UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Análise metabolômica da bioatividade em vias COX e LOX-
dependentes de plantas da subtribo Lychnophorinae**

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

Orientada: Camila Capel Godinho

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Gobbo
Neto

**Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas em 29/07/2016. A versão original
encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão
Preto/USP.**

Ribeirão Preto
2016

FICHA CATALOGRÁFICA

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.

Godinho, Camila Capel

Análise metabolômica da bioatividade em vias COX e LOX-dependentes de plantas da subtribo Lychnophorinae. Ribeirão Preto, 2016.

105p.; 30cm.

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

Orientador: Gobbo Neto, Leonardo.

1. Asteraceae. 2. Lychnophorinae. 3. Metabolômica. 4. UHPLC-MS
5. Espectrometria de Massas. 7. Cicloxigenase. 8. Lipoxigenase.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Camila Capel Godinho

Análise metabolômica da bioatividade em vias COX e LOX-dependentes de plantas da subtribo Lychnophorinae

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. Leonardo Gobbo Neto

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*À minha família, meus amores,
por todo carinho, apoio e amor incondicional.*

Agradecimentos

Nesses anos de crescimento profissional e pessoal, muitas pessoas foram de grande importância. A elas, segue a minha gratidão em forma de palavras.

Ao Prof. Dr. Leonardo Gobbo Neto pela oportunidade e pelo crescimento que esse trabalho me proporcionou. Agradeço por compartilhar toda a experiência e conhecimento sem restrições, pela liberdade de criação, pela paciência e compreensão em cada escolha, e pelo incentivo a cada momento.

Agradeço aos companheiros do grupo NPPNS. Aos técnicos, Tomaz, Jacqueline e Cristina, pela paciência, disposição e auxílio. Aos funcionários Dani, Adeguimar e Carla, pelo auxílio, carinho e sorrisos no café da manhã. Aos professores, pelos momentos de troca de conhecimento, experiências e apoio.

Aos meus amigos e companheiros de todos os dias, Gabriela, Eduarda, Marília, Ariane, Karen, Pâmela, Anelize, Andrés, Daniel, Juliano, Gibson, e aos que deixam grande saudade do convívio, Maria Elvira, Daniel Pavarini, e Denise, pelos momentos de alegria, pelo auxílio, disposição e crescimento pessoal impagável.

Aos alunos, funcionários e professores do Laboratório de Farmacognosia. Em especial à Daniela Chagas, Danniela Faleiro, Rosana, Federico, Anny, Lucas e Gari, pelo apoio, parceria, paciência e pelo conhecimento compartilhado ao longo destes anos.

À FAPESP pela bolsa concedida (Processo nº 2014/01707-3) e pelo financiamento deste projeto. À CAPES, pela bolsa concedida no início do mestrado.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRPUSP), pela oportunidade e apoio durante todo o processo.

A toda equipe, alunos e professores do projeto temático “Estudos morfoanatômicos, metabolômicos e moleculares como subsídios a sistemática de espécies de Asteraceae e acesso ao seu potencial farmacológico” – processo FAPESP nº 2010/51454-3, pelas enriquecedoras discussões em reuniões e pelo apoio. Agradeço em especial ao Dr. Benoit Loeuille, ao Prof. Dr. José Rubens Pirani e a Dra. Maria Elvira pelas amostras fornecidas e pelo auxílio nas viagens para coletas, e à Marli, pelo auxílio, paciência e disposições em relação às burocracias relacionadas ao projeto.

À Glenda, Renata e Raíssa, que me trouxeram tantas felicidades ao passarem pelo meu caminho e na convivência, pela paciência e pelas gargalhadas.

À minhas companheiras de coração, Gabriela e Eduarda, pelas quais tenho gratidão infinita pelo carinho, companheirismo em todas as horas imagináveis, apoio incondicional e por terem me mostrado lados maravilhosos da vida que eu não conhecia.

Aos meus amigos e companheiros de Sadhana, Filipe, Letícia, Gisele, Gabi, Sônia, Carla, Rose, Sheila, a todos os meus amigos do curso de instrutores de Yoga de 2015 e ao nosso Prof. Ronaldo, pela graça e oportunidade de estar ao lado de vocês neste caminhar durante o mestrado, que me trouxe tanta paz, conhecimento, despertar e luz.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, pelo ensino de qualidade, despertar da curiosidade e pelos momentos de felicidade indescritíveis. Em especial ao Prof. Luis Vitor e a todos do Laboratório de Botânica, pelo apoio, carinho liberdade de pensamento e criação, e pela convivência, a qual me despertou a vocação.

À minha família unespiana, que se espalha mas nunca deixa de sair dos meus pensamentos e intensões. Em especial Raíssa, Carol Viana, Juliana Pimenta, Bia, Cami, Luis Fernando Zeitona e Victor Cofap.

Agradeço ao Marcelo, pelo apoiou em todos os momentos da minha vida e por sempre estar ao meu lado, mesmo longe, e por trazer tanto amor, carinho e alegria pra minha vida.

Agradeço, por fim, à minha família, base do meu ser e razão pela qual posso estar aqui neste momento. Pelo carinho, apoio, amor incondicional, pela criação e educação que me deram e pela paciência e apoio em todas as escolhas da minha vida. Não há palavras que possam expressar a minha gratidão por ter vocês na minha vida. Não há amor maior.

RESUMO

GODINHO, C.C. **Análise metabolômica da bioatividade em vias COX e LOX-dependentes de plantas da subtribo Lychnophorinae**. 2016. 97f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Muitas substâncias das espécies de Lychnophorinae (Asteraceae) são relatadas como inibidoras da síntese de mediadores da cascata do processo inflamatório. Nesse processo, duas enzimas são essenciais e atuam no metabolismo do ácido araquidônico, formado em processos inflamatórios: ciclooxigenase (COX) e lipoxigenase (LOX). A análise de impressões digitais metabólicas é um método capaz de fornecer informações sobre o objeto de estudo através da utilização de ferramentas estatísticas, além de possibilitar a correlação desses dados com outros utilizando métodos *in silico*. O objetivo deste estudo foi analisar 26 espécies da subtribo Lychnophorinae quanto à atividade inibitória *in vitro* das vias COX- e LOX-dependentes e identificar as substâncias responsáveis por essa atividade através de análises *in silico* de correlação entre bioatividade e impressão digital metabólica. As impressões digitais metabólicas dos extratos hidrometanólicos das espécies de Lychnophorinae foram obtidas utilizando UHPLC-UV-(DAD)-MS (OrbitrapTM). Os ensaios de triagem de inibição das vias COX-1 e 5-LOX-dependentes revelaram que 20 espécies possuem atividade inibitória dupla para ambas as vias com valores de IC₅₀ menores que 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Dentre essas, 11 espécies apresentaram valores de IC₅₀ menores que 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, e cinco apresentaram valores de IC₅₀ menores que 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Utilizando-se as impressões digitais metabólicas e os resultados de inibição enzimática foram realizadas análises estatísticas multivariadas supervisionadas e não supervisionadas (PCA, PLS e OPLS) visando à identificação de substâncias discriminantes (ativas). Através das análises de correlação, obtiveram-se as prováveis substâncias que detém o potencial inibitório. As cinco substâncias com maior potencial discriminante foram identificadas por técnicas de desreplicação e são: a lactona sesquiterpênica (4,5-diidro-15-desoxigoyazensolido), dois flavonóides glicosilados (3-O-(acetil-hexosídeo)-quercetina e 7-O-(cumaroil-hexosídeo)-apigenina), e um hidroxinerolidol. Assim, este estudo revelou o ótimo potencial inibidor das enzimas COX-1 e 5-LOX dos extratos hidrometanólicos das espécies de Lychnophorinae. Além disso, indicou as substâncias mais discriminantes responsáveis por essa atividade, sendo as substâncias acima mencionadas as propostas como as principais responsáveis pela atividade inibidora das enzimas COX e LOX.

Palavras-chave: Asteraceae, Lychnophorinae, Metabolômica, LC-MS, espectrometria de massas, Ciclooxigenase, Lipoxigenase.

ABSTRACT

GODINHO, C.C. **Metabolomic analysis of the bioactivity in COX and LOX pathways-dependent of plants from subtribe Lychnophorinae.** 2016. 97p. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Several compounds from Lychnophorinae species (Asteraceae) are reported as inhibitors of cascade mediators that elicits the inflammatory process. During this process, two enzymes are essential in the metabolism of the arachidonic acid: cyclooxygenase (COX) and lipoxygenase (LOX). The analysis of metabolic fingerprinting is a method that provides information about the object of study by using statistical tools, and enables the correlation of these data with others using *in silico* methods. This work therefore aimed to analyze 26 species of the Lychnophorinae subtribe for *in vitro* inhibition of COX-1 and 5-LOX and (to) identify the bioactive compounds responsible for this activity by *in silico* correlation analysis between bioactivity and metabolic fingerprint. The metabolomic analysis was carried out using UHPLC-DAD-ESI-Orbitrap and a metabolic fingerprint for each extract was obtained. The *in vitro* inhibition screening assays of COX-1 and 5-LOX revealed that 20 extracts presented dual inhibitory activity on both enzymes with IC₅₀ values lower than 100 µg.mL⁻¹. Among them, 11 species showed IC₅₀ values lower than 40 µg.mL⁻¹ and five lower than 10 µg.mL⁻¹. In order to identify discriminant substances (active), supervised and non-supervised multivariate statistical analysis (PCA, PLS e OPLS) were performed using the metabolic fingerprints and the results of enzyme inhibition. Through correlation analysis, it was possible to locate the substances most likely to be responsible for the pharmacological activity in both enzymes simultaneously; among them, five were chosen as the most likely. The substances were identified by dereplication as: a sesquiterpene lactone (4,5-dihydro-15-desoxygoyazensolide), two flavonoids (3-O-(acetil-hexoside)-quercetin and 7-O-(cumaroil-hexoside)-apigenine), and a hidroxynerylol. In summary, in this work it was possible to reveal crude extracts with outstanding inhibitory potential of both, COX-1 and 5-LOX, enzymes as well as to propose the most probable compounds responsible for this action, and the compounds mentioned above were proposed as the main responsible for the inhibitory activity.

Keywords: Asteraceae, Lychnophorinae, Metabolomics, LC-MS, mass spectrometry, Cyclooxygenase, Lipoxygenase.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representantes da subtribo Lychnophorinae. **A.** *Prestelia eriopus*. **B.** *Lychnophora sellowii*. **C.** *Heterocoma albida*. **D.** *Paralychnophora harleyi*. **E.** *Minasia alpestris*. **F.** *Lychnophora santosii*. **G.** *Piptolepis oleaster*. **H.** *Lychnophora ericoides*. **I.** *Eremanthus glomerulatus*. **Fonte:** LOEUILLE, 2015. 02
- Figura 2.** Porcentagem de atividades biológicas relatadas na literatura de espécies de Lychnophorinae. **Fonte:** KELES, 2010. 03
- Figura 3.** Fluxograma representando os procedimentos a partir da coleta até o armazenamento em laboratório das espécies de Lychnophorinae. 13
- Figura 4.** Fluxograma representando o método de extração das espécies de Lychnophorinae para as análises em Orbitrap™ e ensaio de inibição *in vitro*. 14
- Figura 5.** Procedimento de diluição seriada dos extratos para os ensaios de triagem de inibidores das enzimas COX-1 e 5-LOX. 18
- Figura 6.** Esquema de cronometragem e pipetagem para a reação de inibição da enzima COX-1. Preparou-se cinco microtubos adicionando 10 µL de heme, 160 µL de tampão do ensaio COX-1 e 10 µL da enzima COX-1, estabilizando-os a 37°C em banho-maria. Logo em seguida, adicionou-se a primeira amostra e o cronômetro é disparado. A cada 20 segundos adicionou-se a amostra seguinte, até finalizar 5 microtubos. Após isso, esperou-se completar os 5 minutos de incubação. Em seguida adicionou-se ácido araquidônico aos microtubos cada 20 segundos e esperou-se completar 7 minutos de reação. Logo após, adicionou-se 30 µL de solução de cloreto de estanho, na mesma ordem, a cada 20 segundos. 20
- Figura 7.** Diluição seriada da solução estoque de prostaglandinas liofilizadas em tampão específico do kit (*Bulk Standard*), para a construção de curva padrão para análise quantitativa das prostaglandinas produzidas. **Fonte:** Imagem retirada do manual do kit “COX (ovine) inhibitor screening assay kit” de nº de catálogo 560101, da Cayman Chemical. 21
- Figura 8.** Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico de *Albertinia brasiliensis* (Es_1). **A.** Modo de ionização negativo. **B.** Modo de ionização positivo. 25
- Figura 9.** Comparação entre os cromatogramas no modo de ionização negativo do extrato hidrometanólico de *Hololepis pedunculata*. antes e após o alinhamento, centralização, normalização, remoção de ruídos e fixação de linhas de base. **A.** Cromatograma antes do tratamento. **B.** Cromatograma após o tratamento. 27
- Figura 10.** Imunoensaio enzimático ELISA para a dosagem das prostaglandinas produzidas na etapa de reação do ensaio de inibição da enzima COX-1. **Fonte:** Adaptado de Manual do kit “COX (ovine) inhibitor screening assay kit”, nº de catálogo 560101, da Cayman Chemical. 30
- Figura 11.** Representação esquemática do ensaio de avaliação da inibição da enzima 5-LOX pelos componentes dos extratos, realizado utilizando os kits de triagem de inibidores da enzima LOX “Lipoxygenase inhibitor screening assay” (nº de catálogo 760700, , Cayman Chemical) e “5-Lipoxygenase (potato) screening enzyme” (nº de catálogo 60401, Cayman Chemical). 31

- Figura 12.** Gráfico de *Scores Scatter Plot* da análise estatística multivariada não supervisionada por PCA (Análise de Componentes Principais) realizada com os dados provenientes de todas as espécies do estudo (Apêndice I), incluindo os *outliers* Es_11 e Es_9. Além dos *outliers*, as espécies mais externas ao grupo central são Es_4, Es_22 e Es_7. **R²X(acum): 0,592. Q²: -0,454. B.** Altamente Potente. **N.** Pouco e Não Ativo. 35
- Figura 13.** Gráfico de *Scores Scatter Plot* da análise estatística multivariada não-supervisionada por PCA (Análise de Componentes Principais) realizada sem o *outlier* Es_11 (*Lychnophora markgravi*). Os *outliers* presentes nessa análise são Es_25 e Es_9. As espécies mais externas ao grupo central são Es_4, Es_22 e Es_7. **R²X(acum): 0,383. Q²: -0,442. B.** Altamente Potente. **N.** Pouco e Não Ativo. 36
- Figura 14.** Gráfico de *Scores Scatter Plot* da análise estatística multivariada supervisionada por PLS-DA (Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais). **R²X(acumulativo): 0,472. R²Y(acumulativo): 1,000. Q²: 0,329. B.** Altamente Potente. **N.** Pouco e Não Ativo. 39
- Figura 15.** Gráfico de *Scores Scatter Plot* da análise estatística multivariada supervisionada por OPLS-DA (Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais Ortogonais). **R²X(acumulativo): 0,514. R²Y(acumulativo): 1,000. Q²: 0,534. B.** Altamente Potente. **N.** Pouco e Não Ativo. 40
- Figura 16.** Gráfico de *Loadings Scatter Plot* da análise estatística multivariada supervisionada por OPLS-DA (Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais Ortogonais). **Substâncias:** 1. 75NEG. 2. 124POS. 3. 257POS. 4. 167POS. 5. 244POS. **R²X(acum): 0,514. R²Y(acum): 1,000. Q²: 0,534.** 41
- Figura 17.** Gráficos de VIP (Importância das Variáveis para a Projeção), o qual mostra que as cinco substâncias selecionadas são as mais importantes para a projeção dos grupos indicados no gráfico de *Scores* no *Scatter Plot*, e essas são 244POS, 167POS, 75NEG, 124POS e 257POS. **A.** Gráfico completo de VIP. **B.** Expansão do gráfico com ênfase nos maiores valores de VIP. 43
- Figura 18. A.** Gráfico de *Loadings Scatter Plot* do OPLS-DA. **B.** Gráfico de VIP. Em azul, as variáveis 244POS, 167POS, 75NEG, 124POS e 257POS relacionadas à propriedade dos grupos “Altamente Potente”. Em vermelho, as variáveis 19NEG e 1POS relacionadas ao grupo “Pouco e Não Ativa”. 44
- Figura 19.** Espectro de absorção no ultravioleta dos íons 75NEG e 124POS referentes à análise no extrato de *Lychnophora tomentosa*. 50
- Figura 20.** Comparação entre a vicenina-2 e lucenina-2. A hidroxila na posição C3' do anel B as diferencia, refletindo no espectro de absorção no ultravioleta através do ombro em 290 nm. **Fonte.** Adaptada de Gobbo-Neto (2007). 51
- Figura 21.** Estrutura química da substância 3-O-(6-O-acetil-β-D-glicopiranosídeo)-quercetina. 51
- Figura 22.** Proposta de fragmentação por *eletrospray* de 3-O-(6-O-acetil-β-D-glicopiranosídeo)-quercetina no modo positivo. 52
- Figura 23.** Perfil metabólico do extrato hidrometanólico *Lychnophora tomentosa* (Mart. ex DC.) Sch. Bip., nos modos positivo (A) e negativo (B). A seta indica o pico cromatográfico referente a 124POS e 75NEG. 54

- Figura 24.** Análise dos espectros de massas TIC (*Total Ion Current*) do extrato de *Lychnophora tomentosa* (Mart. ex DC.) Sch. Bip., no modo negativo (A), evidenciando o pico 75NEG ($[M-H]^-$ 505,09930), e no modo positivo (B), representando o pico 124POS ($[M+H]^+$ 507,11416). **T.R.** Tempo de Retenção. 55
- Figura 25.** Espectro de massas com fragmentação por AIF do extrato de *Lychnophora tomentosa*, no modo negativo (A), evidenciando a fragmentação do pico 75NEG ($[M-H]^-$ 505,09930), e no modo positivo (B), mostrando a fragmentação do pico 124POS ($[M+H]^+$ 507,11416). **Pb.** Pico base. 56
- Figura 26.** Espectro de íon produto MS^2 do íon m/z 505 (**A**) e MS^3 da aglicona m/z 301 (**B**) por UFLC-UV(DAD)-ESI- MS^2 tipo *Ion Trap* no modo de ionização negativo. **Setas.** Fragmentos-chave para a identificação da quercetina de acordo com o padrão de fragmentação relatado em TOURINHO et al (2008) e FABRE et al. (2001). 57
- Figura 27.** Espectro de absorção no UV do íon 167POS referente a análise no extrato de *Heterocoma robinsoniana* sp. Ined.. 58
- Figura 28.** Estrutura química da substância 7-O-(6"-O-E-*p*-cumaroil)- β -glicosilapigenina. 59
- Figura 29.** Proposta de fragmentação por *eletrospray* (ESI) de 7-O-(cumaroil-hexosídeo)-apigenina no modo positivo, demonstrando primeiramente a perda neutra de 146 u.a. formando o íon m/z 433 $[(M+H) - 146]^+$, e posterior perda de 162u.a. formando a aglicona de m/z 271. 60
- Figura 30.** Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico *Heterocoma robinsoniana* sp. ined., nos modos positivo (A) e negativo (B). A seta indica o pico cromatográfico referente à 167POS, de baixa intensidade e tempo de retenção aproximadamente 11.68 minutos. 61
- Figura 31.** Análise dos espectros de massas TIC (*Total Ion Current*) do extrato de *Heterocoma robinsoniana* sp. ined., no modo positivo (A) e modo negativo (B), apresentando os íons $[M+H]^+$ 579.15033 e $[M-H]^-$ 577,13440, ambos referentes ao pico 167POS. 62
- Figura 32.** Perfil de fragmentação do íon m/z 579,15 (167POS) adquirido através da fragmentação por AIF do extrato de *Heterocoma robinsoniana* sp. Ined., demonstrando as perdas referentes a fração cumaroil (146) e a fração da glicose (162). **A.** Modo de ionização positivo. **B.** Modo de ionização negativo. **Pb.** Pico base. 63
- Figura 33.** Espectro de íons produtos por AIF do íon m/z 579,15 (167POS) do extrato de *Heterocoma robinsoniana* sp. Ined., demonstrando com as setas os íons referentes à cumaroilglicose, de m/z 309 no modo positivo (A) e m/z 307 no modo negativo (B), e da fração referente à glicose, de m/z 165 no modo positivo (A) e m/z 163 no modo negativo (B), advinda da fragmentação do cumaroilglicose. **Pb.** Pico base. 64
- Figura 34.** **A.** Espectro de íon produto MS^2 do íon m/z 579 demonstrando o íon referente à cumaroilglicose em m/z 309 e a as perdas referentes a fração cumaroil (146) e a fração da glicose (162) no modo positivo (seta). **B.** Espectro de íon 65

produto por MS³ do íon m/z 433 para confirmação da formação do pico base m/z 271 pelo íon m/z 433 e da formação do íon m/z 309 a partir de m/z 579, e não de m/z 433. **Pb.** Pico base.

Figura 35. Espectro de íon produto MS³ da aglicona apigenina m/z 271 no modo positivo. **Setas integras.** Íons referentes a fragmentação com saída de moléculas neutras, como H₂O e CO. **Setas tracejadas.** Íons referentes a fragmentação dos anéis A, C e B da aglicona (TSIMOGIANNIS *et al.*, 2007; WOLFENDER *et al.*, 2000). 66

Figura 36. Espectro de absorção no ultravioleta do pico cromatográfico 244POS presente em *Eremanthus elaeagnus* (Mart. ex DC.) Sch.Bip., obtido através da análise por UFLC-UV(DAD)-ESI-MS² tipo *Ion Trap* (AmazonSL, Bruker). 67

Figura 37. Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico *Lychnophora triflora* (Mattf.) H. Rob. no modo positivo. A seta indica o pico cromatográfico referente à 244POS, de média intensidade e tempo de retenção aproximadamente 15,48 minutos. 69

Figura 38. Espectro de massas de íons totais (TIC) da espécie *Eremanthus elaeagnus* (Mart. ex DC.) Sch.Bip., referente ao tempo de retenção aproximado de 15,48 minutos, demonstrando a presença do 244POS de massa [M+H]⁺ 347,14862. 70

Figura 39. Comparação entre o perfil de fragmentação do íon m/z 347,10 (244POS) presente no extrato de *Eremanthus elaeagnus* (Mart. ex DC.) Sch.Bip. **(A)** e a fragmentação do padrão 4,5-diidro-15-desoxigoyazensolido **(B)**, demonstrando a semelhança nos perfis de fragmentação. **Pb.** Pico base. 71

Figura 40. Espectro de absorção no ultravioleta da substância 257POS presente em *Lychnophora sellowii* Sch.Bip., obtido através da análise por UFLC-UV(DAD)-ESI-MS² tipo *Ion Trap*. 72

Figura 41. Estrutura química das substâncias 9-hidroxinerolidol e 11-hidroxinerolidol. 73

Figura 42. Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico *Lychnophora sellowii* Sch. Bip. no modo positivo. A seta indica 257POS, de baixa intensidade e tempo de retenção aproximadamente 15,16 minutos. 74

Figura 43. Espectro de MS, indicando o íon molecular ([M+H]⁺) e o íon sodiado ([M+H]⁺ + Na). **B.** Espectro de AIF com a presença do íon sodiado e do pico base m/z 221,19. As setas íntegras indicam os possíveis fragmentos formados, confirmados por MS². **Pb.** Pico base. 75

Figura 44. Análise do extrato hidrometanólico *Lychnophora sellowii* Sch. Bip. no modo positivo, obtido através da análise por UFLC-UV(DAD)-ESI tipo *Ion Trap* (AmazonSL, Bruker). **A.** Análise por MS² do íon de m/z 239,00, mostrando sua fragmentação. **B.** Análise por MS³ do íon fragmento de m/z 221,20, advindo do íon de m/z 239,00, confirmando a fragmentação em A. **Pb.** Pico base. 76

Figura 45. Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico de *Albertinia brasiliensis* Spreng. (Es_1). **A.** Modo de ionização negativo. **B.** Modo de ionização positivo 93

Figura 46. Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico de *Blanchetia heterotricha* DC. (Es_2). **A.** Modo de ionização negativo. **B.** Modo de ionização positivo. 93

- Figura 47.** Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico de *Eremanthus crotonoides* (DC.) Sch.Bip. (Es_3). **A.** Modo de ionização negativo. **B.** Modo de ionização positivo. 94
- Figura 48.** Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico de *Eremanthus elaeagnus* (Mart. ex DC.) Sch.Bip. (Es_4). **A.** Modo de ionização negativo. **B.** Modo de ionização positivo. 94
- Figura 49.** Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico de *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish (Es_5). **A.** Modo de ionização negativo. **B.** Modo de ionização positivo. 95
- Figura 50.** Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico de *Eremanthus goyazensis* (Gardner) Sch.Bip. (Es_6). **A.** Modo de ionização negativo. **B.** Modo de ionização positivo. 95
- Figura 51.** Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico de *Eremanthus leucodendron* Mattf. (Es_7). **A.** Modo de ionização negativo. **B.** Modo de ionização positivo. 96
- Figura 52.** Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico de *Eremanthus mollis* Sch.Bip. (Es_8). **A.** Modo de ionização negativo. **B.** Modo de ionização positivo. 96
- Figura 53.** Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico de *Heterocoma robinsoniana* sp. Ined. (Es_9). **A.** Modo de ionização negativo. **B.** Modo de ionização positivo. 97
- Figura 54.** Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico de *Hololepis pedunculata* (DC. ex Pers.) DC. (Es_10). **A.** Modo de ionização negativo. **B.** Modo de ionização positivo. 97
- Figura 55.** Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico *Lychnophora markgravii* G.M. Barroso (Es_11). **A.** Modo de ionização negativo. **B.** Modo de ionização positivo. 98
- Figura 56.** Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico *Lychnophora mellosilvae* sp. ined. (Es_12). **A.** Modo de ionização negativo. **B.** Modo de ionização positivo. 98
- Figura 57.** Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico *Lychnophora regis* H. Rob. (Es_13). **A.** Modo de ionização negativo. **B.** Modo de ionização positivo. 99
- Figura 58.** Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico *Lychnophora sellowii* Sch.Bip. (Es_14). **A.** Modo de ionização negativo. **B.** Modo de ionização positivo. 99
- Figura 59.** Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico *Lychnophora triflora* (Mattf.) H. Rob. (Es_15). **A.** Modo de ionização negativo. **B.** Modo de ionização positivo. 100
- Figura 60.** Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico *Lychnophoriopsis damazioi* (P. Beauv.) H. Rob. (Es_16). **A.** Modo de ionização negativo. **B.** Modo de ionização positivo. 100

- Figura 61.** Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico *Minasia cipoensis* sp. ined. (Es_17) **A.** Modo de ionização negativo. **B.** Modo de ionização positivo. 101
- Figura 62.** Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico *Paralychnophora atkinsiae* D.J.N. (Es_18). **A.** Modo de ionização negativo. **B.** Modo de ionização positivo. 101
- Figura 63.** Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico *Paralychnophora harleyi* H. Rob. (Es_19). **A.** Modo de ionização negativo. **B.** Modo de ionização positivo. 102
- Figura 64.** Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico *Proteopsis argentea* (Mart. & Zucc.) Sch.Bip. (Es_21). **A.** Modo de ionização negativo. **B.** Modo de ionização positivo. 102
- Figura 65.** Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico *Piptolepis monticola* Loeuille esp. nov. (Es_22). **A.** Modo de ionização negativo. **B.** Modo de ionização positivo. 103
- Figura 66.** Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico *Lychnophora diamantinana* Coile & S.B. Jones. (Es_23). **A.** Modo de ionização negativo. **B.** Modo de ionização positivo. 103
- Figura 67.** Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico *Lychnophora tomentosa* (Mart. ex DC.) Sch. Bip. (Es_24). **A.** Modo de ionização negativo. **B.** Modo de ionização positivo. 104
- Figura 68.** Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico *Minasia scapigera* H. Rob. (Es_25). **A.** Modo de ionização negativo. **B.** Modo de ionização positivo. 104
- Figura 69.** Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico *Prestelia eriopus* Sch. Bip. (Es_26). **A.** Modo de ionização negativo. **B.** Modo de ionização positivo. 105
- Figura 70.** Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico *Chronopappus bifrons* (DC. ex Pers.) DC. (Es_28). **A.** Modo de ionização negativo. **B.** Modo de ionização positivo. 105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Diluição dos extratos em tampão COX e dimetilsulfóxido para a produção da solução mãe e a primeira diluição (a) de concentração final 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.	28
Tabela 2	Valores das concentrações inibitórias de 50% da atividade enzimática (IC_{50}) das enzimas COX-1 e 5-LOX pelos extratos hidrometanólicos de espécies de Lychnophorinae. ID: Identificação.	33
Tabela 3	Presença das substâncias indicadas nas análises de correlação <i>in silico</i> nas espécies estudadas e os respectivos valores IC_{50} . ID: Identificação.	45
Tabela 4	Dados espectroscópicos e espectrométricos obtidos por UHPLC-UV(DAD)-MS e UHPLC-UV(DAD)-AIF das cinco substâncias apontadas nas análises de correlação <i>in silico</i> como possíveis responsáveis pela atividade anti-inflamatória.	48
Tabela 5	Dados espectroscópicos e espectrométricos obtidos por UFLC-UV(DAD)-ESI-MS ² - MS ³ (<i>Ion Trap</i> - AmazonSL, Bruker) para a confirmação das estruturas identificadas na desreplicação.	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIF	<i>All Ion Fragmentation</i> (Fragmentação Total de Íons)
AINES	Anti-Inflamatório(s) Não Esteroidal(is)
COX	Ciclooxigenase(s)
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
DNP	<i>Dictionary of Natural Products</i> ©
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
ESI	<i>Electrospray Ionization</i> (Ionização por Eletrospray)
IC ₅₀	Concentração Inibitória de 50% da Atividade Enzimática
IL-10	Interleucina 10
LC	Leucotrieno(s)
LC-MS	<i>Liquid Chromatography Mass Spectrometry</i> (Cromatografia Líquida acoplada à espectrometria de massas)
LOX	Lipoxigenase(S)
LST	Lactona(s) Sesquiterpênica(s)
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
MS	<i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometria de Massas)
NDGA	<i>Nordihydroguaiaretic acid</i> (Ácido Nordiidroguaiarético)
NF-κB	Fator Nuclear de Transcrição kappa-B
NO	Óxido Nítrico
OPLS	<i>Orthogonal Partial Least Squares</i> (Análise por Mínimos Quadrados Parciais Ortogonais)
OPLS-DA	<i>Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis</i> (Análise Discriminatória por Mínimos Quadrados Parciais Ortogonais)
PCA	<i>Principal Component Analysis</i> (Análise de Componentes Principais)
PLS	<i>Partial Least Squares</i> (Análise por Mínimos Quadrados Parciais)
PLS/INF- γ	Interferon gamma PLS
PLS-DA	<i>Partial Least Squares Discriminant Analysis</i> (Análise Discriminatória por Mínimos Quadrados Parciais)
Q ²	Poder de predição
R ²	Coeficiente de correlação múltipla
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
TIC	<i>Total Ion Current</i> (Total de íons ocorrentes)
TNF-α	Fator de Necrose tumoral α
TR	Tempo de Retenção
u.a.	Unidade arbitrária

UHPLC	<i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência)
UFLC	<i>Ultra Fast Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida Ultra Rápida)
UV	Ultravioleta
Es_1	<i>Albertinia brasiliensis</i> Spreng.
Es_2	<i>Blanchetia heterotricha</i> DC.
Es_28	<i>Chronopappus bifrons</i> (DC. ex Pers.) DC.
Es_3	<i>Eremanthus crotonoides</i> (DC.) Sch.Bip.
Es_4	<i>Eremanthus elaeagnus</i> (Mart. ex DC.) Sch.Bip.
Es_5	<i>Eremanthus erythropappus</i> (DC.) MacLeish
Es_6	<i>Eremanthus goyazensis</i> (Gardner) Sch.Bip.
Es_7	<i>Eremanthus leucodendron</i> Mattf.
Es_8	<i>Eremanthus mollis</i> Sch.Bip.
Es_9	<i>Heterocoma robinsoniana</i> sp. Ined.
Es_10	<i>Hololepis pedunculata</i> (DC. ex Pers.) DC.
Es_23	<i>Lychnophora diamantinana</i> Coile & S.B. Jones.
Es_11	<i>Lychnophora markgravii</i> G.M. Barroso
Es_12	<i>Lychnophora mellosilvae</i> sp. ined.
Es_13	<i>Lychnophora regis</i> H. Rob.
Es_14	<i>Lychnophora sellowii</i> Sch.Bip.
Es_24	<i>Lychnophora tomentosa</i> (Mart. ex DC.) Sch. Bip.
Es_15	<i>Lychnophora triflora</i> (Mattf.) H. Rob.
Es_16	<i>Lychnophoriopsis damazioi</i> (P. Beauv.) H. Rob.
Es_17	<i>Minasia cipoensis</i> sp. ined.
Es_25	<i>Minasia scapigera</i> H. Rob.
Es_18	<i>Paralychnophora atkinsiae</i> D.J.N.
Es_19	<i>Paralychnophora harleyi</i> H. Rob.
Es_22	<i>Piptolepis monticola</i> Loeuille esp. nov.
Es_26	<i>Prestelia eriopus</i> Sch. Bip.
Es_21	<i>Proteopsis argentea</i> (Mart. & Zucc.) Sch.Bip.

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract.....	ii
Lista de Figuras.....	iii
Lista de Tabelas	ix
Lista de Abreviaturas e Siglas	x
1. Introdução.....	1
1.1. Família Asteraceae	1
1.2. Subtribo Lychnophorinae	1
1.3. Vias da Cicloxigenase e Lipoxigenase e Possíveis Alvos de Ação.....	5
1.4. Metabolômica	8
2. Objetivos	12
3. Material e Métodos	12
3.1. Material Vegetal	12
3.2. Processamento das Amostras Foliares	13
3.3. Preparo dos Extratos	14
3.4. Equipamentos Utilizados	15
3.5. Método Analítico em UHPLC-UV(DAD)-MS (Orbitrap™)	15
3.6. Método Analítico em UFLC-UV(DAD)-MS ⁿ (Ion Trap)	17
3.7. Triagem <i>in vitro</i> de Inibidores das Vias COX-1 e 5-LOX-dependentes.	17
3.7.1. Preparo das Amostras	17
3.7.2. Ensaios da Inibição <i>in vitro</i> da Via COX-1-dependente	18
3.7.3. Ensaios da Inibição <i>in vitro</i> da Via 5-LOX-dependente	22
3.8. Softwares Utilizados	22
3.8.1. Pré-tratamento dos Dados Cromatográficos	22
3.8.2. Análise dos Dados Obtidos nos Ensaios de Inibição <i>in vitro</i> das vias COX-1 e 5-LOX-dependentes	23
3.8.3. Mineração de Dados: Análise de correlação <i>in silico</i>	23
3.9. Desreplicação	24
4. Resultados e Discussão	25
4.1. Obtenção das Impressões Digitais Metabólicas por UHPLC-UV(DAD)-MS (Orbitrap™)	25
4.2. Pré-tratamento das Impressões Digitais Metabólicas.....	26
4.3. Triagem <i>in vitro</i> de inibidores das vias COX-1 e 5-LOX-dependentes.	28

4.3.1. Preparo das amostras	28
4.3.2. Ensaios da Inibição das vias COX-1 e 5-LOX-dependentes	29
4.4. Mineração de Dados: Análise de correlação <i>in silico</i>	34
4.5. Desreplicação	46
4.5.1. Substâncias 75NEG e 124POS	50
4.5.2. Substância 167POS	58
4.5.3. Substância 244POS	67
4.5.4. Substância 257POS	72
4.6. Atividade biológica de extratos e metabólitos isolados de Lychnophorinae (Asteraceae) relacionadas às vias COX e LOX- dependentes	77
 5. Conclusões	 79
 6. Referências	 80
 Apêndices	 90

1. Introdução

1.1. Família Asteraceae

A família Asteraceae é uma das maiores famílias dentre as plantas superiores (Angiospermae). É o segundo grupo sistemático mais numeroso, constituído de 12 subfamílias, cerca de 11.000 gêneros e mais de 23.600 espécies, representando cerca de 10% da flora mundial e 8% das plantas floríferas (BREMER, 1994; PANERO e FUNK, 2008; MAGENTA, 2006). Está distribuída em todos os continentes, exceto Antártica, apresentando hábito variável, incluindo pequenas ervas, arbustos e poucas árvores (BREMER, 1994). Seus compostos químicos advindos do metabolismo secundário, a plasticidade em relação aos habitats e a morfologia das suas inflorescências são os responsáveis pelo sucesso da família na vasta distribuição em escala global (PANERO e FUNK, 2008).

Essa família é uma das mais fascinantes dentre as Angiospermae, pois possui grande diversidade morfológica, é rica em metabólitos secundários, e possui plantas e substâncias derivadas com atividades farmacológicas úteis ao ser humano (BREMER, 1994).

Esta família caracteriza-se quimicamente pela elevada capacidade de biossintetizar metabólitos secundários com grande diversidade estrutural, principalmente poliacetilenos, flavonoides, cumarinas e terpenóides (HEYWOOD *et al.*, 1977; ZDERO e BOHLMANN, 1990). Dentre esses últimos destacam-se as lactonas sesquiterpênicas (LST), presentes na maioria das tribos (PICMAN, 1986; SCHMIDT, 1999).

1.2. Subtribo Lychnophorinae

Dentro da família Asteraceae e tribo Vernonieae, uma das suas subtribos é a Lychnophorinae, representada por aproximadamente 18 gêneros e 100 espécies. Os gêneros reconhecidos por ROBINSON (1999) em Lychnophorinae são *Anteremanthus*, *Chronopappus*, *Eremanthus*, *Lychnophora*, *Lychnophoriopsis*, *Minasia*, *Paralychnophora*, *Prestelia*, *Piptolepis*, *Proteopsis* e *Vinicia*. Análises filogenéticas baseadas em dados morfológicos e moleculares foram realizados por Loueuille *et al.* (2015), adicionaram sete gêneros à subtribo: *Albertinia*, *Blanchetia*, *Chresta*, *Gorceixia*, *Heterocoma*, *Hololepis* e *Piptocarpha*.

Essa subtribo possui distribuição restrita ao Brasil, presente nos campos rupestres e no Cerrado de Minas Gerais e do Planalto Central (ROBINSON, 1999; 2007; LOEUILLE *et al.*, 2015). Como os maiores níveis de endemismo são encontrados nos campos rupestre, várias famílias de plantas sofreram algum tipo de evolução convergente, como hábito, formato da folha, pilosidade entre esclerófilas verdes, e essas adaptações putativas relacionadas às secas sazonais e ao ambiente sujeito à queimadas periódicas possuem um papel importante na diversificação de espécies dessa subtribo presentes no Cerrado (LOEUILLE *et al.*, 2015).

Figura 1. Representantes da subtribo Lychnophorinae. **A.** *Prestelia eriopus*. **B.** *Lychnophora sellowii*. **C.** *Heterocoma albida*. **D.** *Paralychnophora harleyi*. **E.** *Minasia alpestris*. **F.** *Lychnophora santosii*. **G.** *Piptolepis oleaster*. **H.** *Lychnophora ericoides*. **I.** *Eremanthus glomerulatus*. **Fonte:** LOEUILLE, 2015.

Algumas plantas dessa subtribo têm sido utilizadas na medicina popular brasileira, como exemplo a “arnica da serra” ou “falsa arnica”, espécies do gênero *Lychnophora* utilizadas como agente analgésico e anti-inflamatório. Além dessas atividades, várias outras foram avaliadas, e dentre essas as mais comumente reportadas foram antimicrobiana, tripanocida, analgésica e antinociceptiva e anti-inflamatória (Figura 2) (KELES, 2010).

Figura 2. Porcentagem de atividades biológicas relatadas na literatura de espécies de *Lychnophorinae*. **Fonte:** KELES, 2010.

Substâncias isoladas de espécies dessa subtribo, como lactonas sesquiterpênicas, flavonóides, ácidos clorogênicos, dentre outros, foram descritos na literatura como detentores de atividades biológicas, como exemplo a vicensina-2 (Gobbo-Neto *et al.*, 2005), o ácido clorogênico (SANTOS *et al.*, 2005) e as LST goyazensolido e centraterina (LYSS *et al.*, 1998; RÜNGELER *et al.*, 1999).

Dentre os principais metabólitos secundários que foram descritos na literatura, os terpenóides (70,2%) e os flavonóides (16,9%) foram os mais notados (KELES, 2010). Outros também foram relatados, como mostrado na Figura 2.

Figura 2. Porcentagem da ocorrência de metabólitos secundários em Lychnophorinae relatados na literatura. **Fonte:** KELES, 2010.

Os flavonóides possuem uma ocorrência generalizada nessa subtribo, com porcentagens de ocorrência de 37,4% de flavonóis e 38,7% das flavonas, acima das diidroflavonas, dihidroflavonóis e chalconas, identificadas somente em *L. ericoides*. Dentre os flavonóides já relatados na literatura, Keles *et al.* (2010) mostra que os grupos mais frequentes de substituintes nas flavonas são o grupo metoxila e glicosil, além de que o glicosil está normalmente ligados ao carbono C-6 e/ou C-8 em flavonas e em C-3 em flavonóis.

As lactonas sesquiterpênicas presentes nessa subtribo são principalmente dos tipos guaianolido e germacranolido, estando estes últimos subdivididos em germacrolidos, furanoeliangolidos e eremantolidos, além de outros subgrupos menores (ROBINSON, 1999, 1980; BOHLMANN *et al.* 1980; BOHLMANN e JAKUPOVIC, 1990; SEAMAN, 1982). São conhecidas por suas propriedades anti-inflamatórias, alelopáticas, e tóxicas, além de deterrentes alimentares para herbívoros (DUTTA *et al.*, 1986, 1993; PASSREITER e ISMAN, 1997; PICMAN, 1986; SCHMIDT, 1999; SIEDLE *et al.*, 2004).

1.3. Vias da Ciclooxygenase e Lipooxygenase e Possíveis Alvos de Ação

Muitas substâncias das classes químicas presentes nas espécies de *Lychnophorinae*, em especial as LSTs ou mesmo os ácidos fenólicos, são relatados com inibidores de mediadores da cascata de reações que desencadeiam na produção de eicosanóides, dentre outros processos envolvidos na inflamação (SCHORR *et al.* 2002; SIEDLE *et al.* 2004; NICOLETE *et al.* 2009; GOBBO-NETO *et al.* 2005). Duas vias envolvidas na produção de eicosanóides são as vias das ciclooxygenases e lipooxygenases, tendo como substrato o ácido araquidônico.

Muitos medicamentos que atuam nessas vias, como antiasmáticos, anticoagulantes e anti-inflamatórios, estão entre os agentes terapêuticos mais utilizados no mundo, porém apresentam limitações com relação à sua potência, eficácia e efeitos adversos (BOERS, 2001). Com isso, é de grande valia a busca por substâncias que deem origem a medicamentos com efeitos adversos reduzidos, maior eficiência e baixo custo (PARENTE, 2001; CALIXTO, *et al.*, 2004; FIORUCCI *et al.*, 2001).

O processo inflamatório pode ser definido como “uma sequência de eventos que ocorre em resposta a um estímulo nocivo, trauma ou infecção”. Essas respostas são moduladas por mediadores inflamatórios e células inflamatórias (CALIXTO *et al.*, 2004). As ciclooxygenases e lipooxygenases participam do processo inflamatório, utilizando o ácido araquidônico como substrato para a produção de autacóides.

O ácido araquidônico é um ácido graxo essencial que é metabolizado por várias enzimas em diferentes tecidos. Ele é um derivado de fosfolípidios de membrana, sendo produzido através da clivagem dos fosfolípidios pela enzima Fosfolipase A2, quando há o estímulo físico ou químico, produzindo araquidonato livre para atuar nas vias COX e LOX e consequentemente, produzir vários componentes de largo espectro envolvidos no processo inflamatório.

Duas enzimas são essenciais no metabolismo do ácido araquidônico formado no processo inflamatório: ciclooxygenases (COX) e lipooxygenases (LOX). A oxidação sofrida pelo ácido araquidônico por essas enzimas promove a produção de eicosanóides para a produção de prostaciclina (ex. PGI₂), prostaglandinas (ex. PGE₂, PGF₂α, PGD₂) e tromboxanos (ex. TXA₂)

A via das ciclooxygenases possuem duas enzimas conhecidas: COX-1 e COX-2. A COX-1 é uma enzima constitutiva, a qual está presente em vários tecidos e

células do nosso corpo e possui ação importante na homeostasia, funcionamento e integridade tecidual. Possui grande importância no estômago, sistema circulatório e nos rins. No estômago, prostaglandina PGE_2 produzida pela COX-1 atua nos receptores EP_3 , diminuindo a ação da bomba de prótons e aumentando a produção de muco, atuam, portanto, na citoproteção da mucosa estomacal. Nas plaquetas, há a produção de tromboxano TX_2 que possui ação vasoconstritora e agregante plaquetário. Nos rins, as prostaglandinas PGE_2 e PGI_2 atuam na dinâmica sanguínea renal devida sua ação vasodilatadora (BRUNTON *et al.*, 2007).

A COX-2 é uma enzima indutiva, havendo produção e ação em resposta a um estímulo físico ou químico, como citocinas e fatores de crescimento, e são principalmente encontradas nas células endoteliais, fibroblastos, macrófagos e outros leucócitos.

As enzimas ciclooxigenase possuem uma atividade de endoperoxídeo sintetase, que oxigena e cicliza o ácido graxo precursor não esterificado para formar o endoperoxídeo cíclico PGG, e a atividade de peroxidase, que converte a PGG em PGH. Embora todos os tecidos sejam aptos a sintetizar os esses intermediários, seu destino varia em cada tecido e depende do complemento das enzimas presentes e da sua abundância relativa (BRUNTON *et al.*, 2007). Há vários medicamentos no mercado que possuem essas enzimas como alvos terapêuticos.

Os antiinflamatórios não-esteroidais (AINES) promovem a inibição das ciclooxigenases 1 e 2, e conseqüentemente diminuição da formação central e periférica de prostanóides. Eles atuam tanto na COX-1 (forma constitutiva) quando na COX-2 (forma indutiva). Como os AINES não atuam sobre a LOX, há um desvio da conversão do ácido araquidônico sendo totalmente oxidado pela enzima LOX, aumentando assim a concentração de leucotrienos atuantes no organismo causando broncoespasmos (GADDI *et al.*, 2004; PARENTE, 2001; FIORUCCI *et al.*, 2001). Os AINES são amplamente prescritos para dor, e possuem uma ação anti-inflamatória, antipirética e analgésica.

Devido à inibição da enzima constitutiva (COX-1), há a interrupção de ações importantes organismo, como a ação citoprotetora no estômago, causando dispepsia, náusea, diarreia e lesões, e a aumentam a vasoconstrição renal e diminuem a dinâmica sanguínea nos rins, podendo causar insuficiências renal em pacientes susceptíveis. Além desses, outro efeito é a diminuição da produção de tromboxano pelas plaquetas, interferindo na homeostase sanguínea e diminuindo a

agregação plaquetária. Em doses pequenas, atua como anti-agregante plaquetário utilizado na prevenção de doenças trombóticas (ex. Ácido Acetilsalicílico), mas em doses maiores pode causar hemorragias.

Agentes inibidores da COX-2 em vez de COX-1 foram desenvolvidos, sendo possível pelas diferenças nos sítios ativos das duas enzimas. Esses, são chamados inibidores seletivos da COX-2, não possuem todos os efeitos adversos apresentados nos AINES, já que atuam somente na enzima constitutiva. Mas apresentaram efeitos adversos preocupantes. Um dos efeitos está relacionado à enzima COX-2 ser constitutiva nos rins, havendo os mesmos efeitos descritos para os AINES. Outro efeito, e o mais importante, é a inibição da prostaglandina PGI_2 produzida no endotélio vascular, que possui ação vasodilatadora e anti-agregante plaquetária. Com a diminuição da produção de PGI_2 , há uma maior presença de TXA_2 , PG com ação agregante plaquetária produzida pelas plaquetas, resultando em um desequilíbrio que leva a risco de trombose, acidente vascular cerebral (AVC), dentre patologias cardiovasculares.

A via das lipoxigenases catalisa a oxigenação de ácidos graxos poliênicos em hidroperóxidos lipídicos correspondentes, e as enzimas dessas vias diferem quando à sua especificidade pela adição do grupo hidropoxi e aos tecidos que as contém. Por exemplo, os leucócitos possuem tanto a 5-LOX quanto a 12-LOX, produzindo 5-HPETE e 12-HTPE, e as plaquetas possuem somente 12-LOX. A 5-LOX é uma das mais importantes por estar relacionada à produção de leucotrienos (BRUNTON et al., 2007).

No caso do araquidonato, os eicosanóides são denominados ácidos hidroperoxieicosatetraenóicos (HPETE), precursor da série 4 dos leucotrienos. A 5-LOX catalisa a oxidação em duas etapas: oxigenação do araquidonato no quinto carbono para formar 5-HPETE, seguida de desidratação desse em um 5,6-epóxido, conhecido como leucotrieno LA_4 , precursor de outros leucotrienos como LTB_4 , LTC_4 , LTD_4 , LTE_4 e LTF_4 . Os leucotrienos agem como um agente quimiotático, recrutando células de defesa para o local requerido. Com isso, estimulam a infiltração de leucócitos no trato gastrointestinal, resultando na oclusão de micro vasos e redução do fluxo sanguíneo. Fatores como esses causam a necrose tecidual devido à liberação de radicais livres e proteases, levando a danos gastrointestinais como ulcerações. Além disso, devido ao recrutamento e infiltração dos leucócitos nos pulmões, desencadeiam crises de asma com agravamento da inflamação aguda

para crônica, sendo considerados agentes broncocontritores e broncoespasmódicos (PARENTE, 2001; GADDI *et al.*, 2004; FERREIRA e VANE, 1974). No mercado são encontrados inibidores de 5-LOX utilizados para o tratamento de asma em conjuntos com os agonistas de receptores β -adrenérgico. Esses também são utilizados em conjuntos com os AINES para diminuir os efeitos adversos causados pela exacerbação da via das Lipoxigenases, principalmente em pacientes com doenças do trato respiratório inferior (BRUNTON *et al.*, 2007).

1.4. Metabolômica

Na busca por substâncias bioativas, responsáveis pelas ações farmacológicas, é evidente a necessidade de estudos utilizando abordagens analíticas mais sensíveis, rápidas e eficazes, como as utilizadas na metabolômica (VILLAS-BÔAS *et al.*, 2005; WOLFENDER, 2010; YULIANA, 2011a; VERPOORTE *et al.*, 2005; LANG, 2008). Uma vez que este reflete o fenótipo do organismo, o metaboloma é, dentre as metodologias “ômicas” (genômica, proteômica, metabolômica), o que mais fornece informações no que diz respeito a compreensão dos sistemas biológicos. Por isso, é uma ferramenta inovadora e valiosa para a busca de compostos ativos a partir de extratos complexos de plantas, oferecendo oportunidades para a descoberta de novos fármacos a partir de produtos naturais (YULIANA *et al.*, 2011b; CHAGAS-PAULA *et al.*, 2015c).

O “metaboloma” é o conjunto de todos os metabólitos sintetizados por um organismo em um dado momento, consistindo de substâncias extremamente diversas e complexas, pertencentes tanto ao metabolismo primário quanto ao secundário (SUMNER, 2003; VILLAS-BÔAS *et al.*, 2005). O estudo do metaboloma envolve três abordagens diferentes: a metabolômica, o perfil metabólico e a impressão digital metabólica (VILLAS-BÔAS *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2006).

Metabolômica é a identificação quantitativa e qualitativa de todos os metabólitos presente em um organismo simultaneamente, em um determinado momento e sobre determinadas condições (YULIANA *et al.*, 2011b). Devido à grande complexidade dos metabólitos e suas características, essa abordagem é impraticável e dificilmente aplicável, principalmente com as técnicas analíticas atuais (VILLAS-BÔAS *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2006).

Em contrapartida, estudos abrangendo partes específicas do metaboloma de plantas têm sido realizados através da combinação de metodologias mais eficientes de preparo de amostra, extração, detecção e análise dos metabólitos, utilizando em conjunto diferentes técnicas analíticas, compreendendo diversas etapas. Dentre essas etapas estão duas abordagens do estudo do metaboloma: a obtenção de perfis metabólicos (*metabolite profiling*) e de impressões digitais metabólicas (*metabolite fingerprinting*).

A obtenção do perfil metabólico visa à identificação e quantificação de um grupo de metabólitos de interesse, responsáveis pelas diferenças observadas nas impressões digitais metabólicas, que podem ser identificados com o auxílio de determinada técnica analítica. A obtenção da impressão digital metabólica é a detecção detalhada do maior número de substâncias presentes no organismo sob determinada condição, produzindo um cromatograma ou espectro de RMN que é característico daquela planta, como uma impressão digital. Esta abordagem não visa a quantificação ou identificação dos metabólitos, mas a comparação entre amostras através de ferramentas matemáticas e estatísticas para determinar quais metabólitos ou grupo de metabólitos são diferentes e iguais entre elas (ALLWOOD e GOODACRE., 2010; BAMBA e FUKUSAKI, 2006; CHAGAS-PAULA, 2013; JANSEN *et al.*, 2009; MORITZ e JOHANSSON, 2008; NORDSTRÖM, 2008).

A utilização das impressões digitais metabólicas, aliadas às análises matemáticas e estatísticas, permite uma série de aplicações. Como exemplo, a utilização em classificações taxonômicas através do agrupamento de espécies baseada na similaridade química (MARTUCCI *et al.*, 2014; CHAGAS-PAULA, 2013; KIM *et al.*, 2010). Permite também identificar diferenças nas composições químicas de amostras, como extratos de plantas e amostras biológicas (urina, plasma e sangue). Através dessa abordagem, torna-se possível a identificação de biomarcadores de doenças e de outras propriedades, de produtos de reações enzimáticas, produtos de degradação, de impurezas, dentre outras. É possível realizar a identificação de substâncias com potencial farmacológico em misturas complexas através da correlação de variáveis como atividade biológica e composição química das amostras. Além disso, a identificação das substâncias requeridas é realizada sem a necessidade de isolamento, o qual demanda tempo e recursos financeiros (VILLAS-BÔAS *et al.*, 2005; WOLFENDER *et al.*, 2010; WECKWERTH e MORGENTHAL, 2005, ZHANG *et al.*, 2015).

Para que sejam detectadas as mínimas diferenças químicas entre as amostras, são utilizadas técnicas analíticas hífenadas que possuem grande sensibilidade, eficiência e rapidez, sendo capazes de demonstrar a diversidade química dos extratos proporcionando uma maior representatividade do metaboloma, e essa são a Ressonância Magnética Nuclear (RMN), Espectrometria de Massas (MS) e cromatografia (líquida ou gasosa) de ultra eficiência, preferencialmente acoplada à detectores de UV e analisadores de massa, que aumentam a performance da análise (CHAGAS-PAULA *et al.*, 2015c; YULIANA *et al.*, 2011a; WECKWERTH e MORGENTHAL, 2005).

Na metabolômica, uma técnica de escolha é a cromatografia líquida de alta ou ultra eficiência (HPLC ou UHPLC) acoplada a detector de ultravioleta com arranjo de diodos (UV-DAD) e espectrometria de massas de alta resolução (HRMS) – LC-UV-MS, devido à abrangência de técnica e sua alta sensibilidade (MORITZ e JOHANSSON, 2008; VILLAS-BÔAS *et al.*, 2005, VAN DER KOOY *et al.*, 2009; WOLFENDER *et al.*, 2010). Essa é uma das técnicas empregadas em análises de extratos padronizados, de diferentes partes de uma planta, obtidos através de formas variadas, havendo a possibilidade de identificação de inúmeros constituintes químicos em concentrações ínfimas e sem a necessidade de seu isolamento.

Durante as análises metabolômicas, são geradas grandes quantidades de dados pela obtenção da impressão digital metabólica, tais como tempo de retenção, espectros de absorção no UV e espectros de massas (modos positivo e negativo), para cada pico cromatográfico, e em meio à esses dados, devido a complexidade do metaboloma das plantas, pode ocorrer coeluição de substâncias, sobreposição de perfis de fragmentação e possíveis fragmentações na fonte durante o processo em analisadores de massas. Devido a esses fatores, é necessária a utilização de softwares específicos que extraem as informações úteis para as análises. (BAMBA e FUKUSAKI, 2006; TIKUNOV *et al.*, 2005).

O pré-tratamento dos dados promove a desconvolução dos cromatogramas baseado nos dados de MS, alinha, centraliza e normaliza os cromatogramas obtidos, além de extrair e exportar os dados dos cromatogramas de MS tratados na forma de tabelas. E são realizados utilizando softwares como *MetAlignTM* (RIKILT, Holanda), *MSClustTM* (Plant Research International, Holanda), *XC-MSTM* (METLIN, EUA), *MzMineTM* (BMC Bioinformatics, Reino Unido) entre outros.

A infinidade de informações geradas pelas abordagens metabolômicas podem ser utilizadas para diversas aplicabilidades, mas para que isso seja possível deve-se analisar e manejar adequadamente os dados por meios de métodos *in silico*. Existem vários softwares estatísticos que podem ser empregados para a realização desses procedimentos de mineração de dados (*data mining*), tais como The Unscrambler X (CAMO Software, Noruega), SIMCA (Umetrics) ou R (*R Project for Statistical Computing*). Os softwares fazem a comparação requerida entre as amostras e obtêm as informações relevantes sobre as semelhanças e diferenças entre elas. Por exemplo, as análises podem facilitar a visualização de pequenas diferenças químicas nos extratos que estão correlacionadas com substâncias minoritárias detentoras de atividade farmacológica.

Para isso, a análise dos dados deve ser realizada através de modelos matemáticos e estatísticos adequados para o estudo de correlação entre as variáveis, sendo que usualmente são empregados métodos multivariados de análise não supervisionados, como HCA (*Hierarchical Cluster Analysis* – Análise de Agrupamento Hierárquico) e PCA (*Principal Component Analysis* - Análise de Componentes Principais), e supervisionados, como PLS (*Partial Least Squares* - Análise por Mínimos Quadrados Parciais), OPLS (*Orthogonal Partial Least Squares* - Análise por Mínimos Quadrados Parciais Ortogonais), e SIMCA (*Soft Independent Modeling by Class Analogy*) (YULIANA, 2011a; WECKWERTH e MORGENTHAL, 2005; LANG, 2008; KATAJAMAA e ORESIC, 2007; TRYGG, 2007; SHYUR, 2008).

A identificação dos metabolitos indicados na mineração de dados é preferencialmente feita, dentro da abordagem metabolômica, através da desreplicação, a qual é definida como rápida caracterização das substâncias discriminantes da amostra visando identificar baseando-se em relatos na literatura e que constam em bancos de dados como o SciFinder Scholar® (©American Chemical Society), *Dictionary of Natural Products*® (DNP) (©Taylor & Francis Group) ou PubChem (©National Center for Biotechnology Information), sem necessidade de seu isolamento. Somente os metabolitos não identificados na desreplicação precisam ser isolados para identificação estrutural (CROTTI *et al.*, 2006; GOBBO-NETO e LOPES, 2008; HOSTETTMANN *et al.*, 2001).

2. Objetivos

Os objetivos deste estudo foram analisar 26 espécies da subtribo *Lychnophorinae* quanto à atividade inibitória *in vitro* das vias COX-1 e 5-LOX-dependentes e, através de análises de correlação *in silico* entre bioatividade e impressões digitais metabólicas, identificar as prováveis substâncias responsáveis por essa atividade. Os objetivos específicos foram:

- a. Avaliar o potencial de inibição dupla *in vitro* das vias COX-1 e 5-LOX-dependentes os extratos e substâncias ativas das diferentes espécies;
- b. Obter as impressões digitais metabólicas (*metabolite fingerprint*) por UHPLC-UV(DAD)-MS (OrbitrapTM) dos extratos;
- c. Realizar as análises metabolômicas e correlação *in silico*, utilizando os dados brutos dos cromatogramas obtidos em UHPLC-UV(DAD)-MS (OrbitrapTM) (impressões digitais metabólicas), tendo como parâmetro a atividade biológica;
- d. Realizar a identificação das principais substâncias indicadas, nas análises de correlação *in silico*, como as prováveis contribuintes para o potencial inibitório, através de comparação com padrões e desreplicação.

3. Material e Métodos

3.1. Material Vegetal

As espécies estudadas foram *Albertinia brasiliensis* Spreng., *Blanchetia heterotricha* DC., *Chronopappus bifrons* (DC. ex Pers.) DC., *Eremanthus crotonoides* (DC.) Sch.Bip., *Eremanthus elaeagnus* (Mart. ex DC.) Sch.Bip., *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish, *Eremanthus goyazensis* (Gardner) Sch.Bip., *Eremanthus leucodendron* Mattf., *Eremanthus mollis* Sch.Bip., *Heterocoma robinsoniana* sp. ined., *Hololepis pedunculata* (DC. ex Pers.) DC., *Lychnophora diamantinana* Coile & S.B. Jones, *Lychnophora markgravii* G.M. Barroso, *Lychnophora mellosilvae* sp. ined., *Lychnophora regis* H. Rob., *Lychnophora sellowii* Sch.Bip., *Lychnophora tomentosa* (Mart. ex DC.) Sch. Bip, *Lychnophora triflora* (Mattf.) H. Rob., *Lychnophoriopsis damazioi* (P. Beauv.) H. Rob., *Minasia cipoensis* sp. ined., *Minasia scapigera* H. Rob., *Paralychnophora atkinsiae* D.J.N. Hind, *Paralychnophora harleyi* H. Rob., *Piptolepis monticola* Loeuille sp. ined., *Prestelia eriopus* Sch. Bip. e *Proteopsis argentea* (Mart. & Zucc.) Sch.Bip .

As coletas foram realizadas por Benoît Francis Patrice Loeuille, do Laboratório de Sistemática Vegetal do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Foram coletadas folhas saudáveis e completamente desenvolvidas, preferencialmente a partir de plantas em estágio fenológico similar, durante o período de floração.

Os vouchers foram depositados nos herbários SPF (Universidade de São Paulo - USP) e HUEFS (Universidade Estadual de Feira de Santana – UEFS) sob os códigos indicados no Apêndice I.

3.2. Processamento das Amostras Foliares

As folhas coletadas foram armazenadas em sílica enquanto transportadas ao laboratório, secas em estufa de ar circulante a 50 °C, trituradas com nitrogênio líquido e liofilizadas durante 24 horas. Após a liofilização, as amostras foram armazenadas em dessecador mantido em uma câmara fria até a preparação dos extratos (Figura 3).

Figura 3. Fluxograma representando os procedimentos a partir da coleta até o armazenamento em laboratório das espécies de Lychnophorinae.

3.3. Preparo dos Extratos

O preparo dos extratos para as análises em UHPLC-UV(DAD)-MS(Orbitrap™) e para os ensaios de inibição *in vitro* foram realizados separadamente, utilizando o mesmo método de extração e utilizando uma alíquota da mesma amostra, visando uma concentração final de 1,0 mg/mL para cada. A Figura 4 mostra o fluxograma da preparação dos extratos, descrito a seguir.

Uma amostra de cada espécie foi pulverizada em graal de porcelana com auxílio de nitrogênio líquido. Após, foi adicionado à 10 mg de material vegetal pulverizado 1,0 mL de solução CH₃OH-H₂O (7:3 v/v), e foi realizada a extração em banho de ultrassom (UltraSonic Cleaner 1400, 40kHz, UNIQUE) por 10 minutos. Posteriormente, foi adicionado 0,5 mL de hexano para realizar a retirada de materiais de natureza apolar e pigmentos, seguida de agitação em agitador tipo vórtex e separação da fração hidrometanólica da fração hexânica, utilizando micropipetador. A fração hidrometanólica resultante foi centrifugada por 5 minutos à 15000 rpm e a 10°C (M-240R, BOECO Germany), filtrada com filtro de seringa com membrana filtrante de PTFE (0,22 µm) e acondicionada em microtubos de 2,0 mL previamente pesados. Após isso, foi realizada a secagem utilizando SpeedVac (Rotational Vacuum Concentration - RVC 2-18, Christ, Alemanha) à 30°C e posterior pesagem. Os extratos foram mantidos em freezer a -20°C até o momento da utilização.

Figura 4. Fluxograma representando o método de extração das espécies de Lychnophorinae para as análises em Orbitrap™ e ensaio de inibição *in vitro*.

Para os ensaios de inibição *in vitro*, os extratos foram ressuspensos em solução tampão do *kit* de ensaios de triagem de inibidores da COX (item 3.7.2.). Já para as análises em UHPLC-UV(DAD)-MS(Orbitrap™), os extratos foram ressuspensos com 1,0 mL de solução CH₃OH-H₂O (7:3) (v/v) e à eles foi adicionado padrão interno hidrocortisona em concentração final de 10 µg.mL⁻¹. Em todos os cromatogramas, o pico cromatográfico referente ao padrão interno pôde ser observado em 11,35 minutos, com o íon protonado [M+H]⁺ 363, no modo positivo, e o íon desprotonado complexado ao ácido fórmico [[M-H]⁻ +HCO₂H] 407, no modo negativo.

3.4. Equipamentos Utilizados

As análises das impressões digitais metabólicas por UHPLC-UV-MS e UHPLC-UV-AIF foram realizadas em um sistema UHPLC-UV(DAD)-MS(Orbitrap™) (Thermo Scientific Exactive™, Thermo Scientific®), que consiste em cromatógrafo líquido de ultra eficiência (UHPLC *Accele* 1250) acoplado a um detector de arranjo de diodos (UV/DAD – *Accele*) e um espectrômetro de massas (MS) com fonte de ionização por electrospray (ESI) e analisador tipo Orbitrap™, utilizando simultaneamente o modo de ionização positivo e negativo. Utilizando esse sistema, foi realiza a detecção das massas dos íons formados por ESI das substâncias presentes nos extratos e a fragmentação de íons totais (AIF), que consiste na fragmentação de todos os íons presentes em determinado tempo de retenção.

As análises de fragmentação MS² e MS³ para confirmação das estruturas identificadas na desreplicação foram realizadas em UFLC-UV(DAD)-MSⁿ, utilizando um cromatógrafo líquido ultra rápido (UFLC) (Shimadzu LC-6AD) acoplado a um detector de arranjo de diodos (UV/DAD) e espectrômetro de massas com ionização por *electrospray* e analisador do tipo Ion Trap (AmazonSL, Bruker).

3.5. Método Analítico em UHPLC-UV (DAD)-MS (Orbitrap™)

Para o desenvolvimento do método analítico considerou-se a variabilidade química entre as espécies estudadas, de acordo com a literatura referente às espécies do gênero *Lychnophorinae*, possibilitando a utilização do mesmo método nas análises de todas estas espécies, tornando a aplicação fácil e rápida. O método

escolhido foi desenvolvido utilizando seis espécies aleatórias e com quantidade de droga vegetal suficientes, variando algumas propriedades da análise como gradientes e proporção dos solventes, tempos de análise e fluxo, para obter um método mais abrangente possível para que se conseguisse detectar as substâncias mais diversas.

As análises por UHPLC-UV-MS e UHPLC-UV-AIF foram feitas utilizando $\text{CH}_3\text{CN-HCO}_2\text{H}$ (0,1%) (v/v) (B) e $\text{H}_2\text{O-HCO}_2\text{H}$ (0,1%) (v/v) (A) como fase móvel a um fluxo de 400 $\mu\text{L}/\text{min}$, e o seguinte gradiente de eluição: 0 – 2 min, 5% B; 2 – 30 min, 5 - 100% B ; 30 – 34 min, 100% B; 34 – 37 min, 100 - 5% B; 37 – 40 min, 5% B. Foi utilizada uma coluna KinetexTM Core-Shell 1,7 μm XB-C18 (100 Å; 150 x 2,1 mm; Phenomenex), protegida por uma pré-coluna de material equivalente. O detector de UV(DAD) foi programado para detectar os comprimentos de onda entre 200 – 600 nm.

As análises foram realizadas por ESI-MS e ESI-AIF nos modos positivo e negativo concomitantemente. A ocorrência dos íons totais (TIC) foram registrados na faixa de varredura de 150 a 1200 m/z e os seguintes parâmetros do espectrômetro de massas foram mantidos em todas as análises: 1,0 microscans/s; resolução de 70.000 no modo MS e de 35.000 no modo AIF; e máximo tempo de injeção de 100 ms. Os parâmetros da fonte de ionização foram: fluxo do gás de bainha, 30 u.a.; fluxo de gás auxiliar, 10 u.a.; fluxo de gás de arraste, 11 u.a.; voltagem do spray no modo de ionização positivo, 3,6 kV; voltagem do spray no modo de ionização negativo, 3,2 kV; corrente no spray de 1,4 MA; temperatura do capilar de 320 °C; voltagem no capilar de + e -, 30 V; voltagem na lente de + e -, 90 V; voltagem no cone de + e -, 20 V; S-lens RF: 50; HCD: energia de colisão (NDE) 35 eV. N_2 foi utilizado como gás de secagem e colisão.

Foi realizada a calibração do aparelho para cada polaridade antes das análises, utilizando contaminantes de baixa massa molecular e a solução Thermo calmix (Sigma-Aldrich[®]). Os dados foram gravados usando o software Xcalibur 2.1.0 (Thermo Fisher Scientific[©]). A cada dez amostras, um branco composto por 1,0 mL de solução $\text{CH}_3\text{OH-H}_2\text{O}$ (7:3) (v/v) com padrão interno foi analisado.

3.6. Método Analítico em UFLC-UV (DAD)-MSⁿ (Ion Trap)

As análises dos perfis de fragmentação de íons pai e filhos para a confirmação das substâncias indicadas na desreplicação foram realizadas por UFLC-UV(DAD)-MSⁿ (Ion Trap). As análises foram realizadas utilizando coluna Kinetex™ Core-Shell 2.6 µm C18 (100 Å; 250 x 2,1 mm; Phenomenex). O método analítico utilizou CH₃CN (B) e H₂O-HCO₂H (0,1%) (v/v) (A) como fase móvel a um vazão de 1,0 mL/min, e o seguinte gradiente de eluição: 0 – 2 min, 5% de CH₃CN; 2 – 30 min, 5 - 100% de CH₃CN ; 30 – 34 min, 100% de CH₃CN; 34 – 37 min, 100 - 5% de CH₃CN; 37 – 42 min, 5% de CH₃CN. A temperatura do forno foi de 45°C e o detector de DAD foi programado para registrar os comprimentos de onda entre 200 – 800 nm.

Os espectros de massas foram registrados na faixa de varredura de 50 a 1000 *m/z* (± 3) nos modos positivo e negativo; e os seguintes parâmetros do espectrômetro de massas foram mantidos em todas as análises: 8,1 *m/z* por segundo; intervalo entre os espectros de 200 ms; resolução de 100.000 no modo MRM-CID (modo “Enhanced Resolution”); e tempo máximo de injeção de 250 ms. Os parâmetros da fonte de ionização foram: pressão no nebulizador, 60 psi; taxa da vazão de gás secante, 10 L/min; temperatura do gás secante, 330°C; voltagem no spray, 3,5 kV. N₂ foi utilizado como gás de secagem e de colisão.

3.7. Triagem *in vitro* de Inibidores das Vias COX-1 e 5-LOX-dependentes

3.7.1. Preparo das Amostras

Solubilizou-se 1,0 mg de extrato bruto seco, para cada espécie, em 100 µL de solução tampão (Tris-HCl 0,1 M, pH 8, contendo 5 mM de EDTA e 2 µM de fenol) do *kit* de ensaios de triagem de inibidores da COX (catálogo nº 560101, Cayman Chemical), gerando uma solução mãe de 10,0 mg/mL. A partir dessa solução foram realizadas diluições seriadas (Figura 5), uma para o ensaio de inibição da enzima COX-1 e outra da enzima 5-LOX, com os respectivos tampões (Tris-HCl 0,1 M, pH 8, contendo 5 mM de EDTA e 2 µM de fenol) e (Tris-HCl 0,1 M, pH 7.4). Também foram realizadas diluições seriadas dos padrões comerciais Indometacina (fármaco anti-inflamatório não esteroide) e ácido nordiidroquaiarético (inibidor de LOX), sendo essas 100 µg.mL⁻¹, 10 µg.mL⁻¹, 1,0 µg.mL⁻¹, 0,1 µg.mL⁻¹ e 0,01 µg.mL⁻¹.

Para analisar a influência do dimetilssulfóxido (DMSO), utilizado na solubilização dos extratos, foi realizada uma diluição seriada utilizando 40 μL de dimetilssulfóxido como alíquota inicial, seguindo a sequência de pipetagem e volumes da diluição seriada para o ensaio de COX (Figura 5). Nos ensaios de inibição, foram utilizadas somente a diluição c a hma de DMSO 100%, uma diluição intermediária que possibilita analisar a influência desse solvente nos ensaios.

Figura 5. Procedimento de diluição seriada dos extratos para os ensaios de triagem de inibidores das enzimas COX-1 e 5-LOX.

3.7.2. Ensaios da Inibição *in vitro* da Via COX-1-dependente

Foram utilizados para os ensaios *in vitro* os kits de triagem de inibidores da enzima COX-1 ("COX (ovine) Inhibitor Screening Assay Kit" – nº de catálogo 560101, Cayman Chemical). A triagem foi realizada de acordo com as instruções do kit e as reações foram realizadas para todas as soluções da diluição seriada de cada extrato. Os reagentes disponibilizados pelo kit foram preparados de acordo com as especificações.

A primeira etapa é a de reação de inibição da enzima COX-1 pelos componentes do extrato, em sua respectiva diluição. A reação foi realizada

utilizando o esquema de pipetagem da Figura 6, que concilia os tempos necessários de incubação e a estabilidade dos reagentes, sendo essa realizada em banho-maria à 37°C. Primeiramente foram adicionados aos microtubos a solução tampão (160 µL), a solução de heme (10 µL) e a enzima COX-1 (10 µL). Em seguida, aos respectivos microtubos, foram adicionadas as amostras (10 µL), seguida de incubação por cinco minutos (Figura 6).

Nessa primeira etapa, foram realizadas reações de inibição com diferentes amostras: cinco concentrações de cada extrato, cinco concentrações de indometacina e adição de solução tampão para controle negativo (COX 100%) e para o controle positivo (Bc). A amostra Bc atua como controle positivo, onde há inibição máxima da enzima, pois a enzima utilizada na reação é inativa. A amostra COX 100% atua como controle negativo, onde há atividade máxima da enzima, pois no lugar do inibidor é adicionada solução tampão.

A etapa seguinte foi adicionar ácido araquidônico (10 µL) às amostras e incubá-las por 2 min. Após isso, adicionou-se 100 µL de solução saturada de cloreto de estanho (125 mg de cloreto de estanho em 2,5 mL de ácido clorídrico 0,1 M). Em seguida, retiraram-se os microtubos do banho-maria e colocou-se ao abrigo da luz por 5 minutos, sendo posteriormente armazenados em geladeira.

Figura 6. Esquema de cronometragem e pipetagem para a reação de inibição da enzima COX-1. Preparou-se cinco microtubos adicionando 10 μ L de heme, 160 μ L de tampão do ensaio COX-1 e 10 μ L da enzima COX-1, estabilizando-os a 37°C em banho-maria. Logo em seguida, adicionou-se a primeira amostra e o cronômetro é disparado. A cada 20 segundos adicionou-se a amostra seguinte, até finalizar 5 microtubos. Após isso, esperou-se completar os 5 minutos de incubação. Em seguida adicionou-se ácido araquidônico aos microtubos cada 20 segundos e esperou-se completar 7 minutos de reação. Logo após, adicionou-se 30 μ L de solução de cloreto de estanho, na mesma ordem, a cada 20 segundos.

A segunda etapa é a realização do Imunoensaio ELISA para a detecção das prostaglandinas produzidas na reação de inibição, e esse foi realizado de acordo com o descrito no kit. Para esta etapa, foi realizada a diluição do conteúdo da reação na proporção 1:2000 em solução tampão.

Para auxiliar na análise quantitativa, foi feita uma diluição seriada de prostaglandinas liofilizadas nomeadas de S1 a S8 (Figura 7), possibilitando a construção de uma curva analítica padrão.

Figura 7. Diluição seriada da solução estoque de prostaglandinas liofilizadas em tampão específico do kit (*Bulk Standard*), para a construção de curva padrão para análise quantitativa das prostaglandinas produzidas. **Fonte:** Imagem retirada do manual do kit “COX (*ovine*) inhibitor screening assay kit” de nº de catálogo 560101, da Cayman Chemical.

Nessa etapa utilizou-se uma placa de 96 poços, na qual foram designados poços para as cinco concentrações de cada extrato, cinco concentrações de Indometacina (padrão comercial), cinco concentrações de padrão de prostaglandinas (curva analítica padrão), Bc (controle positivo), COX 100% (controle negativo), B₀ (influência da solução tampão), Blk (branco) e DMSO 100%.

O B₀ é referente à quantidade máxima de *Tracer* a qual o anticorpo (*Antisserum*) consegue se ligar na ausência de analito livre, mostrando a influência da solução tampão e auxiliando na leitura da placa indicando a faixa de desenvolvimento ótimo da placa (B₀ ≥ 0,3 A.U.). Para B₀, em vez de adicionar uma alíquota da reação, adicionou-se 50 µL de solução tampão no respectivo poço da placa. O Blk é o branco, onde nada é adicionado ao poço, e a indometacina é utilizada como padrão de comparação com fármacos ativos, sendo que ela é analisada assim como uma amostra.

Para cada amostra (alíquota da reação diluída em 1:2000) foi adicionada 50 µL à placa, em duplicata. Após a adição dos componentes nos respectivos poços, foi adicionado a cada poço o *Tracer* e o *Antiserum*, e a placa foi incubada por 18 horas à 25-30°C em agitador circular 120 rpm sob proteção da luz.

Após incubação, as placas foram lavadas com solução tampão de lavagem utilizando-se da lavadora de microplacas para a remoção dos reagentes não ligados aos anticorpos anti-PG aderidos à parede dos poços. Em sequência, ao abrigo da luz, foi adicionado o reagente de Ellman (ácido 5 5-ditiobis(2-nitrobenzóico) - DTNB). A placa foi tampada com filme de proteção, colocada em agitador circular a 25-30°C,

protegida da luz, por uma hora. O produto da reação enzimática é amarelo (íon 2-nitro-5-tiobenzoate - TNB⁻²) e a absorbância foi lida utilizando espectrofotômetro em leitora de microplaca no comprimento de onda de 405 nm. A intensidade da cor é proporcional à quantidade de *Tracer* ligado ao poço, que é inversamente proporcional à quantidade de prostaglandina presente na incubação. Sendo assim, uma maior densidade ótica indica maior poder de inibição da enzima COX-1 na produção de prostaglandinas pelo extrato.

3.7.3. Ensaios da Inibição *in vitro* da Via 5-LOX-dependente

Foram utilizados para os ensaios *in vitro* os kits de triagem de inibidores da enzima LOX “*Lipoxygenase inhibitor screening assay*” (nº de catálogo 760700, Cayman Chemical) e “*5-Lipoxygenase (potato) screening enzyme*” (nº de catálogo 60401, Cayman Chemical).

A reação de detecção é realizada diretamente na placa de 96 poços. Aos poços designados, foram adicionados 10 µL das concentrações de cada extrato, 100 µL de solução tampão da reação ao branco (Blk), 10 µL de tampão de reação ao controle negativo (TPL 100%), 10 µL de DMSO 100% e 10 µL de cada concentração de ácido nordihidroguaiarético (NDGA). Todos foram realizados em duplicatas.

Em seguida, foram adicionados 90 µL de enzima 5-LOX em solução tampão a cada poço, exceto ao branco. Ao adicionar 10 µL de substrato (ácido linoleico em hidróxido de potássio), a placa foi colocada em agitador circular por 5 minutos. Após isso, adicionou-se 100 µL de solução cromógena aos poços e as placas foram mantidas em agitador por mais 5 min. A leitura foi feita por uma leitora de microplacas a 490nm.

3.8. Softwares Utilizados

3.8.1. Pré-tratamento dos Dados Cromatográficos

Após a aquisição das impressões digitais metabólicas, os dados brutos foram separados em modo positivo e negativo utilizando a ferramenta RecalOffline, do software Xcalibur 2.1.0 (Thermo Fisher Scientific©). Foi realizado, para cada modo, o pré-tratamento e refinamento dos dados, utilizando os softwares *MetAlign*TM (RIKILT, Holanda) e *MSClust*TM (Plant Research International, Holanda), utilizando-

se os parâmetros listados nos Apêndices II e III, respectivamente. Os parâmetros foram escolhidos analisando diversos cromatogramas quanto à linha de base, largura e altura do pico, entre outros fatores requeridos pelo software.

Os dados brutos foram alinhados, centralizados e normalizados, além de serem submetidos a remoção de ruídos e fixação de linhas de base mais apropriadas, extração e exportação dos dados na forma de tabelas com auxílio do software *MetAlignTM*. Os sinais de massas derivados da mesma substância, que normalmente estão localizados dentro de uma determinada janela de tempo de retenção correspondente ao intervalo coberto pelo pico de eluição da substância, foram agrupados em grupos chamados “centrotipos”. Esses podem ser produzidos por fragmentações na fonte de ionização ou em alguma outra etapa do processo. Através desses agrupamentos, há a reconstrução mais próxima do espectro real da substância íntegra. Esse agrupamento foi realizado pelo software *MSClustTM*.

3.8.2. Análise dos Dados Obtidos nos Ensaios de Inibição *in vitro* das vias COX-1 e 5-LOX-dependentes

As porcentagens de inibição para os dois ensaios de inibição foram determinadas a partir dos valores de absorbância e foram utilizadas para realizar o cálculo de concentração inibitória de 50% da atividade enzimática (IC₅₀). No caso das prostaglandinas produzidas no ensaio de inibição da enzima COX-1, o IC₅₀ foi calculado baseando-se na interpolação com a curva padrão (absorbância x padrão de prostaglandina em pg.mL⁻¹). Todos os cálculos e análises foram feitos utilizando-se o software GraphPad Prism® (GraphPad Software, Inc.).

3.8.3. Mineração de Dados: Análise de Correlação *in silico*

Após o pré-tratamento das impressões digitais metabólicas, obteve-se uma matriz contendo os dados de todas as espécies estudadas para cada modo de ionização, em formato *.xml*. Em cada matriz estão indicadas as espécies estudadas, os íons nelas presentes e as respectivas intensidades, razão massa-carga e tempo de retenção.

Para as análises *in silico*, as espécies estudadas foram classificadas em dois grupos de acordo com os resultados dos ensaios de inibição: **(B)** e **(N)**. Os extratos que demonstraram valores de IC_{50} maiores que $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e os que possuem atividade inibidora somente para uma enzima foram selecionados parte do grupo **(N)**, e os extratos com valores de IC_{50} menores que $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foram selecionados para constituírem o grupo **(B)**.

Reunindo em uma única matriz os dados de ambos os modos de ionização, há um aumento na robustez da análise estatística pelo fato de aumentar o número de variáveis relacionadas às observações, além de haver maior representatividade da impressão digital metabólica (MARTUCCI, 2016). Sendo assim, reuniram-se as matrizes das impressões digitais metabólicas, nos modos de ionização positivo e negativo, em conjunto com os resultados dos ensaios de inibição, formando uma única matriz utilizada como entrada para realizar os estudos *in silico*, visando a identificação de possíveis substâncias discriminantes da atividade inibidora dupla das enzimas COX-1 e 5-LOX através da mineração de dados.

As análises de correlação e estatísticas multivariadas supervisionadas PLS-DA (Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais) e OPLS-DA (Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais Ortogonais), e não supervisionadas, como o PCA (Análise de Componentes Principais) foram realizadas, após submeter a matriz de dados ao escalonamento de Pareto, utilizando-se o software SIMCA 13.0.3.0[®] (Umetrics).

3.9. Desreplicação

As substâncias selecionadas na análise multivariada foram desreplicadas utilizando-se os espectros de UV para inferir, quando possível, a classe do metabólito secundário; as massas acuradas dos íons precursores obtidos em alta resolução para calcular as fórmulas moleculares possíveis, considerando-se um erro inferior a 4 ppm; e os dados de fragmentação dos íons obtidos pelas análises por AIF. Através desses dados, foram feitas buscas na literatura e nos bancos de dados SciFinder Scholar[®] ([®]American Chemical Society), *Dictionary of Natural Products*[®] (DNP) ([®]Taylor & Francis Group) e PubChem ([®]National Center for Biotechnology Information), e “Bohlmann Files Database” ([®]Botanic Garden and Botanical Museum Berlin-Dahlem, Freie Universität Berlin), uma biblioteca de dados de substâncias

naturais da família Asteraceae desenvolvida pelo *Botanic Garden and Botanical Museum Berlin-Dahlem, Freie Universität Berlin*.

Para a confirmação das estruturas propostas, de substituintes e padrão de substituição, foram realizadas análises de fragmentação MS² e MS³ em UFLC-UV(DAD)-MSⁿ(Ion Trap) (Item 6.4).

4. Resultados e Discussão

4.1. Obtenção das Impressões Digitais Metabólicas por UHPLC-UV(DAD)-MS (Orbitrap™)

As impressões digitais metabólicas resultantes das análises por UHPLC-UV(DAD)-MS(Orbitrap™) são mostradas nas Figuras de 1 à 26 do Apêndice IV, referentes aos 40 minutos de análise. Em cada Figura, a parte A corresponde à análise no modo negativo e a B à análise no modo positivo, e em todos os cromatogramas por volta de 11,35 minutos é possível verificar o pico cromatográfico referente ao padrão interno hidrocortisona.

Um exemplo é a impressão digital metabólica da espécie *Albertinia brasiliensis* Spreng. (Es_1), obtida por UHPLC-UV(DAD)-MS(Orbitrap™), utilizando-se gradiente de eluição 0 – 2 min, 5% B; 2 – 30 min, 5 - 100% B ; 30 – 34 min, 100% B; 34 – 37 min, 100 - 5% B; 37 – 40 min, 5% B, sendo a fase móvel CH₃CN-HCO₂H (0,1%) (v/v) (B) e H₂O-HCO₂H (0,1%) (v/v) (A) (Item 3.5).

Figura 8. Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico de *Albertinia brasiliensis* (Es_1). **A.** Modo de ionização negativo. **B.** Modo de ionização positivo.

O método utilizado para a aquisição das impressões digitais metabólicas se mostrou capaz de detectar uma grande diversidade de substâncias químicas presentes nos extratos. Através dele, é possível observar a eluição de substâncias em ordem decrescente de polaridade. A primeira fração são as mais polares, como açúcares, seguidos de compostos de polaridade intermediária entre 5 e 20 minutos e de polaridade intermediária a baixa de 20 a 30 minutos (Figura 8).

Dentre 20 e 30 minutos observamos que poucas substâncias foram detectadas, e as que estão presentes estão em baixa concentração. Essa baixa presença de substâncias de baixa polaridade são resultado da partição com hexano realizada na extração. Essa foi realizada para a retirada de pigmentos e substâncias apolares que podem interferir nos ensaios biológicos, como precipitação ou turvação do meio de reação, precipitação de componentes da reação, resultando em faltos positivos ou negativos.

Por ser uma técnica de grande sensibilidade, a utilização da espectrometria de massas através de ESI e analisador do tipo Orbitrap possibilitou a detecção grande quantidade de substâncias em diferentes concentrações, além de detectar substâncias presentes em caso de coeluição, observadas nos espectros de detecção de íons totais.

4.2. Pré-tratamento das Impressões Digitais Metabólicas

Após a obtenção dos arquivos gerados em UHPLC-UV(DAD)-MS(OrbitrapTM), estes foram separados em modo positivo e negativo e, posteriormente, foram alinhados, centralizados e normalizados, submetidos a remoção de ruídos e fixação de linhas de base apropriadas gerando uma planilha em formato *.xml*. A Figura 9 mostra um exemplo de cromatograma após o tratamento, comparado com um não tratado.

Figura 9. Comparação entre os cromatogramas no modo de ionização negativo do extrato hidrometanólico de *Hololepis pedunculata*. antes e após o alinhamento, centralização, normalização, remoção de ruídos e fixação de linhas de base. **A.** Cromatograma antes do tratamento. **B.** Cromatograma após o tratamento.

Para a escolha dos valores a serem utilizados nos parâmetros para o tratamento dos dados, foram analisados em diversos cromatogramas a linha de base, ruído, a largura e altura do pico, o tempo de análise, dentre outros. Os parâmetros que mais influenciaram no número de picos encontrados nas amostras foram o corte na linha de base e o tempo de análise.

Após a análise da linha de base, notou-se que variam entre duas opções (parâmetro chamado *Peak throltd*): 10^5 ou 10^6 . Quando analisado o modo negativo utilizando o valor de 10^5 , foram encontrados 14995 picos, já utilizando o valor de 10^6 foram encontrados 1962 picos. No modo positivo, utilizando o valor de 10^5 foram encontrados 23130 picos, e para o valor de 10^6 foram encontrados 2993 picos. Houve uma grande diferença entre promover o corte da linha de base em 10^5 e 10^6 , sendo provável que muitos desses íons encontrados sejam ruído e não sejam significativos para o trabalho, devido à baixa intensidade desses na amostra. Sendo assim o valor 10^6 foi o escolhido como o mais apropriado para o ponto de corte para a linha de base. Em relação ao tempo de análise, foi escolhido o de 0 a 1500 scans, que corresponde aos 40 minutos totais de análise, para assegurar que nenhuma substância importante seja excluída da análise.

Após o tratamento, a planilha gerada com os dados das impressões digitais de todas as espécies foi utilizada para a reconstrução dos espectros originais através do agrupamento de íons possivelmente derivados da mesma substância, considerando uma janela de tempo de retenção correspondente ao intervalo de

eluição do pico. Através do agrupamento dos íons em metabólitos representativos (centrotipos), há uma diminuição do número de sinais derivados de um mesmo analito, e consequentemente diminuição da redundância nas análises de correlação *in silico* (TIKUNOV, 2012).

A produção dos “centrotipos” pelo algoritmo também aperfeiçoa, por consequência, o tempo gasto para desreplicação, pois resultam em matrizes que mostram os íons (m/z) componentes a cada centrotipo e seus respectivos dados, como tempos de retenção, número de scan e o número do pico correspondente. O tratamento realizado resultou em 339 centrotipos no modo positivo e 242 centrotipos no modo negativo.

4.3. Triagem *in vitro* de inibidores das vias COX-1 e 5-LOX-dependentes

4.3.1. Preparo das amostras

Quatro extratos não solubilizaram por completo em solução tampão, os das espécies *Lychnophora markgravii* (Es_1), *Minasia cipoensis* (Es_2), *Paralychnophora atkinsiae* (Es_3) e *Paralychnophora harleyi* (Es_4). Para auxiliar na solubilização, foi adicionado dimetilsulfóxido (DMSO). As instruções do kit deixam claro que os inibidores, no caso os extratos, podem estar dissolvidos em metanol, DMSO ou etanol, mas que devem ser adicionados no máximo 10 μL à solução mãe. No caso das espécies citadas acima, para a obtenção da solução mãe foram feitas as diluições nas proporções mostradas na Tabela 3. Além disso, foi realizada também uma diluição seriada de DMSO como controle, utilizando a terceira diluição (c) na placa (cDMSO).

Tabela 1. Diluição dos extratos em tampão COX e DMSO para a produção da solução mãe e a primeira diluição (a) de concentração final 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. **ID.** Identificação. **ESH.** Extrato Hidrometanólico seco. **DMSO.** Dimetilssulfóxido.

ID	Solução Mãe			Diluição (a)	
	EHS (mg)	Tampão COX (μL)	DMSO (μL)	Volume retirado da solução mãe (μL)	Tampão COX (μL)
E1	2.08	208	10	42	38
E2	2.43	243	10	41,6	38,4
E3	1.78	243	10	40,4	39,6
E4	2.53	253	10	41,8	38,2

4.3.2. Ensaios da Inibição das vias COX-1 e 5-LOX-dependentes

As reações dos ensaios enzimáticos possuem limitantes, como o tempo de reação, estabilidade da enzima diluída e do ácido araquidônico, sendo estáveis somente por uma hora. Por esse motivo, foi necessária a otimização da reação que ocorre no ensaio de inibição da enzima COX-1 em relação ao tempo e pipetagem, realizada seguindo o esquema mostrado na Figura 6, sendo que cada série de reações era realizada com a diluição seriada de um extrato, composta de 5 diluições.

A reação proporciona a interação do ácido araquidônico com enzima COX-1 formando a Prostaglandina G_2 (PGG_2) e, logo após a sua formação, há a redução da fração endoperoxídeo dessa prostaglandina pela componente peroxidase da enzima, reduzindo ao álcool correspondente chamado Prostaglandina H_2 (PGH_2), precursor de prostaglandinas, tromboxanos e prostaciclina. No caso deste kit, é mensurada a quantidade de Prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) produzida pela redução da PGH_2 ao adicionar cloreto de estanho ($SnCl_2$).

Para avaliar a inibição ou não da enzima pelos componentes do extrato, o prostanoide $PGF_{2\alpha}$ é detectado e quantificado em imunoensaio ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*), baseado na competição entre prostaglandina produzida (PG) e a prostaglandina conjugada à enzima acetilcolinesterase (*Tracer*) pelos anticorpos anti-PG (*Antiserum*) de número limitado, os quais se ligam aos anticorpos monoclonais anti-IgG fixos nas paredes dos poços da placa de 96 poços (Figura 4). Assim, a ligação do *Tracer* aos anticorpos anti-PG é inversamente proporcional à quantidade de prostaglandina produzida.

Figura 10. Imunoensaio enzimático ELISA para a dosagem das prostaglandinas produzidas na etapa de reação do ensaio de inibição da enzima COX-1. **Fonte:** Adaptado de Manual do kit “COX (ovine) inhibitor screening assay kit”, nº de catálogo 560101, da Cayman Chemical.

O ensaio de inibição da enzima 5-LOX foi realizado diretamente na placa de 96 poços, havendo o contato prévio do extrato com a enzima e posterior reação de lipoxigenação. Nessa reação, há a catálise da oxigenação do ácido graxo poliênico (ácido linoléico), produzindo os hidroperóxidos lipídicos correspondentes.

Ao adicionar solução cromógena, a catálise é interrompida e seus componentes reagem com os hidroperóxidos, produzindo uma coloração cuja absorbância é detectada no comprimento de onda 490 nm (Figura 11). Quanto menor a densidade ótica resultante da reação, menor a produção de hidroperóxidos e maior a inibição da 5-LOX pelas substâncias do extrato.

Figura 11. Representação esquemática do ensaio de avaliação da inibição da enzima 5-LOX pelos componentes dos extratos, realizado utilizando os kits de triagem de inibidores da enzima LOX “Lipoxygenase inhibitor screening assay” (nº de catálogo 760700, , Cayman Chemical) e “5-Lipoxygenase (potato) screening enzyme” (nº de catálogo 60401, Cayman Chemical).

Estudos *in vitro* de inibição enzimática são geralmente realizados com substâncias puras, cujos IC_{50} são referentes inteiramente à substância em destaque. Já em um extrato vegetal, há uma grande complexidade química, sendo possíveis que as substâncias passíveis de atividade não sejam as substâncias majoritárias, e sim presentes em pequenas quantidades (FALEIRO, 2014). Com isso, os valores que limitam a classificação entre ativos e não ativos podem ser valores mais altos do que os utilizados para substâncias puras.

Neste estudo, considerou-se como não ativas as espécies que possuem valores de IC_{50} maiores que $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$. As espécies com valores maiores que $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foram consideradas ativas e separadas em três grupos: Ativos, Potentes e Altamente Potentes.

Os ensaios de inibição das enzimas COX-1 e 5-LOX demonstraram que 25 das 26 espécies estudadas possuem capacidade de inibir pelo menos uma das enzimas. Destas, 20 espécies são inibidoras de COX-1, 25 espécies inibidoras de 5-LOX e somente a espécie *Eremanthus goyazensis* (Gardner) Sch.Bip. não demonstrou atividade inibidora (Tabela 6).

Dentre as 26 espécies de Lychnophorinae, 20 apresentaram atividade inibidora simultânea das enzimas COX-1 e 5-LOX. Dentre essas, 11 espécies apresentaram atividade com valores de IC_{50} menores que $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e cinco espécies apresentaram IC_{50} menores que $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Tabela 6). Os extratos com atividade inibidora simultânea com IC_{50} entre 40 e $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foram considerados “Ativos”, os com IC_{50} entre 10 e $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$, “Potentes” e os com IC_{50} entre 0 e $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ “Altamente Potentes”.

Em Faleiro (2014), foram considerados inibidores das enzimas COX-1 e 5-LOX os extratos que demonstraram inibição com valores de IC_{50} menores que $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, que proporciona considerar as substâncias minoritárias presentes nos extratos. Já em Chagas-Paula *et al.* (2015b), foram considerados ativos os que demonstraram inibição com valores menores que $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$, com o intuito de selecionar os extratos com as substâncias de maior potencial inibidor.

Neste estudo, foram utilizados nas análises de correlação *in silico* as espécies com valores de IC_{50} menores que $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$, com o intuito de selecionar os extratos que possuem as substâncias com grande potencial inibidor das vias estudadas, já que possuem alto grau de inibição em baixa concentração.

Os padrões utilizados como controles positivos nos ensaios, indometacina (Ind) e o ácido nordihidroguaiarético (NDGA), resultaram em IC_{50} $0,853 \mu\text{M}$, e IC_{50} $1,0 \mu\text{M}$, respectivamente.

Tabela 2. Valores das concentrações inibitórias de 50% da atividade enzimática (IC_{50}) das enzimas COX-1 e 5-LOX pelos extratos hidrometanólicos de espécies de Lychnophorinae. **ID:** Identificação.

ID	Espécie	Atividade Biológica		
		Inibidores Duplos	COX-1	5-LOX
Es_2	<i>Blanchetia heterotricha</i> DC.	Altamente Potentes (IC_{50} 0-10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0,03	2,13
Es_25	<i>Minasia scapigera</i> H. Rob.		0,10	1,19
Es_24	<i>Lychnophora tomentosa</i> (Mart. ex DC.) Sch. Bip.		0,16	9,03
Es_9	<i>Heterocoma robinsoniana</i> sp. ined.		0,38	4,89
Es_14	<i>Lychnophora sellowii</i> Sch.Bip.		0,39	1,00
Es_17	<i>Minasia cipoensis</i> sp. ined.	Potentes (IC_{50} 10-40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0,18	29,79
Es_28	<i>Chronopappus bifrons</i> (DC. ex Pers.) DC		0,61	19,78
Es_8	<i>Eremanthus mollis</i> Sch.Bip.		11,86	13,45
Es_15	<i>Lychnophora triflora</i> (Mattf.) H. Rob.		30,36	0,75
Es_4	<i>Eremanthus elaeagnus</i> (Mart. ex DC.) Sch.Bip.		33,11	20,77
Es_22	<i>Piptolepis monticola</i> Loeuille esp. nov.		36,64	10,30
Es_10	<i>Hololepis pedunculata</i> (DC. ex Pers.) DC.	Ativos (IC_{50} 40-100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0,51	99,40
Es_1	<i>Albertinia brasiliensis</i> Spreng.		1,51	17,74
Es_11	<i>Lychnophora markgravii</i> G.M. Barroso		1,71	45,47
Es_23	<i>Lychnophora diamantinana</i> Coile & S.B. Jones		40,54	15,67
Es_12	<i>Lychnophora mellosilvae</i> sp. ined.		41,36	7,55
Es_16	<i>Lychnophoriopsis damazioi</i> (P. Beauv.) H. Rob.		42,84	1,39
Es_21	<i>Proteopsis argentea</i> (Mart. & Zucc.) Sch.Bip		80,25	23,71
Es_18	<i>Paralychnophora atkinsiae</i> D.J.N. Hind		80,42	18,69
Es_13	<i>Lychnophora regis</i> H. Rob.		90,22	41,98
Es_5	<i>Eremanthus erythropappus</i> (DC.) MacLeish	Não Ativo ($IC_{50} > 100 \mu\text{g.mL}^{-1}$)	140,80	28,32
Es_19	<i>Paralychnophora harleyi</i> H. Rob.		164,50	4,67
Es_3	<i>Eremanthus crotonoides</i> (DC.) Sch.Bip.		165,10	4,98
Es_6	<i>Eremanthus goyazensis</i> (Gardner) Sch.Bip.		179,80	7,22. 10^{13}
Es_7	<i>Eremanthus leucodendron</i> Mattf.,		193,20	23,31
Es_26	<i>Prestelia eriopus</i> Sch. Bip.		4,95. 10^{10}	7,90
NDGA	Ácido nordihidroguaiarético	Padrões ($IC_{50} \mu\text{M}$)	-	1,00
Ind	Indometacina		0,85	-

4.4. Mineração de Dados: Análise de Correlação *in silico*

A PCA indicou a presença de *outliers*. A espécie *Lychnophora markgravii* (Es_11) mostrou um comportamento diferente que pode caracterizá-la como *outliers forte*, pois está posicionada muito além da região de tolerância (Figura 12). Na presença de Es-11, os valores do coeficiente de correlação múltipla e poder de predição são, respectivamente, $R^2X(\text{acum})$ de 0,592 e Q^2 de -0,454 (Figura 12). Removendo-se o *outlier* da análise, os valores são $R^2X(\text{acum})$ de 0,383 e Q^2 de -0,442 (Figura 13). Mesmo que os valores sejam maiores na presença do *outlier*, ele faz com que haja uma tendência de modificação das posições das outras observações no espaço amostral.

Assim, esse *outlier* foi removido das análises. Após sua remoção, alguns *outliers* moderados e fracos apareceram, mas como estão localizados próximos à região de tolerância, foram mantidos para as próximas etapas (Figura 13).

Além dos *outliers*, o PCA indicou que há uma grande similaridade química entre as espécies de Lychnophorinae estudadas, pois não mostrou nenhuma tendência de agrupamento das observações (espécies) baseada na similaridade química (Figura 12), nem mesmo a formação de grupos similares às classes indicadas nos ensaios de triagem de inibidores das enzimas. A PCA também mostrou que as três espécies do grupo **(B)**, *Lychnophora tomentosa* (Es_24), *Lychnophora sellowii* (Es_14) e *Blanchetia heterotricha* (Es_2), possuem similaridades na composição química do extrato com espécies do grupo **(N)**. (Figura 12), por estarem muito próximos e no mesmo quadrante.

Com isso, observou-se que as substâncias que proporcionam a pequena diferença química entre as espécies estudadas podem ser as responsáveis pela atividade nos ensaios de inibição. Mas por essas substâncias estarem em menor quantidade e menor frequência, não há a tendência de agrupamentos, somente uma leve dispersão entre as espécies no grupo central na PCA.

Figura 12. Gráfico de *Scores Scatter Plot* da análise estatística multivariada não supervisionada por PCA (Análise de Componentes Principais) realizada com os dados provenientes de todas as espécies do estudo (Apêndice I), incluindo os *outliers* Es_11 e Es_9. Além dos *outliers*, as espécies mais externas ao grupo central são Es_4, Es_22 e Es_7. $R^2X(\text{acum})$: 0,592. Q^2 : -0,454. **B.** Altamente Potente. **N.** Pouco e Não Ativo.

Figura 13. Gráfico de *Scores Scatter Plot* da análise estatística multivariada não-supervisionada por PCA (Análise de Componentes Principais) realizada sem o *outlier* Es_11 (*Lychnophora markgravii*). Os *outliers* presentes nessa análise são Es_25 e Es_9. As espécies mais externas ao grupo central são Es_4, Es_22 e Es_7. $R^2X(\text{acum})$: 0,383. Q^2 : -0,442. **B.** Altamente Potente. **N.** Pouco e Não Ativo.

Nas análises supervisionadas por PLS-DA (Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais) e OPLS-DA (Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais Ortogonais), quanto mais próximo de 1,0 for o R^2 (coeficiente de correlação múltipla), melhor será o grau de separação entre classes devido a melhor correlação entre as amostras com a resposta fornecida, a atividade inibitória. Devido à alta complexidade das amostras em estudos metabolômicos, principalmente relacionados com a construção de modelos de predição, valores acima de 0,5 são considerados aceitáveis (ERIKSSON *et al.*, 2008; YULIANA *et al.*, 2011a, GOLBRAIKH e TROPSHA, 2002, BAILEY, *et al.*, 2004).

O Q^2 indica o poder de predição e, assim como anteriormente discutido para R^2 , valores acima de 0,5 são considerados aceitáveis em estudos metabolômicos, sendo que para modelos de predição, pode-se dizer que valores de Q^2 acima de 0,7 não são comuns em estudos metabolômicos (BYLESJÖ *et al.*, 2006.; YULIANA *et al.*, 2011a; TROPSHA e GOLBRAIKH, 2007).

O Gráfico de Scores da PLS-DA mostrou uma boa separação dos grupos **(B)** e **(N)**, mostrada pelo R^2 1,0, mas apresentou valor de Q^2 0,329, abaixo do aceitável. Além disso, as observações, dentro de cada grupo, ficaram dispersas. O Gráfico de Scores da OPLS-DA mostrou uma boa separação dos grupos, mostrada pelo R^2 1,0, e um bom valor de Q^2 . 0,534. Esse valor é satisfatório para estudos metabolômicos, já que a finalidade deste estudo é propor as prováveis substâncias responsáveis pela atividade correlacionando-se a atividade observada com matrizes orgânicas complexas (extratos vegetais).

O PLS maximiza a covariância entre as variáveis explicativas (x) e a variável resposta (y) e forma vetores de pontuação (*score vectors*) e vetores de carga (*loading vectors*) (LILAND *et al.*, 2011; TRIVEDI; ILES, 2012). Já o PLS-DA, a maximização é realizada com a finalidade de estimar a matriz de covariância entre as classes. O OPLS-DA, além de ser um método introduzido como uma melhoria do método PLS-DA, é utilizado para discriminar duas ou mais classes com o objetivo de determinar como as variáveis afetam a separação entre as classes (WESTERHUIS *et al.*, 2010).

Neste estudo, a análise estatística que proporcionou a melhor correlação entre os dados estudados, foi o OPLS-DA. Esse tipo de análise permitiu discriminar as duas classes relacionadas à inibição enzimática (**(B)** e **(N)**) e identificar as substâncias discriminantes do grupo relacionado à atividade inibidora dupla.

Além disso, devido à adição das componentes ortogonais há um aumento nas correlações entre variáveis, proporcionando maior peso às substâncias minoritárias na análise, e em como as respectivas frequências e a quantidades influenciam na separação. Sendo assim, o OPLS-DA foi o escolhido para a predição das substâncias discriminantes para a atividade inibitória dupla.

Figura 14. Gráfico de *Scores Scatter Plot* da análise estatística multivariada supervisionada por PLS-DA (Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais). $R^2X(\text{acumulativo})$: 0,472. $R^2Y(\text{acumulativo})$: 1,000. Q^2 : 0,329. **B.** Altamente Potente. **N.** Pouco e Não Ativo.

Figura 15. Gráfico de *Scores Scatter Plot* da análise estatística multivariada supervisionada por OPLS-DA (Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais Ortogonais). $R^2X(\text{acumulativo})$: 0,514. $R^2Y(\text{acumulativo})$: 1,000. Q^2 : 0,534. **B.** Altamente Potente. **N.** Pouco e Não Ativo.

Figura 16. Gráfico de *Loadings Scatter Plot* da análise estatística multivariada supervisionada por OPLS-DA (Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais Ortogonais). **Substâncias:** 1. 75NEG. 2. 124POS. 3. 257POS. 4. 167POS. 5. 244POS. **$R^2X(\text{acum})$: 0,514. $R^2Y(\text{acum})$: 1,000. Q^2 : 0,534.**

Através da análise conjunta entre os gráficos de *Scores* e *Loadings* das análises por OPLS-DA, foi possível identificar as substâncias que estão mais correlacionadas com a atividade inibitória. Sobrepondo os quadrantes dos dois gráficos, as variáveis no Gráfico de *Loadings* que estão mais próximos ao respectivo agrupamento no Gráfico de *Scores* estão relacionadas com a propriedade que compõe o agrupamento (ZHENG *et al.*, 2009; BAILEY *et al.*, 2004; LIN *et al.*, 2007; T'KINDT *et al.*, 2009).

Comparando-se as Figuras 15 e 16, observou-se que cinco variáveis estão presentes na mesma região do Gráfico de *Loadings* onde se localiza o agrupamento B no Gráfico de *Scores*. Devido a essa sobreposição, e por essas variáveis serem as que estão mais espacialmente distantes das outras, essas foram indicadas como uma das possíveis variáveis que possuem a atividade inibitória e, portanto, selecionados para identificação.

Cada variável representa um centrotipo, agrupamento formado no pré-tratamento dos dados pelo software *MSClust*. Os cinco centrotipos indicados acima foram avaliados quanto aos íons que os formam, e cada um é referente a somente uma substância detectada no respectivo modo de ionização.

Os códigos de identificação das substâncias são formados pelo número do centrotipo em que se encontra e pelo modo de ionização o qual pertence. Como exemplo, a substância 75NEG está contida no centrotipo de número 75 extraído da matriz do modo de ionização negativo. Portanto, as substâncias indicadas nas análises foram: 75NEG, 124POS, 257POS, 167POS e 244POS.

A partir da análise de OPLS, obteve-se o gráfico VIP (Importância das Variáveis para a Projeção), no qual são identificadas as variáveis que possuem maior importância para a projeção dos grupos. O VIP é usado na determinação das variáveis capazes de diferenciar as classes nas análises multivariadas, uma vez que quanto maior o VIP, mais significativa é a variável na comparação entre duas ou mais classes (TRIVEDI e ILES, 2012).

Observando-se o gráfico VIP, as cinco substâncias indicadas como responsáveis pela atividade inibitória dupla (Figura 16) possuem os maiores valores de VIP, além de serem maiores que um ($VIP > 1$), o que indica relevância na discriminação dos grupos no OPLS-DA. A Tabela 3 mostra em quais espécies essas substâncias estão presentes.

Figura 17. Gráficos de VIP (Importância das Variáveis para a Projeção), o qual mostra que as cinco substâncias selecionadas são as mais importantes para a projeção dos grupos indicados no gráfico de *Scores* no *Scatter Plot*, e essas são 244POS, 167POS, 75NEG, 124POS e 257POS. **A.** Gráfico completo de VIP. **B.** Expansão do gráfico com ênfase nos maiores valores de VIP.

É de grande importância frisar que as análises do gráfico VIP e da sobreposição entre *Scores* e *Loadings* são análises diferentes e devem ser feitas separadamente. A primeira análise mostra quais são as variáveis que possuem maior importância estatística para a projeção dos dois grupos, e a segunda indica qual é a variável que está mais correlacionada com a propriedade do grupo em que se sobrepõe espacialmente no gráfico.

As variáveis que estão correlacionadas com o grupo **(B)** devem ter $VIP > 1$, pois é necessário ter relevância na discriminação dos grupos, mas não é uma condição que essas sejam as de maiores valores de VIP. Um exemplo são as substâncias 1POS e 19NEG (Figura 18) que se sobrepõe ao grupo **(N)**, mas estão em 7º e 14º posições, respectivamente, entre os maiores valores de VIP (Figura 42).

Figura 18. **A.** Gráfico de *Loadings Scatter Plot* do OPLS-DA. **B.** Gráfico de VIP. Em azul, as variáveis 244POS, 167POS, 75NEG, 124POS e 257POS relacionadas à propriedade dos grupos “Altamente Potente”. Em vermelho, as variáveis 19NEG e 1POS relacionadas ao grupo “Pouco e Não Ativa”.

A partir das tabelas geradas pelo MSClust, foi possível identificar as espécies que possuem as substâncias indicadas nas análises de correlação *in silico* (Tabela 3). Dentre as cinco substâncias apontadas pelas análises de correlação *in silico*, quatro estão presentes em espécies do grupo “Altamente Potentes”, demonstrando a relação das substâncias com o potencial de inibição das enzimas (Tabela 7).

Tabela 3. Presença das substâncias indicadas nas análises de correlação *in silico* nas espécies estudadas e os respectivos valores IC₅₀. **ID.** Identificação.

ID	Espécie	Atividade Biológica			ID Substâncias
		Classificação	COX	LOX	
Es_24	<i>Lychnophora tomentosa</i> (Mart. ex DC.) Sch. Bip.	<i>Altamente Potente</i> (IC ₅₀ 0-10 µg.mL ⁻¹)	0,16	9,03	75NEG, 124POS, 257POS
Es_9	<i>Heterocoma robinsoniana</i> sp. ined.		0,38	4,89	167POS
Es_14	<i>Lychnophora sellowii</i> Sch.Bip.		0,39	1,00	257POS
Es_25	<i>Minasia scapigera</i> H. Rob.		0,10	1,19	244POS
Es_17	<i>Minasia cipoensis</i> sp. ined.	<i>Potente</i> (IC ₅₀ 10-40 µg.mL ⁻¹)	0,18	29,79	167POS
Es_15	<i>Lychnophora triflora</i> (Mattf.) H. Rob.		30,36	0,75	244POS
Es_4	<i>Eremanthus elaeagnus</i> (Mart. ex DC.) Sch.Bip.		33,11	20,77	244POS
Es_10	<i>Hololepis pedunculata</i> (DC. ex Pers.) DC.	<i>Ativo</i> (IC ₅₀ 40-100 µg.mL ⁻¹)	0,51	99,40	244POS
Es_18	<i>Paralychnophora atkinsiae</i> D.J.N. Hind		80,42	18,69	244POS
Es_3	<i>Eremanthus crotonoides</i> (DC.) Sch.Bip.	<i>Não Ativo</i> (IC ₅₀ > 100 µg.mL ⁻¹)	165,10	4,98	244POS

A relação entre as substâncias indicadas pelo modelo e a ação inibitória da enzima pode ser influenciada pela presença ou ausência das substâncias indicadas como ativas, pela concentração dessas nos extratos e a possível existência de outras substâncias ativas que causam um efeito inibitório adicional.

A presença de pelo menos uma das substâncias ativas nas espécies pode resultar em um valor de IC₅₀ considerado como ativo para este estudo, ou muito próximo a ele. Esses valores podem mudar de acordo com a concentração da substância no extrato, aumentando a inibição conforme maior concentração, podendo variar entre espécies. E a ação inibitória pode ser mais intensa em uma enzima do que na outra de acordo com a afinidade da substância por determinada enzima, mesmo havendo inibição dupla. Além disso, a presença de substâncias ativas que inibem somente uma enzima pode causar um efeito adicional, havendo um efeito somatório nos valores de IC₅₀.

A substância 167POS está presente nas espécies *Heterocoma robinsoniana* sp. ined , do grupo “Altamente Potentes”, e *Minasia cipoensis* sp. Ined., do grupo “Pontentes”. Um possibilidade é que as duas espécies podem estar classificadas

em diferentes grupos devido quantidade de substância presente nos extratos, que pode ser relacionada com a área relativa do pico cromatográfico.

Além disso, os valores de IC_{50} para a COX-1 são menores do que para a 5-LOX, nas duas espécies. Esses valores podem indicar uma maior afinidade pela COX-1 do que pela 5-LOX, dentro da inibição dupla.

A substância 257POS está presente nas espécies *Lychnophora sellowii* e *Lychnophora tomentosa*, ambas do grupo “Altamente Potentes”, sendo que a diferença entre elas é que presença das substâncias 75NEG e 124POS na *Lychnophora tomentosa*.

A presença concomitante das substâncias 75NEG e 124POS influenciam na inibição da enzima COX-1, havendo uma diminuição dos valores de IC_{50} para a COX-1 na espécie *L. tomentosa*. O mesmo não é observado para a enzima 5-LOX, podendo indicar que essas substâncias possuam pouca influência sobre essa enzima. Como houve uma maior inibição da enzima COX-1, é possível que as substâncias 75NEG, 124POS e 257POS, mesmo atuando nas duas enzimas, possuam uma ação mais acentuada para COX-1.

A substância 244POS é a única substância que está presente em todos os grupos, incluindo o grupo “Não Ativo”. Dentro desse grupo, 244POS está presente na espécie *Eremanthus crotonoides*, a qual possui baixo valor de IC_{50} para a 5-LOX, mas não é inibidor da enzima COX-1. Através disso, é possível que essa substância não seja inibidor duplo ou tenha uma afinidade muito baixa pela enzima COX-1..

Esse grande potencial de inibição da enzima 5-LOX é observado na maioria das espécies que possuem essa substância, pois apresentam valores de IC_{50} menores para 5-LOX do que COX-1. Há também a possibilidade dessa substância estar pouco presente no extrato, havendo pouca inibição da enzima COX-1.

4.5. Desreplicação

A identificação das substâncias 244POS, 167POS, 75NEG, 124POS e 257POS foram realizadas utilizando-se técnicas de desreplicação, estudando-se os dados dos espectros de UV, as fórmulas moleculares calculadas, dados de fragmentação dos íons obtidos por AIF e informações disponíveis nas bases de dados. Os dados espectrométricos e espectroscópicos obtidos a partir das análises de LC-UV-MS de cada substância são mostrados na Tabela 4.

Além dos dados de UV e MS obtidos a partir das análises por UHPLC-UV(DAD)-MS(Orbitrap), também foram realizadas análises de fragmentação MS² e MS³ em UFLC-UV(DAD)-MSⁿ (Ion Trap) visando confirmar os perfis de fragmentação com a literatura e com padrões. Os dados gerados para cada substância estão na Tabela 5.

As substâncias foram identificadas como: uma lactona sesquiterpênica 4,5-diidro-15-desoxigoyazensolido (244POS), dois flavonóides 3-O-(acetil-hexosídeo)-quercetina (75NEG e 124POS) e 7-O-(cumaroil-hexosídeo)-apigenina (167POS), e um sesquiterpeno hidroxinerolidol (257POS).

Tabela 4. Dados espectroscópicos e espectrométricos obtidos por UHPLC-UV(DAD)-MS e UHPLC-UV(DAD)-AIF das cinco substâncias apontadas nas análises de correlação *in silico* como possíveis responsáveis pela atividade anti-inflamatória.

IDc	TR (min)	* Massa Monoisotópica	Modo de Ionização Positivo		Modo de Ionização Negativo		UV max (nm)	Fórmula Molecular	SUBSTÂNCIA
			Íons Precusores (m/z)	AIF (m/z)	Íons Precusores (m/z)	AIF (m/z)			
75NEG	8,996495	506,10712	[M+H] ⁺ 507,11416 [M+Na] ⁺ 529	507→303pb, 273, 257	[M-H] ⁻ 505,09930	505→300pb, 301, 271, 255	255, 268sh, 308sh 351	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₃	3-O-(acetil-hexosídeo)- quercetina
124POS	9,009169	506,10634	[M+H] ⁺ 507,11416 [M+Na] ⁺ 529	507→303pb, 273, 257	[M-H] ⁻ 505,09930	505→300pb, 301, 271, 255	255, 268sh, 308sh 351	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₃	
167POS	11,700327	578,14250	[M+H] ⁺ 579,15033	579→271pb	[M-H] ⁻ 577,13440	577→269 pb	239, 269, 319	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	7-O-(cumaroil- hexosídeo)-apigenina
244POS	15,133834	346,14448	[M+H] ⁺ 347,14862 [M+H ₂ O] ⁺ 364	347→261, 243, 215, 187, 159	(-)	(-)	267	C ₁₉ H ₂₂ O ₆	4,5-diidro-15- desoxigoyazensolido
257POS	15,541909	238,19267	[M+H] ⁺ 239,20050 [M+Na] ⁺ 361,1821	239→261pb, 221, 207, 182, 177, 161	[M-H] ⁻ 235,92560	(=)	246	C ₁₅ H ₂₆ O ₂	hidroxinerolidol

IDc. Código da substância.

***Corresponde** à massa do íon acrescida ou subtraída, dependendo do modo de ionização, da massa do Hidrogênio (1.0078246 u).

pb. Pico base.

sh. Ombro.

(-). Não encontrado.

(=). Não encontrado por motivos de coeluição.

Tabela 5. Dados espectroscópicos e espectrométricos obtidos por UFLC-UV(DAD)-ESI-MS²- MS³ (*Ion Trap* - AmazonSL, Bruker) para a confirmação das estruturas identificadas na desreplicação.

IDc	Modo de Ionização Positivo		Modo de Ionização Negativo		UV max (nm)	Fórmula Molecular	SUBSTÂNCIA
	Íons Precusores (m/z)	CID MS ² MS ³	Íons Precusores (m/z)	CID MS ² MS ³			
75NEG 124POS	n.a.	n.a.	[M-H] ⁻ 505,10	505→463, 445, 343, 301pb, 300, 271, 255, 229, 193, 179, 151, 125, 107	255, 268sh, 308sh, 351	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₃	3-O-(acetil-hexosídeo)-quercetina
167POS	[M+H] ⁺ 579,10	579→433, 367, 309, 291, 271pb, 253, 247, 229,225, 203, 185, 177, 171, 163, 153, 145	n.a.	n.a.	239, 269, 294sh, 317, 356sh	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	7-O-(cumaroil-hexosídeo)-apigenina
244POS	[M+H] ⁺ 347,10	347→301, 261pb, 279, 261, 243, 233, 225, 215, 187, 173, 159, 137, 113, 97	n.a.	n.a.	267	C ₁₉ H ₂₂ O ₆	4,5-diidro-15-desoxigoyazensolido
257POS	[M+H] ⁺ 239,00	239→221pb, 203, 175, 163,149, 135, 121, 111,93, 81, 70	n.a.	n.a.	246	C ₁₅ H ₂₆ O ₂	hidroxinerolidol

IDc. Código da substância.

***C**orresponde à massa do íon acrescida ou subtraída, dependendo do modo de ionização, da massa do Hidrogênio (1,0078246 u).

pb. Pico base.

sh. Ombro.

n.a. Análise não foi realizada para este modo.

4.5.1. Substâncias 75NEG e 124POS

Através da análise dos espectros referentes às substâncias 75NEG e 124POS, nota-se que esses se referem à mesma substância, respectivamente nos modos positivo e negativo, pois possuem tempos de retenção similares e diferença de relação massa-carga (m/z) de aproximadamente 2 u.m. (Figura 23 e 24).

Os cálculos das fórmulas moleculares foram realizados utilizando as massas 505.09930 e 507.11416, considerando-se uma margem de erro de 4 ppm e zero ou um números de nitrogênio. As fórmulas calculadas possuíam dois hidrogênios de diferença entre si, resultando na fórmula molecular $C_{23}H_{22}O_{13}$.

O espectro no ultravioleta deste pico apresentou uma absorção semelhante ao esperado para flavonóis, com absorções máximas em 255 nm e 351 nm e presença de dois ombros em 268 nm e 308 nm (Figura 19). A presença do ombro por volta de 308nm indica a presença de um catecol, na qual o anel B da flavona possui duas hidroxilas nas posições C3' e C4 (MARKHAM, 1982).

Figura 19. Espectro de absorção no ultravioleta dos picos 75NEG e 124POS referentes à análise no extrato de *Lychnophora tomentosa*.

Um exemplo que demonstra a presença desse ombro relacionado ao grupo catecol é a comparação entre a lucenina e vicenina-2. A diferença entre essas substâncias é que a lucenina possui uma hidroxila a mais do que a vicenina-2, no carbono 3', havendo, portanto, um sistema catecólico e, conseqüentemente, um ombro em 290 nm (Figura 20) (Gobbo-Neto, 2007).

Figura 20. Comparação entre a vicenina-2 e lucenina-2. A hidroxila na posição C3' do anel B as diferencia, refletindo no espectro de absorção no ultravioleta através do ombro em 290 nm. **Fonte.** Adaptada de Gobbo-Neto (2007).

No perfil de fragmentação realizado por AIF, os íons fragmentos m/z 303 $[(M+H)^+ - 204]^+$ e m/z 301 $[(M-H)^- - 204]^-$ são referentes à aglicona, gerados após perda de 204 u. Essa perda pode estar relacionada a um glicosídeo acetilado, devido à presença do íon m/z 463 no modo negativo e m/z 465 no modo positivo, formado pela perda de 42 u. (grupo acetil) e perda subsequente de 162 u. (grupo hexosídeo), para a formação da aglicona (Figura 25).

A busca em bases de dados foi realizada utilizando a fórmula molecular calculada e o esqueleto fundamental de um flavonol, sem grupos substituintes. Dentre os isômeros encontrados, um possui estrutura compatível com o perfil de fragmentação observado: a substância 3-O-(6-O-acetil-β-D-glicopiranosídeo)-quercetina (Figura 21).

Figura 21. Estrutura química da substância 3-O-(6-O-acetil-β-D-glicopiranosídeo)-quercetina.

Na análise de fragmentação por MS², no modo negativo, foi evidenciada a perda de 42 u. a partir do íon m/z 505, resultando no íon m/z 463 [(M-H)⁻ - 42]⁺ referente à quercetina-3-hexosídeo. A partir desse, houve a perda de 162 u., referentes à aglicona quercetina m/z 301 [(M-H)⁻ - 204]⁻ (Figura 26A). A Figura 22 mostra uma proposta de mecanismo da fragmentação realizada em MS².

Figura 22. Proposta de fragmentação por *eletrospray* de 3-O-(6-O-acetil-β-D-glicopiranosídeo)-quercetina no modo positivo.

Na fragmentação por MS³ do íon m/z 301 [(M-H)⁻ - 204]⁻, referente à aglicona, foram produzidos os íons fragmento m/z 229, m/z 193, m/z 179, m/z 151, m/z 107 (Apêndice 2), todos condizentes com a fragmentação da aglicona quercetina (TOURIÑO et al, 2008; FABRE et al., 2001).

A quercetina possui um espectro de absorção no UV que apresenta os picos máximos em 253 nm e 368 nm, além da presença de dois ombros em 268 nm e 297 nm (SAKAKIBARA et al. 2003). Comparando o espectro da quercetina e o espectro da substância (Figura 19), há um deslocamento da banda I, relacionada aos anéis C

e B do flavonol, possivelmente devido à presença do substituinte acetil-hexosil ligado a um desses anéis. Como a glicosilação de flavonóis ocorre mais frequentemente nos carbonos 7 (anel A) e 3 (anel C) (CUYCKENS E CLAEYS, 2004), e devido ao deslocamento da banda I, substituinte no anel C, ligado ao carbono 3.

Para que se tenha certeza da posição do grupo acetato em relação às hidroxilas presentes na hexose, para identificar de qual hexose se trata e para provar o padrão de substituição da aglicona, serão realizadas análises por Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Com isso, somente possível afirmar que a substância referente à 75NEG e 124POS é uma 3-O-(acetil-hexosídeo)-quercetina.

Figura 23. Perfil metabólico do extrato hidrometanólico *Lychnophora tomentosa* (Mart. ex DC.) Sch. Bip., nos modos positivo (A) e negativo (B). A seta indica o pico cromatográfico referente a 124POS e 75NEG.

Figura 24. Análise dos espectros de massas TIC (*Total Ion Current*) do extrato de *Lychnophora tomentosa* (Mart. ex DC.) Sch. Bip., no modo negativo (A), evidenciando o pico 75NEG ([M-H]⁻ 505,09930), e no modo positivo (B), representando o pico 124POS ([M+H]⁺ 507,11416). T.R. Tempo de Retenção.

Figura 25. Espectro de massas com fragmentação por AIF do extrato de *Lychnophora tomentosa*, no modo negativo (A), evidenciando a fragmentação do pico 75NEG ($[M-H]^-$ 505,09930), e no modo positivo (B), mostrando a fragmentação do pico 124POS ($[M+H]^+$ 507,11416). **Pb.** Pico base.

Figura 26. Espectro de íon produto MS² do íon m/z 505 (**A**) e MS³ da aglicona m/z 301 (**B**) por UFLC-UV(DAD)-ESI-MS² tipo *Ion Trap* no modo de ionização negativo. **Setas.** Fragmentos-chave para a identificação da quercetina de acordo com o padrão de fragmentação relatado em TOURINHO et al. (2008) e FABRE et al. (2001).

4.5.2. Substância 167POS

O espectro de ultravioleta da 167POS apresentou absorções semelhantes ao esperado para flavonas, com máximas em 269 nm e 317 nm, além de ombros em 294 nm e 356 nm. Ressalta-se que a banda em 239 nm é referente à absorção do solvente (Figura 50). O cálculo da fórmula molecular foi realizado utilizando a massa 578,14250, considerando-se uma margem de erro de 4 ppm e de zero a um nitrogênio na fórmula, resultando na fórmula $C_{30}H_{26}O_{12}$.

Figura 27. Espectro de absorção no UV do pico 167POS referente a análise no extrato de *Heterocoma robinsoniana* sp. Ined..

No perfil de fragmentação realizado por AIF, os fragmentos m/z 271 $[(M+H) - 308]^+$ e m/z 269 $[(M-H) - 308]^-$ são referentes à aglicona, com perda de 308u.. Essa perda de 308 pode relacionada à uma unidade cumaroilglicose ou uma rutinose, devido a perda de 146 u., formando o íon m/z 433 $[(M+H) - 146]^+$ e m/z 431 $[(M-H) - 146]^-$, e posterior perda de 162u. formando a aglicona. (Figura 30 e 31).

Utilizando a massa acurada desses íons, 309,09641 e 307,08228, calculou-se a fórmula molecular referente a perda de 308 u, resultando em $C_{15}H_{17}O_7$, a fórmula molecular da cumaroilglicose. A rutinose possui fórmula molecular $C_{12}H_{21}O_9$, que resulta na massa monoisotópica 309,118516 no modo positivo.

A busca na base de dados foi realizada utilizando a fórmula molecular calculada e o esqueleto de flavona, sem as hidroxilas substituintes. Dentre os isômeros encontrados, vários possuem estrutura compatível com o perfil de fragmentação da aglicona com o grupo cumaroilglicose, e dentre esses há vários isômeros de posição desse grupo na aglicona.

Na fragmentação por MS² do íon m/z 579, no modo positivo, foi possível observar o perfil de fragmentação descrito anteriormente. E através da fragmentação por MS³ do íon m/z 433, foi possível identificar a formação da apigenina a partir desse fragmento (Figura 33).

Na fragmentação por MS³ dos íons m/z 271 [(M-H)⁺ - 308]⁺, foram observados os íons fragmento m/z 253, m/z 225, m/z 163, m/z 153, m/z 121, m/z 119, m/z 109 (Figura 34), compatíveis com a fragmentação da apigenina (TSIMOGIANNIS *et al.*, 2007; WOLFENDER *et al.*, 2000).

Para que haja a formação da apigenina após a perda de 308 u., é necessário que a cumaroilglicose esteja fazendo a ligação glicosídica com alguma das hidroxilas da apigenina, nas posições C7, C5 e C4'. Além disso, nas flavonas a O-glicosilação ocorre geralmente no carbono 7 ou 3, diferente da C-glicosilação que ocorre no carbono 6 ou 8, e a fragmentação de C-glicosídeos é completamente diferente de O-glicosídeos devido a quebra das ligações C-C, e a perda das unidades do açúcar não é vista por não serem ligações C-O. (CUYCKENS E CLAEYS, 2004). Com isso, a substância referente ao pico 167POS é a 7-O-(cumaroil-glicopiranosídeo)-apigenina.

Buscando na base de dados, há quatro isômeros que são indicados: a 7-O-(6"-O-E-*p*-cumaroil-β-glicosil)-apigenina e seus isômeros 2", 4"E e 4"Z. Para elucidar posição da ligação do cumaroil na glicose e para certificar de qual hexose se trata, serão necessárias análises em Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Com isso, é somente possível afirmar que a substância referente ao 167POS é a 7-O-(cumaroil-hexosídeo)-apigenina. A figura 29 mostra uma proposta de fragmentação dessa substâncias, a qual é compatível com a fragmentação por MS².

Figura 28. Estrutura química da substância 7-O-(6"-O-E-*p*-cumaroil)-β-glicosilapigenina.

Figura 29. Proposta de fragmentação por *eletrospray* (ESI) de 7-O-(cumaroyl-hexosídeo)-apigenina no modo positivo, demonstrando primeiramente a perda neutra de 146 u.a. formando o íon m/z 433 $[(M+H) - 146]^+$, e posterior perda de 162u.a. formando a aglicona de m/z 271.

Figura 30. Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico *Heterocoma robinsoniana* sp. ined., nos modos positivo (A) e negativo (B). A seta indica o pico cromatográfico referente à 167POS, de baixa intensidade e tempo de retenção aproximadamente 11.68 minutos.

Figura 31. Análise dos espectros de massas TIC (Total Ion Current) do extrato de *Heterocoma robinsoniana* sp. ined., no modo positivo (A) e modo negativo (B), apresentando os íons $[M+H]^+$ 579.15033 e $[M-H]^-$ 577.13440, ambos referentes ao pico 167POS.

Figura 32. Perfil de fragmentação do íon m/z 579,15 (167POS) adquirido através da fragmentação por AIF do extrato de *Heterocoma robinsoniana* sp. Ined., demonstrando as perdas referentes a fração cumaroil (146) e a fração da glicose (162). **A.** Modo de ionização positivo. **B.** Modo de ionização negativo. **Pb.** Pico base.

Figura 33. Espectro de íons produzidos por AIF do íon m/z 579,15 (167POS) do extrato de *Heterocoma robinsoniana* sp. Ined., demonstrando com as setas os íons referentes à cumaroilglicose, de m/z 309 no modo positivo (A) e m/z 307 no modo negativo (B), e da fração referente à glicose, de m/z 165 no modo positivo (A) e m/z 163 no modo negativo (B), advinda da fragmentação do cumaroilglicose. **Pb.** Pico base.

Figura 34. **A.** Espectro de íon produto MS² do íon m/z 579 demonstrando o íon referente à cumaroilglicose em m/z 309 e a as perdas referentes a fração cumaroil (146) e a fração da glicose (162) no modo positivo (seta). **B.** Espectro de íon produto por MS³ do íon m/z 433 para confirmação da formação do pico base m/z 271 pelo íon m/z 433 e da formação do íon m/z 309 a partir de m/z 579, e não de m/z 433. **Pb.** Pico base.

Figura 35. Espectro de íon produto MS³ da aglicona apigenina m/z 271 no modo positivo. **Setas integras.** Íons referentes a fragmentação com saída de moléculas neutras, como H₂O e CO. **Setas tracejadas.** Íons referentes a fragmentação dos anéis A, C e B da aglicona (TSIMOGIANNIS *et al.*, 2007; WOLFENDER *et al.*, 2000).

4.5.3. Substância 244POS

A 244POS possui uma absorção máxima em 266 nm na região do ultravioleta. As lactonas sesquiterpênicas dos subtipos goyazensolido e eremantolido (tipo furanoelangelido) apresentam uma banda de absorção máxima única entre 260 e 270 nm (GOBBO-NETO, 2007), o qual corresponde à absorção encontrada para este pico (Figura 35).

Figura 36. Espectro de absorção no ultravioleta do pico cromatográfico 244POS presente em *Eremanthus elaeagnus* (Mart. ex DC.) Sch.Bip., obtido através da análise por UFLC-UV(DAD)-ESI-MS² tipo *Ion Trap* (AmazonSL, Bruker).

No modo positivo, esse pico corresponde ao íon de m/z $[M+H]^+$ 347,14862 (Figura 36 e 37). A fórmula molecular foi calculada utilizando a massa 346,14448, considerando-se erro menor que 4 ppm e de zero a um nitrogênios na fórmula, resultando em $C_{19}H_{22}O_6$. A fórmula molecular, o perfil de fragmentação em AIF e o espectro de absorção no ultravioleta constroem um perfil idêntico ao relatado para a substância 4,5-diidro-15-desoxigoyazensolido, identificada no extrato de *Lychnophora ericoides* Mart. por Gobbo-Neto (2007). Além disso, foi feita uma busca nas bases de dados utilizando a fórmula molecular e uma subestrutura (todo o esqueleto) de lactonas sesquiterpênicas e, dentre as substâncias encontradas, a única que possuía um substituinte que poderia resultar em uma fragmentação que produzisse o íon m/z 261 ($[M+H]^+ - 86$) era essa substância.

O perfil de fragmentação em MS² foi produzido selecionando-se o íon m/z 347,10, e a partir desse foi realizada a comparação com o perfil de fragmentação do padrão 4,5-dihidro-15-desoxigoyazensolido, confirmando a identificação (Figura 38).

Essa substância foi previamente identificada em algumas espécies de Astearaceae, como *Minasia alpestris* (CROTTI *et al.*, 2005), *Viguiera greggii* (Gray) Blake (LIU, Y-L *et al.*, 1984; DELGADO *et al.*, 1986), *Viguiera latihactuta* (Hemsl.) Blake (DELGADO *et al.*, 1968), *Eremanthus seidelii*, *Eremanthus goyazensis*, *Vanillosmopsis erythropappa* (VICHNEWSKI *et al.*, 1989), *Calea zacatechichi* (HERZ e KUMAR, 1980), e *Lychnophora ericoides* Mart. (GOBBO-NETO e LOPES, 2008), mas dados sobre sua atividade biológica não constam na literatura.

Figura 37. Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico *Lychnophora triflora* (Mattf.) H. Rob. no modo positivo. A seta indica o pico cromatográfico referente à 244POS, de média intensidade e tempo de retenção aproximadamente 15,48 minutos.

Figura 38. Espectro de massas de íons totais (TIC) da espécie *Eremanthus elaeagnus* (Mart. ex DC.) Sch.Bip., referente ao tempo de retenção aproximado de 15,48 minutos, demonstrando a presença do 244POS de massa $[M+H]^+$ 347,14862.

Figura 39. Comparação entre o perfil de fragmentação do íon m/z 347,10 (244POS) presente no extrato de *Eremanthus elaeagnus* (Mart. ex DC.) Sch.Bip. (A) e a fragmentação do padrão 4,5-diidro-15-desoxigoyazensolido (B), demonstrando a semelhança nos perfis de fragmentação. Pb. Pico base.

4.5.4. Substâncias 257POS

A 257POS possui uma absorção máxima no espectro de absorção no UV em 246 nm (Figura 39) e tempo de retenção de 15,54 minutos. No modo positivo, corresponde ao íon de m/z $[M+H]^+$ 239,2005. O cálculo da fórmula molecular foi realizado utilizando a massa 238,19267, considerando-se uma margem de erro de 4 ppm e de zero a um nitrogênios na fórmula. A fórmula gerada foi $C_{15}H_{26}O_2$.

Figura 40. Espectro de absorção no ultravioleta da substância 257POS presente em *Lychnophora sellowii* Sch.Bip., obtido através da análise por UFLC-UV(DAD)-ESI-MS² tipo *Ion Trap*.

As duas primeiras perdas de massa na fragmentação do íon m/z 239 (Figuras 43 e 44) são de 18 u., correspondendo a duas perdas consecutivas de moléculas de água formando os íons m/z 221 e m/z 203. Na sequência, notam-se perdas de carbonos e hidrogênios consecutivas.

Em uma busca na base de dados *Scifinder*, utilizando-se a fórmula molecular e o parâmetro “Ocorrência”, 462 substâncias resultaram. Já no *Dictionary of Natural Products* (DNP), uma busca utilizando-se somente a fórmula molecular resultou em 642 substâncias possíveis; e adicionando à busca o parâmetro “Compositae” (Asteraceae), foram encontradas 94 substâncias possíveis. Além disso, não foi encontrada na literatura sobre a espécie *Lychnophora sellowii* (Figura 42) a presença de uma substância de mesma massa.

Utilizando o banco de dados “Bohlmann Files Database”, foi feita uma busca na tribo *Vernonieae* e foram encontrados dois sesquiterpenos: 9-hidroxinerolidol e 11-hidroxinerolidol. Devido a perda neutra de duas moléculas de água (Figura 44),

pela possível presença em extratos polares, e pela absorção no espectro de ultravioleta ser compatível, é provável que a substância que buscamos seja uma das mostradas na Figura 40. Devido à possibilidade de isômeros, é necessária a realização de isolamento e identificação por RMN para confirmação da estrutura da substância.

9-hidroxinerolidol

11-hidroxinerolidol

Figura 41. Estrutura química das substâncias 9-hidroxinerolidol e 11-hidroxinerolidol.

Figura 42. Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico *Lychnophora sellowii* Sch. Bip. no modo positivo. A seta indica 257POS, de baixa intensidade e tempo de retenção aproximadamente 15,16 minutos.

Figura 43. A. Espectro de MS, indicando o íon molecular ($[M+H]^+$) e o íon sodiado ($[M+H]^+ + Na$). **B.** Espectro de AIF com a presença do íon sodiado e do pico base m/z 221,19. As setas íntegras indicam os possíveis fragmentos formados, confirmados por MS². **Pb.** Pico base.

Figura 44. Análise do extrato hidrometanólico *Lychnophora sellowii* Sch. Bip. no modo positivo, obtido através da análise por UFLC-UV(DAD)-ESI tipo *Ion Trap* (AmazonSL, Bruker). **A.** Análise por MS² do íon de m/z 239,00, mostrando sua fragmentação. **B.** Análise por MS³ do íon fragmento de m/z 221,20, advindo do íon de m/z 239,00, confirmando a fragmentação em A. **Pb.** Pico base.

4.6. Atividade biológica de extratos e metabólitos isolados de Lychnophorinae (Asteraceae) relacionadas às vias COX e LOX-dependentes

Os eicosanóides produzidos via ciclooxygenase e lipoxigenase atuam em diferentes tecidos (item 1.3.), no processo inflamatório, na homeostasia e integridade tecidual. Assim, essas enzimas se tornaram alvos terapêuticos de fármacos com ação anti-inflamatória, anticoagulante e antiasmática.

Várias espécies da família Asteraceae, incluindo da subtribo Lychnophorinae, possuem propriedades anti-inflamatórias. A *Arnica montana* L., *Tanacetum parthenium* L. Sch. Bip., *Calendula officinalis* L. e *Cichorium intybus* L. são espécies da família Asteraceae bem conhecidas pela suas atividades anti-inflamatórias [19, 20,21,23,6,7]. Muitas das espécies dessa família foram descritas como detentoras do potencial de inibição das COX e LOX (6,7,DANI)

Em Chagas-Paula (2015a), 57 extratos de espécies de Asteraceae foram testados para a inibição das enzimas COX-1 e 5-LOX, e dentre eles 39 demonstraram ser biologicamente ativos, divididos em inibidores da COX-1, inibidores da 5-LOX e inibidores de ambas as enzimas. Houve 13 extratos que demonstraram serem inibidores das duas enzimas simultaneamente.

Ainda em Chagas-Paula (2015a), seis espécies de Lychnophorinae foram estudadas: *Chronopappus bifrons* (DC. ex Pers.) DC., *Lychnophora diamantinana* Coile & S. B. Jones, *Lychnophora tomentosa* (Mart. ex DC.) Sch. Bip., *Minasia scapigera* H. Rob., *Piptolepis monticola* Loeuille e *Prestelia eriopus* Sch. Bip. Todas demonstraram ser ativas para pelo menos uma das enzimas estudadas (Figura 42). Essas espécies foram analisadas neste estudo e essas também demonstraram possuir um ótimo potencial inibitório de pelo menos uma das enzimas COX-1 e 5-LOX (Tabela 2), confirmando o potencial descrito na literatura.

Em Sousa *et al.* (2008), o óleo essencial extraído das folhas de *Eremanthus erythropappus* (DC.) McLeisch inibiu a formação de edema de pata em ratos induzido pela carragenina. A resposta inflamatória induzida pela carragenina resulta na liberação de vários mediadores inflamatórios, entre eles as prostaglandinas produzidas por isoformas indutíveis de ciclooxygenase (COX-2) (DI ROSA *et al*, 1968; SEIBERT *et al*, 1994; NANTEL *et al*, 1999). Além dessa atividade anti-inflamatória, foi realizado o teste de contorção abdominal que resultou em inibição de 27.06%,

sendo que o teste aplicado envolve as vias das cicloxigenases e biossíntese de prostaglandinas (DUARTE *et al.*, 1992).

Além de serem potenciais inibidores da produção de eicosanóides, espécies de *Lychnophorinae* possuem substâncias com ação em várias outras vias relacionadas ao processo inflamatório. Ferrari *et al.* (2013) demonstrou a atividade anti-inflamatória *in vitro* e *in vivo* das LST lychnofolido e eremantolido C, havendo redução o edema de pata induzido por carragenina e a produção de NO, TNF- α e IL-10 por macrófagos estimulados com PLS/IFN- γ . Outros autores, como Guzzo *et al.* (2008) e Sousa *et al.* (2008), também demonstraram atividade anti-inflamatória do lychnofolido e eremantolido C através da redução do edema de pata em ratos induzido por carragenina, corroborando a atividade. Lignanas e derivados de ácidos dicafeoilquínicos, isolados de raízes e folhas de *Lychnophora ericoides* demonstraram atividades analgésicas ((BORSATO *et al.*, 2000; GOBBO-NETO e LOPES, 2008; DOS SANTOS *et al.*, 2005). Já a vicentina-2, isolada de extrato metanólico das folhas de *Lychnophora ericoides* demonstrou ter atividade anti-inflamatória na indução do edema de pata por carragenina (GOBBO-NETO *et al.*, 2005) e inibição da produção de prostaglandina E₂ sem alterar a expressão da enzima COX-2 (DOS SANTOS *et al.*, 2010).

Keles *et al.* (2010) demonstrou algumas substâncias presentes em *Lychnophorinae* que se destacam pela sua atividade anti-inflamatória: 15-hidroxiyeremantolido B, 15-acetoxieremantolide B, 15-desoxigoyazensolido, goyazensolido, isogoyazensolido, lignans e centraterina.

A identificação de uma lactonas sesquiterpênica neste estudo como possíveis responsáveis pelo potencial inibidor do extrato é coerente com o histórico de atividade antiinflamatória dessa classe. Várias espécies da família Asteraceae são utilizadas na medicina tradicional, especialmente como anti-inflamatórios, e as LST são escritas como seus constituintes ativos principais. Em Merfort *et al.* (2011), vários processos inflamatórios podem servir de alvos e que em diversos modelos bioquímicos mostram que as LST inibem as enzimas que participam desses processos ou os mediadores envolvidos. Um dos mecanismos conhecidos das LST é a inibição inibem o fator de transcrição NF- κ B por alquilação seletiva da subunidade p65 por reação com os resíduos de cisteína (RÜNGELER *et al.*, 1999). Para as LST, Rüngeler *et al.* (1999) propõe que os grupos α -metileno- γ -lactona e a carbonila α,β -insaturada são responsáveis por alquilar resíduos de cisteína. Essa

alquilação causa uma ligação cruzada que altera a posição da tirosina 36 e aminoácidos adicionais, de tal maneira que causa a inativação inespecífica de enzimas essenciais.

É de grande importância destacar a ação antiasmática relacionada inibição da enzima 5-LOX. Medicamentos inibidores dessa via são utilizados em conjuntos com os agonistas de receptores β -adrenérgicos no tratamento da asma, além de serem utilizados em conjuntos com os AINES para diminuir os efeitos adversos causados pela exacerbação dessa via.

Como foi demonstrado em Chagas-Paula (2015a), a família Asteraceae possui grande potencial de inibição da enzima 5-LOX, havendo a inibição por 33 dos extratos das espécies estudadas. Neste estudo, a subtribo Lychnophorinae demonstrou possuir uma atividade inibitória excepcional, em que 25 dos 26 extratos estudados possuem atividade inibidora da enzima 5-LOX. Esse resultado mostra um potencial latente que deve ser explorado.

5. Conclusões

Os ensaios *in vitro* de triagem de inibidores das vias COX-1 e 5-LOX-dependentes revelaram o grande potencial inibitório das espécies da subtribo Lychnophorinae estudadas. De 26 espécies estudadas, 20 inibem simultaneamente as duas enzimas, sendo nove espécies classificadas como “Ativos” (IC_{50} 40-100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), seis espécies como “Potentes” (IC_{50} 10-40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e cinco espécies como “Altamente Potentes” (IC_{50} 0-10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), com valores de IC_{50} próximos aos valores dos fármacos comerciais indometacina e ácido nordihidroguaiarético.

As impressões digitais metabólicas foram obtidas em UHPLC-UV(DAD)-MS(OrbitrapTM) e as matrizes de dados obtidas após pré-tratamento mostraram-se plenamente eficientes para utilização nas análises de correlação *in silico*, uma vez que foi possível apontar nas análises supervisionadas por OPLS-DA quais variáveis químicas (centrotipos) são as possíveis responsáveis pela atividade inibitória. Mesmo que as espécies de Lychnophorinae possuam grande similaridade química entre si, evidenciada na análise estatística não supervisionada PCA, foi possível observar quais variáveis são discriminantes e estão relacionadas à propriedade inibitória dupla.

Dentre as variáveis propostas, cinco foram selecionadas para desreplicação, resultando em quatro substâncias. Uma dessas substâncias foi identificada como a lactona sesquiterpênica 4,5-diidro-15-desoxigoyazensolido e confirmada pela comparação dos perfis de fragmentação com um padrão autêntico. As outras três substâncias foram identificados como dois flavonóides 3-O-(acetil-hexosídeo)-quercetina e 7-O-(cumaroil-hexosídeo)-apigenina e um sesquiterpeno hidroxinerolidol. Faz-se necessária a confirmação dos isômeros de posição através de isolamento direcionado e por análises de Ressonância Magnética Nuclear.

Portanto, neste estudo foi possível revelar o excelente potencial de inibição das vias COX-1 e 5-LOX pelos extratos brutos de espécies de Lychnophorinae, vias que estão envolvidas em diferentes atividades no nosso organismo através da produção de eicosanoides, como processos inflamatórios, broncoespasmódicos e coagulantes. Assim como propor e identificar as substâncias mais prováveis de serem as responsáveis pela atividade inibitória, utilizando como ferramentas as análises metabolômicas, através da produção das impressões digitais metabólicas dos extratos, e análises de correlação *in silico*.

6. Referências

- ALLWOOD, J.W.; GOODACRE, R. An introduction to liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation applied in plant metabolomic analyses. **Phytochemical Analysis**, v. 21, p. 33-47, 2010.
- BAILEY, N. J. C. *et al.* Prediction of anti-plasmodial activity of *Artemisia annua* extracts: application of ¹H NMR spectroscopy and chemometrics. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 35, p.117–26, 2004.
- BAMBA, T.; FUKUSAKI, E. Technical problems and practical operations in plant metabolomics. **Journal of Pesticide Science**, v. 31, p. 300-304, 2006.
- BOERS, M. NSAIDS and selective COX-2 inhibitors: competition between gastroprotection and cardioprotection. **The Lancet**, v. 357, p. 1222-1223, 2001.
- BOHLMANN, F.; ZDERO, C.; KING, R.M.; ROBINSON, H. Sesquiterpene lactones from *Eremanthus* species. **Phytochemistry**, v. 19, p. 2663-2668, 1980.
- BOHLMANN, F.; JAKUPOVIC, J. Progress in the chemistry of the Vernoniae (Compositae). **Plant Systematics and Ecology**, v. 4(suppl.), p. 3-43, 1990.

BORSATO, M. L. C.; GRAEL, C. F. F.; SOUZA G. E. P.; LOPES, N. P. Analgesic activity of the lignans from *Lychnophora ericoides*. **Phytochemistry**. v. 55, p. 809, 2000.

BREMER, K. **Asteraceae: cladistics and classification**. Portland: Timber Press, 752p. 1994.

BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. **Goodman & Gilman: as Bases Farmacológicas da Terapêutica**, 12^a ed., Mcgraw-Hill, 2007.

BYLESJÖ, M. *et al.* OPLS discriminant analysis: combining the strengths of PLS-DA and SIMCA classification. **Journal of Chemometrics**. v. 20, p- 341–351, 2006.

CALIXTO, J.B., CAMPOS, M.M., OTIKI, M.F., SANTOS, A. R. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. **Planta Medica**, v.70, p.93–103, 2004.

CHAGAS-PAULA, D. A.; OLIVEIRA, TIAGO ; FALEIRO, DPV ; OLIVEIRA, R. B. ; A COSTA, F. B. . Outstanding Anti-inflammatory Potential of Selected Asteraceae Species through the Potent Dual Inhibition of Cyclooxygenase-1 and 5-Lipoxygenase. **Planta Medica**. v.81, p.1296-1307, 2015a.

CHAGAS-PAULA, D.; OLIVEIRA, T.; ZHANG, T.; EDRADA-EBEL, R.; DA COSTA, F. Prediction of Anti-inflammatory Plants and Discovery of Their Biomarkers by Machine Learning Algorithms and Metabolomic Studies. **Planta Medica**, v. 81(6), p.450-458, 2015b.

CHAGAS-PAULA, D.; ZHANG, T.; DA COSTA, F.; EDRADA-EBEL, R.; A Metabolomic Approach to Target Compounds from the Asteraceae Family for Dual COX and LOX Inhibition. **Metabolites**. v.5, p.404-430, 2015c.

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

CROTTI, A.E.M.; CAROLLO, C.A.; GOBBO-NETO, L.; SANTOS, M.D.; GATES, P.J.; LOPES, N.P. LC-hyphenated techniques: uses in the structural elucidation of low and high-molecular weight compounds. *In*: TAFT, C.A. (Ed.), **Modern biotechnology in medicinal chemistry and industry**. Research Signpost: Kerala, India, pp. 99-141, 2006.

CROTTI, A.E.M.; CUNHA, W.R.; VICHNEWSKI, W.; LOPES, N.P.; LOPES, J.L.C. Sesquiterpene lactones from *Minasia alpestris*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.16, p.677, 2005.

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

DELGADO, G.; ALVAREZ, L. MATA, R.; PEREDA-MIRANDA, R.; VIVAR, A.R.; VILLASEÑOR, J.L. Terpenoids from *Viguiera latibracteata* e *Viguiera greggii*. **Journal of Natural Products**, v.49, n.6, 1986.

DI ROSA, M.; SORRENTINO, L. The mechanism of the inflammatory effect of carrageenan. **European Journal of Pharmacology**, v. 4, p.340–342, 1968.

DOS SANTOS, M. D.; CHEN, G.; ALMEIDA, M. C.; SOARES, D. M.; SOUZA, G. E. P.; LOPES, N. P.; LANTZ, R. C. Effects of caffeoylquinic acid derivatives and C-flavonoid from *Lychnophora ericoides* on *in vitro* inflammatory mediator production. **Natural Product Communications**. v.5, p. 733-40, 2010.

DOS SANTOS, M.D. dos; GOBBO-NETO, L. ; ALBARELLA, L. ; SOUZA, G. E. P. de ; LOPES, N. P. . Analgesic activity of di-caffeoylquinic acids from roots of *Lychnophora ericoides* (Arnica da serra). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 545-549, 2005.

DUARTE, I.D.G.; FERREIRA-ALVES, D.L.; NAKAMURA-CRAIG, M. Possible participation of endogenous opioid peptides on the mechanism involved in analgesia by vouacapan. **Life aScience**. v. 50, p. 891–897, 1992.

DUTTA, P.; CHAUDHURI, R.P.; SHARMA, R.P. Insect feeding deterrents from *Tithonia diversifolia* (Hemsl). Gray. **Journal of Environmental Biology**, v. 14, p. 7-33, 1993.

DUTTA, P; BHATTACHARYYA, P.R; RABHA, L.C. et al. Feeding deterrents for *Philosamia ricini* (*Samiacynthis* subsp. *Ricini*) from *Tithoniadiversifolia*. **Phytoparasitica**, v. 14, p. 77-80, 1986.

ERIKSSON, L., TRYGG, J.; WOLD, S. CV-ANOVA for significance testing of PLS and OPLS® models. **Journal of Chemometrics**. v.22, o.594–600, 2008.

FABRE, N.; RUSTAN, I.; HOFMANN, E.; QUENTIN-LECLERCQ, J. Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**. v.12, n.6, p.707–715, 2001.

FALEIRO, D.P.V. Perfil metabólico, desreplicação de extratos de *Aldama la Llave* (Asteraceae) e inibição de enzimas cicloxygenase e lipoxigenase. 2014. 56 f. **Dissertação (Mestrado em Ciências). Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.**

FERRARI, F.C.; FERREIRA, L. C.; SOUZA, M.R.; GRABE-GUIMARÃES, A.; PAULA, C. A.; REZENDE, S.A.; SAÚDE-GUIMARÃES, D.A. Anti-Inflammatory Sesquiterpene Lactones from *Lychnophora trichocarpha* Spreng. (Brazilian Arnica). **Phytotherapy research**, v. 27, p. 384–389, 2013.

FERREIRA, S.H., VANE, J.R. New aspects of the mode of action of nonsteroid anti-inflammatory drugs. **Annual Review of Pharmacology**, p.57–73, 1974.

FIORUCCI, S., MELI, R., BUCCI, M., CIRINO, G. Dual inhibitors of cyclooxygenase and 5- lipoxigenase. A new avenue in anti-inflammatory therapy? **Biochemical Pharmacology**, v.62, p.1433–1438, 2001.

GADDI, A.; CICERO, A.F.G.; PEDRO, E.G. Clinical perspectives of anti-inflammatory therapy in the elderly: the lipoxigenase (LOX)/cyclooxygenase (COX) inhibition concept. **Archives of Gerontology and Geriatrics**, v. 38, p. 201-212, 2004.

GOBBO-NETO, L. Emprego de técnicas hifenadas na identificação de metabólitos secundários de *Lychnophora ericoides* Mart. (Asteraceae) e determinação de suas variações populacionais e temporais. 2007. 154p. **Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.**

GOBBO-NETO, L.; LOPES, NORBERTO, P.L. Online Identification of Chlorogenic Acids, Sesquiterpene Lactones, and Flavonoids in the Brazilian Arnica *Lychnophora ericoides* Mart. (Asteraceae) Leaves by HPLC-DAD-MS and HPLC-DAD-MS/MS and a Validated HPLC-DAD Method for Their Simultaneous Analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p. 1193–1204, 2008.

GOBBO-NETO, L.; SANTOS, M.D.; KANASHIRO, A.; ALMEIDA, M.C.; LUCISANOVALIM, Y.M.; LOPES, J.L.C.; SOUZA, G.E.P.; LOPES, N.P. Evaluation of the anti-inflammatory activities of di-C-glucosylflavones from *Lychnophora ericoides* (Asteraceae). **Planta Medica**, v. 71, p. 3-6, 2005.

GUZZO, L.S.; SAÚDE-GUIMARÃES, D.A.; SILVA, A.C.A.; LOMBARDI, J.A.; GUIMARÃES, H.N.; GRABE-GUIMARÃES, A. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of ethanolic extracts of *Lychnophora* species. **Journal of Ethnopharmacology**, v.116, p.120–124, 2008.

HERZ, W.; KUMAR, N. Sesquiterpene lactone of *Calea zacatechichi* and *C. urticifolia*. **Phytochemistry**, v.19, p.593-597, 1980.

HEYWOOD, V.A.; HARBONE, J.B.; TURNER, B.L. **The biology and chemistry of the Compositae**. London, New York Academic Press. Vol.I e II, 1977.

HOSTETTMANN, K.; WOLFENDER, J.L.; TERREAUX, C. Modern screening techniques for plant extracts. **Pharmaceutical Biology**, v. 39, p. 18-32, 2001.

JANSEN, J.J.; SMIT, S.; HOEFSLOOT, H.C.J.; SMILDE, A.K. The photographer and the greenhouse: how to analyse plant metabolomics data. **Phytochemical Analysis**, v. 21, p. 48-60, 2009.

KATAJAMAA, M.; ORESIC, M. Data processing for mass spectrometry-based metabolomics. **Journal of Chromatography**, v.1158, p. 318–3284, 2007.

KELES, L.C. *et al.* Lychnophorinae (Asteraceae): a survey of its chemical constituents and biological activities. **Química Nova**, v.33, nº10, p.2245-2260, 2010.
KIM, H. K. *et al.* Metabolic classification of South American *Ilex* species by NMR-based metabolomics. **Phytochemistry**.v.71, p.773–84, 2010.

LANG, G. *et al.* Evolving trends in the dereplication of natural product extracts: new methodology for rapid, small-scale investigation of natural product extracts. **Journal of Natural Products**, v.71, p.1595–9, 2008.

LILAND, K. H.. Multivariate methods in metabolomics – from preprocessing to dimensions reduction and statistical analysis. **Trends in Analytical Chemistry**. v.30, p.827-841, 2011.

LIN, C. Y.; WU, H.; TJEERDEMA, R. S.; VIANT, M. R. Evaluation of metabolite extraction strategies from tissue samples using NMR metabolomics. **Metabolomics**, v. 3, p.55–67, 2007.

LIU, Y-L; GERSHENZON, J.; MABRY, T.J. Furanoheliangolides from *Viguiera greggii*. **Phytochemistry**, v.23, nº9, p.1967-1970, 1984.

LOEUILLE, B.; SEMIR, J.; LOHMANN, L. G.; PIRANI, J. R. A phylogenetic analysis of Lychnophorinae (Asteraceae: Vernonieae) based on molecular and morphological data. **Systematic Botany**. v.40, 2015.

LYSS, G.; KNORR, A.; SCHMIDT, T.J.; PAHL, H.L.; MERFORT, I. The anti-inflammatory sesquiterpene lactone helenalin inhibits the transcription factor NF-κB. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 50, p. 33508-33516, 1998.

MAGENTA, M.A.G. *Viguiera* Kunth (Asteraceae, Heliantheae) na América do Sul e sistemática das espécies do Brasil. **Tese de doutorado em Botânica apresentada ao Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo**. São Paulo, 2006.

MARKHAM, K.R. Ultraviolet-visible absorption spectroscopy. In:____. **Techniques of flavonoids identification**. London: Academic Press Inc., cap.3, p.36-51, 1982.

MARTUCCI, M E. P. ; DE VOS, R. C. H. ; CAROLLO, C. A. ; GOBBO-NETO, L. Metabolomics as a Potential Chemotaxonomical Tool: Application in the Genus *Vernonia* Schreb. **Plos One**, v. 9, p. e93149, 2014.

MARTUCCI, M.E.P. Metabolômica e *screening* de interações ecoquímicas de plantas da subtribo Lychnophorinae (Asteraceae). 2016. 155p. **Tese (Doutorado em Ciências). Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo**, Ribeirão Preto.

MORITZ, T.; JOHANSSON, A.I. Plant metabolomics. In: Griffiths, W.J. (Ed.) **Metabolomics, metabonomics and metabolite profiling**. Reino Unido: The Royal Society of Chemistry: Cambridge. 303p., 2008.

NANTEL, F., DENIS, D., GORDON, R., NORTHEY, A., CIRINO, M., METTERS, K. M., CHAN, C. C. Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation. **Braslian Journal of pharmacology**. v.128, p.853–859, 1999.

NICOLETE, R.; ARAKAWA, N.S.; RIUS, C.; NOMIZO, A.; JOSE, P.J.; DA COSTA, F.B.; SANZ, M.-J.; FACCIOLI, L.H. Budlein A from *Viguiera robusta* inhibits leukocyte-endothelial cell interactions, adhesion molecule expression and inflammatory mediators release. **Phytomedicine**, v. 16, p. 904-915, 2009.

NORDSTRÖM, A. Data mining for metabolomics. In: Griffiths, W.J. (Ed.) **Metabolomics, metabonomics and metabolite profiling**. 2008. Reino Unido: The Royal Society of Chemistry: Cambridge. 303p., 2008.

PANERO, J.L.; FUNK, V.A. The value of sampling anomalous taxa in phylogenetic studies: Major clades of the Asteraceae revealed. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v.47, p. 757–782, 2008.

PARENTE, L. Pros and cons of selective inhibition of cyclooxygenase-2 versus dual lipooxygenase/cyclooxygenase inhibition: is two better than one? **The Journal of Rheumatology**, v.28, p.2375–82, 2001.

PASSREITER, C.M.; ISMAN, M.B. Antifeedant bioactivity of sesquiterpene lactones from *Neurolaena lobata* and their antagonism by c-aminobutyric acid. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 25, p. 371-377, 1997.

PICMAN, A.K. Biological activities of sesquiterpene lactones. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.14, n.3, p.255-282, 1986.

ROBINSON, H. . Generic and subtribal classification of American Vernonieae. **Smithsonian Contributions to Botany**. v.89, p.1-116, 1999.

ROBINSON, H. Notes on the Lychnophorine genera Chresta and Eremanthus (Vernonieae : Asteraceae). **Phytologia** v,45, p.89-100, 1980.

ROBINSON, H.. VI. Tribe Vernonieae Cass. In: Kadereit, J.W.; Jeffrey, C. (Ed.) **The families and genera of vascular plants, vol 8. Flowering plants-eudicot, Asterales**. Berlin: Springer, p.149-174, 2007.

RÜNGELER, P.; CASTRO, V.; MORA, G.; GÖREN, N.; VICHEWSKI, W.; PAHL, H. L.; MERFORT, I.; SCHMIST, T.J. Inhibition of transcription factor NF- κ B by sesquiterpene lactones: a proposed molecular mechanism of action. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v.7, p.2343, 1999.

SAKAKIBARA, H.; HONDA, Y.; NAKAGAWA, S.; SHIDA, H.; KANAZAWA, K. Simultaneous Determination of All Polyphenols in Vegetables, Fruits, and Teas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.51, n.3, p.571-581, 2003.

SCHMIDT, T.J. Toxic activities of sesquiterpenes lactones: structural and biochemical aspects. **Current Organic Chemistry**. v.3, p.577-608, 1999.

SCHORR, K.; GARCÍA-PIÑERES, A.J.; SIEDLE, B.; MERFORT, I.; DA COSTA, F.B. Guaianolides from *Viguiera gardneri* inhibit the transcription factor NF- κ B. **Phytochemistry**, v. 60, p. 733-740, 2002.

SEAMAN, F.C. Sesquiterpene lactones as taxonomic characters in the Astearaceae. **The Botanical Review**, v. 48, nº2, p.121–594, 1982.

SEIBERT, K., ZHANG, Y., LEAHY, K., HAUSER, S., MASFERRER, J., PERKINS, W., LEE, L., ISAKSON, P. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 54, p.7–10, 1994.

SHYUR, L-F.; YANG,N-S. Metabolomics for phytomedicine research and drug development. **Current Opinion in Chemical Biology**. v.12, p.66–71, 2008.

SIEDLE, B.; GARCÍA-PIÑERES, A.J.; MURILLO, R.; SCHULTE-MONTING, J.; CASTRO, V.; RÜNGELER, P.; KLAAS, C.A.; DA COSTA, F.B.; KISIEL, W.; MERFORT, I. Quantitative structure-activity relationship of sesquiterpene lactones as

inhibitors of the transcription factor NF- κ B. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, p. 6042- 6054, 2004.

SOUSA, O.V.; SILVÉRIO, M.S.; DEL-VECHIO-VIEIRA, G.; MATHEUS, F.C.; YAMAMOTO, C.H.; Alves, M.S. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of the essential oil from *Eremanthus erythropappus* leaves. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.60, p.771–777, 2008.

SUMNER, L. W.; MENDES, P.; DIXON, R. A. Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. **Phytochemistry**, v. 62, p. 817–836, 2003.

T'KINDT, R.; MORREEL, K.; DEFORCE, D.; BOERJAN, W.; VAN BOCXLAE, J. Joint GC-MS and LC-MS platforms for comprehensive plant metabolomics: repeatability and sample pre-treatment. **Journal of chromatography**, v. B877, p.3572, 2009.

TIKUNOV, Y.; LOMMEN, A.; DE VOS, C.H.R.; VERHOEVEN, H.A. *et al.*. A novel approach for nontargeted data analysis for metabolomics. Large-scale profiling of tomato fruit volatiles. **Plant Physiology**. v.139, p.1125-1137, 2005.

TIKUNOV, Y.M.; LAPTENOK, S.; HALL, R.D.; BOVY, A.; DE VOS, R.C.H. MSClust: a tool for unsupervised mass spectra extraction of chromatography-mass spectrometry ion-wise aligned data. **Metabolomics**, v. 8, p. 714–718, 2012.

TRIVEDI, D.K e ILES, R.K. The application of SIMCA P+ in shotgun metabolomics analysis of ZIC®HILIC-MS spectra of human urine – experience with the Shimadzu IT-TOF and profiling solutions data extraction software. **Journal of Chromatography Separation Techniques**. v.3,p.1-5, 2012.

TROPSHA, A.; GOLBRAOKH, A. Predictive QSAR modeling workflow, model applicability domains, and virtual screening. **Current Pharmaceutical Design**. v. 13, p.3494–504, 2007.

TRYGG, J.; HOLMES, E.; LUNDSTESDT, T. Chemometrics in metabonomics. **Journal of Proteome Research**. v.6, p. 469–79, 2007.

TSIMOGIANNIS, D.; SAMIOTAKI, M.; PANAYOTOU, G.; OREOPOULOU, V. Characterization of flavonoid subgroups and hydroxy substitution by HPLC-MS/MS. **Molecules**. v.21, n.12(3), p-593-606, 2007.

VAN DER KOOY, F., MALTESE, F., CHOI, Y. H., KIM, H. K. & VERPOOTE, R. Quality control of herbal material and phytopharmaceuticals with MS and NMR based metabolic fingerprinting. **Planta Medica**. v.75, p.763–75, 2009.

VERPOORTE, R.; CHOI, Y. H.; KIM, H. K. Ethnopharmacology and systems biology: a perfect holistic match. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p.53, 2005.

VICHNEWSKI, W.; TAKAHASHI, A.M.; NASI, A.M.T.T.; OLIVEIRA, D.C.R.; GONÇALVES, D.C.R.G.; DIAS, D.A.; LOPES, J.N.C.; GOEDKEN, V.L.; GUTIERREZ, A. B. ; HERZ, W. Sesquiterpene lactones and others constituents from *Eremanthus seidelii*, *Eremanthus goyazensis* and *Vanillosmopsis erythropappa*. **Phytochemistry**, v.28, n.5, p.1441-1451, 1989.

VILLAS-BÔAS, S.; MAS, S.; ÅKESSON, J.S.; NIELSEN, J. Mass spectrometry in metabolome analysis. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 24, p. 613-646, 2005.

WANG, Q.-Z., WU, C.-Y., CHEN, T., CHEN, X. & ZHAO, X.-M. Integrating metabolomics into a systems biology framework to exploit metabolic complexity: strategies and applications in microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**.v.70, p.151–61, 2006.

WECKWERTH, W. e MORGENTHAL, K. Metabolomics : from pattern recognition to biological interpretation. **Drug Discovery Today**. v. 10, p.1551–1558, 2005.

WESTERHUIS, J. A; VAN VELZEN, E. J. J; HOEFSLOOT, H. C. J. *et al.* Multivariate paired analysis: multilevel PLS-DA versus OPLS-DA. **Metabolomics**. v.6, p.119-128, 2010.

WOLFENDER, J. L.; WARIDEL, P.; NDJOKO, K; HOBBY, K.R.; MAJOR, H.J.; HOSTETTMANN, K. Evaluation of Q-TOF-MS/MS and multiple stage IT-MSn for the dereplication of flavonoids and related compounds in crude plant extracts. **Analisis**. v.28, p. 895-906, 2000.

WOLFENDER, J.; MARTI, G.; QUEIROZ, E. F. Advances in techniques for profiling crude extracts and for the rapid identification of natural products: dereplication, quality control and metabolomics. **Current Organic Chemistry**, v.14, p. 1808–1832, 2010.

YULIANA, N. D.; KHATIB, A.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R.; Metabolomics for Bioactivity Assessment of Natural Products. **Phytotherapy Research**. v.25, p.157-169, 2011b.

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, p.6902–6906, 2011a.

ZDERO, C.; BOHLMANN, F.. Systematics and evolution within the Compositae, seen with the eyes of a chemist. **Plant Systematics and Evolution**. v.171, p. 1-14, 1990.

ZHENG, L. *et al.* A chemometric study of chromatograms of tea extracts by correlation optimization warping in conjunction with PCA, support vector machines and random forest data modeling. **Analytica Chimica Acta**, v.642, p.257, 2009.

Apêndices

Apêndice I. Localização das coletas das espécies estudadas e respectivos coletores, códigos de depósito e herbários. **ID.** Identificação.

ID	Espécie	Local	Estado	Coletor	Código	Herbário
ES_1	<i>Albertinia brasiliensis</i> Spreng	Entre Rios	BA	Popovkin	476	HUEFS
Es_2	<i>Blanchetia heterotricha</i> DC	Morro do Chapéu	BA	Loeuille <i>et al.</i>	394	SPF
Es_28	<i>Chronopappus bifrons</i> (DC. ex Pers.) DC	Catas Altas	MG	Loeuille e Albergaria Pena	460	SPF
Es_3	<i>Eremanthus crotonoides</i> (DC.) Sch.Bip	Santana do Riacho	MG	Loeuille <i>et al.</i>	25	SPF
Es_4	<i>Eremanthus elaeagnus</i> (Mart. ex DC.) Sch.Bip	Joaquim Felício	MG	Loeuille <i>et al.</i>	430	SPF
Es_5	<i>Eremanthus erythropappus</i> (DC.) MacLeish	Capitólio	MG	Loeuille <i>et al.</i>	51	SPF
Es_6	<i>Eremanthus goyazensis</i> (Gardner) Sch.Bip	Pirenópolis	GO	Loeuille <i>et al.</i>	438	SPF
Es_7	<i>Eremanthus leucodendron</i> Mattf.: Brazil	Abaíra	BA	Loeuille <i>et al.</i>	347	SPF
Es_8	<i>Eremanthus mollis</i> Sch.Bip	Pirenópolis	GO	Loeuille <i>et al.</i>	305	SPF
Es_9	<i>Heterocoma robinsoniana</i> Loeuille, J.N. Nakaj. & Semir sp. ined	São Roque de Minas	MG	Loeuille <i>et al.</i>	266	SPF
Es_10	<i>Hololepis pedunculata</i> (DC. ex Pers.) DC	São Roque de Minas	MG	Loeuille <i>et al.</i>	259	SPF
Es_23	<i>Lychnophora diamantinana</i> Coile & S.B. Jones	Diamantina	MG	Loeuille <i>et al.</i>	108	SPF
Es_11	<i>Lychnophora markgravi</i> G.M. Barroso	Grão Mogol	MG	Loeuille <i>et al.</i>	440	SPF
Es_12	<i>Lychnophora mellosilvae</i> sp. ined	Mato Verde	MG	Mello-Silva <i>et al.</i>	463	SPF
Es_13	<i>Lychnophora regis</i> H. Rob.	Abaíra	BA	Loeuille <i>et al.</i>	346	SPF
Es_14	<i>Lychnophora sellowii</i> Sch.Bip	Congonhas do Norte	MG	Loeuille <i>et al.</i>	79	SPF
Es_24	<i>Lychnophora tomentosa</i> (Mart. ex DC.) Sch.Bip	Diamantina	MG	Loeuille <i>et al.</i>	93	SPF
Es_15	<i>Lychnophora triflora</i> (Mattf.) H. Rob	Abaíra	BA	Loeuille <i>et al.</i>	333	SPF
Es_16	<i>Lychnophoriopsis damazioi</i> (P. Beauv.) H. Rob	Congonhas do Norte	MG	Loeuille <i>et al.</i>	77	SPF
Es_17	<i>Minasia cipoensis</i> sp. ined	Santana do Riacho	MG	Loeuille <i>et al.</i>	494	SPF
Es_25	<i>Minasia scapigera</i> H. Rob	Diamantina	MG	Loeuille <i>et al.</i>	97	SPF
Es_18	<i>Paralychnophora atkinsiae</i> D.J.N. Hind	Mucugê	BA	Ferreira <i>et al.</i>	267	HUEFS
Es_19	<i>Paralychnophora harleyi</i> (H. Rob.) D.J.N. Hind	Piatã	BA	Loeuille <i>et al.</i>	309	SPF
Es_22	<i>Piptolepis monticola</i> Loeuille sp. ined.	Santo Antônio do Itambé	MG	Loeuille <i>et al.</i>	464	SPF
Es_26	<i>Prestelia eriopus</i> Sch. Bip.	Santana do Riacho	MG	Loeuille <i>et al.</i>	113	SPF
Es_21	<i>Proteopsis argentea</i> Mart. & Zucc. ex DC	Grão Mogol	MG	Loeuille <i>et al.</i>	444	SPF

Apêndice II. Parâmetros utilizados no software *MetAlignTM* para o tratamento dos dados resultantes das análises em UHPLC-UV-MS (OrbitrapTM).

Part A: PROGRAM CONFIGURATION, DATA SET SELECTION AND BASELINE CORRECTION			
Program configuration:	Input format: Xcalibur		
	Output format: Xcalibur		
	Scan filter of 1st data set: Use filter of Scan 2		
	Number of processors to use: 1		
Mass resolution (Accurate mass data)	Mass resolution: 70000		
	Amplitude range for accurate mass determination: from 150 to 1200		
	<i>"Echo" suppression:</i> Interval around mass peak: 0.45 Percentage of amplitude of mass peak: 5		
	<i>"Forest" suppression:</i> Interval around mass peak: 6 Percentage of amplitude of mass peak: 3 Interval offset from mass peak: 0.5		
Retention Begin (scan nr): 1			
Retention End (scan nr): 1150			
Maximum Amplitude: 1000000000			
Peak Slope Factor (x Noise): 1			
Peak Threshold Factor (x Noise): 2			
Peak Threshold (Abs Value): 1000000			
Average Peak Width at Half Height (Scans): 10			
PART B: SCALING AND ALIGNING DATA SETS			
Scaling Options: no scaling			
Initial Peak Search Criteria		Scan nr	Max shift
	Begin of 1st region	0	20
	End of 1st region	1150	20
Tuning Alignment Options and Criteria: No pre-align processing (Rough)			
DETAILED ASCII OUTPUT / EXCEL COMPATIBLE OUTPUT / DIFFERENTIAL RETENTION DISPLAY			
Output Options: Multivariate Compatible Output			
Mass: from 150 to 1200			
Retention: from 3 to 28			
Peak Threshold Factor (x Noise): 3			

Apêndice III. Parâmetros utilizados no software *MSClustTM* após tratamento no *MetAlignTM*

Parâmetros	Valores
Effective peaks	100
Peak Width, scans ou r. time	10
P.W. Margin Softness	2
Correlation thershold (0.0 - 1.0)	0.8
C.T. Margin Softness	0.02
PD Reduction (0.0 - 1.0)	0.8
PD Reduction Softness	0.01
Stop Criterion	2

Apêndice IV. Impressões Digitais Metabólicas obtidas por UHPLC-UV(DAD)-MS (Orbitrap™), utilizando-se gradiente de eluição 0 – 2 min, 5% B; 2 – 30 min, 5 - 100% B ; 30 – 34 min, 100% B; 34 – 37 min, 100 - 5% B; 37 – 40 min, 5% B, e solventes CH₃CN-HCO₂H (0,1%) (v/v) (B) e H₂O-HCO₂H (0,1%) (v/v) (A).

Figura 45. Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico de *Albertinia brasiliensis* Spreng. (Es_1). **A.** Modo de ionização negativo. **B.** Modo de ionização positivo.

Figura 46. Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico de *Blanchetia heterotricha* DC. (Es_2). **A.** Modo de ionização negativo. **B.** Modo de ionização positivo.

Figura 47. Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico de *Eremanthus crotonoides* (DC.) Sch.Bip. (Es_3). **A.** Modo de ionização negativo. **B.** Modo de ionização positivo.

Figura 48. Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico de *Eremanthus elaeagnus* (Mart. ex DC.) Sch.Bip. (Es_4). **A.** Modo de ionização negativo. **B.** Modo de ionização positivo.

Figura 49. Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico de *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish (Es_5). **A.** Modo de ionização negativo. **B.** Modo de ionização positivo.

Figura 50. Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico de *Eremanthus goyazensis* (Gardner) Sch.Bip. (Es_6). **A.** Modo de ionização negativo. **B.** Modo de ionização positivo.

Figura 51. Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico de *Eremanthus leucodendron* Mattf. (Es_7). **A.** Modo de ionização negativo. **B.** Modo de ionização positivo.

Figura 52. Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico de *Eremanthus mollis* Sch.Bip. (Es_8). **A.** Modo de ionização negativo. **B.** Modo de ionização positivo.

Figura 53. Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico de *Heterocoma robinsoniana* sp. Ined. (Es_9). **A.** Modo de ionização negativo. **B.** Modo de ionização positivo.

Figura 54. Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico de *Hololepis pedunculata* (DC. ex Pers.) DC. (Es_10). **A.** Modo de ionização negativo. **B.** Modo de ionização positivo.

Figura 55. Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico *Lychnophora markgravii* G.M. Barroso (Es_11). **A.** Modo de ionização negativo. **B.** Modo de ionização positivo.

Figura 56. Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico *Lychnophora mellosilvae* sp. ined. (Es_12). **A.** Modo de ionização negativo. **B.** Modo de ionização positivo.

Figura 57. Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico *Lychnophora regis* H. Rob. (Es_13). **A.** Modo de ionização negativo. **B.** Modo de ionização positivo.

Figura 58. Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico *Lychnophora sellowii* Sch.Bip. (Es_14). **A.** Modo de ionização negativo. **B.** Modo de ionização positivo.

Figura 59. Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico *Lychnophora triflora* (Mattf.) H. Rob. (Es_15). **A.** Modo de ionização negativo. **B.** Modo de ionização positivo.

Figura 60. Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico *Lychnophoriopsis damazioi* (P. Beauv.) H. Rob. (Es_16). **A.** Modo de ionização negativo. **B.** Modo de ionização positivo.

Figura 61. Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico *Minasia cipoensis* sp. ined. (Es_17) **A.** Modo de ionização negativo. **B.** Modo de ionização positivo.

Figura 62. Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico *Paralychnophora atkinsiae* D.J.N. (Es_18). **A.** Modo de ionização negativo. **B.** Modo de ionização positivo.

Figura 63. Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico *Paralychnophora harleyi* H. Rob. (Es_19). **A.** Modo de ionização negativo. **B.** Modo de ionização positivo.

Figura 64. Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico *Proteopsis argentea* (Mart. & Zucc.) Sch.Bip. (Es_21). **A.** Modo de ionização negativo. **B.** Modo de ionização positivo.

Figura 65. Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico *Piptolepis monticola* Loeuille esp. nov. (Es_22). **A.** Modo de ionização negativo. **B.** Modo de ionização positivo.

Figura 66. Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico *Lychnophora diamantinana* Coile & S.B. Jones. (Es_23). **A.** Modo de ionização negativo. **B.** Modo de ionização positivo.

Figura 67. Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico *Lychnophora tomentosa* (Mart. ex DC.) Sch. Bip. (Es_24). **A.** Modo de ionização negativo. **B.** Modo de ionização positivo.

Figura 68. Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico *Minasia scapigera* H. Rob. (Es_25). **A.** Modo de ionização negativo. **B.** Modo de ionização positivo.

Figura 69. Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico *Prestelia eriopus* Sch. Bip. (Es_26). **A.** Modo de ionização negativo. **B.** Modo de ionização positivo.

Figura 70. Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico *Chronopappus bifrons* (DC. ex Pers.) DC. (Es_28). **A.** Modo de ionização negativo. **B.** Modo de ionização positivo.