

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Perfil metabólico, desreplicação de extratos de *Aldama la Llave* (Asteraceae) e  
inibição das enzimas cicloxigenase e lipoxigenase**

Danniela Príscylla Vasconcelos Faleiro

Ribeirão Preto  
2014

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Perfil metabólico, desreplicação de extratos de *Aldama la Llave* (Asteraceae) e  
inibição das enzimas cicloxigenase e lipoxigenase**

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-graduação em Ciências  
Farmacêuticas para a obtenção do Título  
de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais  
e Sintéticos

**Orientada:** Danniela Príscylla  
Vasconcelos Faleiro

**Orientador:** Prof. Dr. Fernando Batista da  
Costa

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas em 21/08/2014. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto  
2014

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

### FICHA CATALOGRÁFICA

Faleiro, Danniela Príscylla Vasconcelos  
Perfil metabólico, desreplicação de extratos de *Aldama* La Llave (Asteraceae) e inibição das enzimas cicloxigenase e lipoxigenase. Ribeirão Preto, 2014.  
61 p.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Da Costa, Fernando Batista

1. *Aldama*; 2. Potencial anti-inflamatório; 3. Métodos *in silico*

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Danniela Príscylla Vasconcelos Faleiro  
Perfil metabólico, desreplicação de extratos de *Aldama La Llave* (Asteraceae) e  
inibição das enzimas cicloxigenase e lipoxigenase

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Farmacêuticas para obtenção do Título de  
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais  
e Sintéticos.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Batista da  
Costa

Aprovada em: 21 de agosto de 2014.

### Banca Examinadora

Prof. Dr. Fernando Batista da Costa

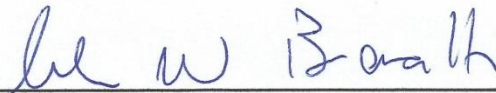
Instituição: FCFRP-USP. Assinatura: \_\_\_\_\_



Profa. Dra. Maique Weber Biavatti

Instituição: UFSC. Assinatura: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_



Prof. Dr. Antônio Eduardo Miller Crotti

Instituição: FFCLRP-USP. Assinatura: \_\_\_\_\_



***“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível,  
em breve estará fazendo o impossível”***

**(São Francisco de Assis)**

**Aos meus pais Adair e Divina, e à minha irmã  
Alynnne, com amor, admiração, carinho e gratidão  
por toda compreensão e incentivo  
ao longo do período de elaboração desse trabalho.**

Dedico

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Adair e Divina, e à minha irmã Alynne, pelo amor incondicional e confiança, os que me fizeram ter forças sempre para levantar a cabeça e seguir em frente. Vocês são para mim o ontem, o hoje e o sempre. Meu porto seguro, amo muito vocês.

Aos meus queridos avós paternos Armindo, *in memoriam*, e Orlanda; e aos maternos Geraldo e Geralda. Sabedoria, afeto e dedicação traduzem o que os senhores representam para mim.

À minha linda família, todos os meus tios, primos, padrinhos e meu cunhado Kleyton, os quais transmitem o amor e a alegria quando estamos juntos ou distantes, pois crescemos juntos, enfrentamos os desafios da vida e torcemos pela felicidade de cada um sempre juntos. Esse período longe de vocês foi árduo, porém possível pelo fato de ter a certeza que vocês sempre me aguardam com muito amor. Amo imensamente cada integrante da minha família.

Ao meu orientador Prof. Dr. Fernando Batista da Costa, pela oportunidade de trabalhar ao seu lado e por ser o maior incentivador na superação dos meus limites.

Ao grupo AsterBioChem, Rejane, Daniela, Federico, Rosana, Bruno, Gari, Felipe, Amanda, Ricardo, Marcelo, Anny e Tiago, pela parceria e trocas de conhecimentos em tantas reuniões proveitosas que tivemos. De forma muito especial à Rejane Barbosa de Oliveira, Federico Padilla e Rosana Casoti. A Rê eu devo agradecê-la por ter entrado na minha vida, acolheu-me na chegada e em todos os momentos necessários, sempre disposta a ajudar, um exemplo de pessoa. Ao Federico eu ofereço toda a minha admiração profissional e pessoal, sua alegria tornou o laboratório um ambiente agradável e seu abraço amigo um verdadeiro conforto científico, junto com a Rô suavizaram a reta final da minha caminhada. A Rô é um exemplo de persistência e coragem, foi uma amiga durante os experimentos e na minha vida pessoal, obrigada pela sua nobre dedicação ao meu trabalho. Aos três minha mais sincera gratidão.

A todos os membros do laboratório de Farmacognosia (FCFRP-USP), aos Profs. Jairo Kenupp Bastos e Nieve Araçari Jacometti Cardoso Furtado, e aos alunos Mariza, Eliane, Tatiane, Marivane, Erick, Ingrid, Cristiane, Juliana, Marcela, Willian e Ana Carolina pela convivência diária no laboratório. Em especial à Mariza

Miranda, até parecíamos ser “twin sister”, obrigada pelo seu carinho transmitido e sua alegria nos momentos de descontração. À Eliane Silva sou grata pelo incentivo e disposição em me ajudar nos pequenos e grandes detalhes, aos poucos fomos construindo nossa amizade regada de harmoniosas conversas e trocas de opiniões; é infinito o meu apreço por ela, muito obrigada mesmo Eli.

Obrigada aos técnicos do laboratório: Angélica, Mario e Waltinho pelo auxílio com os materiais necessários para a execução desse trabalho. Com carinho especial, obrigada à Gelly por ter sido um anjo na minha vida. Em todas as manhãs me saudava com um abraço fraternal, no qual eu me sentia bem acolhida e pronta para mais um dia de experimentos.

A toda equipe do projeto temático: “Estudos morfoanatômicos e de metaboloma como subsídios à sistemática de espécies de Asteraceae e ao acesso a seu potencial farmacológico” (processo FAPESP nº 2010/51454-3), coordenado pela Profa. Dra. Beatriz Appezzato da Glória, pelo fornecimento de uma parte do material vegetal para os estudos desse trabalho, auxílios nas coletas e trocas de conhecimentos. À Profa. Dra. Mara A.G. Magenta pela infinita disponibilidade, por esclarecer minhas dúvidas relacionadas à morfologia das espécies. À Marli Soares pelo auxílio nas compras e prestação de contas para a FAPESP.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP), local de desenvolvimento desse trabalho.

Obrigada à secretária da faculdade Nilva Ruggiero, umas das primeiras pessoas que tive contato antes de chegar a Ribeirão Preto. Sempre muito prestativa, os dias ficavam mais suaves quando eu a encontrava pelos corredores da faculdade, muito obrigada pelo seu carinho.

À FAPESP (processo nº 2010/51454-3), ao CNPq e à CAPES pelo apoio financeiro.

Obrigada à minha amiga Maiara Sobral Silva, minha companheira desde a adolescência até a eternidade, juntas sonhamos um objetivo similar que trouxe a distância como consequência, mas para quem ama, o quilômetro é a medida que menos importa. Torço muito por você, pelo pequeno Davi e toda sua família, obrigada pelo infinito amor doado a mim, eu também te amo.

À Ana Paula Pontes foi minha grande incentivadora desde a vinda a Ribeirão Preto e em todos os momentos do decorrer dessa caminhada. Dona das minhas



boas gargalhadas sempre soube me alegrar. Juntas superamos as tristezas e aproveitamos as alegrias, um verdadeiro sentimento familiar que sempre fez bem em nossas vidas. Muito obrigada pelo seu carinho, sem você minha vida por aqui não teria o mesmo agrado.

À Sônia Figueiredo, minha eterna “sister”, sempre uma grande companheira. Felicidades e aflições dividimos juntas, nossas risadas são para mim de um imenso valor, uma verdadeira amizade para a vida toda.

Àquelas pessoas que eu amo e não posso ter perto de mim hoje, que representam valiosas recordações na minha vida, obrigada pelas memórias e por me fazer tão feliz durante o período que Deus nos permitiu.

E por último, e em primeiro lugar, obrigada ao meu querido Deus e à minha Nossa Senhora das Graças! Obrigada por me ter como filha tão querida e especial, por colocar em minha vida pessoas tão amáveis e companheiras, por acalmar meu coração em épocas de desespero. Vamos celebrar juntos mais esta conquista, que eu possa ser sempre “instrumento de vossa paz”. Amém.

*“Para tudo há um tempo,  
para cada coisa há um momento debaixo do céu:  
tempo de nascer e tempo de morrer;  
tempo de plantar e tempo de arrancar o que se plantou.  
Tempo de matar e tempo de curar;  
tempo de demolir e tempo de construir.  
Tempo de chorar e tempo de rir;  
tempo de prantear e tempo de dançar.  
Tempo de atirar pedras e tempo de ajuntá-las;  
tempo de abraçar e tempo de apartar-se.  
Tempo de procurar e tempo de perder;  
tempo de guardar e tempo de jogar fora.  
Tempo de rasgar e tempo de costurar;  
tempo de calar e tempo de falar.  
Tempo de amar e tempo de odiar;  
tempo de guerra e tempo de paz.”*

**(Eclesiastes 3, 1-8)**

## RESUMO

FALEIRO, D. P. V. **Perfil metabólico, desreplicação de extratos de *Aldama la Llave* (Asteraceae) e inibição das enzimas cicloxigenase e lipoxigenase. 2014** 61f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

O gênero *Viguiera* Kunth é o maior entre os representantes da subtribo Helianthinae (tribo Heliantheae, Asteraceae). As mudanças evolutivas da tribo tem feito a reconstrução filogenética e a circunscrição do gênero tema de grande debate. Considerando-se resultados das análises filogenéticas baseadas em dados moleculares e em caracteres morfológicos, as espécies sul-americanas foram transferidas para o gênero *Aldama* La Llave. A fim de poder contribuir com estudos que visem dar subsídios para a classificação taxonômica de *Aldama*, como, por exemplo, dados químicos, bem como encontrar metabólitos bioativos, foi proposto investigar espécies de *Aldama* utilizando perfis metabólicos obtidos por *Ultra High Performance Liquid Chromatography* (UHPLC) acoplada a detector no ultravioleta (UV) e espectrometria de massas (*Mass Spectrometry*, MS), bem como técnicas de desreplicação e métodos de estatística multivariada, além de avaliar o potencial de inibição *in vitro* das enzimas cicloxigenase (COX) e lipoxigenase (LOX) de extratos. Para isso, foram coletadas 24 espécies e seus respectivos extratos foram obtidos por maceração de folhas, lavagem foliar e dissolução de tricomas glandulares. As impressões digitais obtidas por UHPLC-UV-MS revelaram substâncias como ácidos clorogênicos, flavonoides e lactonas sesquiterpênicas. Dentre os extratos estudados, 19 foram avaliados *in vitro*, três (15,8%) apresentaram a atividade de inibição concomitante das enzimas COX-1 (IC<sub>50</sub> >100; 0,1 e 2,6) e 5-LOX (IC<sub>50</sub> 67,2; 36 e 4), respectivamente os de *A. pilosa*, *A. robusta* e *A. trichophylla*. Os dados de UHPLC-MS no modo de ionização negativo foram normalizados, combinados com os resultados dos ensaios do potencial anti-inflamatórios *in vitro* e analisados por *Orthogonal Partial Least Square Discriminant Analysis* (OPLS-DA), sendo possível obter um modelo com habilidade preditiva de validação cruzada de 66,67% (R<sup>2</sup>= 0,98 e Q<sup>2</sup>= 0,51). Os dados do modelo revelaram que os biomarcadores que exercem maior influência para que o extrato de *A. robusta* fosse ativo são os ácidos 3-O-E-cafeoilquínico e 3,4-dimetoxicinâmico, a rutina e a 3-O-metilquercetina. Os resultados deste trabalho auxiliarão na construção da taxonomia para o gênero *Aldama*.

Palavras-chave: *Aldama*, potencial anti-inflamatório, métodos *in silico*.

## ABSTRACT

FALEIRO, D. P. V. **Metabolic profile, dereplication of extracts of *Aldama la Llave* (Asteraceae) and inhibition of enzymes cyclooxygenase and lipoxygenase.** 2014 61f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

The genus *Viguiera* Kunth is the largest in the subtribe Helianthinae (tribe Heliantheae, Asteraceae). Evolutionary changes of the tribe have made the phylogenetic reconstruction and the circumscription of the genus a topic of great discussion. Taking into account the results of phylogenetic analyses based on molecular data and morphological characters, the South American species of *Viguiera* were transferred to the genus *Aldama* La Llave. In order to contribute to the taxonomic classification of *Aldama* using chemical data, and also to search for bioactive metabolites, this study aims to investigate species of *Aldama* using metabolic profiles obtained by Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC) coupled to Ultraviolet detector (UV) and Mass Spectrometry (MS), extract dereplication and multivariate statistical, besides the evaluation of the potential of *in vitro* inhibition of the enzymes cyclooxygenase (COX) and lipoxygenase (LOX) by plant extracts. Twenty-four *Aldama* species were collected and their extracts were obtained by maceration, leaf rinsing and dissolution of glandular trichomes. The fingerprints obtained by UHPLC-UV-MS revealed compounds such as chlorogenic acids, flavonoids and sesquiterpene lactones. Among the extracts studied, nineteen were evaluated *in vitro*, three of them (15.8%) inhibited simultaneously COX-1 ( $IC_{50} > 100$ , 0.1 and 2.6) and 5-LOX ( $IC_{50}$  67.2; 36 and 4), being those from *A. pilosa*, *A. robusta* e *A. trichophylla*, respectively. The LC-MS data in negative ionization mode were normalized, combined with the results of the *in vitro* of anti-inflammatory potential and analysed by Orthogonal Partial Least Square Discriminant Analysis (OPLS-DA). It was possible to build a model with a predictive ability of cross-validation of 66.67% ( $R^2 = 0.98$  and  $Q^2 = 0.51$ ), demonstrating that the biomarkers that have the highest influence on the extract activity of *A. robusta* are the 3-O-E-caffeoylquinic and 3,4-dimethoxycinnamic acids, rutin and 3-O-methylquercetin. The results obtained herein are important to the taxonomy of the genus *Aldama*.

Keywords: *Aldama*, anti-inflammatory potential, *in silico* methods

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Estruturas de lactonas sesquiterpênicas (LST) de diferentes classes encontradas em espécies brasileiras de *Aldama*. **1.** Guaianolido, **2.** Germacrolido e **3.** Heliangolido (budleína A). .....5
- Figura 2** - Partes aéreas de *Aldama*. **A.** *A. nudibasilaris*, **B.** *A. pilosa*, **C** e **D.** *A. robusta*. .....12
- Figura 3** – Locais de coleta das espécies de *Aldama* visualizados em amarelo no mapa nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul do Brasil. Imagem extraída do Google™ earth. ....13
- Figura 4** – Impressões digitais metabólicas em 254 e 325 nm dos extratos obtidos por HPLC-UV-DAD (0-45% de MeCN em 60 min, 45-100% em 5 min, 100% por 5 min; 1% de ácido acético; duas colunas monolíticas C-18, 3 x 100 mm, em série). **A.** ELF etanólico de *A. anchusifolia* e **B.** ELF acetônico de *A. anchusifolia*. .....25
- Figura 5** - Cromatogramas de íons totais (TIC) do extrato hidroalcoólico de *A. robusta* obtidos a partir das análises por UHPLC-UV-MS nos modos de ionização negativo acima e positivo abaixo. As identificações dos picos cromatográficos constam na Tabela 3. ....27
- Figura 6** - Cromatogramas de íons totais (TIC) do ELF de *A. robusta* obtidos a partir das análises por UHPLC-UV-MS nos modos de ionização negativo acima e positivo abaixo. As identificações dos picos cromatográficos constam na Tabela 4. ....32
- Figura 7** - Cromatogramas de íons totais (TIC) do conteúdo dos tricomas glandulares de *A. robusta* obtidos a partir das análises por UHPLC-UV-MS nos modos de ionização negativo acima e positivo abaixo. As identificações dos picos cromatográficos constam na Tabela 5. ....36
- Figura 8.** Gráfico de *score plot* (OPLS-DA) dos extratos mostrando a tendência de separação dos agrupamentos, onde N (verde)= nenhuma atividade; L (azul)= LOX; C (vermelho)= COX e B (amarelo)= ambas atividades (inibição dupla). ....41
- Figura 9.** Gráfico de *score plot* (OPLS-DA) do modelo de predição com as amostras da calibração. À esquerda em verde está o *cluster* dos extratos sem atividade e à direita em amarelo está o *cluster* referente a ambas atividades (inibição dupla). ....42
- Figura 10.** Gráficos de OPLS-DA. (A) *Loading plot* à esquerda estão as variáveis correlacionadas com a ausência de atividade nos extratos; à direita estão as variáveis para ambas atividades. (B) *Loading plot* em forma de barras para melhor visualização da rerepresentação das variáveis: lado esquerdo com as substâncias sem atividades e lado direito com as substâncias responsáveis pela dupla inibição. (C) VIP variáveis de maior importância para o modelo. ....43

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Espécies coletadas de *Aldama*, sua localização, quantidade de folhas secas íntegras, rendimento dos extratos e presença de tricomas glandulares. ....14
- Tabela 2** - Resultados do potencial de inibição das enzimas cicloxigenase (COX-1) e lipooxigenase (5-LOX) pelos extratos hidroalcoólicos das espécies de *Aldama*. ....23
- Tabela 3** – Identificação dos picos cromatográficos do extrato hidroalcoólico de *A. robusta* e dados de espectrometria de massas e no UV obtidos a partir das análises por UHPLC-UV-MS. Os números dos picos referem-se à Figura 5. ....29
- Tabela 4** - Identificação dos picos cromatográficos do extrato de lavagem foliar (ELF) de *A. robusta* e dados de espectrometria de massas e UV obtidos a partir das análises por UHPLC-UV-MS. Os números dos picos referem-se à Figura 6. ....35
- Tabela 5** - Identificação dos picos cromatográficos do conteúdo dos tricomas glandulares de *A. robusta* e dados de espectrometria de massas e no UV obtidos a partir das análises por UHPLC-UV-MS. Os números dos picos referem-se à Figura 7. ....38
- Tabela 6.** Substâncias correlacionadas com a atividade de inibição das enzimas COX e LOX. ....44

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

AsterBioChem	Chemistry and Biology of Asteraceae
AsterDB	Asteraceae Data Base
CAF	Cafeoila
COX	Cicloxygenase
CQA	Ácido cafeoilquínico
DAD	<i>Diode Array Detector</i>
diCQA	di- <i>O-E</i> -cafeoilquínicos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNP	<i>Dictionary of Natural Products</i>
ELF	Extrato de Lavagem Foliar
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
EtOH	Etanol
FQA	Ácido feruloilquínico
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatograph</i>
LOX	Lipoxigenase
LST	Lactonas Sesquiterpênicas
LT	Leucotrieno
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
MeCN	Acetonitrila
MeOH	Methanol
MS	Mass Spectrometry
OPLS	<i>Orthogonal Partial Least Square</i>
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
PG	Prostaglandina
PLS	<i>Partial Least Squares</i>
Q <sup>2</sup>	Coeficiente de predição
R <sup>2</sup>	Coeficiente de determinação
RMSECV	<i>Root Mean Square Error of Cross-Validation</i>
TBX	Tromboxano
TIC	<i>Total Ion Chromatogram</i>

UHPLC	<i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i>
UV	Ultravioleta
VIP	<i>Variable Importance Plot</i>



## SUMÁRIO

Resumo .....	i
Abstract.....	ii
Lista de figuras .....	iii
Lista de tabelas .....	iv
Lista de abreviaturas e siglas .....	v
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>2</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>10</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>12</b>
<b>3.1 Material vegetal .....</b>	<b>12</b>
<b>3.2 Secagem, armazenamento e investigação de tricomas glandulares.....</b>	<b>15</b>
<b>3.3 Preparo de extratos vegetais .....</b>	<b>15</b>
3.3.1 Extratos hidroalcoólicos .....	15
3.3.2 Extratos de lavagem foliar (ELF).....	16
3.3.3 Extratos glandulares .....	16
<b>3.4 Ensaio do potencial de inibição <i>in vitro</i> – COX-1 e 5-LOX .....</b>	<b>16</b>
<b>3.5 Análises dos perfis químicos dos ELF por HPLC-UV-DAD .....</b>	<b>18</b>
<b>3.6 Análises dos perfis químicos e desreplicação .....</b>	<b>19</b>
<b>3.7 Análises <i>in silico</i> .....</b>	<b>20</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>23</b>

<b>4.1</b>	<b>Ensaio do potencial de inibição <i>in vitro</i> – COX-1 e 5-LOX .....</b>	<b>23</b>
<b>4.2</b>	<b>Análises dos perfis químicos dos ELF por HPLC-UV-DAD .....</b>	<b>24</b>
<b>4.3</b>	<b>Análises dos perfis químicos e desreplicação .....</b>	<b>26</b>
4.3.1	Extrato hidroalcoólico.....	26
4.3.1.1	Ácidos clorogênicos.....	27
4.3.1.2	Flavonoides .....	30
4.3.1.3	Lactona sesquiterpênica .....	31
4.3.2	Extrato de lavagem foliar (ELF) .....	31
4.3.2.1	Flavonoides .....	31
4.3.2.2	Lactonas sesquiterpênicas .....	33
4.3.3	Tricomas glandulares.....	36
4.3.3.1	Flavonoides .....	36
4.3.3.2	Lactonas sesquiterpênicas .....	37
<b>4.4</b>	<b>Análises <i>in silico</i>.....</b>	<b>39</b>
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>47</b>
<b>6.</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>49</b>
	<b>APÊNDICE 1 - PARÂMETROS UTILIZADOS NO SOFTWARE MZMINE 2.10 .....</b>	<b>58</b>
	<b>APÊNDICE 2 - LISTA DAS ESPÉCIES UTILIZADAS PARA CONSTRUÇÃO DO MODELO DE PREDIÇÃO.....</b>	<b>60</b>

## **INTRODUÇÃO**

## 1. INTRODUÇÃO

A família Asteraceae ou Compositae possui cerca de 25.000 espécies e é economicamente uma das mais importantes entre as angiospermas. No mercado alimentício, os principais produtos são folhas, caules, raízes e tubérculos, tais como folhas de alface, folhas e raízes de chicória, inflorescências de camomila, óleo de girassol e alcachofra dentre outros (SIMPSON, 2009).

A grande diversidade morfológica e geográfica de espécies da família é refletida em sua habilidade de biossintetizar uma série de metabólitos secundários incluindo monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, lactonas sesquiterpênicas, poliacetilenos, flavonoides, ácidos fenólicos, benzofuranos, cumarinas e alcaloides pirrolizidínicos (esses últimos restritos às tribos Senecioneae e Eupatorieae) (CALABRIA et al., 2009). Devido ao seu grande número de espécies que exibem diversidade química, os metabólitos secundários da família Asteraceae têm sempre sido de grande interesse para a química e sistemática de plantas. Vários pesquisadores têm contribuído na área da quimiosistemática, que é a aplicação dos dados da química do metabolismo secundário nos estudos de evolução das plantas (HARBORNE, 1977; HEGNAUER, 1986; WATERMAN; GRAY, 1987)

No entanto, a quimiosistemática aliada a dados morfológicos e de estudos baseados em dados moleculares, compreendem uma abordagem inovadora para a sistemática de plantas, proporcionando a oportunidade de se reexaminar dados fitoquímicos bem como resolver problemas filogenéticos presentes na família (CALABRIA et al., 2009; REYNOLDS, 2007).

Dentre as 20 tribos de Asteraceae, Heliantheae é considerada um grupo abrangente e de grande diversidade, com 113 gêneros e aproximadamente 1.500 espécies de ervas, arbustos e árvores, encontrados em todas as Américas (BALDWIN, 2009). Vários exemplos podem ser citados, como a dália (*Dahlia pinnata* Cav.), o margaridão (*Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray), o girassol (*Helianthus annuus* L.), o jambú (*Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen), o yacón (*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Robinson), o picão (*Bidens pilosa* L.) e *Viguiera* Kunth.

O gênero *Viguiera* pertence à subtribo Helianthinae e foi denominado por Kunth em 1820, em homenagem ao médico Francês L. G. A. Viguier, estabelecendo

apenas a espécie *Viguiera helianthoides* Kunth, encontrada em Cuba, que foi sinonimizada como *Viguiera dentata* (Cav.) Spreng., descrita inicialmente como *Helianthus dentatus* Cav., e então registrada para o México. A partir de então, varias adições foram feitas até que, em 1918, Blake fez uma revisão determinando três subgêneros com sete seções, abrangendo dez séries, duas subséries e 143 espécies, das quais 34 com registros no Brasil.

*Viguiera* apresenta a maior diversidade de espécies entre os membros da subtribo Helianthinae, as quais são facilmente confundidas com outros gêneros da família Asteraceae. As ervas são confundidas com representantes de gêneros de outras subtribos como, por exemplo, *Aspilia* Thouars, *Dimmerostema* Cass. e *Wedelia* Jacq., já os arbustos, que atingem mais de dois metros de altura, como *V. nudibasilaris* e *V. santacatarinensis*, assemelham-se a representantes do gênero *Tithonia* Desf. ex Juss (MAGENTA, 2006).

As mudanças evolutivas da tribo tem feito a reconstrução filogenética e a circunscrição do gênero tema de grande debate e trabalhos com base em estudos moleculares efetuados a partir do final da década de 1980 (SCHILLING; JANSEN, 1989; SCHILLING; PANERO, 1991, 1996, 2002, 2011; SCHILLING et al., 2000) deram início à redelimitação no gênero *Viguiera*.

Os estudos realizados por Magenta (2006) afirmam que *Viguiera* está representado na América do Sul por cerca de 61 espécies, das quais 35 ocorrem no Brasil e 27 são exclusivamente brasileiras. Através dos resultados das análises filogenéticas baseadas em dados moleculares (SCHILLING; PANERO, 2002, 2011) e em caracteres morfológicos (MAGENTA et al., 2010; MAGENTA; PIRANI, 2014), as espécies sul-americanas foram transferidas para o gênero *Aldama* La Llave. Com base nessa nova circunscrição publicada por esses autores, o presente trabalho passa a tratar espécies de *Viguiera* como *Aldama*.

No Brasil, as espécies estão localizadas nas seguintes regiões (estados): Norte (Pará e Tocantins), Nordeste (Maranhão, Ceará e Bahia), Centro-Oeste (Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal e Mato Grosso do Sul), Sudeste (Minas Gerais, São Paulo e Rio de Janeiro) e Sul (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul), sendo a maioria localizadas na região do Cerrado (MAGENTA, 2014).

Desde o final anos 90, vários representantes de Asteraceae, medicinais ou não, vêm sendo coletados por integrantes do nosso grupo de pesquisa

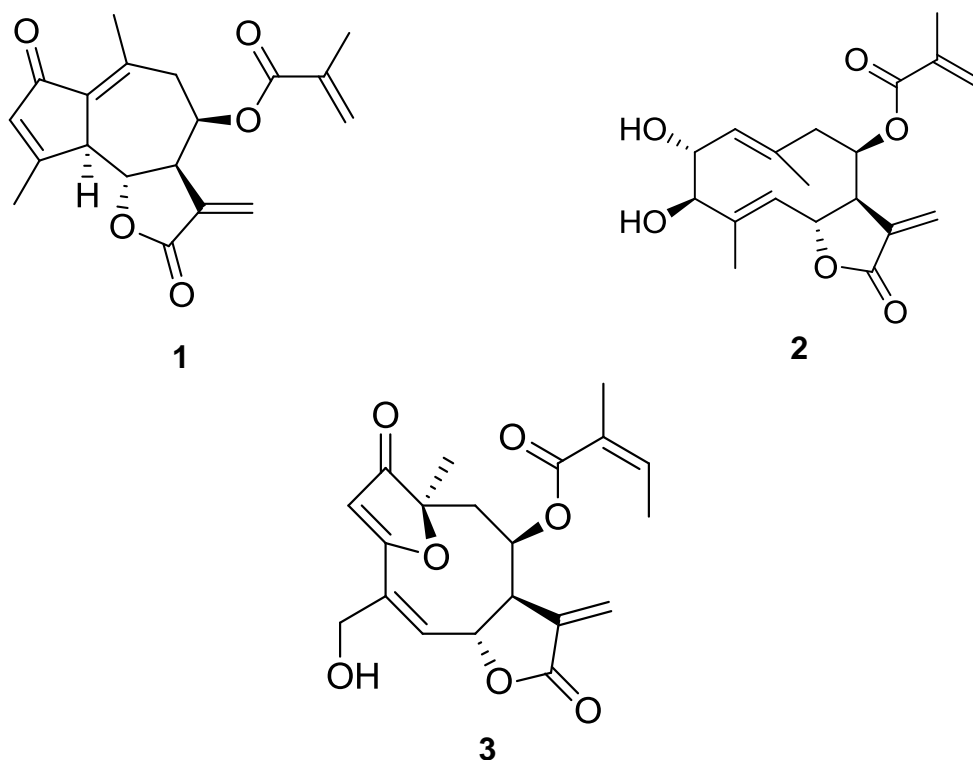
AsterBioChem (*Chemistry and Biology of Asteraceae*, [www.asterbiochem.org](http://www.asterbiochem.org)), do Laboratório de Farmacognosia da FCFRP-USP. Durante este período, mais de 20 delas foram investigadas quimicamente, sendo a maioria da tribo Heliantheae, tendo sido isoladas e identificadas várias lactonas sesquiterpênicas (LST) e diterpenos, além de compostos fenólicos, totalizando mais de uma centena de substâncias, sendo que um quinto delas eram novas na literatura (DA COSTA et al., 1993, 1996; SPRING et al., 2001; STEFANI et al., 2003; AMBROSIO et al., 2004, 2008; TALEB-CONTINI et al., 2007; CHAGAS-PAULA et al., 2012; PASSONI et al., 2013). As LST foram isoladas de extratos de lavagem de folhas ou inflorescências, uma vez que estes metabólitos secundários acumulam-se em tricomas glandulares na superfície destes órgãos, sendo facilmente extraídos através de lavagem do material seco íntegro com solventes orgânicos voláteis. O conjunto de todos os metabólitos secundários obtidos possibilitou a elaboração de uma biblioteca de substâncias puras e de um banco de dados espectrométricos e cromatográficos, o *Asteraceae Data Base (AsterDB)*.

Os metabólitos secundários mais abundantes encontrados nas espécies de *Aldama* são flavonoides, diterpenos e LST. Flavonoides como a isoquercetrina, a quercimeritrina, a glucoluteolina, a luteolina, a quercetina, a hispidulina, a 3-O-metilquercetina, dentre outros, foram encontrados nas folhas e inflorescências das espécies (RIESEBERG; SCHILLING, 1985; SCHILLING, 1989).

Diterpenos derivados do ácido *ent*-pimaradienóico, isolados das raízes de *A. arenaria*, apresentaram atividade tripanocida *in vivo* (AMBROSIO et al., 2004, 2008); já os derivados do ácido *ent*-caurenóico isolados das raízes de *A. aspilioides* e *A. robusta* foram capazes de inibir a contratilidade vascular, sugerindo se tratar de substâncias promissoras para exercer ação anti-hipertensiva. (DA COSTA, et al., 1996; AMBRÓSIO, et al., 2006).

As LST presentes nos tricomas glandulares localizados na face abaxial das folhas tem sido estudadas em espécies brasileiras. SCHORR et al. (2002) demonstraram que guaianolidos (**1**) (Figura 1) isolados das folhas de *A. gardneri*, possuem ação *in vitro* frente a alvos moleculares relacionados à ação anti-inflamatória. Nessa mesma espécie também foi isolado um tipo de germacrolido (**2**). Valério et al. (2007) demonstraram em ratos as atividades anti-inflamatória e analgésica da budleína A (**3**) isolada de folhas de *A. robusta*, sendo que Nicolete et

al. (2009) estabeleceram alguns de seus mecanismos de ação. Observa-se, portanto, que as espécies possuem metabólitos secundários com grande potencial farmacológico.



**Figura 1** - Estruturas de lactonas sesquiterpênicas (LST) de diferentes classes encontradas em espécies brasileiras de *Aldama*. 1. Guaianolido, 2. Germacrolido e 3. Heliangolido (budleína A).

A inflamação é um processo complexo que ocorre através de uma variedade de mecanismos que conduz a mudanças no fluxo sanguíneo local e à liberação de vários mediadores. Esses mediadores, como por exemplo os metabólitos do ácido araquidônico (prostaglandinas - PG, tromboxanos - TBX e leucotrienos - LT), são responsáveis por efeitos no local da inflamação, tais como vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e migração de leucócitos para a área afetada. Também afeta os sistemas gerais do corpo, incluindo o cardiovascular e o renal (MARTELL-PELLETIER et al., 2003).

Através de estímulos mecânicos, químicos, físicos ou através de outros mediadores, os fosfolípidos das membranas celulares liberam o ácido araquidônico, a partir da ativação da enzima fosfolipase A<sub>2</sub>. O ácido araquidônico livre pode ser metabolizado por duas classes principais de enzimas: as cicloxigenases (COX) resultando na produção de eicosanoides (PG, TBX e prostacilinas) e as

lipoxigenases (LOX) originando a biossíntese de LT (PARENTE, 2001; FIORUCCI et al., 2001).

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) possuem propriedades analgésica, antitérmica, anti-inflamatória e antitrombótica e inibem a síntese de PG mediante a inativação de enzimas COX (ROBERTS et al., 2001). Atualmente são conhecidas duas isoformas da enzima cicloxigenase, a COX-1 e a COX-2 que possuem aplicação terapêutica. A isoforma COX-1 é expressa constitutivamente na maioria dos tecidos como por exemplo no estômago e também em células sanguíneas como as plaquetas, e está envolvida na sinalização entre células e na homeostasia tecidual. A isoforma COX-2 é induzida principalmente nas células inflamatórias, quando essas são ativadas durante a inflamação, e tende a facilitar a resposta inflamatória. Entretanto, no cérebro, rins e alguns outros tecidos, a COX-2 é expressa constitutivamente (BOTTING, 2006)

Muitos AINEs inibem ambas as isoformas COX-1 e COX-2 de forma não seletiva. O AINE mais antigo é a Aspirina® (ácido acetilsalicílico), um derivado do ácido salicílico. Este, por sua vez, é um derivado da salicina, obtida originalmente das cascas do tronco do salgueiro (*Salix alba*, Salicaceae) (ROBERTS et al., 2001; VIEGAS JR et al., 2006). Além da Aspirina®, outros anti-inflamatórios não esteroidais se destacam, entre eles o ibuprofeno, o diclofenaco e o piroxicam, todos inibidores não seletivos da COX (ROBERTS et al., 2001; BOTTING, 2006).

A inibição de COX através do tratamento com AINEs pode levar a um desvio no metabolismo do ácido araquidônico em direção à via LOX na produção de LT, que são potentes mediadores da inflamação. Exercem atividade quimiotática para leucócitos, eosinófilos e monócitos, promovendo a migração dessas células para o local afetado. Uma vez no sítio, os LT ativam as células da série branca, promovendo a desgranulação e a produção de superóxidos, que contribuem para os danos teciduais característicos da inflamação (MARTEL-PELLETIER et al., 2003). Podem também induzir à uma resposta fisiopatológica de asma, além de gastrite e úlcera (HUDSON et al., 1993; DRAZEN et al., 1999).

Diante da existência desses efeitos adversos, a ciência tem destacado a importância da procura por agentes que sejam capazes de inibir a COX e a LOX concomitantemente, como é o caso da licofelona (ML3000), que se encontra na fase III do desenvolvimento clínico. Os resultados mostram que o fármaco gera danos



mínimos no trato gastrointestinal e não apresenta hepatotoxicidade nos estudos pré-clínico e clínico (KULKARNI; SINGH, 2007).

No mercado existem *kits* capazes de detectar a inibição das enzimas COX e LOX em ensaios *in vitro*, que estão sendo utilizados por integrantes do AsterBioChem para realizar a triagem de extratos de *Aldama*, já que há evidências que o gênero possui atividade anti-inflamatória.

Extratos de plantas da família Asteraceae e substâncias puras oriundas da mesma vêm demonstrando possuir potencial de inibição das vias COX e LOX-dependentes (CHAGAS-PAULA, 2013). Dessa forma, considerando o histórico e o potencial de plantas da família, nota-se a importância de procurar por substâncias que sejam capazes de inibir concomitantemente as enzimas COX e LOX.

Além do potencial farmacológico, estudos tem ressaltado a aplicabilidade de substâncias como as LST na filogenia e quimiotaxonomia da família Asteraceae, pois alguns tipos de esqueletos são exclusivos em determinadas tribos e subtribos, já outros são mais generalizados (DA COSTA et al., 2005; HRISTOZOV et al., 2007). Daí a importância de estudos de desreplicação para o conhecimento do perfil metabólico e classes químicas presentes nas espécies, pois dados químicos são relevantes para a sistemática de Asteraceae. Desreplicação refere-se à rápida identificação de metabólitos secundários presentes em matrizes orgânicas complexas, como extratos vegetais (ABDELMOHSEN et al., 2014).

Cabe ressaltar que essa dissertação faz parte de um projeto temático financiado pela FAPESP, intitulado “Estudos morfoanatômicos e de metaboloma como subsídios à sistemática de espécies de Asteraceae e ao acesso a seu potencial farmacológico”, coordenado pela Profa. Dra. Beatriz Appezzato-da-Glória (ESALQ-USP) e tendo o Prof. Dr. Fernando B. da Costa (FCFRP-USP) como pesquisador principal. Também colaboram nesse estudo o Prof. Dr. José R. Pirani (IB-USP), o Prof. Dr. Edward E. Schilling (Universidade do Tennessee, EUA) e a Profa. Dra. Mara A.G. Magenta (UNISANTA). O projeto envolve diferentes estudos, tais como anatomia, fitoquímica, metabolômica e filogenia para a investigação do gênero *Aldama*, incluindo estudos envolvendo a inibição enzimática de COX e LOX.

A fim de poder contribuir com estudos que visem dar subsídios para a classificação taxonômica de *Aldama*, por meio da desreplicação de substâncias, bem como encontrar metabólitos bioativos nos biomas brasileiros, decidiu-se

investigar espécies de *Aldama* utilizando perfis metabólicos obtidos através de *Ultra High Performance Liquid Chromatography* (UHPLC) acoplada a detector de Ultravioleta (UV) e espectrometria de massas (*Mass Spectrometry*, MS).

**OBJETIVOS**

## 2. OBJETIVOS

O objetivo geral desse trabalho foi obter perfis químicos de espécies de *Aldama* e avaliar a inibição *in vitro* das enzimas COX-1 e 5-LOX de extratos.

### **Os objetivos específicos foram:**

- a) empregando-se UHPLC-UV-MS, obter e comparar os perfis químicos (impressões digitais) dos extratos hidroalcoólico, de lavagem foliar e de tricomas glandulares das espécies;
- b) avaliar o potencial de inibição *in vitro* das vias COX- e LOX-dependentes dos extratos hidroalcoólicos;
- c) empregando-se estatística multivariada, construir um modelo de predição correlacionando perfis químicos de extratos à atividade de ambas enzimas;
- d) selecionar uma espécie de *Aldama* para o estudo dos seus constituintes químicos, com base nos resultados de inibição enzimática e do modelo estatístico (itens b e c).

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

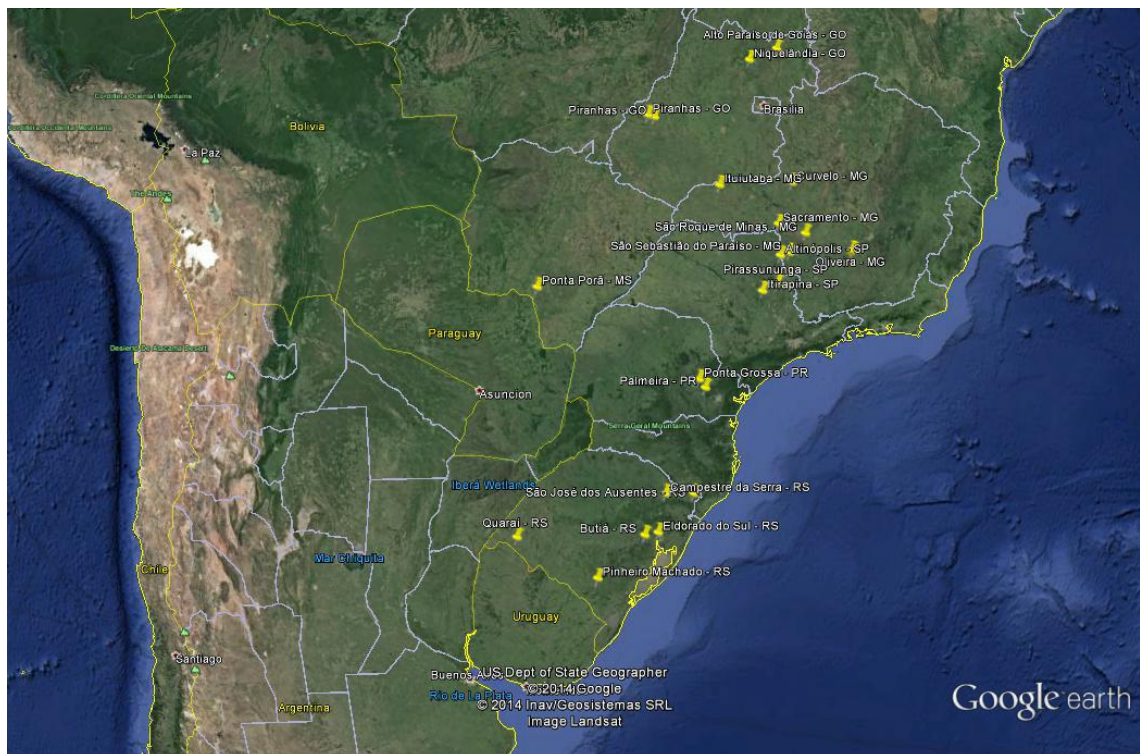
#### 3.1 Material vegetal

As espécies de *Aldama* (alguns exemplos na Figura 2) deste trabalho foram coletadas entre 2000 e 2013 por D.P.V. Faleiro e colaboradores, sob supervisão de M.A.G. Magenta e F.B. Costa, nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul do Brasil (Figura 3). Ao todo, foram coletadas 24 espécies, as quais foram analisadas para checar a presença de tricomas glandulares. A partir das folhas deste material foram obtidos seus respectivos extratos (Tabela 1).



**Figura 2** - Partes aéreas de *Aldama*. **A.** *A. nudibasilaris*, **B.** *A. pilosa*, **C** e **D.** *A. robusta*.

As exsicatas das espécies foram identificadas por M.A.G. Magenta e depositadas nos herbários HUSC (Santos – SP), SPF (São Paulo - SP), ESA (Piracicaba - SP) e SPFR (Ribeirão Preto - SP). Foram estudadas as folhas de todas as espécies com devida autorização de acesso e de remessa de amostra de componente do patrimônio genético n° 010055/2012-6, emitida pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.



**Figura 3** – Locais de coleta das espécies de *Aldama* visualizados em amarelo no mapa nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul do Brasil. Imagem extraída do Google™ earth.

**Tabela 1** – Espécies coletadas de *Aldama*, sua localização, quantidade de folhas secas íntegras, rendimento dos extratos e presença de tricomas glandulares.

Espécie	Local de coleta	Exsicata	Folha seca (g)	Rendimento (20 mg) EtOH 7:3 (%)	Tricomas glandulares
<i>Aldama anchusifolia</i> (DC.) E.E.Schill. & Panero	Eldorado do Sul-RS 30°01'12,3" S e 51°19'10,1" W	D.P.V.FALEIRO 23	300	26	++
<i>Aldama arenaria</i> (Baker) E.E.Schill. & Panero	Itirapina-SP 22°13' S e 47°54' W	T.S.OLIVEIRA 111847	26	29,5	+
<i>Aldama aspilioides</i> (Baker) E.E.Schill. & Panero	Ponta Grossa-PR 25°07'43,8" S e 50°01'57,6" W	M.MAGENTA 478	0,09	27,5	-
<i>Aldama bakeriana</i> (S.F.Blake) E.E.Schill. & Panero	Oliveira-MG 20°46'28,1" S e 044°46'52,5" W	A.B.BOMBO 123043	9	16,5	+
<i>Aldama bracteata</i> (Gardner) E.E.Schill. & Panero	Curvelo-MG 18°35'50,5" S e 46°57'12,9" W	F.B.COSTA 111	10	22,5	+
<i>Aldama discolor</i> (Baker) E.E.Schill. & Panero	Sacramento-MG 20°00'26,1" S e 047°24'30,3" W	D.P.V.FALEIRO 01	510	29,5	++
<i>Aldama filifolia</i> (Sch.Bip. ex Baker) E.E.Schill. & Panero	Alto Paraíso de Goiás-GO 13°58'16,1" S e 47°29'56,7" W	A.B.BOMBO 111848	15	26	-
<i>Aldama gardneri</i> (Baker) E.E.Schill. & Panero	Alto Paraíso de Goiás-GO 13°55'36,1" S e 47°25'51,3" W	M.MAGENTA 446	10	16,5	+
<i>Aldama goyazii</i> E.E.Schill. & Panero	Ituiutaba-MG 18°51'03,6" S e 49°28'32,3" W	M.MAGENTA 720	0.09	20,5	-
<i>Aldama grandiflora</i> (Gardner) E.E.Schill. & Panero	São Roque de Minas-MG 20°14'48,7" S e 046°26'24,8" W	D.P.V.FALEIRO 15	950	29,5	+
<i>Aldama kunthiana</i> (Gardner) E.E.Schill. & Panero	Niquelândia-GO 14°25'23,0" S e 48°26'12,0" W	A.B.BOMBO 122872	8	14,5	+
<i>Aldama linearifolia</i> (Chodat) E.E.Schill. & Panero	Ponta Porã-MS 22°16'38,5" S e 55°40'28,8" W	A.B.BOMBO 113164	10	19	+
<i>Aldama megapotamica</i> (Malme) Magenta & Pirani	Butiá-RS 30°06'31,7" S e 51°48'18,7" W	D.P.V.FALEIRO 22	20	22,5	+
<i>Aldama nudibasilaris</i> (S.F.Blake) E.E.Schill. & Panero	Oliveira-MG 20°39'39,8" S e 44°44'14,8" W	D.P.V.FALEIRO 19	520	28	-
<i>Aldama nudicaulis</i> (Baker) E.E.Schill. & Panero	Pinheiro Machado-RS 31°31'04,4" S e 53°30'48,6" W	LOEUILLE 734	6	22,5	+
<i>Aldama oblongifolia</i> (Gardner) E.E.Schill. & Panero	Piranhas-GO 16°39'14,4" S e 51°42'29,4" W	M.MAGENTA 352	0,31	22,5	-
<i>Aldama pilosa</i> (Baker) E.E.Schill. & Panero	Campestre da Serra-RS 28°46'49,7" S e 51°05'45,2" W	D.P.V.FALEIRO 24	130	26	++
<i>Aldama robusta</i> (Gardner) E.E.Schill. & Panero	Altinópolis-SP 21°01'49,9" S e 047°18'25,4" W	D.P.V.FALEIRO 26	900	23	++
<i>Aldama rubra</i> (Magenta & Pirani) E.E.Schill. & Panero	Pirassununga-SP 21°57'4,3" S e 47°22'47,4" W	F.A.SANTOS 03	200	28,5	+
<i>Aldama santacatarinensis</i> (H.Rob. & A.J.Moore) E.E.Schill. & Panero	São José dos Ausentes-RS	M.MAGENTA 706	0,14	23,5	+
<i>Aldama squalida</i> (S.Moore) E.E.Schill. & Panero	Piranhas-GO 16°35'44,5" S e 51°55'57,7" W	LOEUILLE 771	8	23	-
<i>Aldama tenuifolia</i> (Gardner) E.E.Schill. & Panero	São Sebastião do Paraíso-MG 20°58'53,0" S e 46°58'52,0" W	E.M.S.SILVA 122869	30	25	+
<i>Aldama trichophylla</i> (Dusén) Magenta	Palmeira-PR 25°22'53,4" S e 49°48'21,0" W	A.B.BOMBO 111850	31	26,5	-
<i>Aldama tuberosa</i> (Griseb.) E.E.Schill. & Panero	Quaraí-RS 30°11'22,5" S e 56°29'39,4" W	M.MAGENTA 600	0,14	33	+

+ presença de tricomas glandulares, porém raros; ++ presença abundante de tricomas glandulares; - ausência de tricomas glandulares.



### 3.2 Secagem, armazenamento e investigação de tricomas glandulares

As partes aéreas do material vegetal coletado foram secas em estufa de ar circulante, sob temperatura de 40 °C, durante 48 h. Após secas, foram pesadas (Tabela 1) e armazenadas ao abrigo da luz, calor e umidade até o momento do uso.

A presença de tricomas glandulares (Tabela 1) nas folhas foi investigada em estereomicroscópio (Zeiss, Alemanha, modelo STEMI 2000C). Na família Asteraceae, os tricomas glandulares são particularmente ricos em LST (SPRING, 1989).

### 3.3 Preparo de extratos vegetais

#### 3.3.1 Extratos hidroalcoólicos

Os extratos hidroalcoólicos foram obtidos a partir do pó das folhas secas previamente pulverizadas em moinho analítico, de acordo com padronização feita por integrantes do AsterBioChem. Foram pesados 20 mg do material, que foi peneirado em tamis com abertura de 0,42 mm. O solvente extrator (2 mL), EtOH:H<sub>2</sub>O na proporção de 7:3 (v/v), foi adicionado para realizar a extração por maceração durante 24 h em agitador orbital (25 °C e 110 rpm). Os extratos foram centrifugados e as soluções extrativas foram separadas e então liofilizadas, resultando em extratos brutos secos.

Por fim, os extratos foram particionados com *n*-hexano para remover o material graxo (ceras, pigmentos lipofílicos, etc.), filtrados em membrana de PTFE com poro de 0,20 µm e diâmetro de 15 mm, secos e mantidos a -20 °C até o momento do uso. Parte dos extratos foram utilizados para as análises em UHPLC-UV-MS e a outra parte para análises *in vitro* dos potenciais de inibição das enzimas COX-1 e 5-LOX. Para cada análise foi utilizado 1 mg de extrato particionado e filtrado.

Os solventes orgânicos utilizados foram grau HPLC (J.T. Baker<sup>®</sup>, EUA) e água Milli-Q (Merck Millipore<sup>®</sup>, Alemanha).

### 3.3.2 Extratos de lavagem foliar (ELF)

Os extratos de lavagem foliar foram preparados com as espécies, *A. anchusifolia*, *A. arenaria*, *A. bakeriana*, *A. discolor*, *A. gardneri*, *A. grandiflora*, *A. pilosa*, *A. robusta*, *A. rubra* e *A. tenuifolia*. As folhas secas e íntegras (2,5 g) foram lavadas por 20 s com acetona ou EtOH (150 mL). O objetivo foi escolher o solvente extrator que melhor extraísse as substâncias. Cada folha intacta foi lavada individualmente com cada solvente, tendo a superfície abaxial (onde os tricomas estão localizados) virada para baixo. A extração do conteúdo glandular foi monitorada em estereomicroscópio. Os extratos foram então filtrados e evaporados sob pressão reduzida. Esses extratos foram ressuspensos em MeOH:H<sub>2</sub>O (7:3, v/v) e submetidos à partição líquido-líquido com *n*-hexano para remover o material graxo. A fração hidrometanólica de cada extrato foi evaporada sob pressão reduzida, secada e acondicionada até o momento do uso. Para todos os extratos foram utilizados solventes em grau analítico (Synth<sup>®</sup>, Brasil).

### 3.3.3 Extratos glandulares

Nas espécies *A. anchusifolia*, *A. arenaria*, *A. bakeriana*, *A. discolor*, *A. grandiflora*, *A. pilosa*, *A. robusta*, *A. rubra* e *A. tenuifolia* foram coletados individualmente 50 unidades presentes nas folhas com auxílio de agulha de dissecação, sob estereomicroscópio, e dispostos em um microtubo com capacidade para 1 mL. Em seguida, os tricomas foram dissolvidos em MeCN:H<sub>2</sub>O (1:1, v/v), centrifugados em microcentrífuga e armazenados em refrigerador até o momento do uso. O solvente orgânico utilizado foi grau HPLC (J.T. Baker<sup>®</sup>, EUA) e água Milli-Q.

## 3.4 Ensaios do potencial de inibição *in vitro* – COX-1 e 5-LOX

Da 24 espécies coletadas, 19 foram avaliados quanto ao seu potencial para inibir *in vitro* as enzimas COX-1 e 5-LOX, utilizando os kits de triagem de inibidores da COX (nº do catálogo 560101, Cayman Chemical, USA) e LOX (nº do catálogo

760700 e 60401, Cayman Chemical, USA) de acordo com as instruções do fabricante.

Para avaliar a inibição da via COX-dependente, os extratos e substâncias foram dissolvidos na solução tampão (Tris-HCl 0,1 M; pH 8, contendo 5 mM de EDTA e 2 mM de fenol + 45 mL de água Milli-Q), gerando uma solução estoque (1 mg/100  $\mu$ L). Em seguida, uma diluição seriada desta solução estoque foi realizada, para que se chegasse às concentrações definidas no ensaio piloto, utilizando a solução tampão como diluente, que é também utilizado para desenvolvimento da reação. Considerou-se para essa diluição que apenas 20  $\mu$ L são pipetados e que a concentração final (100, 10, 1, 0,1 e 0,01  $\mu$ g/mL) é determinada levando-se em conta o volume total de 1 mL. As doses obtidas (20  $\mu$ L) foram incubadas por 5 min a 37 °C com a COX-1 (10  $\mu$ L), a solução de Heme (10  $\mu$ L) e solução tampão (950  $\mu$ L). Após adição de ácido araquidônico (10  $\mu$ L), as soluções foram incubadas por mais 2 min. Ácido clorídrico 1 M (50  $\mu$ L) foi adicionado e os tubos foram removidos do banho a 37 °C. Logo após, foram adicionados 100  $\mu$ L de solução saturada de cloreto estanhoso (125 mg de cloreto estanhoso em 2,5 mL de ácido clorídrico 0,1 M).

A produção de PG na etapa de reação descrita acima foi dosada em imunoenensaio (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* - ELISA), baseado na competição entre PG e PG conjugada à enzima acetilcolinesterase (PG-conj) pelo limitado número de anticorpos anti-PG ligados na placa de 96 poços. Assim, a ligação de PG-conj é inversamente proporcional à quantidade de PG. Esta etapa foi realizada exatamente como descrito no *kit*, na diluição recomendada de 1:2000. A placa foi incubada por 18 horas à temperatura ambiente num agitador orbital. As placas de 96 poços foram lavadas com tampão para remover substâncias não ligadas aos anticorpos nos poços. O reagente de Ellman, que contém substrato para acetilcolinesterase, foi adicionado a cada poço. O produto da reação enzimática é amarelo e a intensidade desta cor foi medida em leitor de placa no comprimento de onda de 405 nm. A intensidade da cor é proporcional à quantidade de PG-conj ligada e inversamente proporcional à quantidade de PG incubada; assim, uma maior densidade ótica indica maior poder de inibição da produção de PG por inibição da COX-1 pelos extratos/substâncias. A quantidade de PG foi mensurada por interpolação da densidade ótica obtida em curva de densidade ótica por concentração de PG. As porcentagens de inibição foram determinadas e com elas

foi realizado o cálculo de concentração inibitória de 50% da atividade enzimática ( $IC_{50}$ ).

Para avaliar a inibição da via LOX-dependente, os extratos foram dissolvidos da mesma forma que para o ensaio com a COX, a fim de se chegar às mesmas doses (considerando pipetar 10  $\mu$ L num volume total de 100  $\mu$ L), porém utilizando a solução tampão do respectivo *kit* (Tris-HCl 0,1 M; pH 7,4 + 27 mL de água Milli-Q). Os extratos ou substâncias a serem avaliadas (10  $\mu$ L), a enzima 5-LOX em solução tampão (90  $\mu$ L) e a solução contendo ácido linoléico (10  $\mu$ L) foram mantidas nas placas de 96 poços em agitador por 5 min. A solução cromógena (100  $\mu$ L) foi adicionada aos poços e as placas foram mantidas em agitador por mais 5 min. A atividade da LOX foi mensurada pela produção de hidroperóxidos que absorvem no comprimento de onda de 492 nm. A leitura das densidades óticas foi obtida por leitor de placas; menores densidades óticas indicam maior inibição da 5-LOX pelos extratos/substâncias. As porcentagens de inibição foram determinadas e a partir delas foi calculado os valores de  $IC_{50}$ .

### 3.5 Análises dos perfis químicos dos ELF por HPLC-UV-DAD

Os ELF etanólico e acetônico de cada espécie foram analisados por HPLC em um equipamento Shimadzu (Japão) LC-10ADvp, equipado com *Diode Array Detection* (DAD) SPD-M10Avp e auto-injetor SIL-10ADvp. Para a análise foram utilizadas duas colunas de fase reversa (C-18 monolítica, 3 x 100 mm, Phenomenex<sup>®</sup>, EUA) acopladas em série e protegidas por uma pré-coluna equivalente. O método empregado foi desenvolvido pelo grupo AsterBioChem, no qual a fase móvel foi um gradiente linear de eluição utilizando como solventes MeCN e H<sub>2</sub>O. O seguinte método cromatográfico utilizado foi: 0%-45% de MeCN em 60 min, seguido de 45%-100% de MeCN em 5 min e concluído com 100% de MeCN por 5 min. A vazão foi de 1,4 mL/min e acrescentado 1% de ácido acético na fase móvel.

Os dados cromatográficos foram processados utilizando o software Class VP (versão 6.14 SP2B; Shimadzu, Japão). Os solventes orgânicos utilizados foram grau HPLC (J.T. Baker<sup>®</sup>, EUA) e água Milli-Q.

### 3.6 Análises dos perfis químicos e desreplicação

As análises cromatográficas dos extratos hidroalcoólico, de lavagem foliar e de tricomas, foram realizadas em um UHPLC Accela™ (Thermo Fisher Scientific, USA) acoplado a um detector de UV-DAD (Thermo Fisher Scientific) e a um espectrômetro de massas Exactive Plus™ (Thermo Fisher Scientific) com ionização por *electrospray* (ESI) e analisador do tipo Orbitrap™.

Para a análise dos extratos, foi injetada uma alíquota de 5 µL via auto-injetor, mantido à temperatura de 10 °C. A separação cromatográfica foi feita em uma coluna ACE® cromatográfica de fase reversa (C-18, 150 x 3 mm, 3 µm de diâmetro de partícula), protegida por uma pré-coluna equivalente. A vazão da fase móvel foi de 0,4 mL/min e temperatura do forno 45 °C, utilizando H<sub>2</sub>O com ácido fórmico (0,1%) (v/v) na bomba A e MeCN na bomba B, de acordo com o seguinte gradiente linear de eluição: 0 – 17 min, 2 - 55% B; 17 – 20 min, 55 - 100% B; 20 – 24 min, 100% B; 24 – 27 min, 100 - 2% B; 27 – 30 min, 2% B. Os cromatogramas no UV foram registrados nos comprimentos de onda 214, 254 e 325 nm.

Os espectros de massas foram adquiridos em *full scan* e MS/MS nos modos positivo e negativo concomitantemente, na faixa de varredura 130 - 1200 *m/z*. Os parâmetros a seguir foram mantidos em todas as análises: 250 ms para o máximo tempo de injeção, intervalo entre os espectros de 1 µs, resolução de 70.000, voltagem no spray de 3,6 kV no modo de ionização negativo e 3,2 kV no modo de ionização positivo, e temperatura do capilar de 300 °C.

Antes da sequência de análises foi feita uma calibração externa para cada polaridade, utilizando a solução Thermo calmix (Sigma-Aldrich®). Os dados foram processados e armazenados usando o software Thermo™ Xcalibur™ versão 2.2 (Thermo Fisher Scientific®). As amostras foram analisadas em sequência iniciando pelo branco (MeCN:H<sub>2</sub>O) e, a cada dez amostras, o branco foi reinjetado. A desreplicação foi, então, realizada para todas as amostras por comparação dos dados de massas exatos com os do *Dictionary of Natural Products*® (DNP), do AsterDB e da literatura (SciFinder Scholar®). Essa desreplicação foi realizada com o auxílio do software MZmine (tópico 3.7).

### 3.7 Análises *in silico*

Os dados foram armazenados no software Thermo™ Xcalibur™ no formato (.raw). Esses foram separados em dados de detecção no modo positivo e negativo com o software FTPrograms 2.2 (Thermo Fisher Scientific®) e convertidos do formato (.raw) para (.mzXML) pelo software MS File Reader 2.2 (Thermo Fisher Scientific®), para assim serem processados no MZmine 2.10 (MZmine Development Team, USA).

O software MZmine processa a detecção de massas em cada espectro; os picos detectados na razão massa/carga ( $m/z$ ) foram processados em ordem decrescente de intensidade e aqueles que apresentaram “ombro” foram removidos para evitar sinais falsos. Os cromatogramas foram construídos e desconvoluídos em picos individuais, seus picos isotópicos foram eliminados e apenas o maior isótopo foi mantido. Os picos detectados nos diferentes extratos foram alinhados e os espaços vazios preenchidos. Os parâmetros utilizados no MZmine estão descritos no Apêndice 1.

Com os dados cromatográficos tratados, foi realizada uma desreplicação prévia com os bancos de dados já inseridos no software. Esses bancos foram construídos com substâncias já evidenciadas na família Asteraceae pelo grupo de pesquisas AsterBioChem e também com o auxílio das bases de dados Scifinder® e DNP.

A partir da desreplicação feita pelo MZmine, cada extrato foi analisado no software Thermo™ Xcalibur™ para confirmação dessa identificação avaliando cada sinal cromatográfico. Os espectros de absorção no UV foram usados para sugerir as classes de metabólitos secundários. Em seguida, os espectros de massas foram usados para calcular as possíveis fórmulas moleculares e suas respectivas massas monoisotópicas. As fórmulas moleculares foram usadas como ferramenta de busca nos bancos de dados Scifinder® e DNP. Por fim, a identificação dos picos cromatográficos também foi baseada nos dados presentes na literatura, em especial as substâncias previamente descritas no gênero *Aldama*.

Com os resultados do potencial de inibição das enzimas COX e LOX ( $IC_{50}$ ) das espécies e dos dados cromatográficos de cada extrato (previamente tratados no MZmine e exportados deste software em formato .csv) foram realizadas as análises

de correlação empregando análise estatística multivariada supervisionada no software SIMCA-P 13.0.2.0© (Umetrics, Suécia).

O método de estatística multivariada Projeção Ortogonal de Estruturas Latentes (*Orthogonal Partial Least Square*, OPLS) foi utilizado para indicar biomarcadores com potencial anti-inflamatório a partir dos dados de LC-MS e IC<sub>50</sub> dos extratos. Parâmetros padrão foram utilizados no software para a análise estatística e os dados foram avaliados com a normalização do tipo Pareto. As análises estatísticas foram realizadas com os dados cromatográficos com detecção de massas nos modos positivo e negativo separadamente. Os melhores modelos estatísticos (OPLS) para pesquisa de biomarcadores foram validados para a predição de atividade de inibição concomitante da COX-1 e da 5-LOX em extratos não avaliados previamente. A validação dos modelos foi realizada por validação cruzada e externa. Para tal, as amostras foram divididas em um conjunto de dados de treino (70%) e um de testes e validação destes modelos (30%). As amostras estão descritas no Apêndice 2.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**



## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Ensaios do potencial de inibição *in vitro* – COX-1 e 5-LOX

Dentre os extratos hidroalcoólicos desprovidos de material graxo das 19 espécies de *Aldama* testadas, 16 (84,2%) apresentaram alguma atividade nos alvos avaliados (Tabela 2). Doze espécies (63,1%) revelaram potencial para inibição de apenas uma das enzimas, preferencialmente a 5-LOX; já para COX-1 foi uma espécie (5,3%). Três espécies (15,8%) apresentaram a atividade pretendida nesse estudo, ou seja, a inibição concomitante das enzimas COX-1 e 5-LOX, sendo elas a *A. pilosa*, *A. robusta* e *A. trichophylla*. Do total, apenas três espécies não apresentaram nenhuma atividade. As espécies *A. aspilioides*, *A. goyazii*, *A. oblongifolia*, *A. santacatarinensis* e *A. tuberosa* ainda não foram avaliadas nos bioensaios.

**Tabela 2** - Resultados do potencial de inibição das enzimas cicloxigenase (COX-1) e lipooxigenase (5-LOX) pelos extratos hidroalcoólicos das espécies de *Aldama*.

Espécie	COX IC <sub>50</sub> (µg/mL)	LOX IC <sub>50</sub> (µg/mL)
<i>Aldama anchusifolia</i> (DC.) E.E.Schill. & Panero	s/a	41
<i>Aldama arenaria</i> (Baker) E.E.Schill. & Panero	s/a	16,5
<i>Aldama aspilioides</i> (Baker) E.E.Schill. & Panero	n/a	n/a
<i>Aldama bakeriana</i> (S.F.Blake) E.E.Schill. & Panero	0,1	s/a
<i>Aldama bracteata</i> (Gardner) E.E.Schill. & Panero	s/a	3,6
<i>Aldama discolor</i> (Baker) E.E.Schill. & Panero	s/a	8,4
<i>Aldama fillifolia</i> (Sch.Bip. ex Baker) E.E.Schill. & Panero	s/a	5,6
<i>Aldama gardneri</i> (Baker) E.E.Schill. & Panero	s/a	80,4
<i>Aldama goyazii</i> E.E.Schill. & Panero	n/a	n/a
<i>Aldama grandiflora</i> (Gardner) E.E.Schill. & Panero	s/a	71
<i>Aldama kunthiana</i> (Gardner) E.E.Schill. & Panero	s/a	15,1
<i>Aldama linearifolia</i> (Chodat) E.E.Schill. & Panero	s/a	s/a
<i>Aldama megapotamica</i> (Malme) Magenta & Pirani	s/a	68,1
<i>Aldama nudibasilaris</i> (S.F.Blake) E.E.Schill. & Panero	s/a	67,6
<i>Aldama nudicaulis</i> (Baker) E.E.Schill. & Panero	s/a	s/a
<i>Aldama oblongifolia</i> (Gardner) E.E.Schill. & Panero	n/a	n/a
<i>Aldama pilosa</i> (Baker) E.E.Schill. & Panero	> 100	67,2
<i>Aldama robusta</i> (Gardner) E.E.Schill. & Panero	0,1	36,0
<i>Aldama rubra</i> (Magenta & Pirani) E.E.Schill. & Panero	s/a	0,7
<i>Aldama santacatarinensis</i> (H.Rob. & A.J.Moore) E.E.Schill. & Panero	n/a	n/a
<i>Aldama squalida</i> (S.Moore) E.E.Schill. & Panero	s/a	s/a
<i>Aldama tenuifolia</i> (Gardner) E.E.Schill. & Panero	s/a	>100
<i>Aldama trichophylla</i> (Dusén) Magenta	2,6	4,0
<i>Aldama tuberosa</i> (Griseb.) E.E.Schill. & Panero	n/a	n/a

s/a= sem atividade; n/a= não avaliada.

No ensaio enzimático da inibição de COX-1 foi utilizada a indometacina como controle positivo, resultando em 0,6 µg/mL de inibição (PRUSAKIEWICZ et al., 2004). Para o ensaios com 5-LOX foi utilizado o ácido nordihidroguaiarético, com 0,8 µg/mL de inibição (NAIR; FUNK, 2009). Os extratos de *A. bakeriana* e *A. robusta* apresentaram IC<sub>50</sub> de 0,1 µg/mL para COX-1 e, por se tratarem de extratos, esse resultado é promissor quando comparado com o IC<sub>50</sub> de 0,6 µg/mL da indometacina, uma vez que são mais ativos que o fármaco controle.

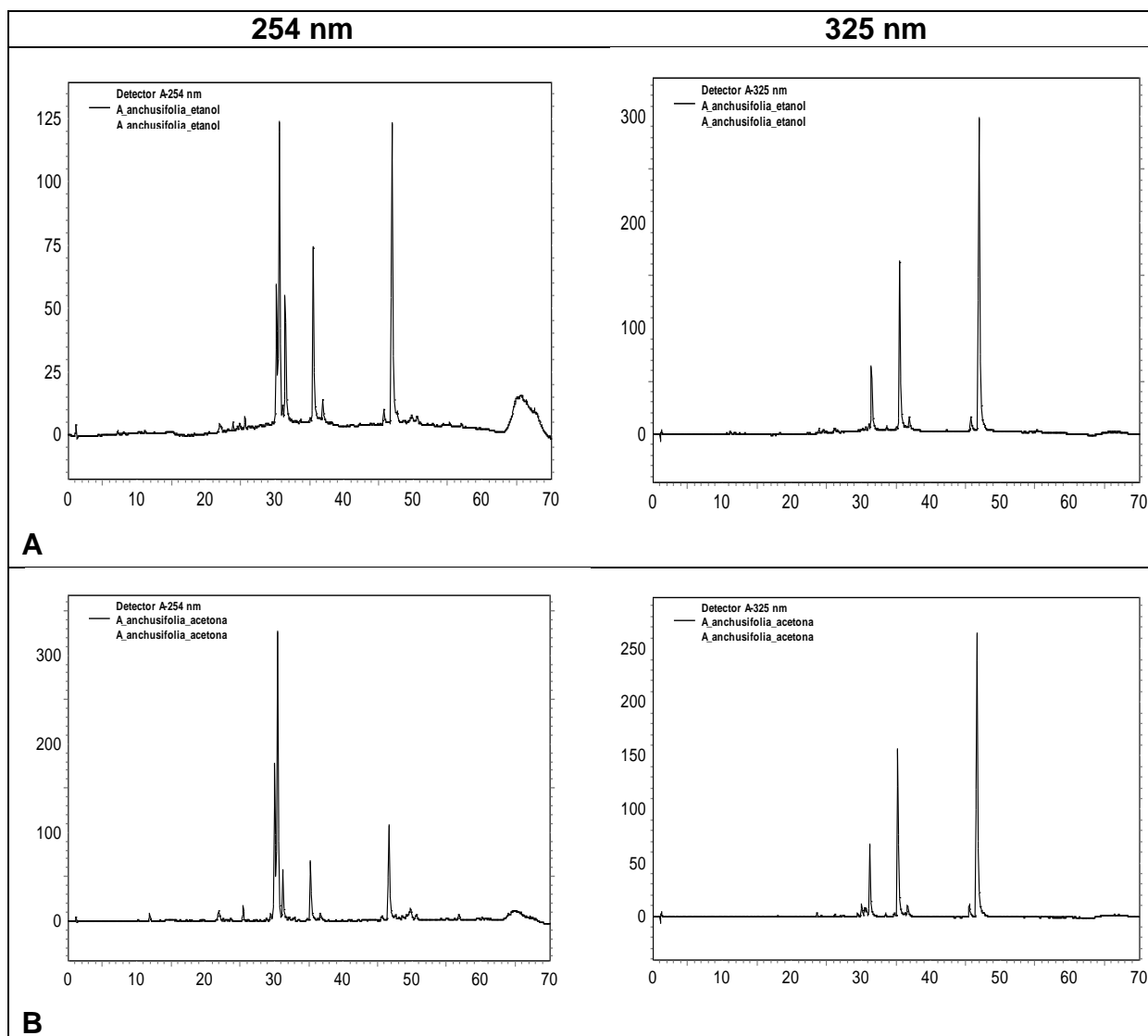
Portanto, a fim de se conhecer qual ou quais substâncias são inibidoras de COX e LOX nos extratos mais ativos, a espécie *A. robusta* foi selecionada para a investigação dos seus constituintes químicos, como será descrito no item 4.3. Com os dados dos estudos de correlação *in silico* é possível determinar qual ou quais substâncias estão correlacionadas com tais propriedades (item 4.4).

#### 4.2 Análises dos perfis químicos dos ELF por HPLC-UV-DAD

Os ELF foram preparados com o material das espécies que possuíam folhas secas em quantidade suficiente para tal procedimento, assim como descrito no item 3.3.2. As espécies analisadas foram: *A. anchusifolia*, *A. arenaria*, *A. bakeriana*, *A. discolor*, *A. gardneri*, *A. grandiflora*, *A. pilosa*, *A. robusta*, *A. rubra* e *A. tenuifolia*.

As impressões digitais obtidas por HPLC-UV-DAD dos extratos demonstraram perfis ricos em substâncias como LST, flavonoides e ácidos clorogênicos. Os flavonoides apresentam bandas de absorção máxima características no UV, uma entre 230-295 (banda II) e outra entre 300-560 nm (banda I), com variações que dependem do tipo da classe do flavonoide (ANDERSEN; MARKHAM, 2006). Por sua vez, os ácidos clorogênicos, muito frequentes nos extratos, apresentam caracteristicamente duas bandas de absorção máxima no UV, uma em torno de 300 e outra em torno de 320 nm (CLIFFORD et al., 2003).

A Figura 4 mostra os cromatogramas com os perfis químicos da espécie *A. anchusifolia* obtido por HPLC-UV-DAD. Nota-se que os ELF etanólico (**A**) e acetônico (**B**) possuem os mesmos picos, os quais foram visualizados nos mesmos sinais tempos de retenção.



**Figura 4** – Impressões digitais metabólicas em 254 e 325 nm dos extratos obtidos por HPLC-UV-DAD (0-45% de MeCN em 60 min, 45-100% em 5 min, 100% por 5 min; 1% de ácido acético; duas colunas monolíticas C-18, 3 x 100 mm, em série). **A.** ELF etanólico de *A. anchusifolia* e **B.** ELF acetônico de *A. anchusifolia*.

A acetona é um solvente irritante, podendo provocar eritema ou ressecamento da pele em contato prolongado ou repetido. Já o contato pelas vias aéreas pode provocar dor de cabeça, fadiga e irritação bronquiolar (VELLASCO JÚNIOR, 2011). Por sua vez, o EtOH é largamente empregado nas indústrias químicas para a fabricação de inúmeros produtos de interesse econômico por apresentar baixa toxicidade no manuseio e no meio ambiente (SILVA, DA; CAMPOS, 2013).

Diante das respostas similares nas impressões digitais obtidas por esses solventes e da toxicidade de cada um, optou-se por empregar EtOH.

### 4.3 Análises dos perfis químicos e desreplicação

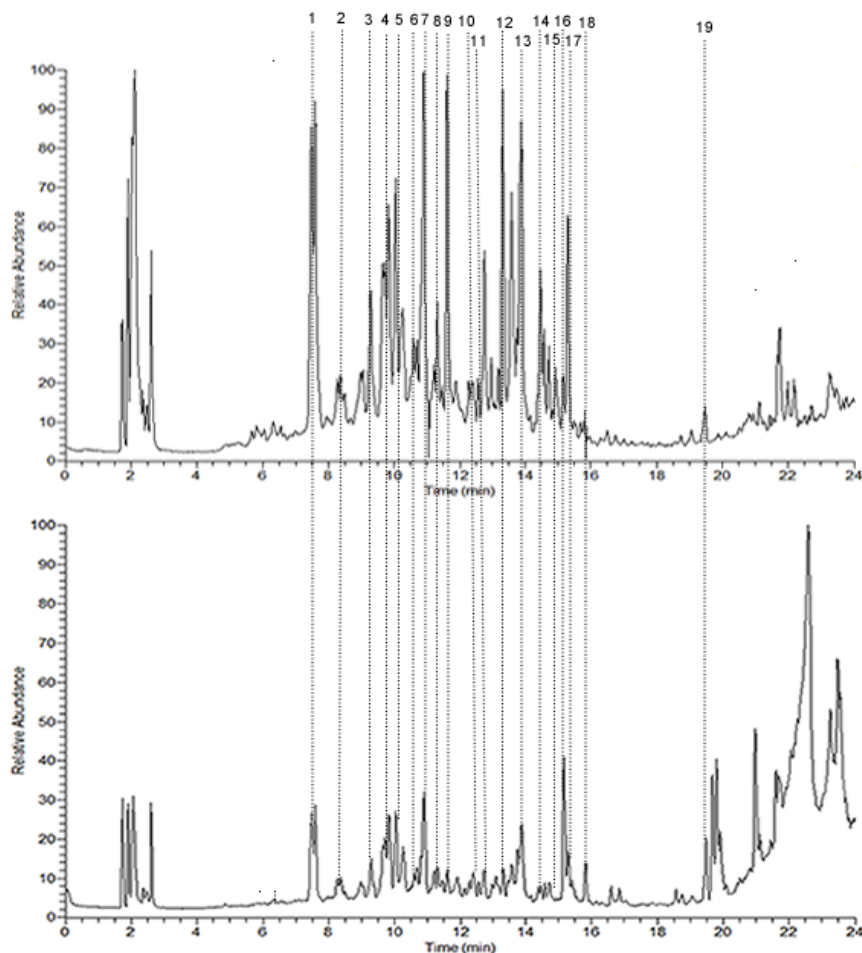
Desreplicação refere-se à rápida identificação de metabólitos secundários conhecidos em matrizes biológicas complexas, como extratos vegetais. As plantas são especialmente ricas em diferentes classes de metabólitos com polaridades diferentes, que geralmente estão presentes numa grande variedade de concentrações. Contudo, métodos analíticos confiáveis, robustos e seletivos são necessários para identificar metabólitos secundários em misturas complexas (VOS, DE et al., 2007; ABDELMOHSEN et al., 2014).

Os perfis químicos foram obtidos por UHPLC-UV-MS com alto poder de resolução e precisão em massa, resultando em confiança analítica para identificação das substâncias (PERRY et al., 2008). Os cromatogramas dos diferentes extratos foram acessados da seguinte forma: foram extraídos os espectros de UV e de massas de cada pico, com os objetivos, respectivamente, de indicação da classe química e obtenção da massa monoisotópica dos íons pico base e fragmentos nos modos de ionização positivo e negativo. Assim, utilizando-se o banco de dados *AsterDB* e as bases de dados Scifinder<sup>®</sup> e DNP, foi possível evidenciar e sugerir substâncias presentes nos extratos.

Com base nos resultados de inibição de COX-1 e a 5-LOX, a espécie *A. robusta* foi selecionada para o estudo de desreplicação, com o intuito de se conhecer os constituintes do extrato responsáveis pela inibição dupla.

#### 4.3.1 Extrato hidroalcoólico

Os extratos brutos hidroalcoólicos tiveram rendimento que variaram de 14,5 a 29,5% de acordo com as espécies (Tabela 1). As impressões digitais obtidas dos extratos de *A. robusta* por UHPLC-UV-MS mostraram que os metabólitos secundários encontrados no extrato hidroalcoólico são pertencentes às classes dos ácidos clorogênicos, flavonoides e LST (Figura 5 e Tabela 3), como será descrito a seguir.



**Figura 5** - Cromatogramas de íons totais (TIC) do extrato hidroalcoólico de *A. robusta* obtidos a partir das análises por UHPLC-UV-MS nos modos de ionização negativo acima e positivo abaixo. As identificações dos picos cromatográficos constam na Tabela 3.

#### 4.3.1.1 Ácidos clorogênicos

Os ácidos clorogênicos foram identificados com base na análise de espectros no UV e de massas, utilizando as chaves para identificação dessa classe, que são os íons pico base e os fragmentos característicos de cada substância (CLIFFORD et al., 2003, 2005, 2006; MARTUCCI et al., 2014) (Figura 5 e Tabela 3).

Os picos cromatográficos 1 e 9 correspondem às substâncias ácido 3-*O-E*-cafeoilquínico (3-CQA) e ácido 4-*O-E*-cafeoilquínico (4-CQA), respectivamente. Estes picos apresentaram o íon pico base  $m/z$  355  $[M+H]^+$  no modo positivo e  $m/z$  353  $[M-H]^-$  no modo negativo. O 3-CQA apresentou o íon fragmento  $m/z$  191 formado após a perda de uma unidade cafeoila (CAF) no modo de ionização negativo, já 4-CQA apresentou o íon  $m/z$  179 derivado do ácido caféico (CLIFFORD

et al., 2003). O padrão da substância 5-CQA foi injetado separadamente para melhor diferenciação.

Os picos 3 e 12 foram identificados como os ácidos 3-*O-E*-feruloilquínico (3-FQA) e 5-*O-E*-feruloilquínico (5-FQA), apresentando o íon pico base  $m/z$  369  $[M+H]^+$  no modo de ionização positivo e o íon  $m/z$  367  $[M-H]^-$  no modo negativo, baseado na descrição de Clifford et al. (2003).

Os picos 6, 7 e 8 correspondem aos ácidos di-*O-E*-cafeoilquínicos (diCQA), sendo 3,4-diCQA, 3,5-diCQA e 4,5-diCQA, respectivamente. No modo de ionização positivo essas substâncias apresentaram os íons  $m/z$  517  $[M+H]^+$  e  $m/z$  499  $[(M+H) - H_2O]^+$ , formados a partir da desidratação do ácido diCQA, enquanto que, no modo de ionização negativo, foram observados os íons  $m/z$  515  $[M-H]^-$  como pico base. A diferença entre eles foi determinada pela ordem de eluição descrita por Clifford et al. (2005).

Os picos 10 e 11 foram correspondentes aos ácidos 3,4-*O-E*-cafeoilferuloilquínico e 3,4-*O-E*-feruloilcafeoilquínico, diferenciados por Martucci et al. (2014). No modo positivo apresentaram o íon pico base  $m/z$  531  $[M+H]^+$  e o íon fragmento  $m/z$  513  $[(M+H) - H_2O]^+$ ; já no modo negativo apresentaram o íon pico base  $m/z$  529  $[M-H]^-$ .

O pico 14 foi sugestivo do ácido 5-*O*-dimetoxicinamoilquínico, uma vez que apresenta o íon pico base no modo de ionização negativo  $m/z$  381  $[M-H]^-$  e um íon fragmento  $m/z$  193 que é atípico, pois o esperado seria o íon fragmento dimetoxicinamoil  $m/z$  207 (CLIFFORD et al., 2006). O pico 15 corresponde ao ácido 3,4-dimetoxicinâmico, baseado em Clifford et al. (2006), que apresenta o pico base  $m/z$  209  $[M+H]^+$  no modo positivo, e o pico base  $m/z$  207  $[M-H]^-$  no modo de negativo. O padrão dessa substância foi injetado a fim de comparar com os espectros de UV e massas do extrato.

**Tabela 3** – Identificação dos picos cromatográficos do extrato hidroalcoólico de *A. robusta* e dados de espectrometria de massas e no UV obtidos a partir das análises por UHPLC-UV-MS. Os números dos picos referem-se à Figura 5.

Número do pico	Tempo de retenção (min)	Substância	Íons observados ( <i>m/z</i> ) no cromatograma TIC (UHPLC-MS) no modo de ionização positivo	Íons observados ( <i>m/z</i> ) no cromatograma TIC (UHPLC-MS) no modo de ionização negativo	UV máx (nm)
1	7,4	ácido 3- <i>O-E</i> -cafeoilquínico*	[M+H] <sup>+</sup> 355,1022 pb, [(M+H) - AQ] <sup>+</sup> 163	[M-H] <sup>-</sup> 353,0879 pb, [(M-H) - CAF] <sup>-</sup> 191	299, 326
2	8,2	quercetina 3,7-diglicosídeo	[M+H] <sup>+</sup> 627,1564 pb	[M-H] <sup>-</sup> 625,1416 pb, [(M-H) - glucosídeo] <sup>-</sup> 447	273, 339
3	9,2	ácido 3- <i>O-E</i> -feruloilquínico	[M+H] <sup>+</sup> 369,1181 pb, [(M+H) - AQ] <sup>+</sup> 177	[M-H] <sup>-</sup> 367,1032 pb	299, 326
4	9,7	rutina*	[M+H] <sup>+</sup> 611,1607 pb, [(M+H) - ramnosila 303] <sup>+</sup> 465, [(M+H) - ramnosila - glucose] <sup>+</sup> 303	[M-H] <sup>-</sup> 609,1462 pb	255, 264sh, 350
5	10,0	quercetina 3- <i>O</i> -glicuronila	[M+H] <sup>+</sup> 479,0822 pb, [(M+H) - glicuronila] <sup>+</sup> 303	[M-H] <sup>-</sup> 47,0674 pb, [(M-H) - glicuronila] <sup>-</sup> 301	256, 265sh, 298sh, 350
6	10,5	ácido 3,4-di- <i>O-E</i> -cafeoilquínico	[M+H] <sup>+</sup> 517,1349 pb, [(M+H) - H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> 499, [(M+H) - AQ] <sup>+</sup> 163	[M-H] <sup>-</sup> 515,1197 pb	300, 328
7	10,9	ácido 3,5-di- <i>O-E</i> -cafeoilquínico	[M+H] <sup>+</sup> 517,1342 pb, [(M+H) - H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> 499, [(M+H) - AQ] <sup>+</sup> 163	[M-H] <sup>-</sup> 515,1193 pb	299, 327
8	11,3	ácido 4,5-di- <i>O-E</i> -cafeoilquínico	[M+H] <sup>+</sup> 517,1347 pb, [(M+H) - H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> 499 [(M+H) - AQ] <sup>+</sup> 163	[M-H] <sup>-</sup> 515,1195 pb	299, 327
9	11,6	ácido 4- <i>O-E</i> -cafeoilquínico	[M+H] <sup>+</sup> 355,1026, [(M+H) - AQ] <sup>+</sup> 163	[M-H] <sup>-</sup> 353,0881 pb, [CAF - H] <sup>-</sup> 179	300, 330
10	12,2	ácido 3,4- <i>O-E</i> -cafeoilferuloilquínico	[M+H] <sup>+</sup> 531,1507 pb [(M+H) - H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> 513	[M-H] <sup>-</sup> 529,1355 pb	299, 326
11	12,5	ácido 3,4- <i>O-E</i> -feruloilcafeoilquínico	[M+H] <sup>+</sup> 531,1510 pb, [(M+H) - H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> 513	[M-H] <sup>-</sup> 529,1356 pb	298, 327
12	13,3	ácido 5- <i>O-E</i> -feruloilquínico	[M+H] <sup>+</sup> 369,1184 pb, [(M+H) - AQ] <sup>+</sup> 177	[M-H] <sup>-</sup> 367,10364 pb	298, 328
13	13,9	3- <i>O</i> -metilquercetina*	[M+H] <sup>+</sup> 317,06537 pb	[M-H] <sup>-</sup> 315,0510	276, 290sh, 349
14	14,4	ácido 5- <i>O</i> -dimetoxicinamoilquínico	[(M+H) + Na] <sup>+</sup> 405 pb, [M+H] <sup>+</sup> 383,1343,	[M-H] <sup>-</sup> 381,1190 pb	295, 328
15	14,9	ácido 3,4-dimetoxicinâmico*	[M+H] <sup>+</sup> 209,0811 pb	[M-H] <sup>-</sup> 207,0658 pb	294, 328
16	15,1	budleína A*	[M+H] <sup>+</sup> 375,1437 pb, [(M+H) - H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> 357	[M-H] <sup>-</sup> 373,1297 pb	267
17	15,2	não identificada	-	[M-H] <sup>-</sup> 602,2584 pb	-
18	15,8	4',5,7-triidróxi-3',6,8-trimetoxiflavona	[M+H] <sup>+</sup> 361,0916 pb	[M-H] <sup>-</sup> 359,0774 pb	276, 308, 339
19	19,4	quercetagetina 3,6-dimetileter	[M+H] <sup>+</sup> 345,0965 pb, [(M+H) - CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> 330, [(M+H) - 2CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> 315	[M-H] <sup>-</sup> 343,0822 pb	276, 292, 339

\* Tempo de retenção comparado com o padrão; pb: pico base; AQ: ácido quínico; CAF: cafeoila

#### 4.3.1.2 Flavonoides

A identificação dos flavonoides presentes no extrato das folhas de *A. robusta* foi feita com base nos espectros no UV e de massas, comparando com os dados da literatura, tanto no modo de ionização positivo quanto no negativo. Também foram usados dados presentes na literatura sobre flavonoides identificados no gênero (Figura 5 e Tabela 3).

O pico 2 foi identificado como quercetina-3,7-diglucosídeo, a qual já havia sido identificada em folhas de *Aldama* (SCHILLING et al., 1988). O espectro de massas obtido no modo de ionização positivo apresentou o íon pico base  $m/z$  627  $[M+H]^+$  e no negativo  $m/z$  625  $[M-H]^-$ , e o íon fragmento  $m/z$  447, originado após a perda de glucosídeo.

O pico 4 apresentou espectro no UV semelhante ao esperado para a rutina, com absorção máxima em 255 e 350 nm e um ombro com absorção máxima em 267 nm. O espectro de massas obtido no modo de ionização positivo mostrou o íon pico base  $m/z$  611  $[M+H]^+$  e os íons fragmentos  $m/z$  465 devido à perda de ramosila e o  $m/z$  303 formado depois da perda de hexose. O modo de ionização negativo apresentou o íon pico base  $m/z$  609  $[M-H]^-$  (CUYCKENS; CLAEYS, 2004). O padrão da rutina foi injetado e os dados comparados com o encontrado no extrato.

O pico 5 foi identificado como quercetina-3-O-glicuronila, apresentando o íon pico base no modo positivo  $m/z$  479  $[M+H]^+$  e o íon fragmento  $m/z$  303 correspondente à perda de glicuronila. No modo negativo observou-se o íon pico base  $m/z$  477  $[M-H]^-$  e o íon fragmento  $m/z$  301, também resultante da perda de glicuronila (ANDERSEN; MARKHAM, 2006).

O pico 13 apresentou os espectros de massas com os íons pico base em  $m/z$  317  $[M+H]^+$  no modo positivo e  $m/z$  315  $[M-H]^-$  no modo negativo, sugestivos da substância 3-O-metilquercetina (MA et al., 1999). Essa substância já havia sido evidenciada no gênero *Aldama* (SCHILLING, 1989). O padrão dessa substância foi injetado para comparação dos espectros no UV e de massas.

O pico 18 é sugestivo da substância 4',5,7-triidróxi-3',6,8-trimetoxiflavona, já evidenciada dentre os flavonoides presentes em *Aldama* (WOLLENWEBER et al., 1995). No modo de ionização positivo, o espectro apresentou o íon pico base  $m/z$  361  $[M+H]^+$  e no modo negativo  $m/z$  359  $[M-H]^-$ .



O pico 19 corresponde à substância quercetagetina 3,6-dimetileter. O espectro no modo de ionização positivo apresentou o íon pico base  $m/z$  345  $[M+H]^+$  e o íons fragmentos  $m/z$  330 e 315 devido à perda de um e dois grupamentos metila respectivamente (PAREJO et al., 2004). O espectro no modo de ionização negativo apresentou o íon pico base  $m/z$  343  $[M-H]^-$ , sendo essa substância já descrita em *Aldama* (SCHILLING, 1989).

#### 4.3.1.2 Lactona sequiterpênica

No extrato hidroalcoólico foi desreplicada apenas a budleína A, referente ao pico 16. Essa LST é encontrada em vários representantes de *Aldama*, como em *A. robusta* (DA COSTA et al., 1996), *A. arenaria* (AMBROSIO et al., 2004), *V. buddleiaeformis* (VIVAR, DE et al., 1976), *V. sylvatica* (TAMAYO-CASTILLO et al., 1989), *V. linearis* (DELGADO et al., 1985), *V. eriophora* (SPRING et al., 2000) e *V. excelsa* (DELGADO et al., 1984).

O espectro no modo de ionização positivo apresentou o íon pico base  $m/z$  375  $[M+H]^+$  e o íon fragmento  $m/z$  357 decorrente da perda de  $H_2O$ ; já no modo de ionização negativo, foi observado o íon pico base  $m/z$  373. A budleína A isolada das folhas de *A. robusta* foi injetada separadamente para comparação da fragmentação.

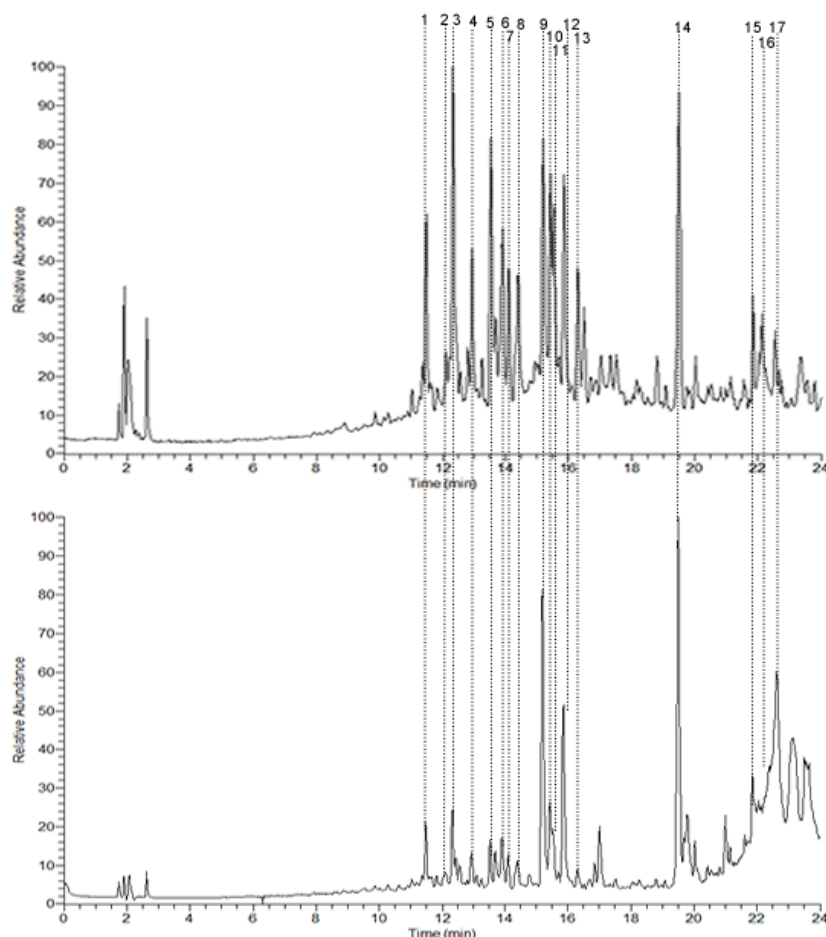
#### 4.3.2 Extrato de lavagem foliar (ELF)

O ELF etanólico de *A. robusta* é constituído basicamente de flavonoides e LST, assim como descrito nos itens a seguir (Figura 6 e Tabela 4).

##### 4.3.2.1 Flavonoides

O pico 6 corresponde à quercetagetina 3,6-dimetileter, a qual já havia sido desreplicada (item 4.3.1.2). O pico 10 é sugestivo da 3',5,7-triidroxi-4',6-dimetoxiflavona já descrita no gênero (SCHILLING, 1989). O espectro de massas obtido no modo de ionização positivo demonstrou a presença do íon pico base  $m/z$  331  $[M+H]^+$  e do seu fragmento  $m/z$  316, originado após a perda de um grupamento

metila. No modo de ionização negativo foi observado o íon pico base  $m/z$  329  $[M-H]^-$  e o fragmento 314 originado após a perda de uma metila.



**Figura 6** - Cromatogramas de íons totais (TIC) do ELF de *A. robusta* obtidos a partir das análises por UHPLC-UV-MS nos modos de ionização negativo acima e positivo abaixo. As identificações dos picos cromatográficos constam na Tabela 4.

O pico 11 foi sugerido como o crisoeriol, com base em informações da literatura (SCHILLING, 1989). No modo de ionização positivo apresentou o íon pico base  $m/z$  301  $[M+H]^+$  e no modo negativo o  $m/z$  299  $[M-H]^-$ . Os íons fragmentos são  $m/z$  286 e 284 respectivamente, originados pela eliminação de um grupamento metila.

O pico 12 corresponde ao flavonoide 4',5,7-triidroxi-3',6,8-trimetoxiflavona também encontrado do extrato hidroalcoólico (item 4.3.1.2). O pico 14 foi identificado como nevadensina com base na literatura (De La FUENTE, et al., 1994). O modo de ionização positivo apresentou o íon pico base  $m/z$  345  $[M+H]^+$  e o íon fragmento  $m/z$

315 após a perda de dois grupamentos metila. Já o modo de ionização negativo apresentou o íon pico base  $m/z$  343  $[M-H]^-$  e o íon fragmento  $m/z$  328 devido à perda de um grupamento metila.

#### 4.3.2.2 Lactonas sesquiterpênicas

O pico 2 é sugestivo da substância 1-ceto-3,10-epoxi-8 $\beta$ -O-metacriol-4,15-dihidroxi-5-acetoxi-2,11-germacradien-6 $\alpha$ ,12-olido, uma vez que já havia sido isolada de folhas de *V. eriophora* (SPRING et al., 2000). Apresenta o íon pico base  $m/z$  437  $[M+H]^+$  no modo de ionização positivo e os íons fragmentos  $m/z$  419 pela perda de  $H_2O$  e o  $m/z$  407 pela eliminação de  $CH_2O$ . No modo de ionização negativo o espectro apresenta o íon pico base  $m/z$  435  $[M-H]^-$  e o fragmento  $m/z$  399 após a eliminação de duas molécula  $H_2O$ .

O pico 5 apresenta o íon  $m/z$  395  $[M+H]^+$  no espectro do modo de ionização positivo e o íon fragmento  $m/z$  377 pela perda de  $H_2O$ . Já no modo negativo observa-se íon pico base  $m/z$  393  $[M-H]^-$ . Comparado com dados da literatura, propõe-se que essa LST possa ser a niveusina C-2',3'-epóxido, anteriormente isolada das folhas de *V. microphylla* (GERSHENZON et al., 1984).

O pico 7 refere-se à substância orizabina, a qual apresenta o íon no modo de ionização positivo  $m/z$  367  $[M+H]^+$  e o íon fragmento após perda de  $H_2O$   $m/z$  349. No modo de ionização negativo observa-se íon pico base  $m/z$  365  $[M-H]^-$ . A orizabina foi isolada de *V. mollis* (LA FUENTE et al., 1994)

A niveusina A já foi isolada das folhas de *A. robusta* (ARAKAWA et al., 2008) e corresponde ao pico 8. Apresenta no modo de ionização positivo o íon pico base  $m/z$  395  $[M+H]^+$  e o íon fragmento  $m/z$  377 após a perda de  $H_2O$ ; no modo negativo observa-se o íon pico base  $m/z$  393  $[M-H]^-$ . O pico 9 refere-se à budleína A e sua identificação foi descrita no item (4.3.1.3).

O pico 16 corresponde ao tiglato de atripliolido também já isolado de folhas de *A. robusta* (DA COSTA et al., 1996). O espectro no modo de ionização positivo apresentou o íon  $m/z$  359  $[M+H]^+$  e no modo negativo  $m/z$  357  $[M-H]^-$ .

O pico 17 é sugestivo de calaxina, já evidenciada em *V. eriophora* (SPRING et al., 2000). No modo de ionização positivo foi observada a presença do íon pico base  $m/z$  345  $[M+H]^+$  e o íon fragmento  $m/z$  309 referente à perda de  $H_2O$ . Já no

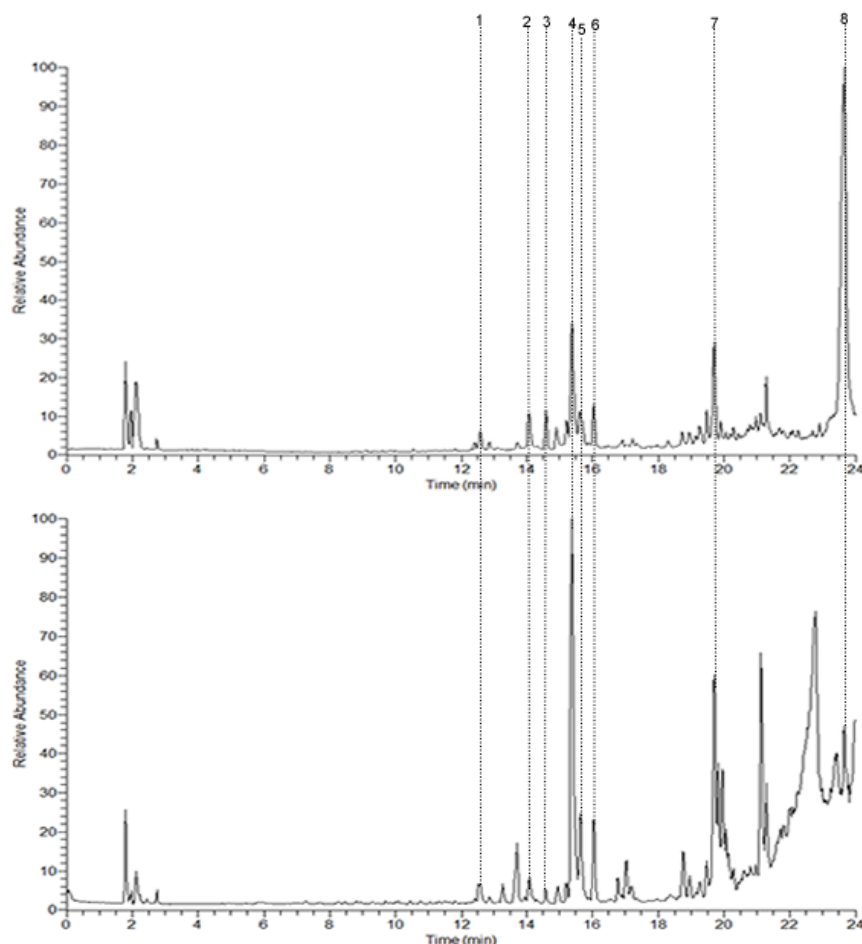
modo negativo observam-se o íon pico base  $m/z$  343  $[M-H]^-$  e o íon fragmento  $m/z$  313 devido à eliminação de  $CH_2O$ .

**Tabela 4** - Identificação dos picos cromatográficos do extrato de lavagem foliar (ELF) de *A. robusta* e dados de espectrometria de massas e UV obtidos a partir das análises por UHPLC-UV-MS. Os números dos picos referem-se à Figura 6.

Número do pico	Tempo de retenção (min)	Substância	Íons observados ( <i>m/z</i> ) no cromatograma TIC (UHPLC-MS) no modo de ionização positivo	Íons observados ( <i>m/z</i> ) no cromatograma TIC (UHPLC-MS) no modo de ionização negativo	UV máx (nm)
1	11,4	não identificada	$[M+H]^+$ 413,1439, $[(M+H) - H_2O]^+$ 395	$[M-H]^-$ 411,1291 pb	265
2	12,1	1-ceto-3,10-epoxi-8 $\beta$ -O-metacrioil-4,15-dihidroxi-5-acetoxi-2,11-germacradien-6 $\alpha$ ,12-olido	$[M+H]^+$ 437,1443 pb, $[(M+H) - H_2O]^+$ 419, $[(M+H) - CH_2O]^+$ 407	$[M-H]^-$ 435,1293 pb, $[(M-H) - 2H_2O]^-$ 399	269
3	12,3	não identificada	$[M+H]^+$ 413,1436, $[(M+H) - H_2O]^+$ 395	$[M-H]^-$ 411,1291 pb	267
4	12,9	não identificada	-	$[M-H]^-$ 439,12405 pb, $[(M-H) - CO]^-$ 411	272
5	13,5	niveusina C 2',3'-epóxido	$[M+H]^+$ 395,1333, $[(M+H) - H_2O]^+$ 377	$[M-H]^-$ 393,1187 pb	279
6	13,9	quercetagetina 3,6-dimetileter	$[M+H]^+$ 347,0755 pb, $[(M+H) - CH_3]^+$ 332, $[(M+H) - 2CH_3]^+$ 317	$[M-H]^-$ 345,0611 pb, $[(M-H) - CH_3]^-$ 330, $[(M-H) - 2CH_3]^-$ 315	274, 346
7	14,1	orizabina	$[M+H]^+$ 367,1385, $[(M+H) - H_2O]^+$ 349	$[M-H]^-$ 365,1237 pb	271
8	14,4	niveusina A	$[M+H]^+$ 395,1700 pb, $[(M+H) - H_2O]^+$ 377	$[M-H]^-$ 393,1555 pb	273
9	15,2	budleína A	$[M+H]^+$ 375,1432 pb, $[(M+H) - H_2O]^+$ 357	$[M-H]^-$ 373,1290pb	267
10	15,4	3',5,7-triidroxi-4',6-dimetoxiflavona	$[M+H]^+$ 331,0808 pb, $[(M+H) - CH_3]^+$ 316	$[M-H]^-$ 329,0664 pb, $[(M-H) - CH_3]^-$ 314	279, 329
11	15,5	crisoeriol	$[M+H]^+$ 301,0713 pb, $[(M+H) - CH_3]^+$ 286	$[M-H]^-$ 299,0558 pb, $[(M-H) - CH_3]^-$ 284	273, 336
12	15,8	4',5,7-triidroxi-3',6,8-trimetoxiflavona	$[M+H]^+$ 361,0912 pb	$[M-H]^-$ 359,0774 pb	279, 343
13	16,3	não identificado	$[M+H]^+$ 469.1709	$[M-H]^-$ 467.1552 pb	272
14	19,5	nevadensina	$[M+H]^+$ 345,0957 pb, $[(M+H) - 2CH_3]^+$ 315	$[M-H]^-$ 343,0818 pb, $[(M-H) - CH_3]^-$ 328	281, 330
15	21,8	não identificada	$[M+H]^+$ 317,2108 pb	$[M-H]^-$ 315.1963 pb	255
16	22,1	tiolato de atripliolido	$[M+H]^+$ 359,2788	$[M-H]^-$ 357,2641 pb	271
17	22,5	calaxina	$[M+H]^+$ 345,2993, $[(M+H) - H_2O]^+$ 309	$[M-H]^-$ 343,2848 pb, $[(M-H) - CH_2O]^-$ 313	265

### 4.3.3 Tricomas glandulares

Nos tricomas glandulares presentes nas folhas de *A. robusta* foi detectada a presença de flavonoides e LST (Figura 7 e Tabela 5).



**Figura 7** - Cromatogramas de íons totais (TIC) do conteúdo dos tricomas glandulares de *A. robusta* obtidos a partir das análises por UHPLC-UV-MS nos modos de ionização negativo acima e positivo abaixo. As identificações dos picos cromatográficos constam na Tabela 5.

#### 4.3.3.1 Flavonoides

A quercetagetina 3,6-dimetileter foi atribuída ao pico 2, o 4',5,7-triidroxi-3',6,8-trimetoxiflavona ao pico 6 e a nevadensina ao pico 7. As fragmentações foram descritas no itens 4.3.1.2 e 4.3.2.1.

#### 4.3.3.2 Lactonas sesquiterpênicas

O pico 1 foi identificado como provável 1-desoxi-9 $\beta$ -hidroxi-1-oxoniveusina C com base na comparação dos dados da literatura, onde descreve-se essa substância em *V. cordata* (BOHLMANN et al., 1984). No modo de ionização positivo essa LST apresentou o íon pico base  $m/z$  393  $[M+H]^+$  e o íon fragmento  $m/z$  375, formado após desidratação. No modo de ionização negativo, apresentou o íon pico base  $m/z$  391  $[M-H]^-$  e os íons fragmentos  $m/z$  373 e 361 após as perdas de H<sub>2</sub>O e CH<sub>2</sub>O respectivamente.

A 2-metilbutirato de budleína A é descrita como metabólito secundário presente em *A. robusta* (DA COSTA et al., 2001) e foi atribuída ao pico 5. No modo de ionização positivo, essa substância apresentou íon pico base  $m/z$  375  $[M+H]^+$  e o íon fragmento  $m/z$  357 após desidratação. No modo de ionização negativo apresentou o íon  $m/z$  373  $[M-H]^-$ .

A niveusina C 2',3'-epóxido foi atribuída ao pico 3 e a budleína A ao pico 4. Suas fragmentações estão descritas nos itens 4.3.2.2 e 4.3.1.3.

**Tabela 5** - Identificação dos picos cromatográficos do conteúdo dos tricomas glandulares de *A. robusta* e dados de espectrometria de massas e no UV obtidos a partir das análises por UHPLC-UV-MS. Os números dos picos referem-se à Figura 7.

Número do pico	Tempo de retenção (min)	Substância	Íons observados ( $m/z$ ) no cromatograma TIC (UHPLC-MS) no modo de ionização positivo	Íons observados ( $m/z$ ) no cromatograma TIC (UHPLC-MS) no modo de ionização negativo	UV máx (nm)
1	12,60	1-desoxi-9 $\beta$ -hidroxi-1-oxoniveusina C	$[M+H]^+$ 393,1549 pb, $[(M+H) - H_2O]^+$ 375	$[M-H]^-$ 391,1398 pb, $[(M-H) - H_2O]^-$ 373, $[(M-H) - CH_2O]^-$ 361	262
2	14,06	quercetagetina 3,6-dimetileter	$[M+H]^+$ 347,0765 pb, $[(M+H) - CH_3]^+$ 332, $[(M+H) - 2CH_3]^+$ 317	$[M-H]^-$ 345,0613 pb, $[(M+H) - CH_3]^+$ 330, $[(M-H) - 2CH_3]^-$ 315	275, 344
3	14,60	niveusina C 2',3'-epóxido	$[M+H]^+$ 395,1333, $[(M+H) - H_2O]^+$ 377	$[M-H]^-$ 393,1187 pb	270
4	15,38	budleína A	$[M+H]^+$ 375,1441 pb, $[(M+H) - H_2O]^+$ 357	$[M-H]^-$ 373,1292 pb	267
5	15,63	2-metilbutirato de budleína A	$[M+H]^+$ 375,1447 pb, $[(M+H) - H_2O]^+$ 357	$[M-H]^-$ 373,1294	281
6	16,04	4',5,7-triidroxi-3',6,8-trimetoxiflavona	$[M+H]^+$ 361,0925 pb	$[M-H]^-$ 359,0777 pb	280, 342
7	19,70	nevadensina	$[M+H]^+$ 345,0973 pb, $[(M+H) - 2CH_3]^+$ 315	$[M-H]^-$ 343,0823 pb, $[(M-H) - CH_3]^-$ 328	281, 330
8	23,67	não identificada	$[M+H]^+$ 398,2335 pb	$[M-H]^-$ 265,1480 pb	-



#### 4.4 Análises *in silico*

As impressões digitais metabólicas de todas as espécies foram obtidas no espectrômetro de massas Exactive Plus<sup>TM</sup> e os dados nos modos positivo e negativo foram tratados separadamente no software MZmine. Após tratamento (detecção de massas, construção dos cromatogramas, desconvolução, eliminação dos isótopos, alinhamento e preenchimento dos espaços vazios) (PLUSKAL et al., 2010), os dados foram exportados (planilhas nos formatos .csv) e então normalizados por intensidade máxima no software Excel (Microsoft Office 2007, EUA), para serem posteriormente analisados no software SIMCA.

Os métodos estatísticos utilizados na metabolômica podem ser divididos em não supervisionados e supervisionados. Os métodos não supervisionados como a Análise por Componentes Principais (*Principal Component Analysis*, PCA) são geralmente empregados para explorar a variância estatística global com o objetivo de aglomerar perfis semelhantes e detectar valores atípicos. Este algoritmo não supervisionado (que não requer conhecimento a priori da classe da amostra), de aglomeração relativamente simples, permite a visualização de dados biológicos ou químicos baseados nas semelhanças e diferenças inerentes às amostras e é empregado nos estágios iniciais de uma investigação, a fim de apresentar uma visão geral da informação contida em cada conjunto de dados (TRYGG et al., 2007).

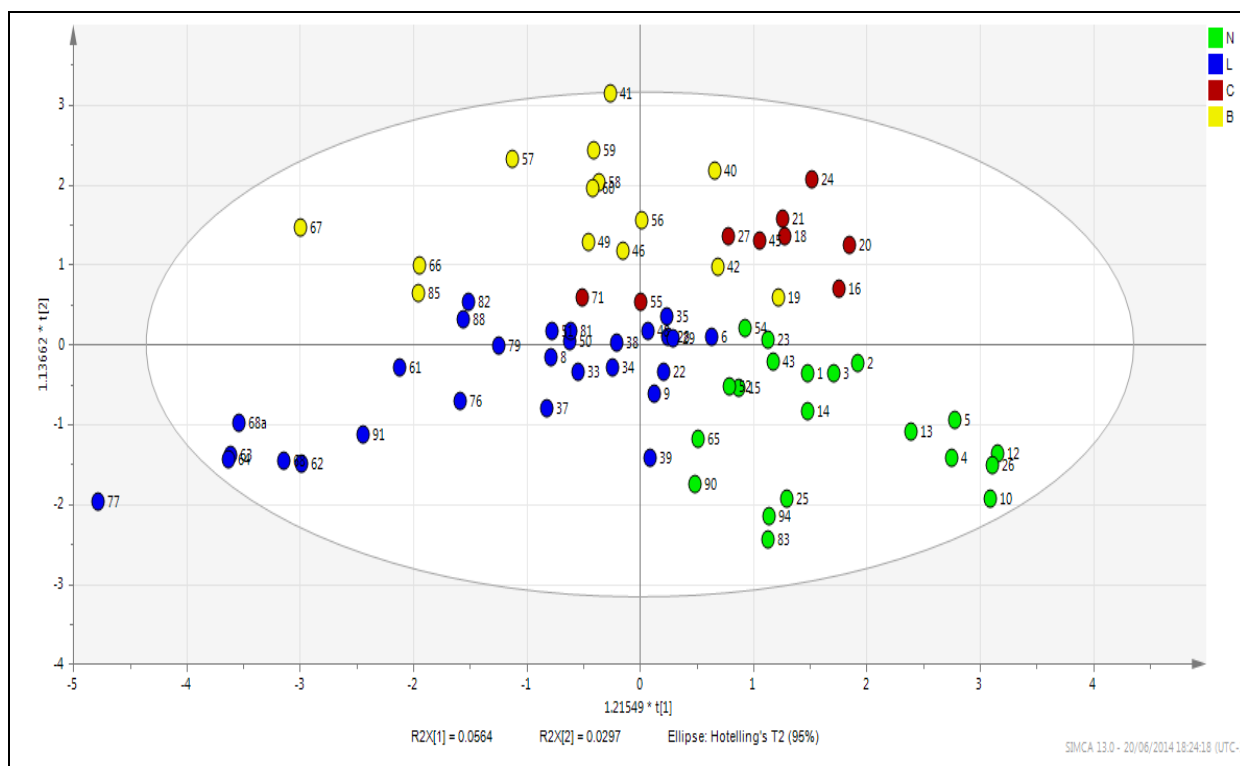
Dentre os vários métodos supervisionados, os mais populares na investigação de dados provenientes de equipamentos analíticos tais como HPLC, LC-UV, LC-MS e espectroscópicos, são aqueles baseadas em Regressão por Quadrados Mínimos Parciais (*Partial Least Squares*, PLS) e sua variante ortogonal OPLS. Essas técnicas utilizam o conhecimento obtido durante o estudo para classificar as amostras de acordo com uma propriedade específica, o que pode ser observado no gráfico de dispersão (*Score plot*, Figura 8) e, dessa forma, empregar análise discriminante (DA) para corroborar os resultados. Os *score plot* representam as coordenadas das amostras no sistema de componentes principais, já os *loading plot* representam a contribuição relativa de cada variável original para o modelo (TRYGG; WOLD, 2002; TRYGG et al., 2007).

A PLS é um método de calibração multivariada que utiliza a técnica de análise de componentes principais para a redução do conjunto de dados para posterior

correlação entre os dados dos espectros (matriz **X**) e as propriedades de interesse (matriz **Y**). Com o objetivo de melhorar a interpretabilidade e reduzir a complexidade dos modelos feitos por PLS, foi desenvolvido o método OPLS, no qual fornece a remoção das variantes do conjunto de dados da entrada em **X**, que não são correlacionadas com a resposta em **Y**. Em outras palavras, remove a variabilidade em **X** que é ortogonal à **Y** (TRYGG; WOLD, 2002).

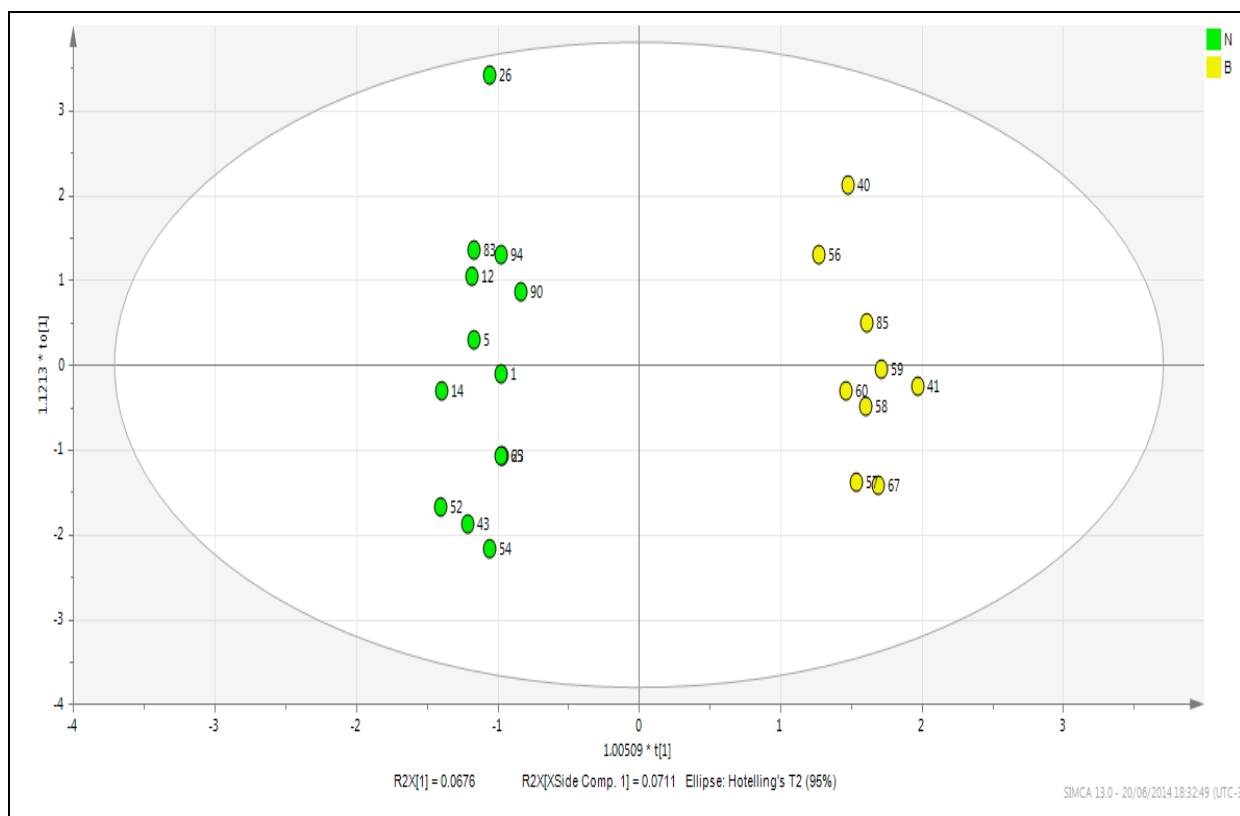
A construção do modelo de predição por OPLS-DA foi realizada com o objetivo de classificar e determinar biomarcadores responsáveis pela inibição dupla das enzimas. Para tal, a estruturação do modelo foi auxiliada pelos resultados da tese de doutorado de Chagas-Paula (2013), a qual relata a pesquisa do potencial de inibição das enzimas COX e LOX com diversos integrantes da família Asteraceae. Os gêneros estudados, envolvendo várias espécies, foram: *Achyrocline*, *Acmella*, *Arnica*, *Baccharis*, *Calea*, *Calendula*, *Cichorium*, *Dasyphyllum*, *Helianthus*, *Lychnophora*, *Smallanthus* e *Tithonia*. Estes, somados às espécies de *Aldama*, somou um número de 70 espécies testadas, revelando grande diversidade metabólica e acrescentando maior robustez ao modelo. A descrição destas espécies está no Apêndice 2. Os extratos dos demais gêneros também foram processados no mesmo equipamento e condições dos extratos de *Aldama*, assim como descrito nos itens (3.3.1 e 3.6).

Dos 70 extratos, 20% (14 espécies) inibiram as ambas enzimas COX-1 e 5-LOX concomitantemente, alcançando um dos objetivos desse estudo; 38,6% (27 espécies) apresentaram atividade apenas para LOX, 12,8% (9 espécies) apenas para COX e 28,6% (20 espécies) não obtiveram qualquer atividade. A Figura 8 mostra o gráfico *score plot* com a distribuição dos extratos de acordo com cada grupo. É destacada a tendência de separação em cada agrupamento pela variação metabólica de acordo com cada atividade.



**Figura 8.** Gráfico de *score plot* (OPLS-DA) dos extratos mostrando a tendência de separação dos agrupamentos, onde N (verde)= nenhuma atividade; L (azul)= LOX; C (vermelho)= COX e B (amarelo)= ambas atividades (inibição dupla).

Os dados do modo de ionização positiva obtidos por UHPLC-UV-MS não apresentaram ajustes satisfatórios para a predição. Dessa forma, o modelo foi realizado apenas com os dados do modo negativo. A construção do modelo de calibração multivariada por OPLS-DA foi realizada com base nas respostas de dois grupos: o de ambas atividades (14 extratos) e nenhuma atividade (20 extratos). Para tal, foram utilizadas 22 amostras escolhidas aleatoriamente, cerca de 70% do número total do dois grupos, para a calibração do modelo (conjunto de treino). Os extratos com ambas atividades (inibição dupla) foram: 40, 41, 56, 57, 58, 59, 60, 67 e 85 (Apêndice 2); os extratos com ausência de atividade foram: 1, 5, 12, 14, 23, 26, 43, 52, 54, 65, 83, 90 e 94 (Apêndice 2). A Figura 9 mostra o gráfico de *score plot* do modelo de regressão OPLS-DA com o conjunto de amostras da calibração. As propriedades dos extratos que compõem cada *cluster* estão correlacionadas com a ausência de atividade na cor verde e presença de ambas atividades (inibição dupla) na cor amarela.



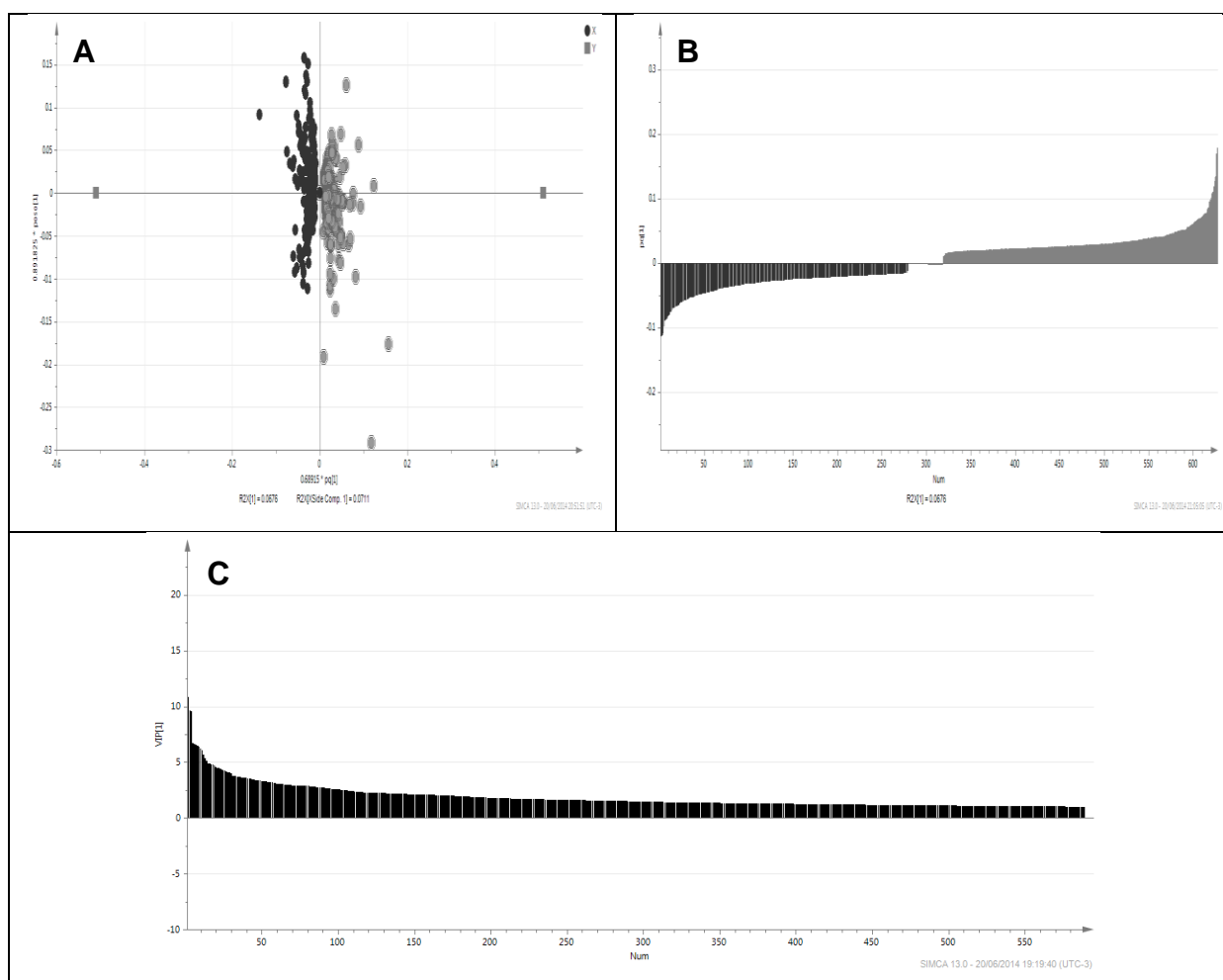
**Figura 9.** Gráfico de *score plot* (OPLS-DA) do modelo de predição com as amostras da calibração. À esquerda em verde está o *cluster* dos extratos sem atividade e à direita em amarelo está o *cluster* referente a ambas atividades (inibição dupla).

O modelo obteve o valor de  $R^2$  (coeficiente de determinação) de 0,98, que representa a fração que é explicada na separação do modelo. Quanto mais próximo de 1 o valor do coeficiente estiver, melhor estará o ajuste do modelo às respostas observadas (ERIKSSON et al., 2008). Os valores de  $Q^2$  (coeficiente de predição) obtidos por validação cruzada foi de 0,51. Valores  $\geq 0,50$  são aceitáveis para dados químicos (LUNDSTEDT et al., 1998). O valor de erro médio quadrático da validação cruzada RMSECV (*Root Mean Square Error of Cross-Validation*) para as amostras de calibração foi de 0,3; a variação dos resíduos foi determinada por CV-ANOVA com o teste  $F$  (distribuição de Fisher). O  $F$  calculado através dos números de graus de liberdade foi de 2,9; já o  $F$  tabelado foi de 4,5. Tal resultado mostra que o modelo prediz adequadamente, uma vez que é esperado que o  $F$  tabelado seja maior que o calculado (ERIKSSON et al., 2008).

Após o modelo estar calibrado, o mesmo foi validado com amostras que não participaram da calibração, porém já avaliadas *in vitro*, sendo elas 2, 3, 4, 10, 13, 15 e 25 para os extratos com nenhuma atividade e 19, 42, 46, 49 e 66 para aqueles que

apresentaram dupla inibição. Nessa validação o modelo apresentou acerto de 66,67%, o que é bastante promissor para a avaliação de extratos ainda não testados.

Portanto, através do *loading plot* (Figura 10), foi possível verificar as características dos extratos que estão correlacionados com o potencial de inibição das enzimas envolvidas no processo inflamatório. Na Figura 10 podem ser observadas as substâncias (lado esquerdo superior, em cinza) consideradas correlacionadas com a inibição da COX e da LOX, no caso os biomarcadores, que tiveram suas buscas considerando os valores das variáveis importantes na projeção VIP (*Variable Importance Plot*).



**Figura 10.** Gráficos de OPLS-DA. (A) *Loading plot* à esquerda estão as variáveis correlacionadas com a ausência de atividade nos extratos; à direita estão as variáveis para ambas atividades. (B) *Loading plot* em forma de barras para melhor visualização da representação das variáveis: lado esquerdo com as substâncias sem atividades e lado direito com as substâncias responsáveis pela dupla inibição. (C) VIP variáveis de maior importância para o modelo.

Os valores de VIP > 1 indicam que são variáveis importantes para o modelo e, quanto maior o valor, mais relevante será essa variável para o modelo (GOSSELIN et al., 2010; YULIANA et al., 2011). Dessa forma, quatro substâncias foram destacadas na predição com um valor alto de VIP, variando de três à nove, como pode ser visto na Tabela 6. Essas substâncias foram desreplicadas no extrato hidroalcoólico das folhas da espécie *A. robusta*, como descrito no item 4.3.1.

**Tabela 6.** Substâncias correlacionadas com a atividade de inibição das enzimas COX e LOX.

ID do MZmine	Tempo de retenção (min)	Substância	VIP	Íons observados ( <i>m/z</i> ) no cromatograma TIC (UHPLC-MS) no modo de ionização negativo
11	7,4	ácido 3- <i>O-E</i> -cafeoilquínico	9,59	[M-H] <sup>-</sup> 353,0879 pb, [(M-H) - CAF] <sup>-</sup> 191
91	9,7	rutina	3,73	[M-H] <sup>-</sup> 609,1462 pb
1494	13,9	3- <i>O</i> -metilquercetina	6,54	[M-H] <sup>-</sup> 315,0510
605	14,9	ácido 3,4-dimetoxicinâmico	6,08	[M-H] <sup>-</sup> 207,06584 pb

Os ácidos 3-*O-E*-cafeoilquínico e 3,4-dimetoxicinâmico pertencem à classe dos ácidos clorogênicos. Trata-se de uma família especial de ésteres formados por um ou mais ácidos *trans*-cinâmicos (cafeico, cinâmico, cumárico, dimetoxicinâmico e ferúlico) esterificados com um ou mais dos quatro grupamentos hidroxila do ácido quínico. São largamente distribuídos na natureza e encontrados principalmente em alimentos de origem vegetal. Fontes alimentares destes ácidos podem ser encontradas no café, chá verde e preto, maçãs, peras, uvas, vinhos e frutas cítricas. Na família Asteraceae eles também são constituintes comuns, por exemplo em folhas de alface (*Lactuca sativa*), chicória (*Cichorium endivia*) e alcachofra (*Cynara cardunculus ssp. scolymus*) (MØLGAARD; RAVN, 1988; CLIFFORD, 1999, 2000).

Estudos tem demonstrado o potencial anti-inflamatório *in vivo* dos ácidos clorogênicos, como é o caso do extrato polar *Tithonia diversifolia*, rico nessa classe de substâncias, o qual resultou em maior redução da inflamação no edema de pata em ratos quando comparado com a indometacina (AINE) (CHAGAS-PAULA et al., 2011).

A rutina e a 3-*O*-metilquercetina são flavonoides. Os flavonoides representam um grupo de fenólicos importante e diversificado entre os produtos de origem vegetal. Essa classe de metabólitos secundários é amplamente distribuída no reino vegetal e diversas funções são atribuídas a eles. Dentre elas, podem-se citar:

controle de ação hormonal; antioxidantes; proteção aos vegetais contra a incidência de raios UV, fungos, vírus e bactérias; inibidores de enzimas, dentre elas as envolvidas no processo inflamatório, daí o potencial anti-inflamatório da classe (ZUANAZZI; MONTANHA, 2007; HARBORNE; WILLIAMS, 2000).

Portanto, para a confirmação da predição do modelo estatístico, será necessário avaliar os ácidos clorogênicos e flavonoides nas enzimas COX-1 e 5-LOX, o que será realizado oportunamente.

Os extratos ainda não testados *in vitro* são das espécies *A. aspilioides*, *A. goyazii*, *A. oblongifolia*, *A. santacatarinensis* e *A. tuberosa*. Essas espécies foram avaliadas no modelo estatístico, apresentando-se o resultado de dupla inibição para *A. oblongifolia* e *A. santacatarinensis*, restando agora realizar a avaliação *in vitro* para confirmação dessa predição.

**CONCLUSÃO**



## 5. CONCLUSÃO

Neste estudo revelou-se experimentalmente que extratos hidroalcoólicos de espécies de *Aldama* apresentam a capacidade de inibir concomitantemente as enzimas relacionadas ao processo inflamatório (COX-1 e 5-LOX). Estes extratos foram analisados por UHPLC-UV-MS e, com base nos dados obtidos, foi possível determinar os biomarcadores do potencial de inibição destas enzimas a partir de 70 extratos vegetais de Asteraceae empregando-se métodos de estatística multivariada. Esses biomarcadores estão presentes em extratos de *A. robusta*.

Três tipos de extratos das folhas de *A. robusta* foram submetidos a análises por UHPLC-UV-MS, permitindo a desreplicação de 29 substâncias, incluindo ácidos clorogênicos, flavonoides e LST, algumas delas descritas pela primeira vez na espécie em questão.

O modelo estatístico empregando-se OPLS obteve uma habilidade preditiva de validação cruzada de 66,67%, demonstrando que os biomarcadores que exercem maior influência para que o extrato de *A. robusta* seja ativo são os ácidos 3-*O-E*-cafeoilquínico e 3,4-dimetoxicinâmico (ácidos clorogênicos), a rutina e a 3-*O*-metilquercetina (flavonoides). A avaliação *in vitro* dessas substâncias é necessária para confirmação dessa atividade, o que será realizado oportunamente.

Os perfis metabólicos por UHPLC-UV-MS e dos dados de desreplicação de *Aldama* obtidos, aliados à outros resultados, auxiliará na construção de uma taxonomia bem sustentada para o gênero e permitirá realizar discussões no âmbito da quimiotaxonomia.

## **REFERÊNCIAS**

## 6. REFERÊNCIAS

- ABDELMOHSEN, U. R.; CHENG, C.; VIEGELMANN, C.; et al. Dereplication strategies for targeted isolation of new antitrypanosomal actinosporins A and B from a marine sponge associated-*Actinokineospora* sp. EG49. **Marine Drugs**, v. 12, n. 3, p. 1220–1244, 2014.
- AMBRÓSIO, S. R.; ARAKAWA, N. S.; ESPERANDIM, V. R.; ALBUQUERQUE, S. DE; COSTA, F. B. DA. Trypanocidal activity of pimarane diterpenes from *Viguiera arenaria* (Asteraceae). **Phytotherapy Research**, v. 22, n. 10, p. 1413–1415, 2008.
- AMBRÓSIO, S. R.; OKI, Y.; HELENO, V. C. G.; et al. Constituents of glandular trichomes of *Tithonia diversifolia*: relationships to herbivory and antifeedant activity. **Phytochemistry**, v. 69, n. 10, p. 2052–2060, 2008.
- AMBROSIO, S. R.; SCHORR, K.; COSTA, F. B. DA. Terpenoids of *Viguiera arenaria* (Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, n. 2, p. 221–224, 2004.
- AMBROSIO, S. R.; TIRAPELLI, C. R.; COSTA, F. B. DA; OLIVEIRA, A. M. DE. Kaurane and pimarane-type diterpenes from the *Viguiera* species inhibit vascular smooth muscle contractility. **Life Sciences**, v. 79, n. 10, p. 925–933, 2006.
- ANDERSEN, O. M.; MARKHAM, K. R. **Flavonoids. Chemistry, Biochemistry and Applications**. New York: CRC Press Taylor & Francis, 2006.
- ARAKAWA, N. S.; SCHORR, K.; AMBRÓSIO, S. R.; MERFORT, I.; COSTA, F. B. DA. Further sesquiterpene lactones from *Viguiera robusta* and the potential anti-inflammatory activity of a heliangolide: inhibition of human neutrophil elastase release. **Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of Biosciences**, v. 63, n. 7-8, p. 533–538, 2008.
- BALDWIN, B. G. Heliantheae alliance. **Systematics, evolution, and biogeography of Compositae**. International Association for Plant Taxonomy, Vienna, Austria, p. 688-711, 2009.
- BLAKE, S.F. A revision of the genus *Viguiera*. **Contributions of the Gray Herbarium**, v. 54, p. 1-205, 1918.
- BOHLMANN, F.; ZDERO, C.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; et al. Heliangolide, Trachyloban- und Villanovan-Derivate aus *Viguiera*-Arten. **Liebigs Annalen der Chemie**, v. 1984, n. 3, p. 495–502, 1984.
- BOTTING, R. M. Cyclooxygenase: Past, present and future. A tribute to John R. Vane (1927–2004). **Journal of Thermal Biology**, v. 31, n. 1-2, p. 208–219, 2006.
- CALABRIA, L. M.; EMERENCIANO, V. P.; SCOTTI, M. T.; MABRY, T. J. **Systematics, evolution, and biogeography of Compositae**. International Association for Plant Taxonomy, Vienna, Austria, p. 73-88, 2009.

CHAGAS-PAULA, D. A.; OLIVEIRA, R. B.; ROCHA, B. A.; COSTA, F. B. DA. Ethnobotany, chemistry, and biological activities of the genus *Tithonia* (Asteraceae). **Chemistry & Biodiversity**, v. 9, n. 2, p. 210–235, 2012.

CHAGAS-PAULA, D. A. **Estudos metabolômicos de Asteraceae por UPLC-UV-HRFTMS, avaliação do potencial anti-inflamatório in vitro e suas correlações através de métodos in silico**. 2013. 118 f. Tese (Doutorado em Ciências). Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

CHAGAS-PAULA, D. A.; OLIVEIRA, R. B. DE; SILVA, V. C. DA; et al. Chlorogenic acids from *Tithonia diversifolia* demonstrate better anti-inflammatory effect than indomethacin and its sesquiterpene lactones. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, n. 2, p. 355–362, 2011.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, n. 3, p. 362–372, 1999.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 7, p. 1033–1043, 2000.

CLIFFORD, M. N.; JOHNSTON, K. L.; KNIGHT, S.; KUHNERT, N. Hierarchical scheme for LC-MS<sup>n</sup> identification of chlorogenic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 10, p. 2900–2911, 2003.

CLIFFORD, M. N.; KNIGHT, S.; KUHNERT, N. Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MS<sup>n</sup>. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 3821–3832, 2005.

CLIFFORD, M. N.; KNIGHT, S.; SURUCU, B.; KUHNERT, N. Characterization by LC-MS<sup>n</sup> of four new classes of chlorogenic acids in green coffee beans: dimethoxycinnamoylquinic acids, diferuloylquinic acids, caffeoyl-dimethoxycinnamoylquinic acids, and feruloyl-dimethoxycinnamoylquinic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 6, p. 1957–1969, 2006.

CUYCKENS, F.; CLAEYS, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 39, n. 1, p. 1–15, 2004.

DA COSTA, F. B.; ALBUQUERQUE, S.; VICHNEWSKI, W. Diterpenes and synthetic derivatives from *Viguiera aspilioides* with trypanomicidal activity. **Planta Medica**, v. 62, n. 6, p. 557–559, 1996.

DA COSTA, F. B.; DIAS, D. A.; CALLEGARI LOPES, J. L.; VICHNEWSKI, W. Flavonoids and heliangolides from *Lychnophora diamantinana*. **Phytochemistry**, v. 34, n. 1, p. 261–263, 1993.

- DA COSTA, F. B.; SCHORR, K.; ARAKAWA, N. S.; SCHILLING, E. E.; SPRING, O. Intraspecific variation in the chemistry of glandular trichomes of two Brazilian *Viguiera* species (Heliantheae; Asteraceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 12, n. 3, p. 403–407, 2001.
- DA COSTA, F. B.; TERFLOTH, L.; GASTEIGER, J. Sesquiterpene lactone-based classification of three Asteraceae tribes: a study based on self-organizing neural networks applied to chemosystematics. **Phytochemistry**, v. 66, n. 3, p. 345–353, 2005.
- DA COSTA, F. B.; VICHNEWSKI, W.; HERZ, W. Constituents of *Viguiera aspillioides* and *V. robusta*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 24, n. 6, p. 585–587, 1996.
- DELGADO, G.; ALVAREZ, L.; VIVAR, A. R. DE. 15-Hydroxy-acetylerioflorin and other constituents from *Viguiera linearis*. **Phytochemistry**, v. 24, n. 11, p. 2736–2738, 1985.
- DELGADO, G.; CÁRDENAS, H.; PELÁEZ, G.; VIVAR, A. R. DE; PEREDAMIRANDA, R. Terpenoids from *Viguiera excelsa* and *Viguiera oaxacana*. **Journal of Natural Products**, v. 47, n. 6, p. 1042–1045, 1984.
- DRAZEN, J. M.; ISRAEL, E.; O'BYRNE, P. M. Treatment of asthma with drugs modifying the leukotriene pathway. **The New England Journal of Medicine**, v. 340, n. 3, p. 197–206, 1999.
- ERIKSSON, L.; TRYGG, J.; WOLD, S. CV-ANOVA for significance testing of PLS and OPLS® models. **Journal of Chemometrics**, v. 22, n. 11-12, p. 594–600, 2008.
- FIORUCCI, S.; MELI, R.; BUCCI, M.; CIRINO, G. Dual inhibitors of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase. A new avenue in anti-inflammatory therapy? **Biochemical Pharmacology**, v. 62, n. 11, p. 1433–1438, 2001.
- GERSHENZON, J.; LIU, Y.; MABRY, T. J.; KORP, J. D.; BERNAL, I. Germacranolides from *Viguiera microphylla*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 6, p. 1281–1287, 1984.
- GOSSELIN, R.; RODRIGUE, D.; DUCHESNE, C. A Bootstrap-VIP approach for selecting wavelength intervals in spectral imaging applications. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 100, n. 1, p. 12–21, 2010.
- HARBORNE, J. B. Flavonoids and the evolution of the angiosperms. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 5, n. 1, p. 7–22, 1977.
- HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 481–504, 2000.
- HEGNAUER, R. Phytochemistry and plant taxonomy — an essay on the chemotaxonomy of higher plants. **Phytochemistry**, v. 25, n. 7, p. 1519–1535, 1986.

HRISTOZOV, D.; COSTA, F. B. DA; GASTEIGER, J. Sesquiterpene lactones-based classification of the family Asteraceae using neural networks and k-nearest neighbors. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 47, n. 1, p. 9–19, 2007.

HUDSON, N.; BALSITIS, M.; EVERITT, S.; HAWKEY, C. J. Enhanced gastric mucosal leukotriene B4 synthesis in patients taking non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Gut**, v. 34, n. 6, p. 742–747, 1993.

KULKARNI, S. K.; SINGH, V. P. Licofelone--a novel analgesic and anti-inflammatory agent. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 3, p. 251–263, 2007.

LA FUENTE, J. DE; VAILE MORALES, I. DEL; SOSA, V. E. Furanoheliangolides and flavonoids from *Viguiera mollis* De La Fuente J. R., Del Valle Morales I., Sosa V. E. **Anales de la Asociacion Quimica Argentina**, v. 82, p. 61–64, 1994.

LUNDSTEDT, T.; SEIFERT, E.; ABRAMO, L.; et al. Experimental design and optimization. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 42, n. 1-2, p. 3–40, 1998.

MA, Y. L.; HEUVEL, H. V.; CLAEYS, M. Characterization of 3-methoxyflavones using fast-atom bombardment and collision-induced dissociation tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 13, n. 19, p. 1932–42, 1999.

MAGENTA, M. *Viguiera* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 14 Jul. 2014 Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB016448>>. Acesso em: 18 Jul. 2014.

MAGENTA, M. A. G. ***Viguiera* Kunth (Asteraceae, Heliantheae) na América do Sul e sistemática das espécies do Brasil**, 2006, 339f. Tese (Doutorado em Ciências). Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.

MAGENTA, M. A. G.; PIRANI, J. R. Novidades taxonômicas em *Aldama* (Asteraceae-Heliantheae). **Rodriguésia**, v. 65, n. 1, p. 175–192, 2014.

MAGENTA, M. A. G.; PIRANI, J. R.; MONDIN, C. A. Novos táxons e combinações em *Viguiera* (Asteraceae - Heliantheae). **Rodriguésia**, v. 61, n. 1, p. 1–11, 2010.

MARTEL-PELLETIER, J.; LAJEUNESSE, D.; REBOUL, P.; PELLETIER, J.-P. Therapeutic role of dual inhibitors of 5-LOX and COX, selective and non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 62, n. 6, p. 501–509, 2003.

MARTUCCI, M. E. P.; VOS, R. C. H. DE; CAROLLO, C. A.; GOBBO-NETO, L. Metabolomics as a potential chemotaxonomical tool: application in the genus *Vernonia* schreb. **Plos One**, v. 9, n. 4, p. e93149, 2014.

MØLGAARD, P.; RAVN, H. Evolutionary aspects of caffeoyl ester distribution In Dicotyledons. **Phytochemistry**, v. 27, n. 8, p. 2411–2421, 1988.

NAIR, D. G.; FUNK, C. D. A cell-based assay for screening lipoxygenase inhibitors. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v. 90, n. 3-4, p. 98–104, 2009.

NICOLETE, R.; ARAKAWA, N. S.; RIUS, C.; et al. Budlein A from *Viguiera robusta* inhibits leukocyte-endothelial cell interactions, adhesion molecule expression and inflammatory mediators release. **Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology**, v. 16, n. 10, p. 904–915, 2009.

PAREJO, I.; JÁUREGUI, O.; VILADOMAT, F.; BASTIDA, J.; CODINA, C. Characterization of acylated flavonoid-O-glycosides and methoxylated flavonoids from *Tagetes maxima* by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM**, v. 18, n. 23, p. 2801–2810, 2004.

PARENTE, L. Pros and cons of selective inhibition of cyclooxygenase-2 versus dual lipoxygenase/cyclooxygenase inhibition: is two better than one? **The Journal of Rheumatology**, v. 28, n. 11, p. 2375–2382, 2001.

PASSONI, F. D.; OLIVEIRA, R. B.; CHAGAS-PAULA, D. A.; GOBBO-NETO, L.; COSTA, F. B. DA. Repeated-dose toxicological studies of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. gray and identification of the toxic compounds. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 147, n. 2, p. 389–394, 2013.

PERRY, R. H.; COOKS, R. G.; NOLL, R. J. Orbitrap mass spectrometry: instrumentation, ion motion and applications. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 27, n. 6, p. 661–699, 2008.

PLUSKAL, T.; CASTILLO, S.; VILLAR-BRIONES, A.; ORESIC, M. MZmine 2: modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. **BMC Bioinformatics**, v. 11, p. 395, 2010.

PRUSAKIEWICZ, J. J.; FELTS, A. S.; MACKENZIE, B. S.; MARNETT, L. J. Molecular basis of the time-dependent inhibition of cyclooxygenases by indomethacin. **Biochemistry**, v. 43, n. 49, p. 15439–15445, 2004.

REYNOLDS, T. The evolution of chemosystematics. **Phytochemistry**, v. 68, n. 22-24, p. 2887–2895, 2007.

RIESEBERG, L. H.; SCHILLING, E. E. Floral flavonoids and ultraviolet patterns in *Viguiera* (Compositae). **American Journal of Botany**, v. 72, n. 7, p. 999, 1985.

ROBERTS, II L. J.; MORROW, J. D. Analgesic-antipyretic and anti-inflammatory agents and drugs employed in the treatment of gout. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; GILMAN, A. G. **Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics**. 10 ed. New York: McGraw Hill. p. 687-731, 2001.

- SCHILLING, E. E. External flavonoid aglycones of *Viguiera* series *Viguiera* (Asteraceae: Heliantheae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 17, n. 7-8, p. 535–538, 1989.
- SCHILLING, E. E.; COSTA, F. B. DA; LOPES, N. P.; HEISE, P. J. Brazilian species of *Viguiera* (asteraceae) exhibit low levels of its sequence variation. **Edinburgh Journal of Botany**, v. 57, n. 3, p. 323–332, 2000.
- SCHILLING, E. E.; JANSEN, R. K. Restriction fragment analysis of chloroplast DNA and the systematics of *Viguiera* and related genera (Asteraceae: Heliantheae). **American Journal of Botany**, v. 76, n. 12, p. 1769–1778, 1989.
- SCHILLING, E. E.; PANERO, J. L. Evidence for a close relationship between *Iostephane* and *Viguiera* (Asteraceae: Heliantheae). **American Journal of Botany**, v. 78, n. 8, p. 1054–1062, 1991.
- SCHILLING, E. E.; PANERO, J. L. Phylogenetic reticulation in subtribe Helianthinae. **American Journal of Botany**, v. 83, n. 7, p. 939–948, 1996.
- SCHILLING, E. E.; PANERO, J. L. A revised classification of subtribe Helianthinae (Asteraceae: Heliantheae). I. Basal lineages. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 140, n. 1, p. 65–76, 2002.
- SCHILLING, E. E.; PANERO, J. L. A revised classification of subtribe Helianthinae (Asteraceae: Heliantheae) II. Derived lineages. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 167, n. 3, p. 311–331, 2011.
- SCHILLING, E. E.; PANERO, J. L.; BOHM, B. A. Flavonoids of *Viguiera* section *Maculatae*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 16, n. 4, p. 413–416, 1988.
- SCHORR, K.; GARCÍA-PIÑERES, A. J.; SIEDLE, B.; MERFORT, I.; COSTA, F. B. DA. Guaianolides from *Viguiera gardneri* inhibit the transcription factor NF-κB. **Phytochemistry**, v. 60, n. 7, p. 733–740, 2002.
- SILVA, W. A. DA; CAMPOS, V. R. Métodos de Preparação Industrial de Solventes e Reagentes Químicos - Etanol. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 5, p. 1007–1021, 2013.
- SIMPSON, B. B. Economic importance of Compositae. In: FUNK, V. A.; SUSANNA, A.; STUESSY, T. F.; BAYER, R. J. **Systematics, evolution, and biogeography of Compositae**. International Association for Plant Taxonomy, Vienna, Austria, p. 45–58, 2009.
- SPRING, O. Microsampling: an alternative approach using sesquiterpene lactones for systematics. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 17, n. 7-8, p. 509–517, 1989.



- SPRING, O.; ZIPPER, R.; KLAIBER, I.; REEB, S.; VOGLER, B. Sesquiterpene lactones in *Viguiera eriophora* and *Viguiera puruana* (Heliantheae; Asteraceae). **Phytochemistry**, v. 55, n. 3, p. 255–261, 2000.
- SPRING, O.; ZIPPER, R.; REEB, S.; VOGLER, B.; COSTA, F. B. DA. Sesquiterpene lactones and a myoinositol from glandular trichomes of *Viguiera quinqueremis* (Heliantheae; Asteraceae). **Phytochemistry**, v. 57, n. 2, p. 267–272, 2001.
- STEFANI, R.; EBERLIN, M. N.; TOMAZELA, D. M.; COSTA, F. B. DA. Eudesmanolides from *Dimerostemma vestitum*. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 3, p. 401–403, 2003.
- TALEB-CONTINI, S. H.; SCHORR, K.; COSTA, F. B. DA; OLIVEIRA, D. C. R. DE. Detection of flavonoids in glandular trichomes of *Chromolaena* species (Eupatorieae, Asteraceae) by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, p. 315–321, 2007.
- TAMAYO-CASTILLO, G.; JAKUPOVIC, J.; BOHLMANN, F.; CASTRO, V. Heliangolides from *Viguiera sylvatica*. **Phytochemistry**, v. 28, n. 10, p. 2737–2740, 1989.
- TRYGG, J.; HOLMES, E.; LUNDSTEDT, T. Chemometrics in metabonomics. **Journal of Proteome Research**, v. 6, n. 2, p. 469–479, 2007.
- TRYGG, J.; WOLD, S. Orthogonal projections to latent structures (O-PLS). **Journal of Chemometrics**, v. 16, n. 3, p. 119–128, 2002.
- VALÉRIO, D. A R.; CUNHA, T. M.; ARAKAWA, N. S.; et al. Anti-inflammatory and analgesic effects of the sesquiterpene lactone budlein A in mice: inhibition of cytokine production-dependent mechanism. **European Journal of Pharmacology**, v. 562, n. 1-2, p. 155–163, 2007.
- VELLASCO JÚNIOR, W. T. Métodos de preparação industrial de solventes e reagentes químicos - Acetona. **Revista Virtual de Química**, v. 3, n. 4, p. 339–343, 2011.
- VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. DA S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326–337, 2006.
- VIVAR, A. R. DE; GUERRERO, C.; DÍAZ, E.; BRATOEFF, E. A.; JIMÉNEZ, L. The germacranolides of *Viguiera buddleiaeformis* structures of budlein-A and -B. **Phytochemistry**, v. 15, n. 4, p. 525–527, 1976.
- VOS, R. C. H. DE; MOCO, S.; LOMMEN, A.; et al. Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. **Nature protocols**, v. 2, n. 4, p. 778–791, 2007.
- WATERMAN, P. G.; GRAY, A I. Chemical systematics. **Natural Product Reports**, v. 4, n. 2, p. 175, 1987.

WOLLENWEBER, E.; DÖRR, M.; ROITMANH, J. N.; SCHILLING, E. External flavonoids of three species of *Viguiera*, section Hypargyrea (Asteraceae). **Zeitschrift für Naturforschung**, p. 588–590, 1995.

YULIANA, N. D.; KHATIB, A.; VERPOORTE, R.; CHOI, Y. H. Comprehensive extraction method integrated with NMR metabolomics: a new bioactivity screening method for plants, adenosine A1 receptor binding compounds in *Orthosiphon stamineus* Benth. **Analytical Chemistry**, v. 83, n. 17, p. 6902–6906, 2011.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonoides. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC. p. 577-614, 2007.

## **APÊNDICES**

## APÊNDICE 1 - PARÂMETROS UTILIZADOS NO SOFTWARE MZMINE 2.10

**Raw data import** – importa os dados extraídos do software Thermo™ Xcalibur™ nos modos separados.

### **Peak detection**

#### *Mass detection*

Mass detector: Exact mass

Noise level: 1.0E5

#### *FTMS shoulder peaks filter*

Mass resolution: 70,000

Peak model function: Lorentzian extended

#### *Chromatogram builder*

Min time span (min): 0.3

Min height: 5.0E5

*m/z* tolerance: 0.002 or 5.0 ppm

#### *Chromatogram deconvolutin*

Algorithm: Local minimum search

Chromatographic threshold: 5%

Search minimum in RT range (min): 0.2

Minimum relative height: 15%

Minimum absolute height: 5.0E5

Min ratio of peak top/edge: 5

Peak duration range (min): 0.3-10.0

### **Isotopes - Isotopic peaks grouper**

*m/z* tolerance: 0.002 or 5.0 ppm

Retention time tolerance: 0.2 absolute

Maximum charge: 2

Representative isotope: Most intense

### **Alignment – Join aligner**

*m/z* tolerance: 0.002 or 5.0 ppm

Weight for *m/z*: 15

Retention time tolerance: 0.2 absolute

Weight for RT: 10

Compare isotope pattern: Isotope  $m/z$  tolerance: 0.002 or 5.0 ppm

Minimum absolute height: 5.0E5

Minimum score: 65%

### Gap filling – Peak finder

Intensity tolerance: 1%

$m/z$  tolerance: 0.002 or 5.0 ppm

Retention time tolerance: 0.2 absolute

RT correction

### Identification

#### Adduct search

For Positive	For Negative
[M+Na-H] 21.9825 $m/z$	[M+Cl+H] 35.9774 $m/z$
[M+K-H] 37.9559 $m/z$	[M+MeCN+H] 41.0270 $m/z$
[M+Mg-2H] 21.9694 $m/z$	
[M+NH <sub>3</sub> ] 17.0265 $m/z$	
[M+MeCN+H] 41.0270 $m/z$	

#### Complex search

Ionization method: [M+H]<sup>+</sup> for positive and [M-H]<sup>-</sup> for negative

Retention time tolerance: 0.2 absolute

$m/z$  tolerance: 0.002 or 5.0 ppm

Max complex peak height: 50%

#### Custom database search

Database file: AsterDB

Field order: ID,  $m/z$ , retention time (min), identity, formula

$m/z$  tolerance: 0.002 or 5.0 ppm

### Export/Import – Export to CSV file

Export common elements: export row ID,  $m/z$ , retention time

Export identity elements: all identity elements

Export data file elements: export peak  $m/z$ , retention time, height and area.

## APÊNDICE 2 - LISTA DAS ESPÉCIES UTILIZADAS PARA CONSTRUÇÃO DO MODELO DE PREDIÇÃO

Código MZmine	Espécie	COX IC <sub>50</sub> (µg/mL)	LOX IC <sub>50</sub> (µg/mL)
1	<i>Achillea millefolium</i> Ledeb. (mil-folhas)	(-)	(-)
2	<i>Achyrocline satureioides</i> (Lam.) DC. (marcela)	(-)	(-)
3	<i>Acmella oleraceae</i> (L.) R.K. Jansen (jambú)	(-)	(-)
4	<i>Ageratum conyzoides</i> L. (mentrasto)	(-)	(-)
5	<i>Anteremanthus hatschbachii</i> H. Rob.	(-)	(-)
6	<i>Arctium lappa</i> L. (bardana)	(-)	17,6
8	<i>Arnica montana</i> L.	(-)	0,009
9	<i>Artemisia absinthium</i> L. (losna)	(-)	13,18
10	<i>Artemisia annua</i> L.	(-)	(-)
12	<i>Baccharis dracunculifolia</i> D.C. (alecrim do campo)	(-)	(-)
13	<i>Baccharis trimera</i> (Less.) DC. (carqueja)	(-)	(-)
14	<i>Bidens pilosa</i> L. (picão)	(-)	(-)
15	<i>Calea cuneifolia</i> DC.	(-)	(-)
16	<i>Calendula officinalis</i> L. (calêndula)	0,1	(-)
18	<i>Chronopappus bifrons</i> (DC. ex Pers.) DC	4,6	(-)
19	<i>Cichorium intybus</i> L. (chicória)	3,6	0,3
20	<i>Cynara scolymus</i> L. (alcachofra)	0,4	(-)
21	<i>Dasyphyllum brasiliense</i> var. <i>latifolium</i> (D.Don) Cabrera (espinho-agulha)	0,02	(-)
22	<i>Echinacea purpurea</i> (L.) Moench (equinácea)	(-)	12,29
23	<i>Emilia sonchifolia</i> L. DC (emília)	(-)	(-)
24	<i>Eremanthus polycephalus</i> (DC.) MacLeish	0,006	(-)
25	<i>Gymnanthemum amygdalinum</i> (Delile) Sch. Bip. ex Walp (boldo da Bahia)	(-)	(-)
26	<i>Helianthus annuus</i> L. (girassol)	(-)	(-)
27	<i>Heterocoma gracilis</i> Loeuille, J. N. Nakaj. & Semir (espécie nova)	50,0	(-)
28	<i>Lactuca sativa</i> L. (alface)	(-)	13,7
29	<i>Lychnophora diamantinana</i> Coile & S.B. Jones	(-)	17,5
33	<i>Lychnophora ericoides</i> Mart. (arnica-da-serra)*	(-)	0,6
34	<i>Lychnophora tomentosa</i> (Mart. ex DC.) Sch. Bip.	(-)	16,6
35	<i>Matricaria chamomilla</i> L. (camomila)	(-)	0,7
37	<i>Mikania glomerata</i> Sprengl. (guaco)	(-)	2,6
38	<i>Mikania hirsutissima</i> DC.	(-)	1,9
39	<i>Mikania laevigata</i> Schultz Bip. ex Baker (guaco(-)cheiroso)	(-)	8,1
40	<i>Minasia scapigera</i> H. Rob.	5,6	4,6
41	<i>Piptolepis monticola</i> Loeuille (espécie nova)	6,7	4,8
42	<i>Prestelia eriopus</i> Sch. Bip.	6,7	20,6
43	<i>Pucea guitoc</i> D.C.	(-)	(-)
45	<i>Smallanthus sonchifolius</i> (Poepp. & Endl.) H. Robinson (yacón)	0,001	(-)
46	<i>Solidago microglossa</i> DC. (arnica brasileira)	5,5	0,08
48	<i>Sonchus oleraceus</i> L. (serralia)	(-)	0,92
49	<i>Sphagneticola trilobata</i> (L.) Pruskei (mal-me-quer)	11,9	12,2
50	<i>Stevia rebaudiana</i> (Bertoni) Bertoni (estévia)	(-)	0,01
51	<i>Tridax procumbens</i> L.	(-)	0,046

52	<i>Tanacetum parthenium</i> L. (feverfew)	(-)	(-)
54	<i>Tanacetum vulgare</i> L.	(-)	(-)
55	<i>Taraxacum officinale</i> Weber ex FH Wigg. (dente-de-leão)	0,002	(-)
56	<i>Tithonia diversifolia</i> (Hemsl.) A. Gray (margaridão)	28,7	11,6
57	<i>Vernonia herbaceae</i> (Vell.) Rusby	0,2	24,6
58	<i>Vernonia platensis</i> (Spreng.) Less.	0,1	15,85
59	<i>Vernonia polyanthes</i> Less. (assa-peixe)	0,06	2,96
60	<i>Vernonia rubriramea</i> Mart. Ex DC.	0,03	1,79
61	<i>Aldama arenaria</i> (Baker) E.E.Schill. & Panero	(-)	16,5
62	<i>Aldama bracteata</i> (Gardner) E.E.Schill. & Panero	(-)	3,6
63	<i>Aldama discolor</i> (Baker) E.E.Schill. & Panero	(-)	8,4
64	<i>Aldama filifolia</i> (Sch.Bip. ex Baker) E.E.Schill. & Panero	(-)	5,6
65	<i>Aldama linearifolia</i> (Chodat) E.E.Schill. & Panero	(-)	(-)
66	<i>Aldama robusta</i> (Gardner) E.E.Schill. & Panero	0,1	36,02
67	<i>Aldama trichophylla</i> (Dusén) Magenta	2,6	4,0
68	<i>Aldama anchlussifolia</i> (DC.) E.E.Schill. & Panero	(-)	41
71	<i>Aldama bakeriana</i> (S.F.Blake) E.E.Schill. & Panero	0,1	(-)
76	<i>Aldama gardneri</i> (Baker) E.E.Schill. & Panero	(-)	80,4
77	<i>Aldama grandiflora</i> (Gardner) E.E.Schill. & Panero	(-)	71
79	<i>Aldama kunthiana</i> (Gardner) E.E.Schill. & Panero	(-)	15,1
81	<i>Aldama megapotamica</i> (Malme) Magenta & Pirani	(-)	68,1
82	<i>Aldama nudibasilaris</i> (S.F.Blake) E.E.Schill. & Panero	(-)	67,6
83	<i>Aldama nudicaulis</i> (Baker) E.E.Schill. & Panero	(-)	(-)
85	<i>Aldama pilosa</i> (Baker) E.E.Schill. & Panero	>100	67,2
88	<i>Aldama rubra</i> (Magenta & Pirani) E.E.Schill. & Panero	(-)	0,7
90	<i>Aldama squalida</i> (S.Moore) E.E.Schill. & Panero	(-)	(-)
91	<i>Aldama tenuifolia</i> (Gardner) E.E.Schill. & Panero	(-)	>100

(-) ausência de atividade.