,7,8-hexametoxiflavona (11).

Os dados espectrais de RMN de  $^1\text{H}$  da fração O7 (Figura 49) estão apresentados na Tabela 15, onde estão comparados com os dados espectrais encontrados por KONG et al. (2004) e HERZ et al. (1980) e assim, as substâncias presentes na fração O7 foram identificadas como 5'-metoxinobiletina (**12**, Figura 50) e eupalestina (**13**, Figura 51).

Analisando os dados do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da fração O7 correspondentes a estrutura da eupalestina, é possível observar que o sinal em  $\delta$  6,09 corresponde ao metilenodióxi ligado ao anel aromático. Os sinais em  $\delta$  4,12,  $\delta$  4,02,  $\delta$  3,96 e  $\delta$  3,95 correspondem as metoxilas. Os dupletos em  $\delta$  7,11 e em  $\delta$  7,16 ( $J=1,5$  Hz) correspondem aos hidrogênios ligados aos carbono C-3 e C-2'.

Analisando os dados do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da fração O7 correspondentes a estrutura da 5'-metoxinobiletina, é possível observar que o singleto em  $\delta$  7,17 corresponde ao hidrogênio ligado aos carbonos C-2' e C-6'. O singleto em  $\delta$  6,16 corresponde ao hidrogênio ligado ao carbono C-3. O singleto em  $\delta$  3,96 corresponde as três metoxilas ligadas ao anel aromático. Os singletos em  $\delta$  3,93 e em  $\delta$  3,96 correspondem as quatro metoxilas ligadas ao anel aromático.

5'-metoxinobiletina foi isolada das partes aéreas de *Eupatorium coelestinum* por LE-VAN & PHAM (1979), do caule e folhas de *A. conyzoides* por ADESOGAN & OKUNADE (1979), das partes aéreas de *Ageratum tomentosum* por VAZQUEZ et al. (1988), das partes aéreas de *A. conyzoides* por GONZALES et al. (1991) e do extrato hexânico de *A. conyzoides* por MOREIRA (2001). Apresentou fraco potencial citotóxico (BEUTLER et al., 1998). Afetou fracamente a fosforilação da quinase regulada por sinal extracelular “ERK1/2” em células T47D (câncer mamário humano) (SLAMBROUCK et al., 2005). Na

concentração de 10 mg/g, é eficiente contra *D. hyalinata*, *R. dominica* e *M. domestica* e ineficiente contra *P. americana* (MOREIRA et al., 2007).

Eupalestina foi isolada das partes aéreas de *Eupatorium coelestinum* por LE-VAN & PHAM, 1979, das partes aéreas de *Conoclinium coelestinum* (Eupatorieae) (HERZ et al., 1980), das partes aéreas de *Ageratum houstonianum* por QUIJANO et al. (1982), das partes aéreas de *Ageratum tomentosum* por VAZQUEZ et al. (1988) e do extrato hexânico de *A. conyzoides* por MOREIRA (2001).

MOREIRA (2001) observou que a eupalestina não apresenta atividade inseticida contra *Diaphania hyalinata* L., *Diaphania nitidalis* Cramer, *Musca domestica* L., *Rhyzopertha dominica* F., *Sitophilus zeamais* Motschulsky e *Tuta absoluta* Meyrick.



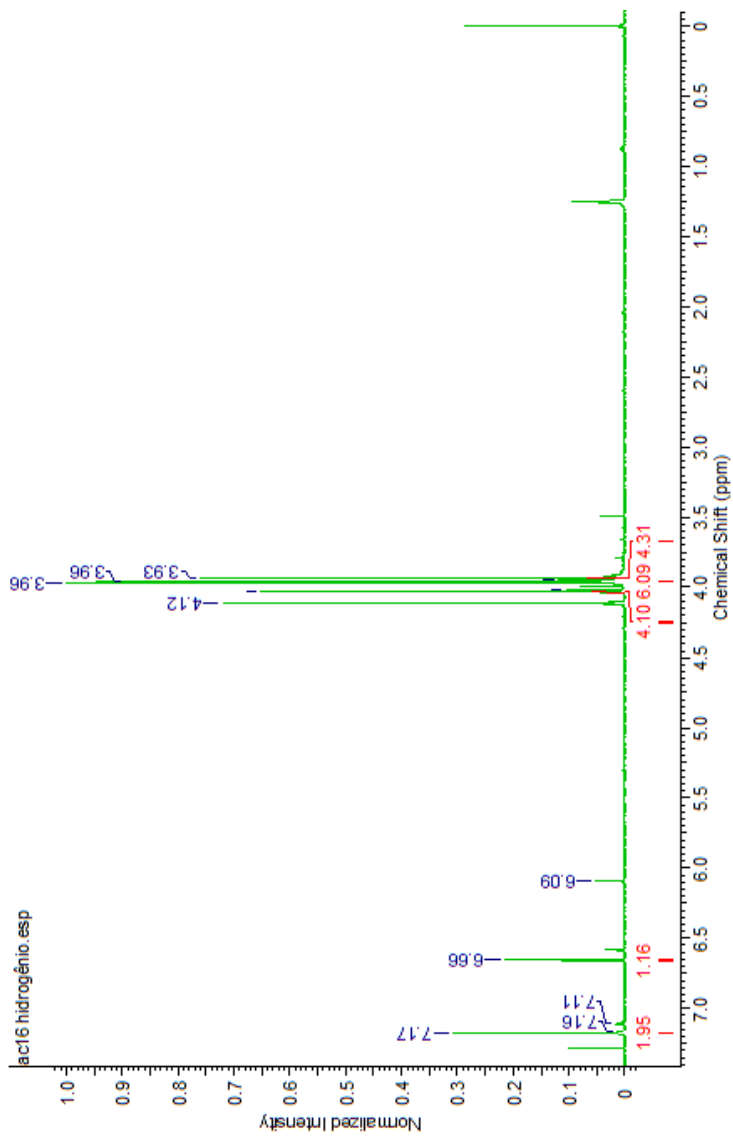


Figura 49 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da fração O7,  $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz.

Tabela 15 – Deslocamentos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  da 5'-metoxinobiletina (12) e da eupalestina (13) comparados com a literatura.

Posição	07, $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz	5'-metoxinobiletina, KONG et al, 2004, $\text{CDCl}_3$	Eupalestina, HERZ et al., 1980, $\text{CDCl}_3$ , 270 MHz
$\text{ArOCH}_3$	3,93 (s) e 3,96 (s)	3,91 (s) e 3,99 (s)	-
$\text{Ar}'\text{OCH}_3$	3,96 (s)	3,95 (s)	-
OMe	4,12 – 4,02 – 3,96 – 3,95	-	4,09 – 4,00 – 3,97 – 3,94
3	6,66 (s)	6,55 (s)	-
2' e 6'	7,17 (s)	7,11 (s)	-
3 e 2'	7,11 (d) e 7,16 (d) (J=1,5 Hz)	-	7,14 (d) e 7,09 (d) (J=1,5 Hz)
$\text{OCH}_2\text{O}$	6,09	-	6,08

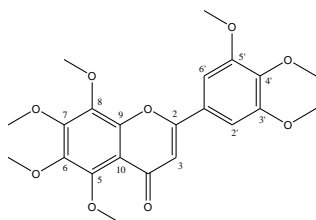


Figura 50 – Estrutura molecular da 5'-metoxinobiletina (12).

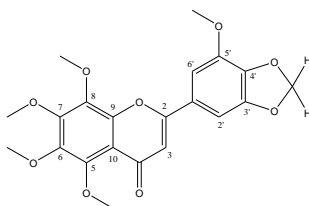


Figura 51 – Estrutura molecular da eupalestina (13).

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta foi a primeira vez que alcaloides pirrolizidínicos foram identificados no chá preparado de acordo com a RDC 10/10 da ANVISA e com *A. conyzoides* sem flores.

Foram isoladas e elucidadas 5 substâncias: 6-(1'-hidroxietil)-7-metoxi-2,2-dimetilcromeno, precoceno II, estigmasterol, cumarina e 5'-metoxinobiletina. Ainda, foram identificadas em mistura 8 substâncias: ácido *o*-hidróxi-cinâmico, ácido 3-(2-hidroxifenil)propanoico, 3'-hidroxi-4',5,5',6,7,8-hexametosiflavona, sesamina, linderoflavona B, 5'-metoxinobiletina, eupalestina, 6-(1'-hidroxietil)-2,2-dimetilcromeno.



## REFERÊNCIAS

ABENA, A. A.; KINTSANGOULA-MBAYA, G. S.; DIANTAMA, J.; BIOKA, D. Analgesic effects of a raw extract of *Ageratum conyzoides* in the rat. **Encephale**, v. 19, n. 4, p. 329-332, 1993.

ABENA, A. A.; OUAMBA, J. M.; KEITA, A. Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of essential oil of *Ageratum conyzoides*. **Phytoterapy Research**, v. 10, p. 164-165, 1996.

ACHOLA, K. J.; MUNENGA, R. W.; MWAURA, A. M. Pharmacological properties of root and aerial parts extracts of *Ageratum conyzoides* on isolated ileum and heart. **Fitoterapia**, v. 65, p. 322-325, 1994.

ACHOLA, K. J.; MUNENGE, R. W. Activity of *Ageratum conyzoides* on Isolated Rat Phrenic Nerve-Diaphragm and Blood Pressure on Anaesthetised Rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 35, n.1, p. 31-37, 1997.

ACHOLA, K. J.; MUNENGE, R. W. Bronchodilating and Uterine Activities of *Ageratum conyzoides* Extract. **Pharmaceutical Biology**, v. 36, n. 2, p. 93-96, 1998.

ADEBAYO, A.H.; JI, C.; ZHANG, Y.; HE, W.; ZENG, G.; HAN, H.; XU, J.; AKINDAHUNSI, A. A.; TAN, N. A new chromene isolated from *Ageratum conyzoides*. **Natural Product Communications**, v. 6, n. 9, p. 1263-1265, 2011.

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. 62-66, 2010a.

ADEBAYO, A. H.; ZENG, G. Z.; ZHANG, Y. M.; JI, C. J.; AKINDAHUNSI, A. A.; TAN, N. H. Toxicological evaluation of precocene II isolated from *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae) in Sprague Dawley rats. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 20, p. 2938-2944, 2010b.

ADESOGAN, E. K.; OKUNADE, A. L. A new flavone from *Ageratum conyzoides*. **Phytochemistry**, v. 18, p. 1863-1864, 1979.

AKINYEMI, K. O.; OLADAPO, O.; OKWARA, C. E.; IBE, C. C.; FASURE, K. A. Screening of crude extracts of six medicinal plants used in South-West Nigerian unorthodox medicine for anti-methicillin resistant *Staphylococcus aureus* activity. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, p. 5-6, 2005.

AMADI, E. S.; OYEKA, C. A.; ONYEAGBA, R. S.; UGBOGU, O. C.; OKOLI, I. Antimicrobial screening of *Breynia nivosus* and *Ageratum*. **Journal of Biological Sciences**, v. 7, p. 354-358, 2007.

ANTAI, A. B.; EYONG, E. U.; ETENG, M. U.; ITAM, E. H.; EKO, M. E.; ITA, S. O. Serum protein and enzyme levels in rats following administration of ethanolic leaf extract of *Ageratum conyzoides* (goat weed). **Nigerian Journal of Physiological Sciences**, v. 24, n. 2, p. 117-120, 2009.

**ANTHOS - ANTHOS IMAGE DATABASE**. Disponível em: <[http://anthos.u-strasbg.fr:8080/catmaid/httpdocs/list.php?query=Ageratum conyzoides](http://anthos.u-strasbg.fr:8080/catmaid/httpdocs/list.php?query=Ageratum%20conyzoides)>. Acesso em: 03 maio 2012.

**ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA**. Disponível em: <<http://www.brasilsus.com.br/legislações/rdc/103202-10>>. Acesso em 4 maio 2012.

ASTHANA, A.; CHANDRA, H.; DIKSHIT, A.; DIXIT, S. N. Volatile fungitoxicants from leaves of some higher plants against *Helminthosporiumoryzae*. **Pflanzenkr Pflanzenschutz**, v. 89, p. 475, 1982.

AYINDE, B. A.; ODIGIE, F. Larvicidal properties of the volatile oil of *Ageratum conyzoides* L. (Compositae) against culex specie mosquito larvae. **Nigerian Journal of Applied Science**, v. 19, p. 23-25, 2001.

BEUTLER, J. A.; HAMEL, E.; VLIETINCK, A. J.; HAEMERS, A.; RAJAN, P.; ROITMAN, J. N.; CARDELLINA II, J. H.; BOYD, M. R. Structure-Activity Requirements for Flavone Cytotoxicity and Binding to Tubulin. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, n.13, p. 2333-2338, 1998.

BHATHAL, S. S.; SINGH, D.; DHILLON, R. S. Insecticidal activity of *Ageratum conyzoides* Linn, against *Lipaphis erysimi* (kaltenbach). **Journal of Insect Science**, v. 7, p. 35-36, 1994.

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

**CABI - CROP PROTECTION COMPENDIUM**. Disponível em: <[http://www.cabicompendium.org/NamesLists/CPC/Full/AGE\\_CO.htm](http://www.cabicompendium.org/NamesLists/CPC/Full/AGE_CO.htm)>. Acesso em 03 maio 2012.

CALLE, J.; RIVERA, A.; LUIS, J. G.; AGUIAR, Z.; NIMEYER, H. M.; NATHAN, P. J. Insecticidal activity of the petroleum ether extract of *Ageratum conyzoides* L. **Revista Colombiana de Química**, v. 19, p. 91-96, 1990.

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

**CIRAD - CARIB FRUITS**. Disponível em: <[http://caribfruits.cirad.fr/production\\_fruitiere\\_integree/fiches\\_synthetiques/les\\_adventices\\_des\\_vergers](http://caribfruits.cirad.fr/production_fruitiere_integree/fiches_synthetiques/les_adventices_des_vergers)>. Acesso em: 03 maio 2012.

COSTA-LOTUFO, L. V.; WILKE, D. V.; JIMENEZ, P. C. Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: histórico & perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 703-716, 2009.

DA SILVA, C. V.; DETONI, C. B.; VELOZO, E. S. Alcaloides e outros metabólitos do caule e frutos de *Zanthoxylum tingoassuiba* A. ST. HIL. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2052-2055, 2008.

DAS, N. G.; GOSWAMI, D.; RABHA, B. Preliminary evaluation of mosquito larvicidal efficacy of plant extracts. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 44, p. 145-148, 2007.

DAYIE, N. T. K. D. Screening for Antimicrobial Activity of *Ageratum conyzoides* L.: A Pharmaco-Microbiological Approach. **The Internet Journal of Pharmacology**, v. 5, n. 2, 2008.

DE MENDONÇA, F. A.; DA SILVA, K. F.; DOS SANTOS, K. K.; RIBEIRO JÚNIOR, K. A.; SANT'ANA, A. E. Activities of some Brazilian plants against larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. **Fitoterapia**, v. 76, n. 7-8, p. 629-36, 2005.

DUBEY, S.; GUPTA, K.C.; MATSUMOTO, T. Sterols of *Ageratum conyzoides*. **Herba Hungarica**, v. 28, n. 1-2, p. 71-73, 1989.

DUDDY, S. K.; HSIA, M. T. S. Alteration of precocene II-induced hepatotoxicity by modulation of hepatic glutathione levels. **Chemico-Biological Interactions**, v. 71, n. 2-3, p. 187-199, 1989.

DURODOLA, J. I. Antibacterial Property of Crude Extracts from a Herbal Wound Healing Remedy – *Ageratum conyzoides*, L. **Planta Medica**, v. 32, p. 388-390, 1977.

#### **ECFLORA - PLANTS OF THE EASTERN CARIBBEAN.**

Disponível em: <<http://ecflora.cavehill.uwi.edu/plantdetails.php?pid=229&sn=Ageratum+conyzoides&cn=Bouton%2C+petit+pain-doux%2C+wild+ageratum&gh=herb>>. Acesso em: 03 maio 2012.

EKUNDAYO, O.; LAASKO, I.; HILTUNEN, R. Essential Oil of *Ageratum conyzoides*. **Planta Medica**, v. 54, p. 55-57, 1988.

ESCOBAR, B. T. **Avaliação psicofarmacológica de *Ageratum conyzoides* L. Asteraceae.** 2007. 73 f. Dissertação (Mestrado em Saúde) – Curso de Mestrado em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 2007.

FAGOONEE, I.; UMRIT, G. **Insect Science and Its Applications**, v. 1, p. 373, 1981.

FIORI, A. C. G.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; VIDA, J. B.; SCAPIN, C. A.; CRUZ, M. E. S.; PASCHOLATI, S. F. Antifungal Activity of Leaf Extracts and Essential Oils of some Medicinal Plants against *Didymella bryoniae*. **Journal of Phytopathology**, v. 148, n. 7-8, p. 483-487, 2000.



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.  
 GANESAN, T.; KRISHNARAJU, J. Antifungal properties of wild plants-II. **Advances in Plant Sciences**, v. 8, p. 194-196, 1995.

GBOLADE, A. A.; ONAYADE, O. A.; AYINDE, B. A. Insecticidal activity of *Ageratum conyzoides* L. volatile oil against *allosobruchus chinensis* F in seed treatment and fumigation laboratory tests. **Insect Science and its application**, v. 19, p. 237, 1999.

**GLOBINMED - GLOBAL INFORMATION HUB ON INTEGRATED MEDICINE**. Disponível em: <[http://www.globinmed.com/index.php?option=com\\_content&view=article&id=79069:ageratum-conyzoides-linn-asteraceae&catid=703:a](http://www.globinmed.com/index.php?option=com_content&view=article&id=79069:ageratum-conyzoides-linn-asteraceae&catid=703:a)>. Acesso em: 03 maio 2012.

GONZALEZ, A. G.; AGUIAR, Z. E.; GRILLO, T. A.; LUIS, J. G.; RIVERA, A.; CALLE, J. Methoxy Flavone from *Ageratum conyzoides*. **Phytochemistry**, v. 30, p. 1269, 1991.

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

HAMMOND, A. H.; FRY, J. R. Involvement of cytochrome P4502E1 in the toxicity of dichloropropanol to rat hepatocyte cultures. **Toxicology**, v. 118, p. 171-179, 1997.

HAMMOND, A. H.; GARLE, M. J.; FRY, J. R. Mechanism of toxicity of precocene II in rat hepatocyte cultures. **Journal of Biochemical Toxicology**, v. 10, n. 5, p. 265-273, 1995.

HARVEY, A. L. **Bridging the gap: using natural products in drug discovery research in academia and industry**. New Hampshire, 2009.

HERZ, W.; KULANTHAIVEL, P. Flavones from *Eupatorium leucolepis*. **Phytochemistry**, v. 21, n. 9, p. 2363-2366, 1982.

HERZ, W.; GOVINDAN, S. V.; RIESS-MAURER, I.; KREIL, B.; WAGNER, H.; FARKAS, L.; STRELISKY, J. Isolation and synthesis

of two new flavones from *Conoclinium coelestinum*. **Phytochemistry**, v. 19, n. 4, p. 669-672, 1980.

HIRSCHHORN, H. Botanical Remedies of South and Central America, and the Caribbean: na Archival analysis. Part II. Conclusion. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 5, p. 163-180, 1982.

HOFFMAN, B. R.; DELASALAS, H.; BLANCO, K.; WIEDERHOLD, N.; LEWIS, R. E.; WILLIAMS, L. Screening of Antibacterial and Antifungal Activities of Tem Medicinal Plants from Ghana. **Pharmaceutical Biology**, v. 42, n. 1, p. 13-17, 2004.

HORN, C.; LIN, S.; CHEN, A. Phytochemical study on *Ageratum conyzoides*. **Taiwan Kexue**, v. 30, n. 3, p. 101-105, 1976.

HORN, R. C.; VARGAS, V. M. F. Mutagenicity and antimutagenicity of teas used in popular medicine in the *salmonella*/microsome assay. **Toxicology in Vitro**, v. 22, p. 1043-1049, 2008.

HU, F.; KONG, C. Allelopathy off *Ageratum conyzoides*. I. Allelopathy of *Ageratum conyzoides* aqueous extract and isolation and identification of its allelochemicals. **Yingyong Shengtai Xuebao**, v. 8, n. 3, p. 304-308, 1997.

IGBOASOIYI, A. C.; ESEYIN, O. A.; EZENWA, N. K.; OLADIMEJI, H. O. Studies on the Toxicity of *Ageratum conyzoides*. **Journal of Pharmacology and Toxicology**, v. 2, n. 8, p. 743-747, 2007.

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

**ISSG - GLOBAL INVASIVE SPECIES DATABASE**. Disponível em: <<http://www.issg.org/database/species/ecology.asp?si=1493&fr=1&sts=&lang=EN>>. Acesso em 03 maio 2012.

ITA, S. O.; ETIM, O. E.; BEN, E. E.; EKPO, O. F. Haematopoietic properties of ethanolic extract of *Ageratum conyzoides* (goat weed) in albino rats. **Niger Journal of Physiology Science**, v. 22, p. 83-87, 2007.

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

JOHNSON, E. A.; MOLYNEUX, R. J.; MERRILL, G. B. Chemistry of toxic range plants. Variation in pyrrolizidine alkaloid content of *Senecio*, *Amsinckia* and *Crotalaria* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 33, p. 50-55, 1985.

**JSTOR - JSTOR PLANT SCIENCE**. Disponível em: <[http://plants.jstor.org/upwta/1\\_861](http://plants.jstor.org/upwta/1_861)>. Acesso em: 03 maio 2012.

KAMBOJ, A.; SALUJA, A.K. Isolation of stigmaterol and  $\beta$ -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.

KASALI, A. A.; WINTERHALTER, P.; ADIO, A. M.; KNAPP, H.; BONNLANDER, B. Chromenes in *Ageratum conyzoides* L. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 17, p. 247-250, 2002.

KATO-NOGUCHI, H. Assessment of the Allelopathic Potential of *Ageratum Conyzoides*. **Biologia Plantarum**, v. 44, n. 2, p. 309-311, 2001.

KAUR, N.; CHAUDHARY, J.; JAIN, A.; KISHORE, L. Stigmaterol: a comprehensive review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 2, n. 9, p. 2259-2265, 2011.

KISSMANN, K. G.; GROTH, D. **Plantas Infestantes e Nocivas**. São Paulo: BASF Brasileira S. A., 1992.

KONG, C. H. Ecological pest management and control by using allelopathic weeds (*Ageratum conyzoides*, *Ambrosia trifida*, and *Lantana camara*) and their allelochemicals in China. **Weed Biology and Management**, v. 10, p. 73-80, 2010.

KONG, C.; LIANG, W.; HU, F.; XU, X. ; WANG, P. ; JIANG, Y. ; XING, B. Allelochemicals and their transformations in the *Ageratum*

*conyzoides* intercropped citrus orchard soils. **Plant and Soil**, v. 264, p. 149-157, 2004.

KONG, C.; HU, F.; XU, X.; ZHANG, M.; LIANG, W. Volatile allelochemicals in the *Ageratum conyzoides* intercropped citrus orchard and their effects on mites *Amblyseius newsami* and *Panonychus citri*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 31, n. 9, p. 2193-2203, 2005.

KONG, C.; HU, F.; XU, X. Allelopathic potential and chemical constituents of volatiles from *Ageratum conyzoides* under stress. **Journal of Chemical Ecology**, v.28, n. 6, p. 1173-1182, 2002.

KONG, C.; HU, F.; XU, T.; LU, Y. Allelopathic Potential and Chemical Constituents of Volatile Oil from *Ageratum conyzoides*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 25, n. 10, p. 2347-2356, 1999.

KONGDUANG, D.; WUNGSINTAWEEKUL, J.; DE-EKNAMKUL, W. Biosynthesis of  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol proceeds exclusively via the mevalonate pathway in cell suspension cultures of *Croton stellatopilosus*. **Tetrahedron Letters**, v. 49, p. 4067-4072, 2008.

KUMAR, A.; SHUKLA, R. SINGH, P.; DUBEY, N. K. Chemical composition, antifungal and antiaflatoxigenic activities of *Ocimum sanctum* L. essential oil and its safety assessment as plant based antimicrobial. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 2, p. 539-543, 2010.

KUMAR, A.; SHUKLAR, R.; SINGH, P.; PRASAD, C. S.; DUBEY, N. K. Assessment of *Thymus vulgaris* L. essential oil as a safe botanical preservative against post harvest fungal infestation of food commodities. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 9, n. 4, p. 575-580, 2008.

KUPRIYANOVA, G. S. NMR studies of the electronic structure of coumarins. **Journal of Structural Chemistry**, v. 38, n. 3, p. 408-414, 1997.

LANS, C. Ethnomedicines used in Trinidad and Tobago for reproductive problems. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 3, n. 13, 2007.

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

LEE, H. H.; TAN, C. H. Syntheses of Flavones from *Lindera lúcida*. **Journal of Chemical Society**, p. 2743-2749, 1965.

**LIFEMAPPER**. Disponível em: <<http://www.lifemapper.org/species/Ageratum%20conyzoides>>. Acesso em: 03 maio 2012.

LIMA, R. K.; CARDOSO, M. G.; MORAES, J. C.; ANDRADE, M. A.; MELO, B. A.; RODRIGUES, V. G. Caracterização química e atividade inseticida do óleo essencial de *Ageratum conyzoides* L. sobre a lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda*. **Bioscience Journal**, v. 26, n. 1, p. 1-5, 2010.

LIU, F.; WAN, S. Y.; JIANG, Z.; LI, S. F. Y.; ONG, E. S.; OSORIO, J. C. C. Determination of pyrrolizidine alkaloids in comfrey by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. **Talanta**, v. 80, p. 916-923, 2009

MACEDO, M. E.; CONSOLI, R. A. G. B.; GRANDI, T. S. M.; DOS ANJOS, A. M. G.; DE OLIVEIRA, A. B.; MENDES, N. M.; QUEIROZ, R. O.; ZANI, C. L. Screening of Asteraceae (Compositae) plant extracts for larvicidal activity against *Aedes fluviatilis* (Diptera: Culicidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 4, p. 565-570, 1997.

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

MAKAMBILA-KOUBEMBA, M. C.; ABENA, A. A.; NDOUGA, M. Activité antalgique d'un extrait brut de *Ageratum conyzoides* chez la souris. Etude comparative au Tetra. **Pharmacopée et Médecine Traditionnelle Africaines**, v. 9, p. 34-39, 1997.

MENDES, N. M.; QUEIROZ, R. O.; GRANDI, T. S. M.; DOS ANJOS, A. M. G.; DE OLIVEIRA, A. B.; ZANI, C. L. Screening of Asteraceae (Compositae) Plant Extracts for Molluscicidal Activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 3, p. 411-412, 1999.

MIRUNALINI, S.; KRISHNAVENI, M. Coumarin: A Plant derived Polyphenol with wide Biomedical Applications. **International Journal of PharmTech Research**, v. 3, n. 3, p. 1693-1696, 2011.

MISHRA, A. K.; DUBEY, N. K. Evaluation of Some Essential Oils for Their Toxicity against Fungi Causing Deterioration of Stored Food Commodities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 4, p. 1101-1105, 1994.

**MNHN - HERBARIUM MUSEI PARISIENSIS**. Disponível em: <<http://coldb.mnhn.fr/ScientificName/Ageratum%20conyzoides>>. Acesso em: 03 maio 2012.

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

MOMESSO, L. S.; MOURA, R.M. X.; CONSTANTINO, D. H. J. Atividade antitumoral do *ageratum conyzoides* L (asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 3, p. 660-663, 2009.

MOODY, J. O.; ADEBIYI, O. A.; ADENIYI, B. A. Do *Aloe vera* and *Ageratum conyzoides* enhance the anti-microbial activity of traditional medicinal soft soaps (Osedudu)? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 92, n. 1, p. 57-60, 2004.

MOREIRA, M. D. **Isolamento, identificação e atividade inseticida de constituintes químicos de *Ageratum conyzoides***. 2001. 60 f. Tese (*Magister Scientiae*) – Programa de Pós-Graduação em Entomologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001.

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

MOURA, A. A.; SILVA, E. L.; FRAGA, M. C.; WANDERLEY, A. G.; AFIATPOUR, P.; MAIA, M. B. Antiinflammatory and chronic

toxicity study of the leaves of *Ageratum conyzoides* L. in rats.

**Phytomedicine**, v. 12, p. 138-142, 2005.

MUSTAFA, M. R.; MAHMOOD, A. A.; SIDIK, K.; NOOR, S. M. Evaluation of wound healing potential of *Ageratum conyzoides* leaf extract in combination with honey in rats as animal model.

**International Journal of Molecular Medicine and Advance Science**, v. 1, n. 4, p. 406-410, 2005.

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

NETO, J. F. M.; COSTALLAT, L. T. L.; FERNANDES, S. R. M.; DE NAPOLI, M. D. M.; SAMARA, A. M. Efeitos do “*Ageratum conyzoides* Linèe” no tratamento da artrose. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 28, n. 4, p. 109-114, 1988.

NISAR, S.; HUSAIN, S. I. Allelopathic effects of some plants on the larval emergence of *Meloidogyne incognita* chitwood. **Indian Journal Applied and Pure Biology**, v. 5, p. 129-130, 1990.

NISBET, L. J.; MOORE, M. Will natural products remain an important source of drug research for the future? **Current Opinion in Biotechnology**, v. 8, p. 708-712, 1997.

NOGUEIRA, J. H.; GONÇALEZ, E.; GALLETI, S. R.; FACANALI, R.; MARQUES, M. O.; FELICIO, J. D. *Ageratum conyzoides* essential oil as aflatoxin suppressor of *Aspergillus flavus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, n. 1, p. 55-60, 2009.

NOUR, A. M. M.; AKHALID, S.; ABDALLAH, W. E.; KAISER, M.; BRUN, R.; SCHMIDT, T. J. Trypanocidal Flavonoids from *Ageratum conyzoides*. **Planta Medica**, v. 72, 2006.

NOUR, A. M.; KHALID, S. A.; KAISER, M.; BRUN, R.; ABDALLA, W. E.; SCHMIDT, T. J. The antiprotozoal activity of methylated

flavonoids from *Ageratum conyzoides* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, n. 1, p. 127-30, 2010.

NWEZE, N. E.; OBIWULU, I. S. Anticoccidial effects of *Ageratum conyzoides*. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 122, n.1, p. 6-9, 2008.

NYUNAĪ, N.; NJIKAM, N.; ABDENNEBI, E. L. H.; MBAFOR, J. T.; LAMNAOUER, D. Hypoglycaemic and antihyperglycaemic activity of *Ageratum conyzoides* L. in rats. **African Journal of Traditional and Complement Alternative Medicine**, v. 6, n. 2, p. 123-130, 2009.

NYUNAĪ, N.; NJIKAMB, N.; MOUNIERC, C.; PASTOUREAUD, P. Blood glucose lowering effect of aqueous leaf extracts of *ageratum conyzoides* in rats. **African Journal of Traditions**, v. 3, n. 3, p. 76-79, 2006.

OKEMY-ANDISSA, N.; OUAMBA, J. M.; KOUDOU, J.; DIATEWA, M.; GBEASSOR, M.; ABENA, A. A. Comparative study of analgesic activities of Tetra® and an association of three plants: *Ageratum conyzoides*, *Combopogon citrates* and *Lippia multiflora*. **International Journal of Pharmacology**, v. 2, p. 42-44, 2006.

OKWORI, A. E. J.; DINA, C. O.; JUNAID, S.; OKEKE, I. O.; ADETUNJI, J. A.; OLABODE, A. O. Antibacterial Activities of *Ageratum conyzoides* Extracts on Selected Bacterial Pathogens. **The Internet Journal of Microciology**, v. 4, n. 1, 2007.

PAGANINI-COSTA, P.; DA-SILVA, D. C. Uma Xícara (chá) de Química. **Revista Virtual de Química**, v. 3, n. 1, p. 27-36, 2011.

PANDEY, D. K.; ASTHANA, A.; TRIPATHI, N. N.; DIXIT, S. N. Volatile plant products vis-à-vis potato pathogenic bacteria. **Indian Perfum**, 1981.

PARI, K.; SUBRAHMANYAM, B.; RASTOGI, J. N.; DEVAKUMAR, C.; RAO, P. J. insecticidal (Z)-6-Methyl-12-heptadecenoic Acid from the Essential Oil of *Ageratum conyzoides*. **Cheminform**, v. 32, n. 3, 2001.

PATIL, R. P. NIMBALKAR, M. S.; JADHAV, U. U.; DAWKAR, W.; GOVINDWAR, S. P. Antiaflatoxigenic 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.

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

**PIER - PACIFIC ISLAND ECOSYSTEMS AT RISK**. Disponível em: <[http://www.hear.org/pier/species/ageratum\\_conyzoides.htm](http://www.hear.org/pier/species/ageratum_conyzoides.htm)>. Acesso em 03 maio 2012.

**PLANTNET - PLANTINVASION**. Disponível em: <<http://eee.plantnet-project.org/showbyaccno.php?acno=AGECO>>. Acesso em: 03 maio 2012.

POPP, F. D.; WEFER, J. M.; ROSEN, G.; NOBLE, A. C. Investigations of Philippine Plants for Alkaloids, Antimalarial Agents, and Antineoplastic Agents. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 56, n. 9, p. 1195-1197, 1967.

PRAJAPATI, V.; TRIPATHI, A. K.; KHANUJA, S. P. S.; KUMAR, S. Anti-insect Screening of Medicinal Plants from Kukrail Forest, Lucknow, India. **Pharmaceutical Biology**, v. 41, n. 3, p. 166-170, 2003.

PROKSCH, P.; RODRIGUEZ, E. Chromenes and benzofurans of the Asteraceae, their chemistry and biological significance. **Phytochemistry**, v. 22, n. 11, p. 2335-2348, 1983.

QUIJANO, L.; CALDERÓN, J. S.; GÓMEZ, F.; RÍOS, T. Two polymethoxyflavones from *Ageratum houstonianum*. **Phytochemistry**, v. 21, n. 12, p. 2965-2967, 1982.

RANDRIAMINAHY, M.; WITTE, L.; KUNZE, A.; WRAY, V.; PROKSCH, P. Detoxification of Naturally Occurring Chromenes in Larvae of the Generalist Herbivore *Spodoptera littoralis* (Noctuidae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 20, n. 8, p. 711-722, 1992.

RAO, J. T. Die in vitro antimikrobielle Wirkung des ätherischen Öles Von *Ageratum conyzoides*. **Riechstoffe, Aromen, Koerperpflegem**, v. 26, n. 4, p. 50, 1976.

REITZ, R. **Flora Ilustrada Catarinense**. Itajaí, 1989.

RENU, S.; NIDHI, B. Phytosterols from *in vivo* and *in vitro* cultures of two medicinal plants viz. *Adhatoda vasica* and *Ageratum conyzoides*. **International Journal of Research in Ayurveda & Pharmacy**, v. 2, n. 3, p. 927-930, 2011.

ROCHA, L.; LUCIO, E. M. A.; FRANÇA, H. S.; SHARAPIN, N. *Mikania glomerata* Spreng: Desenvolvimento de um produto fitoterápico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 744-747, 2008.

RÖDER, E.; WIEDENFELD, H. Isolierung und strukturaufklärung des alkaloids fuchsisenecionin aus *Senecio fuchsia*. **Phytochemistry**, v. 16, p. 1462-1463, 1977.

ROEDER, E. Medicinal plants in Europe containing pyrrolizidine alkaloids. **Pharmazie**, v. 50, p. 83-98, 1995.

ROGHANI, M.; BALUCHNEJADMOJARAD, T.; DEHKORDI, F. R. The Sesame Lignan Sesamin Attenuates Vascular Permeability in Rats with Streptozocin-Induced Diabetes: Involvement of Oxidative Stress. **International Journal of Endocrinology & Metabolism**, v. 9, n. 1, p. 248-252, 2011.

ROSANGKIMA, G.; PRASAD, S. B. Antitumour activity of some plants from Meghalaya and Mizoram against murine ascites Dalton's lymphoma. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 42, n. 10, p. 981-988, 2004.

RUAN, J.; LI, N.; XIA, Q.; FU, P. P.; PENG, S.; YE, Y.; LIN, G. Characteristic ion clusters as determinants for the identification of pyrrolizidine alkaloid *n*-oxides in pyrrolizidine alkaloid-containing natural products using HPLC-MS analysis. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 47, p. 331-337, 2012.

SALMAH, I.; PHILIP, K.; SIDIK, K.; SUZAINUR, K. A. R.; MAHMOOD, A. A. Antiulcerogenic activity of *Ageratum conyzoides* leaf extract against ethanol-induced gastric ulcer in rats as animal model. **International Journal of Molecular Medicine And Advanced Sciences**, v. 1, p. 402-405, 2005.

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.

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

SAXENA, A.; SAXENA, R. C. Effects of *Ageratum conyzoides* extract on the development stages of malaria vector, *Anopheles stephansi* (Diptera: Culicidae). **Journal of Environmental Biology**, v. 13, p. 207-209, 1992.

SAXENA, V. K.; SHRIVASTAVA, P. 4'-hydroxy-3,6-dimethoxy-6'',6''-dimethyl chromeno(7,8,2'',3'')flavone from *Citrus reticulata* CV Blanco. **Phytochemistry**, v. 36, n. 4, p. 1039-1041, 1994.

SCHRANKEL, K. R.; GROSSMAN, S. J.; HSIA, S. Precocene II nephrotoxicity in the rat. **Toxicology Letters**, v. 12, p. 95-100, 1982.

#### **SDBS – SPECTRAL DATABASE FOR ORGANIC COMPOUNDS.**

Disponível em: <[http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/cre\\_index.cgi?lang=eng](http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/cre_index.cgi?lang=eng)>. Acesso em: 07 maio 2012.

SHARMA, G. P.; JAIN, N. K.; GARG, B. D. Antihelmintic activity of some essential oils. **Indian Perfum**, v. 23, p. 210-212, 1979a.

SHARMA, G. P.; JAIN, N. K.; GARG, B. D. Antibacterial activity of some essential oils. **Indian Drugs**, v. 17, p. 14-15, 1979b.

SHARMA, P.; MOHAN, L.; SRIVASTAVA, C. N. Anti-juvenile activity of *Azadirachta indica* extract on the development and morphometry of filaria vector, *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) Say. **Parasitology Research**, v. 105, n. 5, p. 1193-203. 2009.

SHIRWAIKAR, A.; BHILEGAONKAR, P. M.; MALINI, S.; KUMAR, J. S. The gastroprotective activity of the ethanol extract of *Ageratum*

*conyzoides*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 86, n. 1, p. 117-121, 2003.

SIEBERTZ, R.; PROKSCH, P.; WITTE, L. Accumulation and biosynthesis of the chromenes precocene I and II in *Ageratum houstonianum*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 7, p. 2135-2138, 1990.

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

SINGH, P.; KUMAR, A.; DUBEY, N. K.; GUPTA, R. Essential oil of *Aegle marmelos* as a Safe Plant-Based Antimicrobial Against Postharvest Microbial Infestations and Aflatoxin Contamination of Food Commodities. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 6, p. 302-307, 2009.

SINGH, H. P.; BATISH, D. R.; KAUR, S.; KOHLI, R. K. Phytotoxic Interference of *Ageratum conyzoides* with Wheat (*Triticum aestivum*). **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 189, n. 5, p. 341-346, 2003.

SINGH, P. P.; SHUKLA, H. S.; SINGH, R. S.; TRIPATHI, S. C. Antifungal properties of essential oil of *Ageratum conyzoides* L. **National Academy Science Letters**, v. 9, p. 97, 1986.

SLAMBROUCK, S. V.; PARMAR, V. S.; SHARMA, S. K.; DE BONDT, B.; FORÉ, F.; COOPMAN, P.; VANHOECKE, B. W.; BOTERBERG, T.; DEYPERE, H. T.; LECLERCQ, G.; BRACKE, M. E. Tangeretin inhibits extracellular-signal-regulated kinase (ERK) phosphorylation. **Federation of European Biochemical Societies letters**, v. 579, p. 1665-1669, 2005.

SOARES, F. P. S.; RAPUANO, F. M.; FRAMIL, R. A.; DIRÉ, G. F.; GOMES, M. L.; BERNARDO-FILHO, M. An *In vitro* Evaluation of an *Ageratum conyzoides* Linn. Extract on the Labeling of Sanguineous Cells and Proteins with <sup>99m</sup>Tc. **Journal of Food Technology**, v. 2, n. 3, p. 176-179, 2004.

SOARES, S. F.; BORGES, L. M.; DE SOUSA, R. B.; FERREIRA, L. L.; LOULY, C. C.; TRESVENZOL, L. M.; DE PAULA, J. R.; FERRI, P. H. Repellent activity of plant-derived compounds against

*Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) nymphs. **Veterinarian Parasitology**, v.167, n. 1, p. 67-73, 2010.

SUJATHA, C. H.; VASUKI, V.; MARIAPPAN, T.; KALYANASUNDARAM, M.; DAS, P. K. **Interntional Pest Control**, v. 30, p. 122-124, 1988.

TANDON, S. K.; CHANDRA, S.; TRIPATHI, H. C. Pharmacological effects of *Ageratum conyzoides* roots. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 56, p. 182-184, 1994.

TRONGTOKIT, Y.; RONGSRIYAM, Y.; KOMALAMISRA, N. ; APIWATHNASORN, C. Comparative repellency of 38 essential oils against mosquito bites. **Phytotherapy Research**, v. 19, n. 4, p. 303-309, 2005.

**TROPICOS - MISSOURI BOTANICAL GARDEN**. Disponível em: <<http://www.tropicos.org>>. Acesso em: 03 maio 2012.

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

VYAS, A. V.; MULCHANDANI, N. B. Biosynthesis of precocenes-I and -II, anti-juvenile hormones. **Phytochemistry**, v. 19, p. 2597-2598, 1980.

WEBER, A. D. **Estudo Fitoquímico e da Atividade Biológica de *Zanthoxylum rhoifolium***. 2005. 137 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.

WIEDENFELD, H.; ANDRADE-CETTO, A. Pyrrolizidine alkaloids from *Ageratum houstonianum* Mill. **Phytochemistry**, v. 57, p. 1269-1271, 2001.

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

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

WIEDENFELD, H.; HÖSCH, G.; ROEDER, E.; DINGERMAN, T.  
Lycopsamine and cumambrin B from *Eupatorium maculatum*.  
**Pharmazie**, v. 64, p. 415-416, 2009.

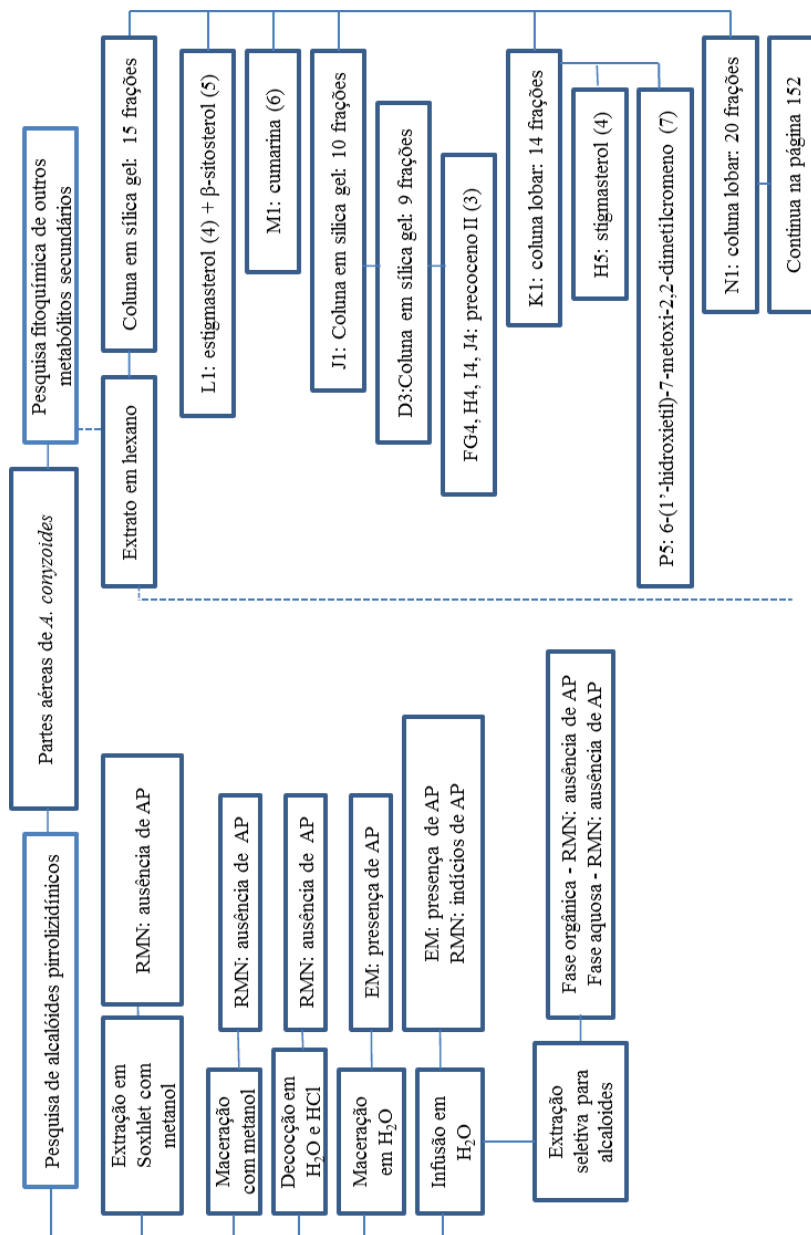
**WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION**. WHO monographs  
on selected medicinal plants. Geneve, v. 1, p. 1-295, 1999.

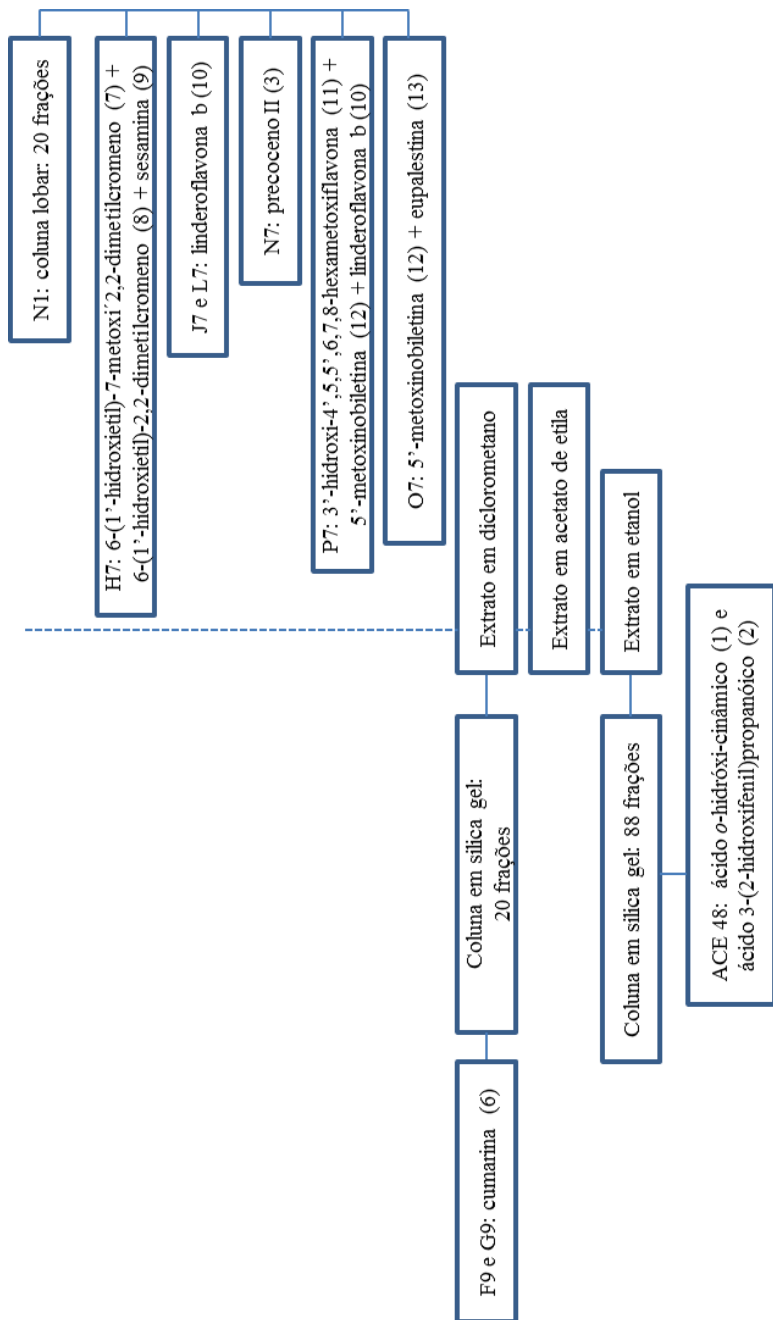
WIDODO, G. P.; SUKANDAR, E. Y. S.; ADNYANA, I. K. A  
coumarin from ageratum leaves (*Ageratum conyzoides* L.).  
**International Journal of Pharmacology**, v. 4, p. 56-59, 2008.

XU, T.; KONG, C.; HU, F. Allelopathy of *Ageratum conyzoides* III:  
Allelopathic effects of volatile oil from *Ageratum* on plants under  
different nutrient levels. **Yingyong Shengtai Xuebao**, v. 10, p. 748-  
750, 1999.

YAMAMOTO, L. A.; SOLDERA, J. C.; EMIM, J. A.; GODINHO, R.  
O.; SOUCCAR, C.; LAPA, A. J. Pharmacological screening of  
*Ageratum conyzoides* L. (Mentraso). **Memórias do Instituto Oswaldo  
Cruz**, v. 86, s. 2, p. 145-147, 1991.

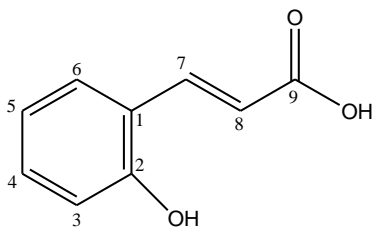
## APÊNDICE A – FLUXOGRAMA GERAL DO TRABALHO



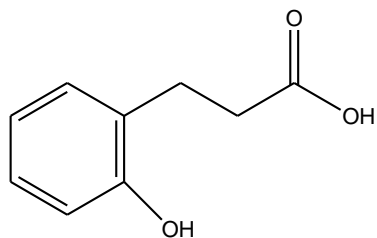




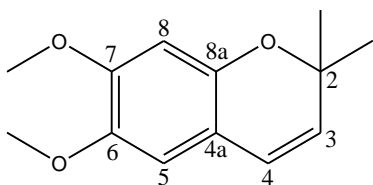
APÊNDICE B – ESTRUTURAS DAS SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS



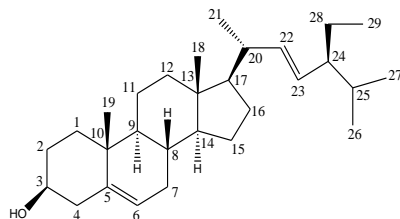
(1) Ácido *o*-hidróxi-cinâmico



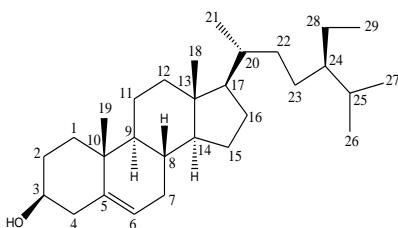
(2) Ácido 3-(2-hidróxifenil)propanoico



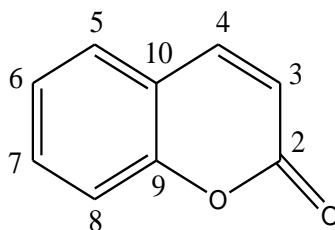
(3) Precoceno II



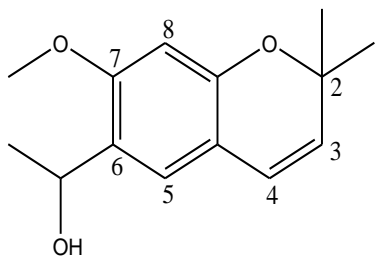
(4) Estigmasterol



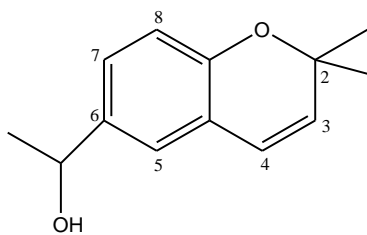
(5)  $\beta$ -sitosterol



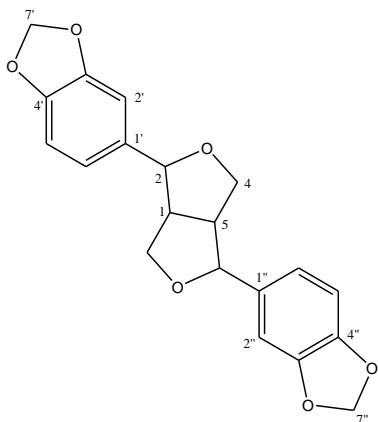
(6) Cumarina



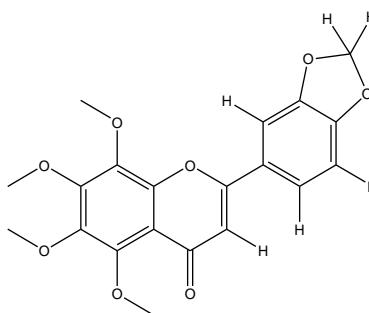
(7) 6-(1'-hidroxietil)-7-metoksi-2,2-dimetilcromeno



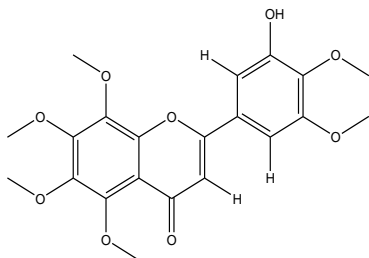
(8) 6-(1'-hidroxietil)-2,2-dimetilcromeno



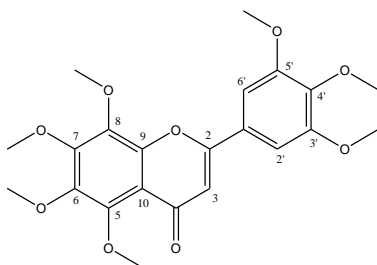
(9) Sesamina



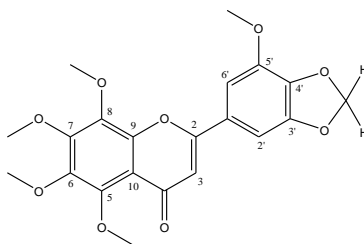
(10) Linderoflavona B



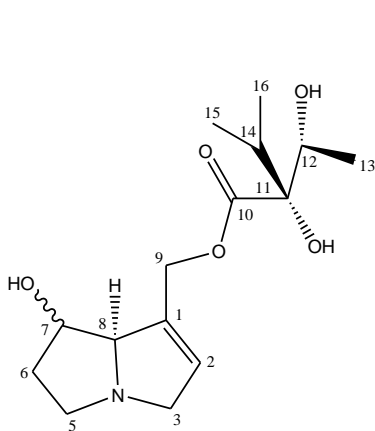
(11) 3'-hidroxi-4',5,5',6,7,8-hexametoksi-flavona



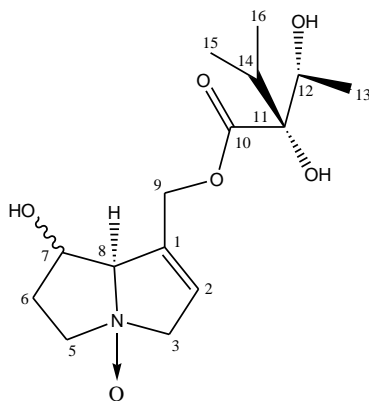
(12) 5'-metoxinobiletina



(13) Eupalestina



(14) Licopsamina



(15) Licopsamina N-óxido



## ANEXO – ARTIGO SUBMETIDO PARA A REVISTA FOODCHEMISTRY

Elsevier Editorial System(tm) for Food Chemistry  
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Pyrrolizidine alkaloids in the medicinal tea of *Ageratum conyzoides* (Asteraceae) Article Type: Research Article (max 7,500 words)  
Keywords: *Ageratum conyzoides*; Asteraceae; pyrrolizidine alkaloids; lycopsamine; chromenes; methoxylated flavonoids

Corresponding Author: Dr Maique Biavatti, Corresponding Author's Institution:  
First Author: Maique Biavatti

Order of Authors: Maique Biavatti; Cristiane Bosi; Raphael Grougnet; Nikolaos Lemonakis; Maria Halabalaki; Alexious Skaltsounis

Abstract: It is now well-recognized that the concept of no adverse effect and/or toxicity of natural products is an incorrect one; some plants traditionally used can present chronic toxicity. The well-established popular use of *Ageratum conyzoides* has led to its inclusion in the list of notified herbal drugs; a category of medicinal crude drugs created by the Brazilian Health Surveillance Agency. *Ageratum* belongs to the Eupatorieae tribe of the Asteraceae family, being described as containing the most toxic pyrrolizidine alkaloids (PAs). Water extracts of *A. conyzoides* harvested in South Brazil (commercial, blooming and non-blooming samples), and its XAD fractions, were analyzed by HPLC-HRMS, being detected six peaks corresponding to the PAs lycopsamine, dihydro-lycopsamine, acetyl- lycopsamine and their N-oxides. Lycopsamine and its N-oxide were the two major PAs (known hepatotoxins and tumorigens). To date, there are no established safety guidelines on PA-containing medicinal plants and their use in Brazil. Together with the PAs found by HPLC-HRMS, 13 phenolic known compounds were detected in the aqueous extract, particularly methoxylated flavonoids and chromenes, together with coumarin and simple phenolics. Systematic toxicological studies on *A. conyzoides* with accurate quantification of toxic PAs are warranted, as is monitoring its clinical use.

Cover Letter

To the Editor-in-chief of  
Food Chemistry

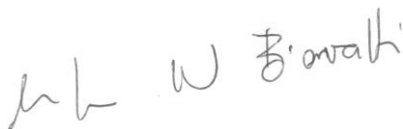
Florianópolis/SC, June 17th, 2012

Dear Editor,

Please find enclosed the manuscript entitled: "Pyrrolidizine alkaloids in the medicinal tea of *Ageratum conyzoides* (Asteraceae)", to be published in the Food Chemistry.

The manuscript has been revised by a native English speaker, please find the certificate attached.

I look forward to hearing from you, and remain at your disposal.

Handwritten signature in black ink, appearing to read "M. W. Biavatti".

Dr. Maique Weber Biavatti – maique@ccs.ufsc.br

Laboratório de Farmacognosia Departamento de Ciências Farmacêuticas Centro  
de Ciências da Saúde  
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC Campus  
Universitário/Trindade - 88040-900  
Florianópolis, SC – Brasil

---

5 Copper Chare  
Morpeth  
Northumberland  
United Kingdom  
NE61 1BS

June 16, 2011

To whom it may concern

I declare that the manuscript **Pyrrolizidine alkaloids in the medicinal tea of *Ageratum conyzoides* (Asteraceae)** has been edited and proofread by myself, a native English speaker with an MA in Translation Studies and ten years of experience in editing academic texts for publication. I can vouch that to the best of my knowledge, the language used in the text (grammar, syntax, spelling, etc.) is correct. I cannot vouch for the scientific content of the paper, since that is outside my area of expertise.

Yours Sincerely



Fiona Robson

MA Translation Studies, MA Information Science, BA Languages.

\*Highlights (for review)

Pyrrolidizine alkaloids in the medicinal tea of *Ageratum conyzoides*  
(Asteraceae)

Cristiane F. Bosi<sup>a</sup>, Raphael Grougnet<sup>b</sup>, Nikolaos Lemonakis<sup>c</sup>, Maria  
Halabalaki<sup>c</sup>, Alexios Leandros Skaltsounis<sup>c</sup>, Maique W. Biavatti<sup>a\*</sup>

1

2 <sup>a</sup>CIF, CCS, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis,  
3 SC, 88040-900 – Brazil.

4 <sup>b</sup>Laboratoire de Pharmacognosie, Faculté de Pharmacie, UMR  
5 CNRS 8638, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris cité, 4  
6 Avenue de l'Observatoire, F-75006 Paris, France.

7 <sup>c</sup>Department of Pharmacognosy and Natural Products Chemistry,  
8 Faculty of Pharmacy, National and Kapodistrian University of Athens,  
9 Panepistimioupolis Zografou, 15771, Athens, Greece

10

11

12

13

14

15

16 .



17

18 HIGHLIGHTS

19

20 1. The concept of no adverse effect and/or toxicity of natural products

21 is an incorrect one.

22

23 2. *Ageratum* is being described as containing the most toxic

24 pyrrolizidine alkaloids.

25

26 3. *Ageratum conyzoides* has a long history of medicinal use in

27 tropical countries.

28

29 4. Water extracts of *A. conyzoides* were analyzed by HPLC-HRMS

30

31 5. Six PAs were detected - Lycopsamine and its *N*-oxide are

32 hepatotoxic and tumorigens

33

\*Manuscript

Pyrrrolidizine alkaloids in the medicinal tea of *Ageratum conyzoides*  
(Asteraceae)

Cristiane F. Bosi<sup>a</sup>, Raphael Grougnet<sup>b</sup>, Nikolaos Lemonakis<sup>c</sup>, Maria  
Halabalaki<sup>c</sup>, Alexios Leandros Skaltsounis<sup>c</sup>, Maique W. Biavatti<sup>a\*</sup>

1

2 <sup>a</sup> CIF, CCS, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis,

3 SC, 88040-900 – Brazil.

4 <sup>b</sup> Laboratoire de Pharmacognosie, Faculté de Pharmacie, UMR

5 CNRS 8638, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris cité, 4

6 Avenue de l'Observatoire, F-75006 Paris, France.

7 <sup>c</sup> Department of Pharmacognosy and Natural Products Chemistry,

8 Faculty of Pharmacy, National and Kapodistrian University of Athens,

9 Panepistimioupolis Zografou, 15771, Athens, Greece

10

11

12

13

14

15

16 .

## 17 Abstract

18 It is now well-recognized that the concept of no adverse effect and/or  
19 toxicity of natural products is an incorrect one; some plants  
20 traditionally used can present chronic toxicity. The well-established  
21 popular use of *Ageratum conyzoides* has led to its inclusion in the list  
22 of notified herbal drugs; a category of medicinal crude drugs created  
23 by the Brazilian Health Surveillance Agency. *Ageratum* belongs to  
24 the Eupatorieae tribe of the Asteraceae family, being described as  
25 containing the most toxic pyrrolizidine alkaloids (PAs). Water extracts  
26 of *A. conyzoides* harvested in South Brazil (commercial, blooming  
27 and non-blooming samples), and its XAD fractions, were analyzed by  
28 HPLC-HRMS, being detected six peaks corresponding to the PAs  
29 lycopsamine, dihydro-lycopsamine, acetyl-lycopsamine and their *N*-  
30 oxides. Lycopsamine and its *N*-oxide were the two major PAs (known  
31 hepatotoxins and tumorigens). To date, there are no established  
32 safety guidelines on PA-containing medicinal plants and their use in  
33 Brazil. Together with the PAs found by HPLC-HRMS, 13 phenolic  
34 known compounds were detected in the aqueous extract, particularly  
35 methoxylated flavonoids and chromenes, together with coumarin and  
36 simple phenolics. Systematic toxicological studies on *A. conyzoides*  
37 with accurate quantification of toxic PAs are warranted, as is  
38 monitoring its clinical use.

39

40 Keywords- *Ageratum conyzoides*; Asteraceae; pyrrolizidine alkaloids;  
41 lycopsamine; chromenes; methoxylated flavonoids

## 42 1. Introduction

43 The *Ageratum* genus comprises ca 30 species that are not yet well  
44 investigated. The widespread neotropical species *Ageratum*  
45 *conyzoides* L. is an annual aromatic neotropical plant that is  
46 considered an invasive and cosmopolite weed in tropical areas, and  
47 is very common in Brazil. Its peculiar odour has been likened to the  
48 smell of goats, giving rise to the popular name of *goatweed*. In Brazil  
49 it has several names, such as mentrasto, maria-preta, picão-branco;  
50 picão-roxo, erva-de-são-joão, erva-de-são-josé, erva-de-santa-lúcia.  
51 *Ageratum conyzoides* has a long history of medicinal use in several  
52 tropical countries around the world, and has a plethora of indications,  
53 from skin diseases to mental disorders and infectious diseases  
54 (Okunade, 2002).

55 Specifically in Brazil, its aerial parts are widely used (internally and  
56 externally, fresh or dried, in tinctures or infusions) for their supposed  
57 analgesic and anti-inflammatory properties, especially to treat  
58 menstrual cramps, arthritis, rheumatism, and diarrhea (Lorenzi and  
59 Matos, 2008; Okunade, 2002).

60 The well-established popular use of this plant has led to its inclusion  
61 in the list of notified herbal drugs, a category of medicinal crude  
62 drugs created by the Brazilian Health Surveillance Agency – ANVISA  
63 (RDC No. 10, March 9<sup>th</sup>, 2010). From now on, commercialization of  
64 this crude drug (aerial parts crushed or powdered) is permitted  
65 without medical prescription, for the preparation of infusions.

66 Scientific publications reporting bioactivity have been carried mainly  
67 on its essential oil, despite the constituents that have been described  
68 for *A. conyzoides*, such as pyrrolizidine alkaloids (PAs), isolated from  
69 plants grown in Kenya (Wiedenfeld & Roder, 1991). These alkaloids  
70 are potentially hepatotoxic, and acute intoxications caused by PAs  
71 are characterized by haemorrhagic liver necrosis. Long-term  
72 exposure causes hepatic megalocytosis and veno-occlusive disease  
73 (to a lesser extent in the lungs), fatty liver degeneration and cirrhosis,  
74 and proliferation of the biliary tract epithelium. Moreover, many PAs  
75 are genotoxic and carcinogenic in rodents (Chen & Huo, 2010).  
76 Since there is no published paper that confirms the presence of PAs  
77 in the Brazilian *Ageratum conyzoides*, this work investigated the  
78 presence of PAs in the tea (aqueous extract) obtained by infusion of  
79 harvested plants (with and without flowers) and with a commercial  
80 sample (prepared according to the ANVISA procedure). It also aimed  
81 to isolate PAs and further constituents present in this medicinal plant.

82

## 83 2. Experimental methods

84

### 85 2.1. *Plant material*

86 The whole plant was harvested from the Garden of Medicinal Plants  
87 of the University Hospital of the Universidade Federal de Santa  
88 Catarina and from vacant lots near Praia Brava Beach, Florianópolis,  
89 SC. A voucher was identified by the botanist Renato Záchia and is  
90 deposited in the Herbarium of the Universidade Federal de Santa

91 Maria (No. SMDB 13.138). A commercial sample was purchased  
92 from a Pharmacy in Ouro Preto, MG.

93

#### 94 *2.2 Plant processing and extraction*

95 The aerial parts of blooming and non-blooming species were  
96 separated and air-dried at 50 °C (6 days), then crushed, and stored  
97 in a refrigerator (4 °C). The aqueous extract (infusion) was prepared  
98 using 3 g of crude drug to 150 ml of boiling water (according to RDC  
99 10/10, ANVISA). The resulting aqueous extract was freeze dried and  
100 then analysed by NMR and HPLC-HRMS. The following three  
101 samples were prepared: Blooming aerial parts (BS), non-blooming  
102 aerial parts (NBS), commercial sample (CS).

103 In order to isolate the main compounds, a selective extraction of the  
104 crude drug with flowers (1 kg) was performed with solvents of  
105 increasing polarity, using *n*-hexane (28 g of *n*-hexane extract),  
106 dichloromethane (34 g of dichloromethane extract), ethyl acetate (3 g  
107 of ethyl acetate extract) and ethanol (11 g of ethanol extract). From  
108 *n*-hexane extract, the following known compounds were obtained  
109 (spectral data in accordance with the literature):  $\beta$ -sitosterol and  
110 stigmasterol (Kongduang, Wungsintaweekul, & De-Eknamkul, 2008),  
111 coumarin (**7**) (Kupriyanova, 1997), precocene II (**8**) (Adebayo, Zeng,  
112 Zhang, JL, Akindahunsi, & Tan, 2010), enecalol and  
113 demethoxyencecalol (**9** and **10**) (González, Aguiar, Grillo, Luis,  
114 Rivera, & Calle, 1991), sesamin (**11**) (Moazzami, Andersson, &  
115 Kamal-Eldin, 2007), linderoflavone B (**12**) (Saxena & Shrivastava,

116 1994), 3'-hydroxy-5,6,7,8,4',5'-hexamethoxyflavone (**13**) (Herz &  
117 Kulanthaivel, 1982), 5'-methoxynobiletin (**14**) (Le-Van & Van Cuong  
118 Pham, 1979), and eupalestin (**15**) (Herz, Govindan, Riess-Maurer,  
119 Kreil, Wagner, Farkas, et al., 1980). From the ethanol extract, the  
120 following were obtained: 2-Hydroxycinnamic and 2-  
121 dihydrohydroxycinnamic acids (**16** and **17**) (Gerothanssis,  
122 Exarchou, Lagouri, Troganis, Tsimidou, & Boskou, 1998).  
123

#### 124 2.3 *Pyrrrolizidine alkaloids (PAs) extraction procedures*

125 The method described by (Wiedenfeld & Roder, 1991) was  
126 reproduced in an attempt to obtain the alkaloids previously isolated  
127 from *A. conyzoides* (harvested in Kenya), but without success.  
128 Additionally, traditional and improved methods for PA extraction were  
129 used, but no alkaloids were isolated (Frahn, Culvenor, & Mills, 1980)  
130 (Mroczek, Widelski, & Główniak, 2006).

131

#### 132 2.4 *Aqueous extract fractionation*

133 In order to screen the chemical composition of the medicinal  
134 aqueous extract of *A. conyzoides*, CC fractionation was performed  
135 with Amberlite resin (Rohm and Hass Co) XAD-4 (230 g) and XAD-7  
136 (250 g), using the hot aqueous extract (10 L), prepared according to  
137 the Brazilian official method (item 2.2) (Figure 2). 21 g of the non-  
138 retained extract in the resin XAD-7 was solubilized in water,  
139 partitioned with butanol, and chromatographed in silica gel with a  
140 hexane-ethyl acetate-methanol gradient, resulting in the identification  
141 of two compounds in the mixture (1.7 g of 2-hydroxycinnamic acid, **16**  
142 and 2-hydroxydihydrocinnamic acid, **17**). The retained tea in XAD-4

143 (eluted with methanol) afforded 3.6 g, which was partitioned with  
144 dichloromethane (68.8 mg) and chromatographed in silica gel with a  
145 hexane-ethyl acetate-methanol gradient, furnishing 5.3 mg of  
146 compounds **16** and **17** and 8.5 mg of precocene II (**8**).

147 All other fractions obtained, shown in Figure 2, were freeze-dried and  
148 analyzed by UHPLC-HRMS: XAD 4 aqueous fraction, XAD 4  
149 aqueous fraction after partition with dichloromethane, XAD 7  
150 aqueous fraction, XAD 7 aqueous fraction after partition with ethyl  
151 acetate, and aqueous extract not retained in XADs.

152

### 153 2.5 Equipment

154 NMR data for the isolated compounds were recorded on Bruker  
155 AVANCE 400 and AVANCE III 400 NMR spectrometers, both  
156 operating at 9.4 T.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  nuclei were observed at 400.13 and  
157 100.61 MHz, respectively. The spectrometers were equipped with  
158 either a 5 mm multinuclear direct detection probe with z-gradient or a  
159 5 mm multinuclear inverse detection probe with z-gradient. One-bond and  
160 long-range  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  correlations from HSQC and HMBC NMR  
161 experiments were performed with average coupling constants  $^1J_{(\text{H,C})}$   
162 and  $^{\text{LR}}J_{(\text{H,C})}$  optimized for 140 and 8 Hz, respectively. The NMR  
163 chemical shifts are given in ppm related to TMS signal at 0.00 ppm  
164 as internal reference. The UHPLC-ESI-(+)-HRMS and UHPLC-  
165 ESI(+)-HRMS/MS analyses were performed using the Accela system



166 (San Jose, CA, USA) equipped with a binary pump, autosampler,  
167 online vacuum degasser, and temperature-controlled column  
168 compartment. High resolution mass spectrometry was performed on  
169 a hybrid LTQ-Orbitrap XL Discovery mass spectrometer equipped  
170 with an ESI probe (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA).

171

## 172 2.6 UHPLCESI(+)-HRMS & HRMS/MS analysis of

### 173 extracts/isolated compounds

174 The solvents used in this study were of LC-MS grade, purchased  
175 from Fluka/Riedel-de Haën (St. Gallen, Switzerland). The freeze-  
176 dried extracts were stored in the dark at 4 °C prior to preparation for  
177 LC-MS, being diluted at the moment of analysis in MeOH at a final  
178 concentration of 100 µg/mL. An Express Gold C18 100 x 2.1, 3 µm  
179 reversed phase column (Thermo Scientific, Brehmen, Germany) was  
180 used at a flow rate of 300 µL/min for the chromatographic separation.  
181 The mobile phase consisted of solvents A: water, 0.1% formic acid  
182 and B: ACN 0.1% formic acid. A gradient method (total run time of 20  
183 min) was used for the profiling of the samples as follows: 0 to 5 min:  
184 5% B, 5 to 7 min: 25% B, 7 to 14 min: 95% B, 14 to 16 min: 95% B,  
185 16 to 17 min: 5% B and 17 to 20 min: 5% B. The injection volume  
186 was 2 µL. The hybrid high resolution mass spectrometer (LTQ-  
187 Orbitrap Discovery XL) was operated in positive ion mode under the  
188 following optimized conditions: capillary temperature, 270°C; capillary  
189 voltage, 20 V; tube lens, 110 V; source voltage, 3.5 kV; sheath gas  
190 flow, 40 arb. units; aux gas flow, 20 arb. units. Analysis was  
191 performed in the full scan mode, using a resolution of 30 000 and the  
192 scan range was set to  $m/z$  100 -1000.

193 For the HRMS/MS analysis, a “data-dependant” method was used,  
194 enabling the fragmentation of the three highest peaks detected for  
195 each scan. Two main scan events were performed successively,  
196 using only Orbitrap analyzers, the first consisting of a full scan (3  
197 microscans, 50000 injection time and 50-1000  $m/z$  scan range) and  
198 the second consisting of three HRMS/MS acquisitions to of the three  
199 most intense peaks (2 microscans, 10000 injection time, 45V CID /  
200 Q:0.25).

201

202

### 203 3 *Results and Discussion*

204 It is common knowledge that the use of herbal plants as natural  
205 remedies, functional foods, and dietary supplements for health care  
206 has been increasing worldwide. Market estimates suggest that the  
207 rate of growth in sales of traditional medicinal products in recent  
208 years is between 5% and 18% per annum (Kohler & Baghdadi-  
209 Sabeti, 2011). It is now well-recognized that the concept of no  
210 adverse effect and/or toxicity of natural products is an incorrect one  
211 (Li, Xia, Ruan, Fu, & Lin, 2011). It is highly possible that PA-  
212 containing plants are the most common poisonous plants affecting  
213 livestock, wildlife, and humans, and are probably also the leading  
214 hepatotoxic and tumorigenic phytochemicals associated with human  
215 and animal diseases.

216 Consequently, it is appropriate and imperative to identify plants and  
217 herbal products that contain toxic PAs, and to assess the risk posed  
218 by exposure to these substances present in herbal products  
219 (Molyneux, Gardner, Colegate, & Edgar, 2011). It has been reported  
220 that 3% of all flowering plants contain PAs, but they are primarily  
221 found in members of three plant families: Asteraceae, Boraginaceae  
222 and Fabaceae (Fu, Yang, Xia, Chou, Cui, & Lin, 2002).

223 *Ageratum* belongs to the Eupatorieae tribe of the Asteraceae family,  
224 the Eupatorieae and Senecioneae tribes being the two described as  
225 containing the most toxic PA compounds; 1,2-dehydropyrrolizidine  
226 ester alkaloids (dehydroPAs, see in lycopsamine (**1**) and derivatives)  
227 and their N-oxides. Worldwide, human hepatotoxicity due to 1,2-  
228 dehydropyrrolizidine alkaloids is mostly associated with the  
229 consumption of herbal remedies. In mammals, ingested dehydroPAs  
230 are oxidised in the liver by mixed-function oxidases (cytochrome  
231 P450s) to pyrrolic derivatives. The pyrrolic ring system renders the C-  
232 7 and/or C-9 position highly electrophilic and capable of reacting with  
233 tissue nucleophiles, concomitant with cleavage of the ester  
234 substituents, thereby binding to proteins and/or nucleic acids. This, in  
235 turn, can alter cell function, leading to cell damage or cell death  
236 (Molyneux, Gardner, Colegate, & Edgar, 2011).

237 The presence of dehydroPAs and its N-oxides have been reported in  
238 *Ageratum conyzoides* harvested in Kenya (Wiedenfeld & Roder,  
239 1991), Ethiopia (Wiedenfeld, 2011) and Hawaii (Molyneux, Gardner,  
240 Colegate, & Edgar, 2011). PAs and other toxins occur in low  
241 concentrations, and as predicted by the shifting defense hypothesis,  
242 toxin concentrations are significantly higher in invasive weed

243 individuals than in native individuals (Doorduyn & Vrieling, 2011).  
244 *Ageratum* is native to tropical America, being highly invasive,  
245 especially under drought conditions outside of its natural range. The  
246 shifting defense hypothesis may help explain why in this work, it was  
247 not possible to isolate the alkaloids using the specific method for  
248 these dehydro PAs, and also using the same method as that  
249 previously used for the same species (item 2.3).

250 Additionally, water extracts of *A. conyzoides* harvested in South  
251 Brazil (samples BS, NBS, CS), and its XAD fractions, were analyzed  
252 by HPLC-HRMS in full scan mode to investigate the presence of the  
253 previously isolated dehydro PAs isomers lycopsamine and  
254 echinatine, and other biogenetically related PAs, such as acetyl-  
255 lycopsamine, dihidrolycopsamine and their *N*-oxide forms.

256 In the full scan HPLC-HRMS analysis, there were only a few peaks  
257 representing the relatively higher content of components in the TIC  
258 (Figure 3, 1<sup>st</sup> line); however, in the extracted ion chromatograms  
259 (XIC, 2<sup>nd</sup> to 7<sup>th</sup> lines in Figure 3), six PAs were detected. In order to  
260 verify their identities, HRMS/MS were recorded, generated by a  
261 newly developed data compound-dependent method for PAs. The  
262 resulting retention times, exact mass of protonated molecular ions  
263 and characteristic fragment ions are summarized in Tables 1 and 3.

264 In the full scan (TIC), six peaks with protonated molecular ions  
265 ( $[M+H]^+$ ) were observed at  $m/z$  300.1805 (3.05 min, lycopsamine; **1**),

266 316.1755 (3.36 min, lycopsamine *N*-oxide, **2**), 302.1962 (3.38 min,  
267 dihydro-lycopsamine, **3**), 318.1911 (3.75 min, dihydro-lycopsamine  
268 *N*-oxide, **4**), 342.1911 (4.62 min, acetyl-lycopsamine, **5**), and  
269 358.1860 (4.83 min, acetyl-lycopsamine *N*-oxide, **6**). In the  
270 HRMS/MS experiment, these six peaks showed the characteristic  
271 retronecine-type specific diagnostic fragment ion at 138 m/z (Table  
272 3). Of these six alkaloids identified, only two peaks were related to  
273 the dihydroPA form of lycopsamine and its *N*-oxide, and were not  
274 characterized as carcinogenic or hepatotoxic. It is important to note  
275 that together with the above mentioned PAs, several isomers, mainly  
276 of dihydroPA, were also present (Figure 3, Table 1).

277 Few peaks were observed in the total ion chromatogram (TIC),  
278 confirming that the content of PAs in the samples is low (Figure 3).  
279 Lycopsamine and its *N*-oxide were the two major PAs (known  
280 hepatotoxins and tumorigens), while the other PAs identified were  
281 only minor ingredients in the plant. Semi-quantitative information is  
282 possible by comparison between the three samples in Table 1. It was  
283 clearly observed that in the non-blooming sample, the dihydro and *N*-  
284 oxide forms were predominant, but toxic dehydroPAs were also  
285 present, contrary to the expectation that the plant would only produce  
286 these alkaloids when in bloom, or only in the flowers, due to the  
287 sequestration of these alkaloids by butterflies (Hartmann & Ober,  
288 2000). Moreover, rhizomatous propagation of *A. conyzoides* makes it  
289 very difficult to physically separate the non-blooming from blooming  
290 specimens. Despite the recommendation of ANVISA (Brazilian  
291 Health Surveillance Agency) regarding the commercialization of the  
292 non-blooming plant, only samples containing flowers were

293 commercially available. In this work, we used only non-rhizomatous  
294 specimens for the non-blooming sample. Indeed, semi-quantitative  
295 comparison with the blooming and commercial samples showed that  
296 their alkaloids contents were very similar.

297 Therefore, in the present study, hepatotoxic and tumorigenic PAs  
298 and *N*-oxide PAs were identified in *A. conyzoides*. The use of this  
299 plant and its extracts for medicinal preparations could potentially be  
300 harmful to human health, despite the low content of these  
301 substances in plants harvested in Brazil; chronic exposure to these  
302 toxic PAs can present a risk of liver damage. In some countries,  
303 its clinical use is only recommended within certain limits. For example,  
304 in Germany, it is recommended that daily exposure to PAs should be  
305 no more than 0.1 mg for less than six weeks per year; and in  
306 Belgium, the limit for PAs in plants is 1 ppm (1 mg per gram of plant)  
307 (Chen & Huo, 2010). Systematic toxicological studies on *A.*  
308 *conyzoides* with accurate quantification of toxic PAs in plants are  
309 warranted, as is monitoring the clinical use of this drug. To date,  
310 there are no established safety guidelines on PA-containing  
311 medicinal plants and their use in Brazil.

312 Together with the PAs found by HPLC-HRMS, 13 phenolic known  
313 compounds were detected in the aqueous extract, particularly  
314 methoxylated flavonoids and chromenes, together with coumarin and  
315 simple phenolics. Table 2 shows the PAs distributed in various

316 fractions, similar to the flavonoids after XAD fractionation, which was  
317 performed as shown in Figure 2. The possible role of these abundant  
318 phenolics in the medicinal qualities of this plant should also be  
319 explored, for both beneficial and adverse effects.

320

321

322 Acknowledgements

323 The authors are grateful to CNPq, UFSC and CHEMBIOFIGHT  
324 (PIRSES-GA-2010-269301) for their financial support.

Table 1. LC-HRMS data for compounds identified in the CS, BS and NBS aqueous preparations

Compound	LC-HRMS analysis					Identification		Preparations	
	$t_R$ (min)	Experimental $m/z$	Calculated $m/z$	Delta (ppm)	RDBE (ESI+)	Molecular Formula	CS <sup>1</sup>	BS <sup>2</sup>	NBS <sup>3</sup>
1	3.05	300.1805	300.1811	1.768	3.5	C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> O <sub>2</sub> N	++	+++	+
2	2.90		302.1967	1.425					+
2a	3.38	302.1962	302.1967	1.458	2.5	C <sub>11</sub> H <sub>17</sub> O <sub>3</sub> N	+	+	+
2b	4.03		302.1966	1.425					+++
3	4.65	342.1911	342.1917	1.742	4.5	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> O <sub>3</sub> N	+	+++	++
3	3.36	316.1755	316.1760	1.569	3.5	C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> O <sub>2</sub> N	+++	++	+
4	3.21		318.1915	1.307					+
5a	3.75	318.1911	318.1915	1.244	2.5	C <sub>11</sub> H <sub>17</sub> O <sub>2</sub> N	++	+	+++
5b	3.94		318.1915	1.244					+++
6	4.83	358.1860	358.1866	1.539	4.5	C <sub>13</sub> H <sub>17</sub> O <sub>3</sub> N	++	+	+++
6a	11.99		358.1869	2.489					+++
7	12.50	417.1180	417.1174	-1.579	11.5	C <sub>19</sub> H <sub>27</sub> O <sub>5</sub>	+	+	+
8	11.87	433.1493	433.1486	-1.729	10.5	C <sub>22</sub> H <sub>35</sub> O <sub>5</sub>	+	+	+
9	4.83	205.1223	205.1219	1.835	5.5	C <sub>12</sub> H <sub>19</sub> O <sub>2</sub>	+	+	+
10	12.70	235.1329	235.1327	-0.940	5.5	C <sub>14</sub> H <sub>19</sub> O <sub>2</sub>	+	+	+
12	12.66	167.0703	167.0700	-1.680	4.5	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> O <sub>2</sub>	+	+	+
13	10.95	163.1117	163.1113	-2.830	4.5	C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> O	+	-	-
14	5.96	223.1329	223.1324	-2.111	4.5	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> O <sub>2</sub>	-	-	-
15	10.66	419.1337	419.1336	-0.116	10.5	C <sub>21</sub> H <sub>33</sub> O <sub>5</sub>	+	+	+
16	11.88	387.1074	387.1065	-2.413	11.5	C <sub>22</sub> H <sub>35</sub> O <sub>5</sub>	+	+	+
17	7.49	147.0441	147.0437	-2.761	6.5	C <sub>9</sub> H <sub>13</sub> O <sub>2</sub>	+	+	+
18	12.14	221.1172	221.1169	-1.406	5.5	C <sub>12</sub> H <sub>19</sub> O <sub>2</sub>	-	+	+
19	11.41	403.1387	403.1392	1.106	10.5	C <sub>19</sub> H <sub>27</sub> O <sub>5</sub>	+	+	+
20	10.26	389.1231	389.1239	2.020	10.5	C <sub>22</sub> H <sub>35</sub> O <sub>5</sub>	+	-	-

1 Commercial sample

2 Blooming sample

3 Non-blooming sample



Table 2. LC-HRMS data of compounds identified in XAD fractions

Identification	Samples				Not retained <sup>5</sup>
	XAD4A <sup>1</sup>	XAD4AG <sup>2</sup>	XAD7A <sup>3</sup>	XAD7AG <sup>4</sup>	
Lycopsamine	+	+	+	+	+
Dihydro-Lycopsamine	+	+	+	+	-
Acetyl -lycopsamine	-	-	-	+	-
Lycopsamine- <i>N</i> -oxide	+	+	+	+	+
opsamine- <i>N</i> - oxide	-	-	-	+	-
opsamine- <i>N</i> - oxide	-	+	+	+	-
Eupalestin	+	+	-	+	+
5'-Methoxynobiletin	+	+	+	+	+
Demethoxyencecalol	-	-	-	-	-
Encecalol	-	-	-	-	-
ydrocinnamic acid	+	+	-	-	-
2,2-Dimethylchromane	-	-	-	-	-
3,4-Dihydroprecocene II	-	-	-	+	-
-Hydroxy-5,6,7,8,4',5'-hexamethoxyflavone	-	+	+	-	-
Linderoflavone B	+	+	+	+	+
Coumarin	-	+	+	+	-
Precocene II	-	-	-	-	-
5,6,7,3',4',5'-Hexamethoxyflavone	+	+	+	+	+
Ageconyflavone C	-	+	-	-	-

<sup>1</sup> XAD 4 aqueous fraction

<sup>2</sup> XAD 4 aqueous fraction after partition with dichloromethane

<sup>3</sup> XAD 7 aqueous fraction

<sup>4</sup> XAD 7 aqueous fraction after partition with ethyl acetate

<sup>5</sup> Aqueous extract not retained in XADs

Table 3. HRMS/MS data of major PAs found in *Ageratum conyzoides* aqueous extract

Compounds	Measured $m/z$ [M+H] <sup>+</sup>	Main fragment ions $m/z$ (RDB)				
		282.1704 (3.5)	156.1019 (2.5)	138.0912 (3.5)	172.0967 (2.5)	138.0912 (3.5)
Lycopsamine	300.1805	282.1704 (3.5)	156.1019 (2.5)	138.0912 (3.5)		
Dihydro-Lycopsamine	302.1962	138.0911 (3.5)				
Acetyl Lycopsamine	342.1911	282.1700 (4.5)	138.0912 (3.5)			
Lycopsamine N-oxide	316.1755	298.1647 (4.5)	272.1495 (3.5)	226.1439 (3.5)	172.0967 (2.5)	155.0939 (3.0)
Dihydro Lycopsamine N-oxide	318.1911	300.1802 (3.5)	274.1647 (2.5)	174.1121 (1.5)	138.0909 (3.5)	
Acetyl Lycopsamine N-oxide	358.1860	177.0907 (5.5)				

Captions to figures

**Fig. 1** – Pyrrolizidine alkaloids and main phenolic compounds identified in *Ageratum conyzoides* aqueous extract.

**Fig. 2** – Flow chart of the *Ageratum conyzoides* aqueous extract fractionation using Amberlite XAD4 and XAD7 resins.

**Fig. 3** - Total ion chromatogram and extracted peaks obtained for the three analysed samples of *Ageratum conyzoides* aqueous extract together with the respective extracted ion chromatograms (XIC), with several PAs detected.

## References

- Adebayo, H., Zeng, G. Z., Zhang, Y. M., Ji, C. J., Akindahunsi, A. A., & Tan, N. H. (2010). Toxicological evaluation of precocene II isolated from *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae) in Sprague Dawley rats. *African Journal of Biotechnology*, 9(20), 2938-2944.
- Chen, Z., & Huo, J. R. (2010). Hepatic veno-occlusive disease associated with toxicity of pyrrolizidine alkaloids in herbal preparations. *Neth J Med*, 68(6), 252-260.
- Doorduyn, L. J., & Vrieling, K. (2011). A review of the phytochemical support for the shifting defence hypothesis. *Phytochemistry Reviews*, 10(1), 99-106.
- Frahn, J. L., Culvenor, C. C. J., & Mills, J. A. (1980). Preparative separation of the pyrrolizidine alkaloids, intermedine and lycopsamine, as their borate complexes. *Journal of Chromatography A*, 195(3), 379-383.
- Fu, P. P., Yang, Y. C., Xia, Q. S., Chou, M. W., Cui, Y. Y., & Lin, G. (2002). Pyrrolizidine alkaloids - Tumorigenic components in Chinese herbal medicines and dietary supplements. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(4), 198-211.
- Gerothanassis, I., Exarchou, V., Lagouri, V., Troganis, A., Tsimidou, M., & Boskou, D. (1998). Methodology for identification of phenolic acids in complex phenolic mixtures by high-resolution two-dimensional nuclear magnetic resonance. Application to methanolic extracts of two oregano species. *Journal of agricultural and food chemistry*, 46(10), 4185-4192.
- González, A. G., Aguiar, Z. E., Grillo, T. A., Luis, J. G., Rivera, A., & Calle, J. (1991). Chromenes from *Ageratum conyzoides*. *Phytochemistry*, 30(4), 1137-1139.
- Hartmann, T., & Ober, D. (2000). Biosynthesis and metabolism of pyrrolizidine alkaloids in plants and specialized insect herbivores. *Biosynthesis*, 207-243.
- Herz, W., Govindan, S. V., Riess-Maurer, I., Kreil, B., Wagner, H., Farkas, L., & Strelisky, J. (1980). Isolation and synthesis of two new flavones from *Conoclinium coelestinum*. *Phytochemistry*, 19(4), 669-672.
- Herz, W., & Kulanthaivel, P. (1982). Flavones from *Eupatorium leucolepis*. *Phytochemistry*, 21(9), 2363-2366.
- Kohler, J. C., & Baghdadi-Sabeti, G. (2011). THE WORLD MEDICINES SITUATION 2011.
- Kongduang, D., Wungsintaweekul, J., & De-Eknamkul, W. (2008). Biosynthesis of  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol proceeds exclusively via the mevalonate pathway in cell suspension cultures of *Croton stellatopilosus*. *Tetrahedron Letters*, 49(25), 4067-4072.
- Kupriyanova, G. (1997). NMR studies of the electronic structure of coumarins. *Journal of structural chemistry*, 38(3), 408-414.
- Le-Van, N., & Van Cuong Pham, T. (1979). Two new flavones from *Eupatorium coelestinum*. *Phytochemistry*, 18(11), 1859-1861.

- Li, N., Xia, Q., Ruan, J., Fu, P. P., & Lin, G. (2011). Hepatotoxicity and tumorigenicity induced by metabolic activation of pyrrolizidine alkaloids in herbs. *Curr Drug Metab*, 12(9), 823-834.
- Moazzami, A. A., Andersson, R. E., & Kamal-Eldin, A. (2007). Quantitative NMR analysis of a sesamin catechol metabolite in human urine. *The Journal of nutrition*, 137(4), 940-944.
- Molyneux, R. J., Gardner, D. L., Colegate, S. M., & Edgar, J. A. (2011). Pyrrolizidine alkaloid toxicity in livestock: a paradigm for human poisoning? *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 28(3), 293-307.
- Mroczek, T., Widelski, J., & Głowniak, K. (2006). Optimization of extraction of pyrrolizidine alkaloids from plant material. *Chemia analityczna*, 51(4), 567-580.
- Okunade, A. L. (2002). *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae). *Fitoterapia*, 73(1), 1-16.
- Saxena, V., & Shrivastava, P. (1994). 4'-hydroxy-3, 6-dimethoxy-6", 6"-dimethyl chromeno (7, 8, 2", 3") flavone from *Citrus reticulata* cv blanco. *Phytochemistry*, 36(4), 1039-1041.
- Wiedenfeld, H. (2011). Plants containing pyrrolizidine alkaloids: toxicity and problems. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 28(3), 282-292.
- Wiedenfeld, H., & Roder, E. (1991). Pyrrolizidine Alkaloids from *Ageratum conyzoides*. *Planta Med*, 57(6), 578-579.

Figure 1

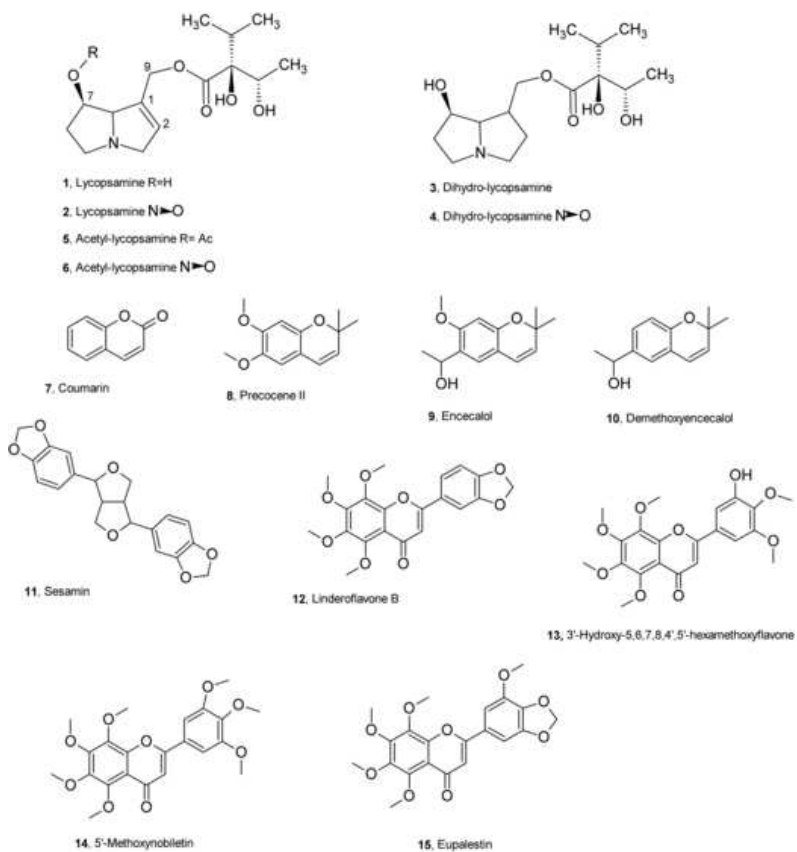


Figure 2

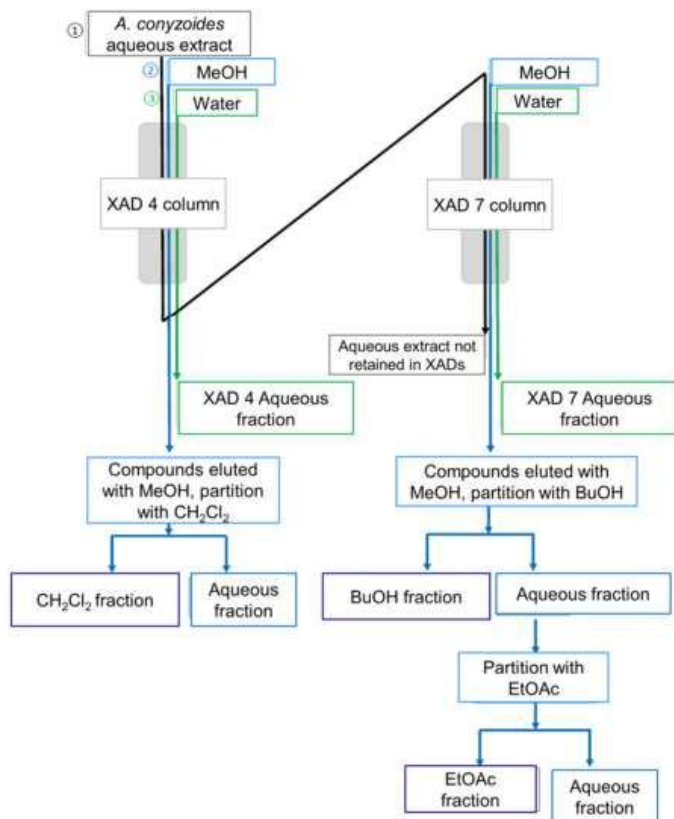


Figure 3

