UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Atividade anti-inflamatória e caracterização fitoquímica do chá e de
diferentes extratos de *Tithonia diversifolia* (Asteraceae)**

Daniela Aparecida Chagas de Paula

Ribeirão Preto

2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Atividade anti-inflamatória e caracterização fitoquímica do chá e de
diferentes extratos de *Tithonia diversifolia* (Asteraceae)**

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: Daniela Aparecida Chagas de
Paula

Orientador: Prof. Dr. Fernando Batista da
Costa

Ribeirão Preto

2010

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Chagas_Paula, Daniela Aparecida

Atividade anti-inflamatória e caracterização fitoquímica do chá e de diferentes extratos de *Tithonia diversifolia* (Asteraceae).
Ribeirão Preto, 2010.

116 p.; 30cm.

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

Orientador: Da Costa, Fernando Batista.

1. Anti-inflamatória. 2. *Tithonia diversifolia*. 3. Asteraceae.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome da aluna: Daniela Aparecida Chagas de Paula.

Título do trabalho: Atividade anti-inflamatória e caracterização fitoquímica do chá e de diferentes extratos de *Tithonia diversifolia* (Asteraceae)

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

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientador: Prof. Dr. Fernando Batista da Costa

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho,

aos meus amados: pais, irmã, Ivo e Eunice;

ao primo Luiz e à Vanessa;

à Rejane e demais amigos;

e aos meus professores, em especial ao Prof. Dr. Fernando Batista da Costa.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus e meus santos protetores, Nossa Senhora Aparecida e São Geraldo Magela. Que me deram a vida, a luz e a oportunidade de trilhar o caminho do conhecimento. Caminho este dos meus sonhos e cercado de pessoas maravilhosas que me proporcionaram grande evolução.

Aos meus pais e irmã pelo amor e apoio incondicional, que me proporcionaram alcançar todos os meus sonhos. Tenho muito orgulho de pertencer a esta família. Obrigada pela força em todos os momentos difíceis. Amo muito vocês!

Ao Ivo, grande amor e companheiro, as coisas são tão mais simples e facilmente solucionadas com você. Obrigada por todo amor, carinho e paciência. Sou muito feliz por ter você em minha vida. Amo você!

À Eunice e ao Peco que sempre me apoiaram em todos os meus sonhos.

A toda minha família pelo bom exemplo e amor, e principalmente à tia Carminha e ao tio Zé pelas boas dicas e orientações.

Ao primo Luiz, à Vanessa e família pelo acolhimento e apoio. Esse sonho não seria possível sem vocês. Gratidão eterna e inestimável.

Ao prof. Dr. Fernando Batista da Costa pela oportunidade, orientação e amizade. Grande cientista, grande pensador e grande idealizador. Foram dois anos e meio de muito aprendizado. Muito obrigada!

À Rejane, Rê, não é possível expressar satisfatoriamente agradecimento a tudo que você já fez por mim. Eu não escolheria outra parceira de experimentos. Quanto aprendi com a Rê! Para mim a Rê é um verdadeiro anjo! Sempre pude contar com ela nos momentos mais difíceis e decisivos deste meu mestrado. Muito obrigada.

Aos prof(a)s. Drs. Leonardo Gobbo-Neto e Lúcia Helena Faccioli, e a Dra. Thaís Helena Gasparoto, pela imensa contribuição científica neste trabalho.

A todos os amigos do laboratório de Farmacognosia (FCFRP-USP) pelos ensinamentos, boa convivência e apoio. Muito obrigada Renat's, Mauro, Eliane, Willian, Brunin, João, Marizeira, Vanessa, Flavinha, Juzinha, Jú, Flávia, Clarissa, Ramon, Tatiane e Rapha. Foram muitas gargalhadas, trapalhadas... momentos inesquecíveis.

A todos os meus amigos, que também marcaram minha vida e meus estudos, Sabrina, Kelly, Joanito, Renatinho, Luiz Fernando, Taty, Yara, Lindsay, Rasga, Léo, Franco, Tanare, Paulita, Cíntia. E agradeço também a todos os meus professores e em especial às prof(a)s. Maria, Claudina, Solange, Maria Tereza, Afonsinho, Dra. Marta de Lana e Dra. Carla, que contribuirão com paixão para meu aprendizado. Muito obrigada!

Aos técnicos de laboratório Mário, Valtinho e João Gabriel, que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho. Em especial devo agradecer ao Mário pelos auxílios nas coletas e demais ajudas, muito obrigada!

À Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto pela minha formação profissional.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP, local de desenvolvimento deste trabalho.

À CAPES, à FAPESP e ao CNPq pelo apoio financeiro.

"Toda verdade é provisória – esta é, talvez a única certeza que fica quando observamos a maneira pela qual o conhecimento humano é construído no curso da história"

(José Carlos de Azeredo)

RESUMO

CHAGAS_PAULA, D. A. **Atividade anti-inflamatória e caracterização fitoquímica do chá e de diferentes extratos de *Tithonia diversifolia* (Asteraceae)**. 2010. 116f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Tithonia diversifolia Hemsl. A. Gray (margaridão, Asteraceae) é uma planta medicinal com propriedade anti-inflamatória bastante promissora, embora tenha sido parcialmente investigada do ponto de vista químico e farmacológico. Neste trabalho, a partir de suas folhas foram obtidos um infuso (chá), um extrato de lavagem foliar em acetona rico em lactonas sesquiterpênicas (LSTs), um extrato em metanol-H₂O das folhas livres de tricomas (ELT) e o óleo essencial, incluindo das inflorescências. Pela primeira vez os constituintes polares das folhas de *T. diversifolia* foram identificados e o seu mecanismo de ação anti-inflamatório foi investigado. Através dos perfis químicos dos extratos obtidos por CLAE-UV-DAD e CG-EM, comparação com dados da literatura e de uma biblioteca de padrões, juntamente com a identificação de alguns constituintes isolados, foi possível identificar mais de 20 substâncias desta planta e efetuar a caracterização química de todos seus extratos. O sucesso na obtenção de extratos que refletem diferentes classes de metabólitos secundários de *T. diversifolia*, avaliados por ensaios anti-inflamatórios *in vivo* (tópico e oral) e *in vitro*, permitiu concluir que as LSTs não são as únicas substâncias que contribuem para atividade anti-inflamatória da planta como se acreditava anteriormente. O extrato polar (ELT), rico em ácidos clorogênicos (ACGs) e livre de LSTs, apresentou atividade anti-inflamatória superior à do extrato contendo LSTs, do fármaco de referência (indometacina) e do fitoterápico Acheflan[®]. Muito similar quimicamente ao ELT, o infuso não apresentou atividade anti-inflamatória interessante, o que nos leva a desestimular seu uso popular. Ainda foi possível demonstrar que a forma de preparar cada extrato causa influência na atividade farmacológica. O estudo do óleo essencial das folhas e inflorescências permitiu observar que seus mono e sesquiterpenos também apresentam atividade anti-inflamatória. Os mecanismos de ação propostos através dos ensaios *in vivo* e *in vitro* permitiram definir que as LSTs e/ou flavonas e os ACGs de *T. diversifolia* são bons anti-inflamatórios, inclusive sem apresentar os efeitos colaterais comuns aos anti-inflamatórios não esteroidais atuais. Além disso, foi possível observar que a toxicidade de todos os extratos testados por via oral foi menor que aquela apresentada pelo fármaco de referência (indometacina) correntemente utilizado na terapêutica. Com base nos resultados obtidos, pode-se afirmar que a *T. diversifolia* brasileira possui diferentes substâncias com propriedades anti-inflamatórias que agem por diferentes mecanismos de ação. Em pelo menos um destes mecanismos, os extratos demonstraram agir sinergicamente. Embora o emprego de seu infuso não seja recomendado como anti-inflamatório, esta planta é promissora para o desenvolvimento de novos fitofármacos ou como fonte de substâncias anti-inflamatórias.

Palavras-chave: Anti-inflamatória, *Tithonia diversifolia*, Asteraceae.

ABSTRACT

CHAGAS_PAULA, D. A. **Anti-inflammatory activity and phytochemical characterization of infuse and different extracts from *Tithonia diversifolia* (Asteraceae)**. 2010. 116f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Tithonia diversifolia Hemsl. A. Gray (Mexican sunflower, Asteraceae) is a very promising anti-inflammatory medicinal plant, although so far it has been partially investigated from the chemical and pharmacological point of view. In this work, an infusion, a sesquiterpene lactone (STL)-rich leaf rinse extract in acetone, a methanol-H₂O extract from trichome-free leaves (TFL), and the essential oil were obtained from the leaves of *T. diversifolia*, including the essential oil from its inflorescences. The main polar constituents were identified in the leaves of *T. diversifolia* and its anti-inflammatory mechanism of action was determined for the first time. More than 20 compounds from this plant were identified and all extracts were chemically characterized based on chemical profiles obtained from HPLC-UV-DAD and GC-MS analyzes, comparison with literature data, data from our pure compounds library, and on the identification of isolated compounds. The success in obtaining extracts with different classes of secondary metabolites of *T. diversifolia* allowed, after *in vivo* (topic and oral) and *in vitro* anti-inflammatory assays were carried out, to show that the STLs are not the only class of compounds that contribute to the anti-inflammatory activity of this plant as previously believed. The TFL extract, which was proved to be rich in chlorogenic acids and free of LSTs, demonstrated better activity and better mechanism of action than those displayed by the LSTs, the reference drug (indomethacin) and Acheflan® (a phytomedicine). The infusion, which is chemically very similar to the TFL extract, did not show any interesting anti-inflammatory activity, therefore discouraging its popular use. Additionally, it can be stated that the way the extracts are prepared exert influence in their pharmacological activity. The study of the essential oil allowed to observe that its mono e sesquiterpenoids also present anti-inflammatory activity. The mechanisms of action proposed after *in vivo* and *in vitro* assays were carried out allowed us to define that the STLs and/or flavones and chlorogenic acids from *T. diversifolia* are good anti-inflammatory agents; it should also be mentioned that these compounds do not present the side effects which are common to the current non-steroidal anti-inflammatory drugs. Furthermore, it was possible to observe that the toxicity of all extracts tested orally was lower than that presented by the reference drug (indomethacin) commonly used in the treatment of inflammatory diseases. These results altogether allowed us to conclude that the Brazilian *T. diversifolia* presents different classes of secondary metabolites with anti-inflammatory properties that act through different mechanisms of action. These extracts also displayed a synergistic mechanism. Although the use of the infusion is not recommended as anti-inflammatory remedy, this plant is promising for the development of new phytomedicines or as a source of anti-inflammatory compounds.

Keywords: Anti-inflammatory, *Tithonia diversifolia*, Asteraceae.

1. INTRODUÇÃO

A família Asteraceae possui um grande número de espécies investigadas por pesquisadores de diferentes áreas da Ciência, em especial da química, biologia, farmacologia e agronomia (Heywood *et al.*, 1977; Funk *et al.*, 2009). No Brasil, existem vários representantes desta família, nativos ou aclimatados, que também fazem parte deste universo. No âmbito da química de produtos naturais, o estudo fitoquímico de extratos vegetais e moléculas desta família é o enfoque principal das pesquisas. Além do estabelecimento do perfil químico, os objetivos destes estudos têm sido a confirmação de propriedades medicinais com vistas à validação do uso popular, a investigação detalhada de propriedades farmacológicas já conhecidas e a descoberta de substâncias bioativas frente a novos alvos biológicos (Da Costa, 2007).

Alguns exemplos de espécies de Asteraceae conhecidas no Brasil por suas propriedades medicinais são o guaco (*Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker), a carqueja [*Baccharis trimera* (Less.) DC.], o assa-peixe (*Vernonia polianthes* Less.), a calêndula (*Calendula officinalis* L.) e a marcela [*Achyrocline satureioides* (Lam.) DC.], dentre outras (Gupta, 1995; Teske e Trentini, 2001; Funk *et al.*, 2009). Diversos preparados obtidos de espécies medicinais não tão consagradas também têm sido utilizados pela população, porém a maioria ainda não teve sua ação farmacológica ou tóxica comprovada, tampouco os princípios ativos e marcadores conhecidos (Gupta, 1995; Teske e Trentini, 2001; Funk *et al.*, 2009).

As classes de moléculas mais investigadas de Asteraceae são os terpenoides e os compostos fenólicos que, além da diversidade estrutural, apresentam potencial farmacológico. Dentre os terpenoides, os diterpenos e as lactonas sesquiterpênicas (LSTs) são os mais estudados e, dentre os compostos fenólicos, destacam-se os flavonoides e, mais recentemente, os ácidos clorogênicos (ACGs) (Da Costa, 2007; Gobbo-Neto *et al.*, 2008).

Nos últimos dez anos, vários representantes de Asteraceae, medicinais ou não, foram coletados por integrantes de nosso grupo de pesquisa. Durante este período, mais de 20 delas foram investigadas quimicamente, tendo sido isoladas e identificadas várias LSTs e diterpenos, além de compostos fenólicos. As LSTs foram isoladas de extratos de lavagem de folhas ou flores, uma vez que estas moléculas

acumulam-se em glândulas na superfície destes órgãos, sendo facilmente extraídas através de lavagem com solventes orgânicos (Da Costa, 2007).

Em nossas investigações, o estudo do potencial farmacológico de extratos e de moléculas foi direcionado a três atividades: antiespasmódica, anti-inflamatória e antiparasitária. Os resultados possibilitaram descobrir que os diterpenos possuem intensa ação antiespasmódica (Ambrósio *et al.*, 2006) e que as LSTs têm potente ação anti-inflamatória (Arakawa *et al.*, 2008; Schorr *et al.*, 2002, 2005, 2007; Siedle *et al.*, 2004; Stefani *et al.*, 2006; Valério *et al.*, 2007). Com relação à atividade antiparasitária, observou-se que os diterpenos foram eficazes *in vitro* contra o *Trypanosoma cruzi* (Ambrósio *et al.*, 2008a; Da Costa *et al.*, 1996) e as LSTs contra *Leishmania* spp (Ambrósio, 2006).

Com relação à atividade anti-inflamatória, inicialmente foram realizados ensaios *in vitro* com várias LSTs isoladas de diferentes espécies, com o objetivo de selecionar substâncias promissoras. Empregou-se como alvo molecular a inibição da ativação do fator de transcrição nuclear NF- κ B, um regulador central das respostas imune e inflamatória humana através da regulação da transcrição de mediadores inflamatórios, tais como citocinas, ciclooxigenase 2 (COX-2) e óxido nítrico (NO) sintase (Schorr *et al.*, 2002, 2007; Siedle *et al.*, 2004; Stefani *et al.*, 2006). Também foi avaliada a inibição da protease elastase de neutrófilos humanos (Arakawa *et al.*, 2008; Schorr *et al.*, 2005). Dentre as moléculas analisadas, o furanoeliangolido budleína A, isolado de espécies de *Viguiera*, foi um dos mais ativos. Com base nestes resultados, a budleína A foi selecionada para o estudo *in vivo* das atividades anti-inflamatória e anti-nociceptiva induzidas por carragenina, utilizando-se ratos. Constatou-se que a substância apresentou as propriedades avaliadas através de um mecanismo dependente da inibição de produção de citocinas (Valério *et al.*, 2007). Todos estes ensaios foram importantes para estabelecer a atividade anti-inflamatória *in vitro* e *in vivo* de LSTs.

Com base no exposto, conclui-se que o potencial farmacológico de Asteraceae é elevado e que os resultados preliminares dos estudos de algumas plantas e de seus metabólitos são promissores. Entretanto, como a maioria das espécies possui LSTs, o que justifica sua ação farmacológica, em especial a anti-inflamatória, algumas delas podem também apresentar toxicidade quando ingeridas (Schmidt, 1999). Como exemplo, pode ser citada a arnica européia (*Arnica montana* L.), tendo LSTs como princípios ativos (Wesolowska *et al.*, 2006), a qual possui

atividade anti-inflamatória e é comercializada e recomendada para uso apenas na forma de preparados para uso tópico. No entanto, se de fato o uso oral destas espécies causar efeito tóxico, este ainda pode ser realizado, desde que seja viável a separação das substâncias tóxicas, como no caso dos extratos padronizados. Um exemplo é o *Ginkgo biloba* (Ginkgoácea), cujo extrato padronizado, entre outros componentes indesejáveis, não possui os ácidos ginkgólicos, os quais estimulam respostas alérgicas e outras reações tóxicas (Becker e Skipworth, 1995; Hausen, 1998).

Os anti-inflamatórios estão entre os agentes terapêuticos mais utilizados no mundo, porém apresentam algumas limitações com relação à sua potência, eficácia e efeitos adversos (Parente, 2000; Fiorucci *et al.*, 2001). Os AINEs (anti-inflamatórios não esteroidais) apresentam efeitos gastrintestinais adversos e os AINEs seletivos para COX-2 foram associados a alterações cardiovasculares pequenas, porém proeminentes em alguns pacientes (Parente, 2000; Boers, 2001). Os anti-inflamatórios esteroidais apresentam proeminentes efeitos adversos devido à ação comum aos esteroides. Já os recentes moduladores ou anti-citocinas (anti-IL-1 β e anti-TNF- α) são muito caros e a via de administração é subcutânea, pelo menos duas vezes por semana, o que diminui a adesão ao tratamento (Calixto *et al.*, 2004). Devido a esses inconvenientes, torna-se necessária a busca por substâncias naturais com potencial anti-inflamatório que possam dar origem a novos fármacos de baixo custo e com efeitos adversos reduzidos, ou que ao menos possam auxiliar no entendimento de mecanismos de ação.

Dados da literatura mostram que moléculas de origem vegetal apresentam importantes atividades anti-inflamatórias e que muitas de suas ações são relacionadas à habilidade de inibir a síntese ou ação de citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão, vias do ácido araquidônico e NO, além da inibição do NF- κ B (Calixto *et al.*, 2004; Werz, 2007).

As preparações de plantas, por sua vez, freqüentemente inibem mais de uma via de ação, maximizando os efeitos anti-inflamatórios e minimizando efeitos adversos (Schmitz e Bacher, 2005). Isso se deve ao fato de haver uma mistura de substâncias que podem agir sinergicamente ou antagonicamente, através de diferentes mecanismos de ação. Além disso, sugere-se que compostos derivados de plantas possam ser utilizados na forma de monopreparados ou em associação aos

medicamentos atuais, com o objetivo de diminuir custos e aumentar eficácia (Calixto *et al.*, 2004).

A espécie *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray, o margaridão, é uma planta que ocorre da América Central, tendo sido naturalizada nos trópicos. Também introduzida no Brasil, pode ser encontrada ao longo de rodovias e em terrenos baldios, sendo considerada planta invasora. As partes aéreas do margaridão tem sido utilizadas como planta medicinal em alguns países, incluindo o Brasil, evidenciando-se sua ação anti-inflamatória (Owoyele *et al.*, 2004), dentre várias outras (Tab. 1 e 2). As LSTs isoladas desta planta, além da ação anti-inflamatória, apresentam outras ações farmacológicas, como foi constatado por nosso grupo de pesquisas. O extrato de lavagem foliar, cujo perfil químico foi estabelecido, é rico em LSTs e apresentou as atividades fagoinibidora frente a larvas do lepidóptero *Chlosyne lacinia* (Ambrósio *et al.*, 2008b), ação antiespasmódica no músculo anococcígeo de ratos e propriedade leishmanicida frente a *Leishmania major* (Ambrósio *et al.*, 2007).

Em estudos de *Lychnophora ericoides* Mart. (Asteraceae), uma planta brasileira utilizada contra inflamação, popularmente denominada “arnica da serra”, o foco também havia sido as LSTs, entretanto, recentemente foi demonstrado pelos autores que polifenóis (C-glicosilflavonas e derivados de ácido cafeoilquínico) oriundos de extratos polares possuem atividade analgésica e anti-inflamatória (Gobbo-Neto *et al.*, 2008). O exemplo de *Dasyphyllum brasiliense* (Asteraceae), uma outra espécie medicinal nativa de cerrado, é ainda mais marcante, pois o efeito anti-inflamatório *in vivo* foi observado para o extrato aquoso, em modelo de peritonite aguda, entretanto a planta não possui LSTs, evidenciando mais uma vez que frações polares podem apresentar substâncias de interesse anti-inflamatório (Castelucci *et al.*, 2007). As principais substâncias do extrato aquoso desta espécie são derivados do ácido cafeoilquínico, revelando o enorme potencial anti-inflamatório dessas substâncias (Passoni *et al.*, 2008). No caso da *T. diversifolia*, a avaliação da ação anti-inflamatória foi realizada anteriormente com o extrato metanólico e aquoso das folhas (Owoyele *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 1993), ou com substâncias isoladas de frações de média polaridade, nas quais estão presentes as LSTs (Herrera *et al.*, 2007; Rüngeler *et al.*, 1998; García e Delgado, 2006) (Tab. 1). Cos *et al.* (2002b), avaliando a atividade antiviral, observou que o extrato metanólico inativo e citotóxico, após processo de fracionamento, forneceu fração aquosa ativa e

seletiva, sugerindo que compostos polares desta planta podem aumentar a chance de encontrar atividade e que componentes tóxicos podem até mesmo mascarar o efeito farmacológico de outras substâncias em um extrato bruto. O óleo essencial das partes aéreas nunca foi avaliado quanto à atividade anti-inflamatória, embora possua em sua composição substâncias com propriedades anti-inflamatórias (Moronkola *et al.*, 2007).

Apesar de se creditar às LSTs a atividade anti-inflamatória de *T. diversifolia*, o fato é que extratos polares podem revelar outras classes de substâncias ativas com o mesmo tipo de efeito, eventualmente, por outros mecanismos de ação. Portanto, há necessidade de se realizar estudos fitoquímicos e farmacológicos com a forma utilizada tradicionalmente (chá ou infuso – extrato aquoso) e extratos ricos em substâncias distintas e sem a presença de LSTs.

Em suma, com relação ao margaridão, a fim de que se possa afirmar se consumo do mesmo é eficaz, resta ainda analisar com detalhes o seu efeito anti-inflamatório, propor mecanismos de ação, verificar se a forma utilizada popularmente é realmente eficaz, avaliar a constituição química do extrato polar das folhas, determinar possíveis princípios ativos adicionais e comprovar se as LSTs são realmente as únicas substâncias responsáveis pela atividade anti-inflamatória da espécie. Dentro dessa abordagem, propõe-se neste trabalho realizar ensaios *in vitro* e *in vivo* do infuso, dos extratos de lavagem foliar (ELF), das folhas livre de tricomas - ELT (lavadas em solvente) e de óleo essencial. O extrato de lavagem foliar com solvente orgânico (ELF) é rico em LSTs, visto que tais substâncias ficam armazenadas em glândulas presentes na superfície das folhas, enquanto o extrato das folhas livres de tricomas - ELT (glândulas retiradas) não deve conter as LSTs, mas se for macerado com um solvente polar, muito provavelmente irá conter compostos fenólicos. Deve ser investigado ainda se os constituintes dos tricomas glandulares estão ou não dissolvidos em extratos aquosos por infusão. Desta forma, este estudo permite avaliar a melhor forma de preparar o chá pela população, a qual garanta eficácia.

Tabela 1. Extratos e substâncias de *Tithonia diversifolia* que apresentaram atividades biológicas.

Atividades biológicas	Extrato/Substância	Referências
Anti-inflamatória (inibição NF- κ B) (fase aguda e crônica) (modulação do complemento) (tópica) (inibe a geração superóxidos por neutrófilos) (inibe migração de leucócitos em colite induzida por ácido acético)	EA diversifolina, éter metílico de diversifolina, tirotundina EMeOH EEtOH 80% tagitinina A, tagitinina C 1,3-dihidróxi-3,10-epóxi-8-(2-metilpropanoilóxi)-germacra-1(13)-en-6 α ,12-olido; 1,3-dihidróxi-3,10-epóxi-8-(2-metilpropanoilóxi)-germacra-4,11(13)-dien-6 α ,12-olido; 1,3-dimetóxi-3,10-epóxi-8-(2-metilpropanoilóxi)-germacra-4,11(13)-dien-6 α ,12-olido; 1-hidróxi-3-metóxi-3,10-epóxi-8-(2-metilpropanoilóxi)-germacra-4,11(13)-dien-6 α ,12-olido ácido caurenico	Lin <i>et al.</i> , 1993 Rungeler <i>et al.</i> , 1998* Owoyele <i>et al.</i> , 2004 Cos <i>et al.</i> , 2002a* García e Delgado, 2006 Herrera <i>et al.</i> , 2007* Paiva <i>et al.</i> , 2003
Analgésica (origem inflamatória ou não inflamatória)	EMeOH	Owoyele <i>et al.</i> , 2004
Antimicrobiana (<i>Candida albicans</i> e algumas cepas de bactérias) (antibacteriana: <i>Bacillus megaterium</i> ¹ , antifúngica: <i>Microbotryum violaceum</i> ² e algicida: <i>Clorella fusca</i> ³) (moderada: <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Candida albicans</i> ; ligeira: <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Trichophyton mentagrophytes</i>) [antibacteriana: <i>S. aureus</i> (G+) ¹ , <i>Proteus vulgaris</i> (G-) ² , <i>Bacillus subtilis</i> (G+) ³ , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (G-) ⁴ , <i>Escherichia coli</i> (G-) ⁵ ; antifúngica: <i>Penicilium atrovenetium</i> ⁶ , <i>Aspergillus niger</i> ⁷ , <i>Geotrichum cadidum</i> ⁷ , <i>Fusarium flocciferum</i> ⁷] (<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>) (<i>B. subtilis</i>) (<i>B. cereus</i>)	frações sucessivas: <i>n</i> -hexano, AcOEt, MeOH; LST tipo germacrolido titoniaquinona A ^{1,2} psoraleno ^{1,2,3} tagitinina C EEtOH das flores ^{1,3,5,6,7} EA das flores ^{1,3,4,5,6,7} EEtOH das raízes ^{1,5,6,7} EA das raízes ^{1,2,3,4,5,6,7} EEtOH folhas ^{5,6,7} EA folhas ^{1,4,5,7} EA ^d diversifolina ácido caurenico	Obafemi <i>et al.</i> , 2006* Bouberte <i>et al.</i> , 2006* Ragasa <i>et al.</i> , 2007* Liasu e Ayandele, 2008* Kareru <i>et al.</i> , 2008 Rungeler <i>et al.</i> , 1998 Wilkens <i>et al.</i> , 2002
Antiviral (HIV) (HSV-1 e HSV-2)	Fração Aquosa EA ^d	Cos <i>et al.</i> , 2002b* Chiang <i>et al.</i> , 2004*
Antidiarréica (ação antibacteriana ¹ , antiamoébia ² e antispasmodica ³)	EA ^{m1,2,3} fração polifenólica ³	Tona <i>et al.</i> , 1999*; 1998* Tona <i>et al.</i> , 2000*
Antiespasmódica e vaso-relaxante	ácido caurenico	Oliveira <i>et al.</i> , 2008; Ambrósio <i>et al.</i> , 2004; Tirapelli <i>et al.</i> , 2002, 2004
Leishmanicida	ELF, LSTs	Ambrósio, 2006; <i>et al.</i> 2007;

Tabela 2. Continuação da Tabela 1.

Atividades biológicas	Extrato/Substância	Referências
Antimalárica (antes da infecção, infecção residual e estabelecida) (estágio sanguíneo e hepático, exoeritrocítico)	ET, tagitinina C 70% EtOH fração éter de petróleo MeOH, EA	Goffin <i>et al.</i> , 2002* Elufioye e Agbedahunsi, 2004** Do Céu Madureira <i>et al.</i> , 2002* Oyewole <i>et al.</i> , 2008
Antidiabética	80 % EtOH EA ácido caurenoico	Miura <i>et al.</i> , 2005 Miura <i>et al.</i> , 2002 Bresciani <i>et al.</i> , 2004 Takahashi, 1998 Patente
Citotoxicidade (células MT-4) (células leucêmicas promielocíticas humanas HL-60) (39 linhagens de células cancerosas) (células leucêmicas mielogênicas humanas K-562 e de carcinoma de colon HCT-15) (células de câncer cervical HeLa e de ovário de ramster chinês CHO) (genotoxicidade em células V-79) (células leucêmicas CEM, de câncer de mama MCF-7, de câncer de cólon HCT-8 e hemácias)	EEtOH (80 %); Fração AcOEt; Fração éter de petróleo 15 substâncias 1β –metóxidiversifolina 3-O-metil éter acetiltagitinina; tagitinina F tagitinina A, tagitinina C fração em diclorometano do EEtOH ácido caurenoico ácido caurenoico	Cos <i>et al.</i> , 2002b* Kuroda <i>et al.</i> , 2007* Wu <i>et al.</i> , 2001* García e Delgado 2006* Chavez <i>et al.</i> , 1997* Cavalcante <i>et al.</i> , 2005 Costa-Lotufo <i>et al.</i> , 2002 Shashida <i>et al.</i> , 2007 Patente
Toxicidade [hematológica, bioquímica e histopatológica (fígado e rins); em ratos] (aumento do peso renal, mas nenhuma toxicidade hematológica e peso normal do coração, fígado e baço; em porcos) (DL ₅₀ 120 mg/kg, dose máxima tolerada 100 mg/kg, redução de peso, leves lesões de pele e alteração hematológica; em ratos) (baixo índice de sobrevivência; em camundongo) (proteção lesões hepáticas em ratos) (alterações no fígado, no rim e hematológicas; em ratos)	EA ^m planta seca triturada 20% EA ^p 70% EEtOH EA 70% EEtOH	Fankule e Abatan <i>et al.</i> , 2007 Olayeni <i>et al.</i> , 2006 Oyewole <i>et al.</i> , 2007 Elufioye e Agedahunsi, 2004 Lin <i>et al.</i> , 1993 Elufioye <i>et al.</i> , 2009
Bioinsectida (interfere na oviposição, adulto emergência e mortalidade) (inibe alimentação)	95% EEtOH fervido por 30 min face abaxial das folhas; ECH ₂ Cl ₂	Adedire e Akinneye, 2004 Ambrósio <i>et al.</i> , 2008b
Alelopatia	hispidulina > tagitinina A > tagitinina C	Baruah <i>et al.</i> , 1994; Tongma <i>et al.</i> , 2001;

Extrato aquoso (EA), Extrato etanólico (EEtOH), Extrato etéreo (ET), Extrato metanólico (EMeOH), Extrato diclorometânico (ECH₂Cl₂); Metanol (MeOH); Acetato etila (AcOEt); ^ddecocto, ^mmacerado, ^pprensado; * *in vitro*;

**sugere toxicidade.

5. CONCLUSÕES

O sucesso na obtenção de extratos que refletem diferentes classes de metabólitos secundários de *T. diversifolia*, avaliados por ensaios anti-inflamatórios *in vivo* e *in vitro*, permitiu concluir que as lactonas sesquiterpênicas (LSTs) não são as únicas substâncias que contribuem para atividade anti-inflamatória da planta. Pela primeira vez se caracterizou quimicamente o extrato polar desta planta (ELT), que demonstrou ser rico em ácidos clorogênicos (ACGs). Tal extrato surpreendentemente demonstrou atividade e mecanismo de ação superior aos do ELF (rico em LSTs e algumas flavonas) e dos fármacos de referência utilizados, a indometacina e o Acheflan[®]. A partir do estudo com o óleo essencial das partes aéreas da planta, foi possível determinar que outra classe de substâncias desta planta também apresenta atividade anti-inflamatória: os terpenos do óleo essencial. Assim, pode-se afirmar que *T. diversifolia* apresenta diferentes classes de substâncias com propriedades anti-inflamatórias e que agem por diferentes mecanismos de ação.

Além disso, foi possível observar que a toxicidade dos extratos testados por via oral foi menor que a apresentada pelo fármaco de referência correntemente utilizado na terapêutica. Portanto, estudos de toxicidade sub-crônica dos mesmos se encontram em andamento a fim de se determinar seu risco-benefício.

Foi possível também concluir que embora as plantas apresentem princípios ativos, a forma de preparar seus extratos influencia na atividade. O infuso (EA), composto pelas mesmas substâncias presentes nos demais extratos (ELF e ELT), apresentou propriedade anti-inflamatória inferior a estes, agindo apenas pela inibição da produção de TNF- α e do recrutamento de células inflamatórias. Sugere-se que até mesmo o calor em meio aquoso possa favorecer a extração de algum componente não extraído nos demais extratos, ou mesmo o surgimento de algum produto de degradação, o qual não foi detectado pelas técnicas analíticas utilizadas e que possa exercer atividade antagonista. Portanto, a utilização do infuso *a priori* não é recomendada.

Os mecanismos de ação propostos ainda permitiram definir que as LSTs e/ou flavonas, assim como os ACGs tem potencial anti-inflamatório e não produzirão os mesmos efeitos colaterais dos anti-inflamatórios não esteroidais atuais, por inibirem tanto a formação de edema quanto o recrutamento de células inflamatórias. Além

disso, o efeito sinérgico entre compostos polares e LSTs foi evidenciado pela avaliação da mistura dos extratos ELF e ELT, pelo menos com relação à inibição da produção de NO.

Destaca-se por fim que foi possível identificar mais de 20 substâncias de *T. diversifolia*, que todos os extratos foram caracterizados quimicamente, todos os objetivos propostos foram alcançados e o isolamento de LSTs permitiu identificar aquelas majoritárias no extrato de lavagem foliar anti-inflamatório, além de enriquecer o banco de padrões do laboratório. As LSTs isoladas ainda serão utilizadas, juntamente com os extratos e flavonas e ACGs, em estudos adicionais para a investigação de mecanismos de ação e sinergismos, após procedimentos de melhor purificação das mesmas. Em suma, a reunião de todos os resultados obtidos, após a realização deste trabalho, demonstrou que *T. diversifolia* é de fato promissora para o desenvolvimento de fitoterápicos e como fonte de diversas substâncias anti-inflamatórias que merecem um estudo mais aprofundado.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, R.P. 1995. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**. Carol stream, Allured Publishing Corporation, Illinois.
- Adedire, C.O.; Akinneye, J.O. 2004. Biological activity of tree marigold, *Tithonia diversifolia*, on cowpea seed bruchid, *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Annals of Applied Biology**, v. 144, p. 185-189.
- Ambrósio, S.R. 2006. Aspectos fitoquímicos, sazonais e ecológicos de *Tithonia diversifolia*. **Tese de Doutorado**. Departamento de Química, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
- Ambrósio, S.R.; Arakawa, N.S.; Esperandim, V.R.; Albuquerque, S.; Da Costa, F.B. 2008a. Trypanocidal activity of pimarane diterpenes from *Viguiera arenaria* (Asteraceae). **Phytotherapy Research**, v. 22, p. 1413-1415.
- Ambrósio, S.R.; Oki, Y.; Heleno, V.C.; Chaves, J.S.; Nascimento, P.G.; Lichston, J.E.; Constantino, M.G.; Varanda, E.M.; Da Costa, F.B. 2008b. Glandular trichomes of *Tithonia diversifolia*: relationships to herbivory and antifeedant activity. **Phytochemistry**, v. 69, p. 2052–2060.
- Ambrósio, S.R.; Tirapelli, C.R.; Coutinho, S.T.; de Oliveira, D.C.R.; de Oliveira, A.M.; Da Costa, F.B. 2004. Role of the carboxylic group in the antispasmodic and vasorelaxant action displayed by kaurenoic acid. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, p. 1407-1413.
- Ambrósio, S.R.; Tirapelli, C.R.; Da Costa, F.B.; Oliveira, A.M. 2006b. Kaurane and pimarane-type diterpenes from the *Viguiera* species inhibit vascular smooth muscle contractility. **Life Sciences**, v. 79, p. 925-933.
- Ambrósio, S.R.; Toledo, J.S.; Toledo, T.C.I.; Cerri, D.G.; Lopes, W.; Cruz, A.K., Da Costa, F.B. 2007. Atividade leishmanicida de LSTs de *Tithonia diversifolia* (Asteraceae). In: **30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**. Águas de Lindóia, SP. Resumos.
- Arakawa, N.S.; Schorr, K.; Ambrósio, S.R.; Merfort, I.; Da Costa, F.B. 2008. Further sesquiterpene lactones from *Vigueira robusta* and the potential anti-inflammatory activity of a heliangolide: inhibition of human neutrophil elastase release. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 63c, p. 533-538.

Baruah, N.C.; Sarma, J.C.; Barua, N.C.; Sarma, S.; Sharma, R.P. 1994. Germination and growth inhibitory sesquiterpene lactones and a flavone from *Tithonia diversifolia*. **Phytochemistry**, v. 36, p. 29-36.

Boers, M. 2001. NSAIDS and selective COX-2 inhibitors: competition between gastroprotection and cardioprotection. **The Lancet**, v. 357, p. 1222-1223.

Bouberte, M.Y.; Krohn, K.; Hussain, H.; Dongo, E.; Schulz, B.; Hu, Q. 2006 Tithoniaquinone A and tithoniamide B: a new anthraquinone and a new ceramide from leaves of *Tithonia diversifolia*. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 61b, p. 78-82.

Becker, L.E.; Skipworth, G.B. 1975. Ginkgo - tree dermatitis, stomatitis, and proctitis. **Journal of the American Medical Association**, v. 231, p. 1162-1163.

Bradley, P.P.; Priebat, D.A.; Christensen, R.D.; Rothstein, G. 1982. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 78, p. 206-209.

Bresciani, L.F.V.; Yunes, R.A.; Bürger, C.; De Oliveira, L.E.; Bóf, K.L.; Cechinel-Filho, V. 2004. Seasonal variation of kaurenoic acid, a hypoglycemic diterpene present in *Wedelia paludosa* (*Acmela brasiliensis*) (Asteraceae). **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 59c, p. 229-232.

Calixto, J.B.; Campos, M.M.; Otuki, M.F.; Santos, A.R. 2004. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. **Planta Medica**, v. 70, p. 93-103.

Calixto, J.B.; Otuki, M.F.; Santos, A.R. 2003. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor κ B (NF- κ B). **Planta Medica**, v. 69, p. 973-983.

Calixto, J.B.; Siqueira Jr., J.M. 2008. The drug development in Brazil: challenges. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 78, p. 98-106.

Casarett, L.J.; Klaassen, C.D. Doull, J. 2008. **Toxicology: the basic science of poisons**. McGraw-Hill Professional, EUA.

Castelucci, S.; Rogério, A.P.; Ambrósio, S.R.; Arakawa, N.S.; de Lira, S.P.; Faccioli, L.H.; Da Costa, F.B. 2007. Anti-inflammatory activity of *Dasyphyllum brasiliensis* (Asteraceae) on acute peritonitis induced by beta-glucan from *Histoplasma capsulatum*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 192-198.

Cavalcanti, B.C.; Costa-lotufo, L.V.; Moraes, M.O.; Burbano, R.R.; Silveira, E.R.; Cunha, K.M.A.; Rao, V.S.N.; Moura, D.J.; Rosa, R.M.; Henriques, J.A.P.; Pessoa, C. 2006. Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in Copaiba oil. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 388-392.

Chavez, P.I.; Sánchez, I.A.; González, F.A.; Rodríguez, J.L.; Axelrod, F. 1997. Cytotoxicity correlations of puerto rican plants using a simplified brine shrimp lethality screening procedure. **Pharmaceutical Biology**, v. 35, p. 222-226.

Chiang, L.C.; Cheng, H.Y.; Chen, C.C.; Lin, C.C. 2004. In vitro anti-leukemic and antiviral activities of traditionally used medicinal plants in Taiwan. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 32, p. 695–704.

Chowdhury, P.K; Sharma, R.P.; Baruah, J.N. 1983. Photocyclization of a heliangolide - a cyclodecadienone. **Tetrahedron Letters**, v. 24, p. 5429-5432.

Coll, J.C.; Bowden, B.F. 1986. The application of vacuum liquid chromatography to the separation of terpene mixtures. **Journal of Natural Products**, v. 49, p. 934-936.

Cos, P.; Hermans, N.; Van Poel, B.; De Bruyne, T.; Apers, S.; Sindambiwe, J.B.; Vanden Berghe, D.; Pieters, L.; Vlietinck, A.J. 2002a. Complement modulating activity of Rwandan medicinal plants. **Phytomedicine**, v. 9, p. 56–61.

Cos, P.; Hermans, N.; De Bruyne, T.; Apers, S.; Sindambiwe, J.B.; Witvrouw, M.; De Clercq, E.; Vanden Berghe, D.; Pieters, L.; Vlietinck, A. J. 2002b. Antiviral activity of Rwandan medicinal plants against human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1). **Phytomedicine**, v. 9, p. 62–68.

Costa-Lotufo, L.V.; Cunha, G.M.A.; Farias, P.A.M.; Viana, G.S.B.; Cunha, K.M.A.; Pessoa, C.; Moraes, M.O.; Silveira, E.R.; Gramosa, N.V.; Rao, V.S.N. 2002. The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. **Toxicon**, v. 40, p. 1231-1234.

Da Costa, F.B. 2007. Quimiotaxonomia e potencial farmacológico de Asteraceae do cerrado (Simpósio: Estudos Multidisciplinares de Asteraceae). In: **58° Congresso Nacional de Botânica**, São Paulo. A botânica no Brasil: pesquisa, ensino e políticas públicas ambientais. São Paulo: Imprensa Oficial do estado de São Paulo, p. 246-250.

Da Costa, F.B. Albuquerque, S.; Vichnewski, W.; 1996. Diterpenes and synthetic derivatives from *Viguiera aspilioides* with trypanomicidal activity. **Planta Medica**, v. 62, p. 557-559.

Di Rosa, 1972. Biological properties of carrageenan. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 24, p. 89-102.

Dirsch, V.M.; Stuppner, H.; Ellmerer-Mueller, E.P.; Vollmar, A.M. 2000. Structural requirements of sesquiterpene lactones to inhibit LPS-induced nitric oxide synthesis in RAW 264.7 macrophages. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 8, p. 2747-2753.

Do Céu de Madureira, M.; Martins, A.P.; Gomes, M.; Paiva, J.; Da Cunha, A.P.; Do Rosário, V. 2002. Antimalarial activity of medicinal plants used in traditional medicine in S. Tomé and Príncipe islands. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, p. 23-29.

Elufioye, T.O.; Agbedahunsi, J.M. 2004. Antimalarial activities of *Tithonia diversifolia* (Asteraceae) and *Crossopteryx febrifuga* (Rubiaceae) on mice *in vivo*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93, p. 167-171.

Elufioye, T.O.; Alatise, O.I.; Fakoya, F.A.; Agbedahunsi, J.M.; Houghton, P.J. 2009. Toxicity studies of *Tithonia diversifolia* A. Gray (Asteraceae) in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, p. 410-415.

Fankule, J.O.; Abatan, M.O. 2007. The toxicological effects of aqueous leaf extract of *Tithonia diversifolia* Gray in rats. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 6, p. 1223-1226.

Fernandes, E.S.; Passos, G.F.; Medeiros, R.; Cunha, F.M.; Ferreira, J.; Campos, M.M.; Pianowski, L.F.; Calixto, J.B. 2007. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-*trans*-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **European Journal of Pharmacology**, v. 569, p. 228-236.

Ferreira, S.H.; Vane, J.R. 1974. New aspects of the mode of action of nonsteroid anti-inflammatory drugs. **Review of Pharmacology**, v. 14, p. 57-73.

Fiorucci, S.; Meli, R.; Bucci, M.; Cirino, G. 2001. Dual inhibitors of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase. A new avenue in anti-inflammatory therapy? **Biochemical Pharmacology**, v. 62, p. 1433.

Fischer, H.D.; Fischer, N.H.; Franck, R.W.; Olivier, E.J. 1979. **Progress in the chemistry of organic natural products**. Springer-Verlag, Wien-New York, v. 38.

Funk, V.A.; Susanna, A.; Stuessy, T.F.; Bayer, R.J. 2009. **Systematics, Evolution, and Biogeography of Compositae**. Internacional Association for Plant Taxonomy. Viena, Austria.

García, A.; Delgado, G. 2006. Constituents from *Tithonia diversifolia*. Stereochemical revision of 2 α -hydroxytirotondin. **Journal of Mexican Chemical Society**, v. 50, p. 180-183.

Gobbo-Neto, L.; dos Santos, M.D.; Albarella, L.; Zollo, F.; Pizza, C.; Lopes, N.P. 2008. Glycosides, caffeoylquinic acids and flavonoids from the polar extract of leaves of *Lychnophora ericoides* Mart. (Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 36, p. 473-465.

Gobbo-Neto, L.; Lopes, N.P. 2008. 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.

Goffin, E.; Ziémosn, E.; De Mol, P.; Madureira, M. C.; Martins, A. P.; Proença da Cunha, A.; Philippe, G.; Tits, M.; Angenot, L.; Frederich, M. 2002. *In vitro* antiparasitic activity of *Tithonia diversifolia* and identification of its main active constituent: tagitinin C. **Planta Medica**, v. 68, p. 543-545.

Goffin, E.; Cunha, A.P.; Ziemons, E.; Tits, M.; Angenot, L.; Frederich, M. 2003. Quantification of tagitinin C in *Tithonia diversifolia* by reversed-phase high performance liquid chromatography. **Phytochemical Analysis**, v. 14, p. 378–380.

Gu, J.; Gills, J. J.; Park, E. J.; Mata-Greenwood; Hawthorne, M. E.; Axelrod, F.; Chavez, P. I.; Fong, H. H. S.; Mehta, R.; Pezzuto, J. M.; Kinghorn, A. D. 2002. Sesquiterpenoids from *Tithonia diversifolia* with potential cancer chemopreventive activity. **Journal of Natural Products**, v. 65, p. 532-536.

Gupta, M.P. 1995. **270 Plantas Medicinales Iberoamericanas**. Convenio Andres Bello (CYTED, SECAB, UNESCO), Bogota, Colombia.

Hausen, B.M. 1998. The sensitizing capacity of ginkgolic acids in guinea pigs. **American Journal of Contact Dermatitis**, v. 9, p. 146-148.

Herrera, J.; Troncone, G.; Sánchez, M.R.; Miguel, V.; Lopez, S.E. 2007. The effect of furanoheliangolides from *Tithonia diversifolia* on superoxide anion generation in human neutrophils. **Fitoterapia**, v. 78, p.465-469.

Heywood, V.H.; Harborne, J.B.; Turner B.L. 1977. **The biology and Chemistry of the Compositae**.: Academic Press, New York-London vol. 1 e 2.

Ismail, T.S.; Gopalakrishnan, S.; Begum, V.H.; Elango, V. 1997. Anti-inflammatory activity of *Salacia oblonga* Wall. And *Azima tetraacantha* Lam. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 56, p. 145-152.

Játem-Lászer, A.; Ricardi, M.C.; Adamo, G. 1998. Herbal traditional medicine of Venezuelan Andes: an ethnopharmacological study. **Phytotherapy Research**, v. 12, p. S53–S59.

Kadoma, Y.; Fushisawa, S. 2008. A comparative study of the radical-scavenging activity of the phenolcarboxylic acids caffeic acid, p-coumaric acid, chlorogenic acid and ferulic acid, with or without 2-mercaptoethanol, a thiol, using the induction period method. **Molecules**, v. 13, p. 2488-2499.

Kareru, P.G.; Gachanja, A.N.; Keriko, J.M.; Kenji, G.M. 2008. Antimicrobial activity of some medicinal plants used by herbalists in eastern province, Kenya. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 5, p. 51-55.

Kelsey, R.G; Locken, L.J. 1987. Phytotoxic properties of cnicin, a sesquiterpene lactone from *Centaurea maculosa* (spotted knapweed). **Journal of Chemical Ecology**, v. 13, p. 19-33.

Kim, H.K; Cheon, B.S.; Kim, Y.H.; Kim, S.Y.; Kim, H.P. 1999. Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7 and their structure–activity relationships. **Biochemical Pharmacology**, v. 58, p. 759–765.

Kuroda, M.; Yokosura, A.; Kobayashi, R.; Jitsuno, M.; Kando, H.; Nosaka, K.; Ishii, H.; Yamori, T.; Mimaki, Y. 2007. Sesquiterpenoids and flavonoids from the aerial parts of *Tithonia diversifolia* and their cytotoxic activity. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 55, v. 1240-1244.

Li, Q.; You, Y.; Chen, Z.; Zou, P. 2009. COX-2/12-LOX dual pathway, a novel strategy for treatment of multiple myeloma? **Bioscience Hypotheses**, v. 2, p. 81-84.

Liasu, M.O.; Ayandele, A.A. 2008. Antimicrobial activity of aqueous and ethanolic extracts from *Tithonia diversifolia* and *Bryum Coronatum* collected from Ogbomoso, Oyo State. Nigeria. **Advances in Natural and Applied Sciences**, v. 2, p. 31-34.

Liles, W.C., Voorhis, W.C.V. 1995. Nomenclature and biologic significance of cytokines involved in inflammation and the host immune response. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 172, p. 1573.

Lin, C.C.; Lin, M.L.; Lin, J.M. 1993. The antiinflammatory and liver protective effect of *Tithonia diversifolia* (Hemsl) gray and dicliptera-chinensis juss extracts in rats. **Phytotherapy Research**, v. 7, p. 305-309.

Li-Weber, M.; Palfi, K.; Giaisi, M.; Krammer, P.H. 2005. Dual role of the anti-inflammatory sesquiterpene lactone: regulation of life and death by parthenolide. **Cell Death and Differentiation**, v. 12; p. 408-409.

Makarov, S.S. 2000. NF-kB as a therapeutic target in chronic inflammation: recent advances. **Molecular Medicine Today**, v. 6, p. 441-448.

Matsuda, H.; Morikawa, T.; Ando, S.; Toguchida, I.; Yoshikawa, M. 2003. Structural requirements of flavonoids for nitric oxide production inhibitory activity and mechanism of action. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 1995-2000.

Middleton Jr., E; Kandaswami, C.; Theoharides, T.C. 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacological Reviews**, v. 52, p. 673-751.

Miura T.; Furuta K.; Yasuda A.; Iwamoto N.; Kato M.; Ishihara E.; Ishida T.; Tanigawa, K. 2002. Antidiabetic Effect of Nitobegiku in KK-Ay diabetic Mice. **The American Journal of Chinese Medicine**. v. 30, p. 81-86.

Miura, T.; Nosaka, K.; Ishii, H.; Ishida, T. 2005. Antidiabetic effect of nitobegiku, the herb *Tithonia diversifolia*, in KK-Ay diabetic mice. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, p. 2152-2154.

Moronkola, D.O.; Ogunwande, I.A.; Walker, T.M.; Setzer, W.N.; Oyewole, I.O. 2007. Identification of main volatile compounds in the leaf and flower of *Tithonia diversifolia* (Hemsl) Gray, **Journal of Natural Medicines**, v. 61, p. 63-66.

Obafemi, C. A.; Sulaimon, T. O.; Akipelu, D. A.; Olugbade. 2006. Antimicrobial activity of extracts and a germacranolidetype sesquiterpene lactone from *Tithonia diversifolia* leaf extract. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 1254-1258.

Oga, S.; Batistuzzo, J.A.O.; Camargo, M.M.A. 2008. **Fundamentos de toxicologia**, Atheneu, Sao Paulo, 3ª edição.

Olayeni, T.B.; Farinu, G.O.; Togun, V.A.; Adedeji, O.S.; Aderinola, A.O. 2006. Performance and haematological characteristics of weaner pigs fed wild sunflower (*Tithonia diversifolia* Hemsl. A Gray) leaf meal. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 5, p. 499-502.

de Oliveira, A.M.; Tirapelli, C.R.; Ambrósio, S.R.; da Costa, F.B. 2008. Diterpenes: a therapeutic promise for cardiovascular diseases. **Recent Patents on Cardiovascular Drug Discovery**, v. 3, p. 1-8.

Owoyele, V.B.; Wuraola, C.O.; Soladoye, A.O.; Olaleye, S.B. 2004. Studies on the anti-inflammatory and analgesic properties of *Tithonia diversifolia* leaf extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, p. 317-321.

Oyewole, I.O.; Ibidapo, C.A.; Moronkola, D.O.; Oduola, A.O.; Adeoye, G.O.; Anyasor, G.N.; Obansa, J.A. 2008. Anti-malarial and repellent activities of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) leaf extracts. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 2, p. 171-175

Oyewole, I.O.; Magaji, Z.J.; Awoyinka, O.A. 2007. Biochemical and toxicological studies of aqueous extract of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) leaves in wister albino rats. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 1, p. 030-033.

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

Paiva, L.A.F.; Gurgel, L.A.; Silva, R.M.; Tome', A.R.; Gramosa, N.V.; Silveirab, E.R. ; Santos, F.A.; Rao, V.S.N. 2003. Anti-inflammatory effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on acetic acid-induced colitis in rats. **Vascular Pharmacology**, v. 39, p. 303-307.

Passoni, F.D.; Carollo, C.A.; Gobbo-Neto, L.; Castelucci, S.; Da Costa, F.B. 2008. Polifenóis na fração ativa de espinho-agulha (*Dasyphyllum brasiliense*, Asteraceae), uma planta medicinal com atividade anti-inflamatória. In: **31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**. Águas de Lindóia - SP. Resumos.

Petellier, S. W.; Chokshi, H.P.; Desai, H.K. 1986. Separation of separation of diterpenoid alkaloid mixtures using vacuum liquid chromatography. **Journal of Natural Products**, v. 49, p. 892-900.

Picman, A.K.; Ranieri, R.L., Towers, G.H.N., Lam, J. 1980. Visualization reagents for sesquiterpene lactones and polyacetylene on thin layer chromatograms. **Journal of Chromatography**. v. 189, p. 187-198.

Posadas, I.; Bucci, M.; Roviezzo, F.; Rossi, A.; Parente, L.; Sautebin, L.; Cirino, G. 2004. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. **British Journal of Pharmacology**, v. 142, p. 331-338.

Ragasa, C.; Tepora, M. M.; Rideout, J. A. 2007. Terpenoids from *Tithonia diversifolia*. **Journal of Research in Science, Computing, and Engineering**, v, 4, p. 1-7.

Rang, H.P.; Dale, M.M.; Ritter, J.M.; Moore, P.K. 2004. **Farmacologia**. Elsevier Editora Ltda, Rio de Janeiro. Tradução da 5ª Edição americana.

Rao, T.S.; Currie, J.L.; Shaffer, A.F.; Isakson, P.C. 1993. Comparative evaluation of arachidonic acid (AA)- and tetradecanoylphorbol acetate (TPA)-induced dermal inflammation. **Inflammation**, v. 17, p. 723-741.

Rüngeler, P.; Lyss, G.; Castro, V.; Mora, G.; Pahl, H.L.; Merfort, I. 1998. Study of three sesquiterpene lactones from *Tithonia diversifolia* on their anti-inflammatory activity using the transcription factor NF-kappa B and enzymes of the arachidonic acid pathway as targets. **Planta Medica**, v. 64, p. 588-593

Salminen, A.; Lehtonen, M.; Suuronen, T.; Kaarniranta, K.; Huuskonen, J. 2008. Terpenoids: natural inhibitors of NF-kB signaling with anti-inflammatory and anticancer potential. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, p. 2979-2999.

Salvemini, D.; Wang, Z.Q.; Wyatt, P.S.; Bourdon, D.M.; Marino, M.H.; Manning, P.T.; Currie, M.G. 1996. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v. 118, p.829-838.

Samuelsson, B. 1983. Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. **Science**, v. 220, p. 568-575.

Santos, M.D.; Almeida, M.C.; Lopes, N.P.; Souza, G.E.P. 2006. Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the natural polyphenol chlorogenic acid. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, p. 2236-2240.

Scapini, P.; Lapinet-Vera, J.A.; Gasperini, S.; Calzetti, F.; Bazzoni, F.; Cassatella, M.A. 2000 The neutrophil as a cellular source of chemokines. **Immunological Reviews**, v. 177, p. 195-203.

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

Schmitz, L.M.; Bacher, S. 2005. Novel molecular targets in the search for anti-inflammatory agents. **Phytochemistry Reviews**, v. 4, p. 19-25

Schorr, K.; Da Costa, F.B. 2005. Quantitative determination of enhydrin in leaf rinse extracts and in glandular trichomes of *Smallanthus sonchifolius* (Asteraceae) by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Phytochemical Analysis**, v. 16, p. 161-165.

Schorr, K.; García-Piñeres, A.J.; Siedle, B.; Merfort, I.; Da Costa, F.B. 2002. Guaianolides from *Viguiera gardneri* inhibit the transcription factor NF- κ B. **Phytochemistry**, v. 60, p. 733-740.

Schorr, K.; Merfort, I.; Da Costa, F.B. 2007. A novel dimeric melampolide and further terpenoids from *Smallanthus sonchifolius* (Asteraceae) and the inhibition of the transcription factor NF- κ B. **Natural Product Communications**, v. 2, p. 367-374.

Schorr, K.; Rott, A.; Da Costa, F.B.; Merfort, I. 2005. Optimisation of a human neutrophil elastase assay and investigation of the effect of sesquiterpene lactones. **Biologicals**, v. 33, p. 175-184.

Schuster, A.; Castro, V.; Poveda, L.; Papastergiou, F.; Jakupovic, J. 1992. Sesquiterpene lactones from *Koanophyllon albicaule*. **Phytochemistry**, v. 31, p. 3143-3146.

Shan, J.; Fu, J.; Zhao, Z.; Kong, X.; Huang, H.; Luo, L.; Yin, Z. 2009. Chlorogenic acid inhibits lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression in RAW264.7 cells through suppressing NF- κ B and JNK/AP-1 activation. **International Immunopharmacology**, v. 9, p. 1042-1048.

Shashida, *et al.* Jun. 7, 2007. Novel compound and pharmaceutical composition. **US Patent Number** 2007/0129427 A1.

Siedle, B.; García-Piñeres, A.J.; Murillo, R.; Schulte-Monting, J.; Castro, V.; Rüngeler, P.; Klass, C.A.; Da Costa, F.B.; Kisiel, W.; Merfort, I. 2004. 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.

Silverstein, R.M.; Bassler, G.C.; Morrill, T.C. 1979. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Editora Guanabara Dois, Rio de Janeiro, 3ª edição.

Simões, C.M.O; Schenkel, E.P.S.; Gosman, G.; Mello, J.C.P; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. 2007. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Editora da UFRGS e UFSC, Porto Alegre-Florianópolis, 6ª edição.

Soliman, K.F.A.; Soliman, M.R.I.; Owasoyo, J.O.; Walker, C.A. 1983. Diurnal variation in the phlogogenic response of rats to inflammatory agents. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 35, p. 388-389.

Solomons, T.W.G.; Fryhle, C. 2005. **Química orgânica**. Editora LTC, Rio de Janeiro, 8ª edição, v. 1.

Spring, O.; Zipper, R.; Reeb, S.; Vogler, B.; Da Costa, F.B. 2001. Sesquiterpene lactones and a myoinositol from glandular trichomes of *Viguiera quinqueremis* (Heliantheae; Asteraceae). **Phytochemistry**, v. 57, p. 267-272.

Stefani, R.; Schorr, K.; Tureta, J.M.; Vichnewski, W.; Merfort, I.; Da Costa, F.B. 2006. Sesquiterpene lactones from *Dimerostemma* species (Asteraceae) and *in vitro* potential anti-inflammatory activities. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 61c, p. 647-652.

Sticher, O. 2008. Natural product isolation. **Natural Product Reports**, v. 25, p. 517–554

Still, W.C.; Kahn, M.; Mitra, A. 1978. Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 43, p. 2923-2925.

Takahashi, M. 1998. Compositions for curing diabetes mellitus, processes for the preparation of same, and usage of same. **US Patent Number** 5,773,004, 30 Jun 1998.

Teske, M.; Trentini, A.M. 2001. **Herbarium, Compêndio de Fitoterapia**. Ed. Herbarium, Curitiba, 3ª edição.

Tirapelli, C.R.; Ambrósio, S.R.; Da Costa, F.B.; de Oliveira A.M. 2002. Inhibitory action of kaurenoic acid from *Viguiera robusta* (Asteraceae) on phenylephrine-induced rat carotid contraction. **Fitoterapia**, v. 73, p. 56-62.

Tirapelli, C.R.; Ambrósio, S.R.; Costa, F.B.; Coutinho, S.T.; de Oliveira, D.C.R.; Oliveira, A.M. 2004. Analysis of the mechanisms underlying the vasorelaxant action of kaurenoic acid in the isolated rat aorta. **European Journal of Pharmacology**, v. 492, p. 233-241.

Tona, L.; Kambu, K.; Mesia, K.; Cimanga, K.; Apers, S.; De Bruyne, T.; Pieters, L.; Totté, J.; Vlietinck, A.J. 1999. Biological screening of traditional preparations from some medicinal plants used as antidiarrhoeal in Kinshasa, Congo. **Phytomedicine**, v. 6, p. 59-6

Tona, L.; Kambu, K.; Ngimbi, N.; Cimanga, K.; Vlietinck, A.J. 1998. Antiamoebic and phytochemical screening of some Congolese medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 61, p. 57–65.

Tona,L.; Kambu,K.; Ngimbi,N.; Mesia,K.; Penge,O.; Lusakibanza,M.; Cimanga,K.; De,Bruyne T.; Apers,S.; Totte,J.; Pieters,L.; Vlietinck,A.J. 2000. Antiamoebic and spasmolytic activities of extracts from some antidiarrhoeal traditional preparations used in Kinshasa, Congo. **Phytomedicine**, v. 7, p. 31-8

Tongma, S.; Kobayashi, K.; Usui, K. 2001. Allelopathic activity of Mexican sunflower (*Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray) in soil under natural field conditions and different moisture conditions. **Weed Biology and Management**, v. 1, p. 115-119.

Tubaro, A.; Dri, P.; Delbello, G.; Zilli, C.; Loggia, R.D. 1985. The croton oil ear test revisited. **Agents and Actions**, v. 17, p. 347-349.

Valério, D.; Cunha, T.M.; Arakawa, N.S.; Lemos, H.P.; Da Costa, F.B.; Parada, C.A.; Ferreira, S.H.; Cunha, F.Q.; Verri, W.A. 2007. Anti-inflammatory and analgesic effects of the sesquiterpene lactone budlein A in mice: inhibition of cytokine production-dependent mechanism. **European Journal of Pharmacology**, v. 562, p. 155-163.

Verpoorte, R.; Choi, Y.H.; Kim, H.K. 2005. Ethnopharmacology and systems biology: a perfect holistic match. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 53–56.

Werz, O. 2007. Inhibition of 5-lipoxygenase product synthesis by natural compounds of plant origin. **Planta Medica**, v. 73, p. 1331-1357.

Wesołowska, A.; Nikiforuk, A.; Michalska, K.; Kisiel, V.; Chojnacka-Wójcik, E. 2006. Analgesic and sedative activities of lactucin and some lactucin-like guaianolides in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, p. 254-258.

Wilkens, M.; Alarcón, C.; Urzúa, A.; Mendoza, L. 2002. Characterization of the bactericidal activity of the natural diterpene kaurenoic acid. **Planta Medica**, v. 68, p. 452-454.

Winter, C.A.; Risley, E.A.; Nuss, G.W. 1962. Carrageenan-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 111, p. 544-547.

Wu, T.S.; Shi, L.S.; Kuo, P.C.; Leu, Y.L.; Liou, M.J.; Wu, P.L.; Wu, Y.C.; Iou, S.C.; Chen, Y.P.; Cheng, H.C. 2001. Cytotoxic principles from the leaves of *Tithonia diversifolia*. **China Pharmaceutical Journal**, v. 53, p. 217-223.

Ziémons, E.; Dive, G.; Debrus, B.; Barillaro, V.; Frederich, M.; Lejeune, R.; Anfenot, L.; Delattre, L.; Thunus, L.; Hubert, P. 2007. Study of the physicochemical properties in aqueous medium and molecular modeling of tagitinin C/cyclodextrin complexes. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, p. 910-919.