

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Estudos metabolômicos de Astedraceae por UPLC-UV-HRFTMS,
avaliação do potencial anti-inflamatório *in vitro* e suas correlações
através de métodos *in silico***

Daniela Aparecida Chagas de Paula

Ribeirão Preto

2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Estudos metabolômicos de Asteraceae por UPLC-UV-HRFTMS,
avaliação do potencial anti-inflamatório *in vitro* e suas correlações
através de métodos *in silico***

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Doutor em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e
Sintéticos

Orientada: Daniela Aparecida Chagas de
Paula

Orientador: Prof. Dr. Fernando Batista da
Costa

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas no dia 25/09/2013. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2013

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

Estudos metabolômicos de Asteraceae por UPLC-UV-HRFTMS, avaliação do potencial anti-inflamatório *in vitro* e suas correlações através de métodos *in silico*. Ribeirão Preto, 2013.

97 p.; 30cm.

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

Orientador: Da Costa, Fernando Batista.

1. Metabolômica. 2. Asteraceae. 3. Anti-inflamatório.

*Fotos da capa de autoria de Daniela Aparecida Chagas-Paula

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome da aluna: Daniela Aparecida Chagas de Paula.

Título do trabalho: Estudos metabólicos de Asteraceae por UPLC-UV-HRFTMS, avaliação do potencial anti-inflamatório *in vitro* e suas correlações através de métodos *in silico*.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor 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: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus e meus santos protetores, Nossa Senhora Aparecida e São Geraldo Magela. Que me guiaram no caminho do conhecimento, caminho este dos meus sonhos e cercado de pessoas maravilhosas que me proporcionaram evolução.

Aos meus pais e irmã pelo amor e apoio incondicionais! Exemplos que me orgulham muito e me inspiram. À Eunice e ao Peco que sempre estão comigo e posso contar. Amo muito vocês!

À toda minha família e principalmente à tia Carminha e ao tio Zé pelas boas dicas, orientações e exemplo. Ao primo Luiz e à Vanessa pelo acolhimento e apoio. Esse sonho não teria se iniciado sem vocês. Gratidão eterna e inestimável.

Ao prof. Dr. Fernando Batista da Costa pela oportunidade, orientação e amizade. Grande cientista, grande pensador, grande idealizador e admirável ser humano. Foram anos de muito aprendizado. Muito obrigada! Muito obrigada! Muito obrigada mesmo. Qualquer agradecimento não será capaz de descrever meu sentimento de profunda gratidão e amizade.

À profa. Dra. RuAngelie Edrada-Ebel, pela amizade e tão dedicada orientação em meu estágio sanduíche na University of Strathclyde. Posso dizer que sorte maior não há em ter o Dr. Fernando como orientador e a Dra. RuAn como co-orientadora. Ela é outra que o agradecimento é infinito e inexpressável em palavras.

Devo um imensurável agradecimento à toda equipe do projeto temático “Estudos morfoanatômicos e de metaboloma como subsídios à sistemática de espécies de Asteraceae e ao acesso a seu potencial farmacológico” (processo FAPESP nº 2010/51454-3) pelo fornecimento do material vegetal para os estudos das espécies do cerrado incluídas neste projeto. Em especial à profa. Dra. Beatriz Appezzato da Glória (coordenadora do projeto temático), à profa. Dra. Mara Angelina Galvão Magenta, à pesquisadora. Dra. Adriana Hissae Hayashi, ao Dr. Benoît Francis Patrice Loeuille, à Makeli Garibotti Lusa, à Aline Bertolosi Bombo, à

Arinawa Liz Del Prado Filartiga, à Maria Elvira Poleti Martucci e à Marli Kasue Missaki Soares, pelo contato direto no fornecimento do material vegetal, assim como troca de informações sobre as recentes publicações e discussões dos resultados. Não apenas enriqueceram este trabalho, mas foram fundamentais para o seu desenvolvimento. À Marli ainda devo agradecer pelo carinho nas compras e prestação de contas para FAPESP.

À profa. Dra. Ana Maria S. Pereira pelo fornecimento do material vegetal de grande parte das espécies deste trabalho. É, portanto uma contribuição também imensurável, o início de tudo. Ainda devo agradecer pela sugestão de inclusão do estudo de algumas espécies, que no momento inicial deste trabalho eu ainda não havia conhecimento da importância no uso popular.

Aos amigos Dr. Alex (Tong Zhang) e Branquinho (Tiago Branquinho Oliveira) não apenas pela amizade e carinho, mas pela parceria nos ensaios *in silico*. E que parceria! Além de tudo, muito mais que proveitosa e prazerosa. Ao Alex ainda tenho que agradecer pelo cuidado e atenção ao me ensinar a operar o UPLC-UV-HRFTMS, trabalhar no MZmine e SIMCA-P+. Ao Branquinho a incondicional e indispensável ajuda na padronização e execução do ensaio *in vitro* de avaliação da inibição da ciclooxygenase. Gratidão eterna, amizade eterna.

À Dra. Rejane Barbosa de Oliveira, Rê, não é possível expressar satisfatoriamente o agradecimento e todo o amor que sinto por você, minha grande amiga. Quanto aprendi com a sua sabedoria e grande coração. Rê é um verdadeiro anjo em minha vida. Sempre pude contar com ela nos momentos fáceis, assim como nos mais difíceis e decisivos de toda a minha pós-graduação. Muito obrigada! Essa conquista é nossa, nunca me esquecerei dessa frase: "eu sou você e você é como se fosse eu".

À Danniela Faleiro (Danni) pela amizade e companherismo. Grande parceira de experimentos, seja de dia ou de noite, dia útil ou feriado, incondicionalmente sempre parceira. Meu braço direito e esquerdo. À Vanessa da Silva (Van), outra grande amiga-irmã com quem também sempre posso contar. Muito obrigada!

Ao prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos e à profa. Dra. Niege Araçari Jacometti Cardoso Furtado, por sempre poder contar com o pronto apoio de vocês. É uma honra ter trabalhado no laboratório de vocês, os admiro muito e tenho grande gratidão por tudo, em todos esses cinco anos de convivência.

À profa. Dra. Marta de Lana, amiga e orientadora de iniciação científica, foram quatro anos inspiradores de amor ao ensino e pesquisa. Esta é outra profa. que não me canso de agradecer e me inspirar.

A todos do laboratório de Farmacognosia (FCFRP-USP) pelos ensinamentos, boa convivência e apoio. Todos mesmo, aos que ficaram e aos que já saíram, foram inúmeros momentos inesquecíveis e gargalhadas, acima de tudo. Muito obrigada Eli, Renat's, Mauroeira, Willian, Marizeira, Jú, Tati, Cris, Mari, Erick, Ricardo, Joãos e toda a equipe do AsteBioChem: Rê, Danni, Branquinho, Bruno, Rosana, Federico, Felipe e Anny. Assim como a todos do RuAn's group: Alex, Chiara, Wini, Lynsay, Tome, Cheng, Halida, Weqas, Ahmed.

À Eli devo um agradecimento especial, não apenas pelo tempo de convivência e grande companheirismo desde as disciplinas às discussões científicas. A parceria vai, além disso, em idéias, princípios, sendo presente até mesmo nos momentos de apuros de manutenção e conserto de equipamentos científicos. Quando nos conhecemos, por acaso, nos corredores da faculdade, parecia que já éramos amigas desde a infância e não tenho dúvidas que será para vida toda. A Renat's, o Willian, a Mariza, a Rê, também presentes ali, desde o princípio deste sonho, do comecinho do mestrado até... sempre. Muito obrigada!

A Jú e a Chiara também sempre me incentivaram e apoiaram. O olhar sincero de querer meu melhor, que todos os experimentos e experiências fossem um sucesso. É uma amizade que transborda, e é verdadeiramente recíproco! Não precisa dizer nada, se sente.

Aos técnicos de laboratório de farmacognosia Mário, Waltinho e Angélica, que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho. Em especial

devo agradecer ao Mário pela amizade, compreensão, auxílios e tudo mais, muito obrigada!

A todos os meus inesquecíveis amigos, que também marcaram minha vida e meus estudos Sabrina, Kelly, Lana, Juninho, Renatinho, Luiz, Taty, Yara, Lindsay, Rasga, Léo, Franco, Tanare, Paulita, Cíntia, Adrisio, Dani. E agradeço também a todos os meus professores e em especial às prof(a)s. Maria, Claudina, Solange, Maria Tereza, Afonsinho e Dra. Carla, que contribuirão com paixão para meu aprendizado. 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. Assim como devo agradecer a University of Strathclyde, aonde também foi realizado significativa parte deste trabalho.

À CAPES, à FAPESP e ao CNPq pelo apoio financeiro. Em especial à FAPESP pela bolsa de mestrado (processo nº 2008/02185-0) e pela bolsa de doutorado (processo nº 2010/10940-2). Ainda devo agradecer à FAPESP pelos projetos de financiamento, dos quais os meus projetos de mestrado e doutorado fizeram parte, processos nº 2008/57149-8 e nº 2010/51454-3, respectivamente.

"The whole of science is nothing more than a refinement
of every day thinking"

Albert Einstein (1879-1955)

RESUMO

CHAGAS-PAULA, D. A. **Estudos metabolômicos de Asteraceae por UPLC-UV-HRFTMS, avaliação do potencial anti-inflamatório *in vitro* e suas correlações através de métodos *in silico***. 2013. 97f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Estudos metabolômicos de plantas, estudos *in silico* e ensaios biológicos *in vitro* são estratégias que, em conjunto, otimizam a busca por substâncias inéditas e/ou ativas correlacionadas a determinados mecanismos de ação. Embora a família Asteraceae possua inúmeras espécies com reconhecido potencial anti-inflamatório (AI), várias delas nunca foram investigadas, como algumas espécies endêmicas do Cerrado brasileiro. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi encontrar extratos e substâncias AI que apresentassem um mecanismo de ação superior ao dos AIs atuais. Foram estudadas 57 espécies da família pertencentes a várias tribos, agrupadas em três diferentes grupos: plantas com prévia evidência AI, plantas alimentícias e espécies do Cerrado. Para se encontrar substâncias com potencial AI foi realizada a avaliação da inibição concomitante das enzimas ciclooxigenase (COX-1) e lipoxigenase (5-LOX), sendo ambas as principais vias envolvidas na inflamação, cuja inibição pode conferir maior eficácia e menores efeitos adversos do que os AI atualmente disponíveis. Adequados estudos metabolômicos (HPLC-UV-HRFTMS) e *in silico* (diferentes modelos estatísticos) foram realizados. O conjunto de metabólitos secundários (metaboloma) das 57 espécies investigadas representou um vasto universo de substâncias (n=6.215), que conseguiu abranger várias delas com o mecanismo de ação investigado. Corroborando o potencial desta família em apresentar espécies AI, cerca de 23% das plantas aqui investigadas foram capazes de promover a dupla inibição, com valores de IC₅₀ (36,0 a 0,03 µg/mL) para seus extratos comparáveis com aqueles dos inibidores padrões. Através dos estudos *in silico* foi possível determinar que as substâncias ativas dos extratos se referem a seus constituintes minoritários, sugerindo que devem ser muito potentes. Dentre as substâncias correlacionadas com a propriedade de dupla inibição, algumas não puderam ser identificadas, mesmo utilizando abrangentes bibliotecas de dados de produtos naturais, sugerindo que se tratam de substâncias inéditas. Além disso, dentre as espécies ativas, uma é consagrada como alimentícia e, portanto, pode vir a exercer um importante papel como nutracêutico, por exemplo vir a ser incluída na dieta de pacientes que sofrem de patologias inflamatórias. As demais espécies ativas, por sua vez, apresentam potencial para o desenvolvimento de fitoterápicos e descoberta de novos princípios ativos. Devido ao fato dos modelos estatísticos terem sido validados, as substâncias ativas ainda poderão ser utilizadas para predição de novos extratos ativos a partir apenas de seu metaboloma. Portanto, este trabalho, além de resultar em relevantes resultados, exemplifica muito bem as novas estratégias para a busca de produtos naturais inéditos e AI para um mecanismo de ação requerido, através de uma abordagem inédita e explorando espécies de importância da flora brasileira, alimentícia ou farmacológica, a partir de mínima quantidade de material vegetal.

Palavras-chave: Metabolômica, Asteraceae, anti-inflamatório.

ABSTRACT

CHAGAS-PAULA, D. A. **Metabolomic studies of Asteraceae by UPLC-UV-HRFTMS, *in vitro* evaluation of the anti-inflammatory potential and their correlation by *in silico* methods.** 2013. 97f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Plant metabolomic studies, *in silico* studies and *in vitro* biological assays are strategies that together, optimize the discovery of new and/or active compounds correlated to a specific mechanism of action. Asteraceae family has many species with well known anti-inflammatory (AI) potential. Several of them have never been investigated, as some of Brazilian Cerrado. In this context, the objective of this work was to find the AI extracts and substances with a better mechanism of action than the usual AI. It was studied 57 species from different tribes of Asteraceae family, which were divided in three groups: plants with known AI property, food plants and species from Cerrado. In order to find substances with AI potential, the inhibition of cyclooxygenase (COX-1) and lipoxygenase (5-LOX) were evaluated to access AI property, once both are the main pathways involved in inflammatory process and the dual inhibition of them can provide better efficacy and less side effects than current AI. Suitable metabolomic (HPLC-UV-HRFTMS) and *in silico* (statistical models) studies were performed. All the secondary metabolites (metabolome) of the 57 species covered a huge number of substances (n=6,215) and some of them displayed the investigated mechanism of action. About 23% of the plants extracts were able to be dual inhibitor, with IC₅₀ (36.0 – 0.03 µg/mL) similar of the standard drugs, corroborating the AI potential of Asteraceae family. Through the *in silico* studies it was possible to determine the AI substances and that they are the minor compounds in the active extracts, suggesting that these must be potent AI. Among the substances correlated with the dual inhibition some could not be identified, even using comprehensive data bases of natural products, suggesting that these ones could be new compounds. Besides, among the active species, one is a food plant that could be useful as nutraceutical, being included in the dietary of people with inflammatory diseases. The other active plants have potential to the development of phytomedicines or drug discovery. Due to the fact that statistical models were validated, the substances also can be useful for prediction of new AI extracts only from the plant metabolome. Therefore, this work has many relevant results and also exemplifies the recent strategies to discovery of new compounds and AI with a required specific mechanism of action, trough a new approach and studying important species of the Brazilian flora, food plants and AI plants, from a minimum quantity of plant material.

Keywords: Metabolomics, Asteraceae, anti-inflammatory.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Procedimento de diluição das amostras (extratos, substâncias ou padrões) para os ensaios de triagem de inibidores da COX e LOX.9
- Figura 2. Procedimento de cronometragem da etapa de reação do ensaio de triagem de inibidores da COX. 10
- Figura 3. Etapa de ELISA para a dosagem da produção de produção de PG na etapa de reação do ensaio de triagem de inibidores da COX (Figura 2)..... 11
- Figura 4. Tribos da família Asteraceae de importância econômica (alimentícia, tóxica ou etnofarmacológica) organizadas filogeneticamente.. 16
- Figura 5. Cromatogramas obtidos por CLAE-UV-DAD (0-45% de MeCN em 60 min; 0,5% ácido acético; coluna monolítica C18; 1,4 mL/min) de extratos de *T. diversifolia* (Td) obtidos em agitador orbital (24 h) e em banho de ultrassom (10 min), utilizando etanol-água 3:7 (v/v) como solvente extrator..22
- Figura 6. Cromatogramas obtidos por CLAE-UV-DAD (0-45% de MeCN em 60 min; 0,5% ácido acético; coluna monolítica C18; 1,4 mL/min) de extratos de *T. diversifolia* (Td) obtidos em agitador orbital (24 h) e em banho de ultrassom (10 min), utilizando etanol-água 1:1 (v/v) como solvente extrator..23
- Figura 7. Cromatogramas obtidos por CLAE-UV-DAD (0-45% de MeCN em 60 min; 0,5% ácido acético; coluna monolítica C18; 1,4 mL/min) de extratos de *T. diversifolia* (Td) obtidos em agitador orbital (24 h) e em banho de ultrassom (10 min), utilizando etanol-água 7:3 (v/v) como solvente extrator..24
- Figura 8. Cromatogramas obtidos por CLAE-UV-DAD (0-45% de MeCN; 0,5% de ácido acético; coluna monolítica C18; 1,4 mL/min) dos extratos de *T. diversifolia* (Td). Os extratos foram obtidos por remaceração em etanol-água (24 h) em diferentes proporções.....25
- Figura 9. Total de amostras do primeiro ensaio piloto.....26
- Figura 10. Cromatogramas obtidos por CLAE-UV-DAD (0-45% de MeCN; 0,5% de ácido acético; coluna monolítica C18; 1,4 mL/min) dos extratos de *T. diversifolia* (Td) para comparação do efeito dos solventes extratores etanol-água e metanol-água 3:7 (v/v).27
- Figura 11. Cromatogramas obtidos por CLAE-UV-DAD (0-45% de MeCN; 0,5% de ácido acético; coluna monolítica C18; 1,4 mL/min) dos extratos de *T. diversifolia*

(Td) para comparação do efeito dos solventes extratores etanol-água e metanol-água 1:1 (v/v).....	28
Figura 12. Cromatogramas obtidos por CLAE-UV-DAD (0-45% de MeCN; 0,5% de ácido acético; coluna monolítica C18; 1,4 mL/min) dos extratos de <i>T. diversifolia</i> (Td) para comparação do efeito dos solventes extratores etanol-água e metanol-água 7:3 (v/v).....	29
Figura 13. Pesquisa de tricomas glandulares na face abaxial das folhas em estereomicroscópio no aumento de 10x. Esses tricomas, comuns em espécies da família Astereaceae, biossintetizam e armazenam lactonas sesquiterpênicas (LST).....	31
Figura 14. Anti-inflamatórios não esteroidais e as principais vias envolvidas nos processos inflamatórios.....	34
Figura 15. Reação de adição do tipo Michael do grupo α -metileno- γ -lactônico com resíduo de cisteína livre. Esta mesma reação ocorre com proteínas, daí LST serem substâncias tão bioativas.	36
Figura 16. Cromatogramas do ensaio piloto para desenvolvimento de fase móvel contendo 0,1% de ácido acético. Os cromatogramas do extrato de Td foram obtidos por CLAE-UV-DAD em coluna monolítica C18 e registrados em três comprimentos de onda: 215, 254 e 325 nm (dispostos em sequência de cima para baixo).	38
Figura 17. Curvas de absorção no UV características dos metabólitos secundários mais frequentes nos extratos das plantas avaliadas.....	40
Figura 18. Exemplos de anéis γ -lactônicos.....	41
Figura 19. Impressão digital metabólica em 3D do extrato de <i>Viguiera arenaria</i> obtida por CLAE-UV-DAD (0-45% de MeCN em 60 min, 45-100% em 5 min, 100% por 5 min; 1% de ácido acético; 1,4 mL/min, e 2 colunas monolíticas C18 em série).	45
Figura 20. Impressão digital metabólica em 215, 254 e 325 nm do extrato de <i>Viguiera arenaria</i> obtida por CLAE-UV-DAD (0-45% de MeCN em 60 min, 45-100% em 5 min, 100% por 5 min; 1% de ácido acético; 1,4 mL/min e 2 colunas monolíticas C18 em série).....	45
Figura 21. Impressão digital metabólica em 3D do extrato de <i>Smallanthus sonchifolius</i> obtida por CLAE-UV-DAD (0-45% de MeCN em 60 min, 45-100%	

- em 5 min, 100% por 5 min; 1% de ácido acético; 1,4 mL/min e 2 colunas monolíticas C18 em série).....47
- Figura 22. Impressão digital metabólica em 215, 254 e 325 nm do extrato de *Smallanthus sonchifolius* obtida por CLAE-UV-DAD (0-45% de MeCN em 60 min, 45-100% em 5 min, 100% por 5 min; 1% de ácido acético; 1,4 mL/min e 2 colunas monolíticas C18 em série).47
- Figura 23. Impressão digital metabólica em 3D do extrato de *Mikania glomerata* obtida por CLAE-UV-DAD (0-45% de MeCN em 60 min, 45-100% em 5 min, 100% por 5 min; 1% de ácido acético; 1,4 mL/min e 2 colunas monolíticas C18 em série).49
- Figura 24. Impressão digital metabólica em 215, 254 e 325 nm do extrato de *Mikania glomerata* obtida por CLAE-UV-DAD (0-45% de MeCN em 60 min, 45-100% em 5 min, 100% por 5 min; 1% de ácido acético; 1,4 mL/min e 2 colunas monolíticas C18 em série).....49
- Figura 25. Cromatograma de análise em UPLC-UV-HRFTMS, utilizando o método piloto: coluna C18 (150 x 3 mm), temperatura controlada a 30 °C, fluxo de 0,3 mL/min, gradiente de 5-40% de MeCN em 31 min, 90% MeCN de 31-36 min, seguido de 5% de MeCN por mais 5 min, 0,1% de ácido fórmico na fase móvel..51
- Figura 26. Cromatogramas (modo negativo) de todos os extratos sobrepostos, obtidos através de UPLC-UV-HRFTMS, no método definitivo (fluxo 0,3 mL/min, gradiente MeCN/água; 0,1% ácido fórmico na água, 5% de MeCN em 5 min, 5%-100% de MeCN em 50 min, temperatura da coluna 30 °C, coluna C18, 3 µm, 150 x 3 mm).53
- Figura 27. Tratamento dos dados cromatográficos de todos os extratos no software MZmine. Neste tratamento inclui-se a desconvolução, eliminação dos isótopos, alinhamento até a desreplicação.....54
- Figura 28. PCA no software SIEVE. Os agrupamentos observados foram baseados na composição química dos extratos e não nas suas propriedades anti-inflamatórias.....54
- Figura 29. OPLS da composição química dos extratos que exibiram inibição para COX, LOX, ambas as enzimas ou nenhuma delas. $R^2 = 0,97$56
- Figura 30. *Score-plot* (à esquerda; mostra a distribuição dos extratos de acordo com a propriedade anti-inflamatória - variáveis Y) e *loading-plot* (à direita; mostra a

- distribuição das substâncias - variáveis X) obtidos na análise por OPLS (Figura 29; componente 1 vs 2) da composição química dos extratos (UPLC- HRFTMS) supervisionada pelas propriedades anti-inflamatória.56
- Figura 31. Gráficos de áreas sob os picos referentes às substâncias correlacionadas com a propriedade de inibição de COX e LOX. Detecção no modo positivo das análises por UPLC-HRFTMS..60
- Figura 32. Gráficos de áreas sob os picos referentes às substâncias correlacionadas com a propriedade de inibição de COX e LOX. Detecção no modo negativo das análises por UPLC-HRFTMS..61
- Figura 33. Ampliação de picos de dois distintos ácidos clorogênicos (ácidos 4,5-di-*O*-*E*-cafeoilquínico isômeros, m/z 355,102 no modo positivo) em seus respectivos t_R , antes do alinhamento no MZmine. O correto alinhamento em dois picos distintos desse mesmos metabólitos foi mostrado na Figura 27.63
- Figura 34. Controle de reprodutibilidade entre as diferentes análises, sobreposição dos cromatogramas da amostra de código 33 injetados no início, no meio e no fim de toda a sequência aleatória de injeções cromatográficas deste trabalho (amostras códigos: 1-67). Cromatogramas obtidos no modo negativo e positivo, respectivamente, acima e abaixo.63
- Figura 35. Estratégias para pesquisa de biomarcadores de inibição de COX e LOX e construção de modelos para predição.65
- Figura 36. Arvore de decisão J48 a partir dos dados de detecção no modo negativo previamente tratado e os de propriedade anti-inflamatória (b: inibidor de ambas as enzimas, n: inibidor de nenhuma das enzimas ou apenas de LOX, e c: inibidor apenas de COX. $R^2= 1,0$ e $Q^2= 0,7$. Círculos verdes sobre os biomarcadores da inibição de ambas as enzimas COX e LOX.66
- Figura 37. Arvore de decisão J48 a partir dos dados de detecção no modo positivo previamente tratados e os de propriedade anti-inflamatória (b: inibidor de ambas as enzimas, n: inibidor de nenhuma das enzimas ou apenas de LOX, e c: inibidor apenas de COX. $R^2= 0,9$ e $Q^2= 0,6$ Círculos verdes sobre os biomarcadores da inibição de ambas as enzimas COX e LOX.66
- Figura 38. Modelo de redes neurais artificiais (RN) para predição de inibição de COX e LOX - b ou inatividade - n. Assim os dados de entrada são as áreas sob os picos dos biomarcadores definidos pela árvore de decisão para os dados

metabolômicos obtidos no modo positivo. Os dados de saída são as predições n
e b.71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Espécies vegetais locais de coleta, grupos, tribos, rendimento de seus extratos e o código dos mesmos.....	17
Tabela 2. Rendimento (mg) dos extratos de <i>T. diversifolia</i> (Td) e <i>V. gardneri</i> (Vg) obtidos em agitador orbital ou em banho de ultrassom. Parte do estudo piloto para desenvolvimento do melhor método extrator.	25
Tabela 3. Resultados dos ensaios de inibição da COX e LOX, resultados da investigação de tricomas glandulares e a relação das tribos das espécies estudadas.....	31
Tabela 4. Substâncias avaliadas nos ensaios anti-inflamatórios <i>in vitro</i> : controles ou avaliadas pela primeira vez.	35
Tabela 5. Lista de substância identificadas por CLAE-UV-DAD, AsterDB e literatura, em 33 amostras vegetais aleatoriamente selecionadas.....	42
Tabela 6. Desreplicação do extrato foliar de <i>Viguiera arenaria</i>	46
Tabela 7. Desreplicação do extrato foliar de <i>Smallanthus sonchifolius</i>	48
Tabela 8. Desreplicação do extrato foliar de <i>Mikania glomerata</i>	50
Tabela 9. Desreplicação de dois extratos complexos (<i>T. diversifolia</i> e <i>S. sonchifolius</i> ; 30 <i>hits</i>) no MZmine utilizando a biblioteca de dados AsterDB e o DNP. Os dados cromatográficos foram obtidos através do método piloto para UPLC-UV-HRFTMS.	52
Tabela 10. Substâncias correlacionadas com a inibição de COX e LOX.	57
Tabela 11. Área sob os picos das substâncias correlacionadas com a propriedade de inibição de COX e LOX dos extratos ativos.	59
Tabela 12. Valores de erro médio quadrático da validação cruzada dos modelos de OPLS.....	64
Tabela 13. Biomarcadores das propriedades anti-inflamatórias determinadas pela árvore de decisão J48.....	67
Tabela 14. Valores dos modelos de predição por OPLS e RN.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACG	Ácido(s) Clorogênico(s)
MeCN	Acetonitrila
AINES	Anti-Inflamatório(s) Não Esteroidal(is)
AsterDB	Asteraceae <i>Data Base</i>
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COX	Ciclooxigenase(s)
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
DNP	<i>Dictionary of Natural Products</i> ®
HCA	<i>Hierarchical Cluster Analysis</i>
IC ₅₀	Concentração Inibitória de 50% da Atividade Enzimática
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
EtOH	Etanol
HRFTMS	<i>High Resolution Fourier Transformation Mass Spectrometry</i>
LOX	Lipoxigenase(s)
LST	Lactona(s) Sesquiterpênica(s)
LC	Leucotrieno(s)
<i>m/z</i>	massa/carga
NDGA	<i>Nordihydroguaiaretic acid</i>
NF-κB	Fator Nuclear de Transcrição kappa-B
OPLS	<i>Orthogonal Partial Least Squares</i> ™
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
PG(-conj)	Prostaglandina(s)(-conjugada a acetilcolinesterase)
PLS	<i>Partial Least Squares</i>
QSAR	<i>Quantitative Structure-Activity Relationship</i>
RMSE(CV)	<i>Root-Mean-Square Error (of Cross-Validation)</i>
RN	Redes Neurais Artificiais
rpm	rotações por minuto
SIMCA	<i>Soft Independent Modeling by Class Analogy</i>
Td	<i>Tithonia diversifolia</i>
t _R	Tempo de Retenção
UPLC	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>

UV	Ultravioleta
UVar	<i>Unit variance</i>
Vg	<i>Viguiera gardneri</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
μ	Micro
™	Trademark
®	Marca Registrada
©	Copyright

SUMÁRIO

Resumo	I
Abstract	II
Lista de figuras	III
Lista de tabelas	VIII
Lista de abreviaturas e siglas	IX
Lista de símbolos	XI
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	6
2.1. Objetivo Geral.....	6
2.2. Os Objetivos Específicos	6
3. MATERIAL E MÉTODOS	6
3.1. Material vegetal	6
3.2. Secagem, armazenamento e investigação de tricomas glandulares	7
3.3. Preparo dos extratos.....	7
3.4. Ensaio anti-inflamatório <i>in vitro</i> - COX e LOX	8
3.5. Metabolômica	12
3.6. Pesquisa de substâncias precipitadoras de proteínas	13
3.7. Análises de correlação <i>in silico</i> e desrepliação	13
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
4.1. Espécies e locais de coleta.....	15
4.2. Preparo dos extratos.....	20
4.3. Investigação de tricomas glandulares.....	30
4.4. Ensaio anti-inflamatório <i>in vitro</i> – COX e LOX	33
4.5. Estudos metabolômicos.....	37
4.6. Pesquisa de substâncias precipitadoras de proteínas	53
4.7. Análises de correlação <i>in silico</i> e desrepliação	53
5. CONCLUSÃO	72
6. REFERÊNCIAS	73
APÊNDICE I - Parâmetros utilizados no software MZmine.....	86
APÊNDICE II - Parâmetros utilizados para seleção de atributos por algoritmos genéticos e construção da árvore de decisão J48 no software Weka.....	88
APÊNDICE III - Parâmetros utilizados para construção das RNs no software Weka.....	89
APÊNDICE IV - Grupos para treino dos modelos de predição (OPLS e RN) e grupos teste para validação dos mesmos modelos.....	91
APÊNDICE V - Estruturas das substâncias avaliadas nos ensaios anti-inflamatórios.....	92

1. INTRODUÇÃO

Metaboloma é o conjunto de todos os metabólitos, ou seja, os componentes de baixo peso molecular sintetizados por um organismo, seja ele planta, microrganismo ou animal. O sufixo grego “-oma” significa “todo”, “completo”, “conjunto de”; então, analogamente ao metaboloma, existem também o genoma e o proteoma que são, respectivamente, o conjunto de todos os genes e proteínas de determinado organismo^{1,2}. Os estudos metabolômicos ou estudos do metaboloma englobam três diferentes abordagens: metabolômica, perfil metabólico e impressão digital metabólica^{3,4}.

Metabolômica é a identificação de todos os metabólitos do organismo sob determinada condição, qualitativamente e quantitativamente. Esta abordagem ainda é dificilmente aplicável, considerando-se que em um organismo existe uma infinidade de metabólitos, de diferentes características, impossíveis de serem detectados ao mesmo tempo com as técnicas analíticas atuais. Perfil metabólico é a identificação e quantificação de um grupo metabólitos de interesse que podem ser identificados com o emprego de uma determinada técnica analítica. Já a impressão digital metabólica é a abordagem mais rápida quando comparada aos demais estudos metabolômicos; ela não visa a identificação de metabólitos, mas a obtenção da impressão digital da composição do organismo sob determinada condição.^{3,4}

Apenas a impressão digital metabólica já permite uma série de aplicações importantes como, por exemplo, no controle de qualidade de plantas^{5,6}. Quando aliado a análises estatísticas adequadas permite, por exemplo, auxiliar na solução de problemas filogenéticos com o agrupamento de plantas que possuem perfis químicos relacionados⁷. Permite também indicar diferenças nas composições químicas entre diversas plantas com atividade farmacológica e plantas sem tal atividade. Tais diferenças podem direcionar a identificação de substâncias ativas antes mesmo de isolá-los e identificá-los, o que demandaria muito tempo e dinheiro.^{2,6,8-10}

Os métodos fitoquímicos tradicionais se valem de técnicas menos sensíveis e abrangentes do que aquelas utilizadas para estudos metabolômicos. Desta forma, geralmente apenas as substâncias majoritárias de uma dada planta são isoladas e identificadas. Portanto, as atividades biológicas muitas vezes são erroneamente atribuídas a estas substâncias, ou somente a elas, sendo que geralmente as plantas podem conter ainda vários outros que contribuem para sua propriedade

farmacológica. Assim sendo, mostra-se necessária a utilização de metodologias mais apuradas como as metodologias metabolômicas para realizar um processo mais rápido, sensível, eficaz e menos dispendioso para a descoberta de novas substâncias bioativas, inclusive em plantas já investigadas.^{3,6,8,9,11}

As abordagens metabolômicas são, então, realizadas com o emprego de técnicas capazes de demonstrar a diversidade química das plantas, tais como ressonância magnética nuclear (RMN), espectrometria de massas (EM) e, preferencialmente, cromatografia acoplada a detectores no ultravioleta (UV) ou EM, ou por mais de uma destas técnicas^{1,3,5,8,9,12}. Dentre as elas, uma de escolha é a cromatografia líquida de ultraeficiência acoplada com espectrômetro de massas de ionização por *eletrospray* e detector de alta resolução do tipo *Orbitrap* (UPLC-UV-HRFTMS). Isso se deve à abrangência da técnica e sua altíssima sensibilidade^{3,5,6,13-16}.

Dentre os analisadores de massa de alta resolução, o *Orbitrap* tem grande destaque para estudos metabolômicos, devido à resolução superior ($\Delta m/z$) e acurácia de massa (ppm) em relação aos demais analisadores de similar custo^{14,16}. Além disto, permite analisar os modos positivo e negativo em uma única eluição cromatográfica, o que acarreta em ganho não somente por reduzir o tempo e o custo de análise, mas também em reprodutibilidade. Por exemplo, o mesmo t_R (tempo de retenção) exato será obtido para ambos os modos^{14,16}.

A infinidade de informações sobre a composição química das plantas gerada pelas abordagens metabolômicas culminam em uma diversidade de aplicações, porém, para realizá-las, é necessário que os dados sejam manejados e analisados adequadamente por métodos *in silico*. Os espectros (de RMN ou EM) ou cromatogramas precisam ser processados para eliminação de ruídos, para promover alinhamento entre si e normalização de dados. Os dados necessitam ser precisamente compilados e transportados para bancos de dados para que então seja realizada a adequada análise dos mesmos. Atualmente existem vários softwares, comerciais ou livres, que são empregados para realização destes procedimentos com a máxima acuidade^{10,17,18}.

A análise de todos estes dados deve ser realizada através de modelos estatísticos adequados para o estudo de correlação entre as variáveis empregando-se métodos de estatística multivariada como, por exemplo, PCA (*Principal Component Analysis*), HCA (*Hierarchical Cluster Analysis*), SIMCA (*Soft*

Independent Modeling by Class Analogy), PLS (*Partial Least Squares*) e OPLS (*Orthogonal Partial Least Squares*[™]). Estas análises facilitam a visualização das sutis diferenças na composição química das espécies as quais são correlacionadas com alguma propriedade como, por exemplo, compostos minoritários comuns a plantas com uma dada propriedade farmacológica e aqueles ausentes em plantas sem tal propriedade. Vale ressaltar que alguns softwares ainda facilitam o processo de desreplicação de picos cromatográficos ou espectrométricos comuns entre plantas, por permitirem acesso a banco de dados próprio, livre ou comercial, facilitando assim o direcionamento para se isolar substâncias inéditas ou com interesse farmacológico^{8,10,11,17,19,20}.

Vários representantes de Asteraceae, medicinais ou não, foram coletados por integrantes de nosso grupo de pesquisa AsterBioChem da FCFRP-USP. Dezenas delas foram investigadas quimicamente, tendo sido isoladas e identificadas várias lactonas sesquiterpênicas (LST) e diterpenos, além de compostos fenólicos^{21,22}. O conjunto de todas estas substâncias obtidas possibilitou a elaboração de uma biblioteca de substâncias e de um banco de dados espectrométricos e cromatográficos, o Asteraceae *Data Base* (AsterDB), que podem ser utilizados para auxiliar no processo de desreplicação de extratos vegetais de Asteraceae ainda não investigados. Além disso, várias LST com pronunciada atividade anti-inflamatória *in vitro* foram detectadas^{23,24}, sendo que uma delas, a budleína A, também apresentou atividade anti-inflamatória *in vivo* e teve seu mecanismo de ação investigado²⁵. Vale lembrar que as LST destas espécies são biossintetizadas e armazenadas em tricomas glandulares presentes em diferentes órgãos^{22,26}.

A família Asteraceae possui espécies com consagradas propriedades anti-inflamatórias, tais como a arnica (*Arnica montana* L.)²⁷, o tanaceto ou feverfew (*Tanacetum parthenium* L.)²⁸, o guaco (*Mikania glomerata* Sprengl.)^{29,30}, a carqueja [*Baccharis trimera* (Less.) DC.]^{29,30}, o assa-peixe (*Vernonia polyanthes* Less.)³⁰ e a marcela [*Achyrocline satureioides* (Lam.) DC.]^{29,30}, dentre outras. Há ainda nesta família espécies com importância alimentícia, como o girassol (*Helianthus annuus* L.)²⁹, a alcachofra (*Cynara scolymus* L.)³¹, a chicória (*Cichorium intybus* L.)³², o jambú [*Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen]³³⁻³⁵ e o alface (*Lactuca sativa* L.)³⁶ que, além do uso na culinária, ainda apresentam comprovadas atividades farmacológicas e anti-inflamatórias, muitas vezes se tratando de nutracêuticos.

Estudos do potencial farmacológico de plantas desta família coletadas no Brasil demonstraram potente ação anti-inflamatória, inclusive independente de seu histórico etnofarmacológico^{25,37}. Com base no exposto, conclui-se que o potencial anti-inflamatório de Asteraceae brasileiras é elevado e real.

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, sendo necessária a busca por substâncias com potencial anti-inflamatório que eventualmente possam dar origem a novos fármacos de baixo custo e com efeitos adversos reduzidos, ou mesmo para auxiliarem no processo de investigação de mecanismos de ação de substâncias³⁸⁻⁴¹.

As ciclooxigenases (COX) e as lipoxigenases (LOX) são enzimas fundamentais na regulação do ácido araquidônico formado no processo inflamatório. O ácido araquidônico pode sofrer oxidação pelas enzimas COX ou pelas LOX, resultando na produção de eicosanóides (prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos) na via COX-dependente, ou leucotrienos na via LOX-dependente^{38,42}. As prostaglandinas (PG) contribuem para os sintomas da inflamação aguda, tais como aumento da permeabilidade vascular, vasodilatação, formação de edema, produção de dor e febre. Já os leucotrienos (LC) causam danos gastrointestinais por estimular a infiltração de leucócitos, que contribuem para a ulceração por oclusão de micro vasos, redução do fluxo sanguíneo e liberação de radicais livres e proteases que causam a necrose dos tecidos. Além disso, devido à estimulação do recrutamento de leucócitos pelos LC, estes precipitam crise de asma e conversão da inflamação aguda para crônica^{38,42,43}.

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) atuais são capazes de inibir as COX e não são capazes de inibir as LOX^{29,34}. Assim, há um desvio da via de metabolização do ácido araquidônico e ele passa a ser metabolizado apenas pelas LOX, resultando na formação ainda maior de LC, sendo estes considerados como os responsáveis pelos principais efeitos adversos dos AINES^{38,40}. Recentemente, destacou-se a importância de procurar agentes que sejam capazes de inibir tanto a COX-1 como a 5-LOX^{38,40,44,45}. Tais agentes seriam úteis para o tratamento dos processos inflamatórios agudos e crônicos como, por exemplo, a artrite reumatoide, psoríase, asma, ulceração gástrica e até mesmo para o tratamento e prevenção de doenças de origem inflamatória como, por exemplo, a doença de Alzheimer, o mal de Parkinson, diabetes e aterosclerose^{38,39,42,45-48}.

Adicionalmente, tanto as COX quanto as LOX têm sido descritas como enzimas superexpressadas em muitos tipos de tumores, sendo que inibidores simultâneos dessas enzimas são candidatos potenciais a substâncias com propriedade anti-câncer ou mesmo como coadjuvantes^{38,45,46}. Existem atualmente no mercado kits capazes de detectar a inibição dessas enzimas em ensaios *in vitro*, que podem ser usados para realizar a triagem de substâncias e de extratos de plantas. Extratos de plantas da família Asteraceae e diversas classes de metabólitos oriundos das mesmas vêm demonstrando possuir potencial de inibição das vias COX e LOX-dependentes^{44,47}, porém nenhum estudo sistemático foi realizado, em especial com a análise do conteúdo de tricomas glandulares.

No Brasil, é fato que existem inúmeras plantas, sob-risco de extinção, as quais nunca foram estudadas quanto à sua constituição química e potencial farmacológico. Dentre estas, estão algumas plantas da família Asteraceae, endêmicas de Cerrado, área considerada prioritária para a conservação⁴⁹.

Logo, considerando o histórico e o potencial de plantas da família Asteraceae em apresentarem atividade anti-inflamatória, a importância da busca por anti-inflamatórios que sejam capazes de inibir ambas as enzimas COX e LOX, propusemos avaliar a inibição das vias COX- e LOX-dependentes por várias espécies dessa família. Para realizar esta triagem, propusemos investigar espécies nativas do Cerrado, algumas plantas alimentícias e outras sabidamente anti-inflamatórias empregando-se estudos metabolômicos, a fim de determinar possíveis correlações entre os seus constituintes químicos e as atividades biológicas com a utilização de métodos de análise *in silico*. Por fim, ainda propomos desenvolver um modelo de avaliação de atividade anti-inflamatória com a inibição da COX e LOX para a triagem de plantas ativas.

Vale a pena mencionar que o presente trabalho faz parte de um projeto maior, o projeto temático intitulado “Estudos morfoanatômicos e de metaboloma como subsídios à sistemática de espécies de Asteraceae e ao acesso a seu potencial farmacológico” (processo FAPESP nº 2010/51454-3), envolvendo ainda filogenia e fisiologia vegetal. Além disso, todo o suporte necessário para os estudos metabolômicos e *in silico* foi disponibilizado pelo *Metabolomic Group* da *University of Strathclyde* (*Strathclyde Institute of Pharmacy and Biomedical Sciences*) que faz parte do *ScotMet: The Scottish Metabolomics Facility*, sob a supervisão da Dr. RuAngelie Edrada-Ebel.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral do presente plano de pesquisa foi o estudo metabolômico de espécies de Asteraceae empregando-se UPLC-UV-HRFTMS e avaliação da inibição *in vitro* das enzimas COX e LOX por extratos vegetais. Além disso, propôs-se correlacionar todos os dados obtidos por métodos *in silico*.

2.2. Os objetivos específicos

- a) aquisição de plantas da família Asteraceae nativas do Cerrado e de importância alimentícia e medicinal;
- b) desenvolver um método de extração capaz de extrair uma maior diversidade de componentes;
- c) desenvolver um método cromatográfico capaz de oferecer boa resolução para os extratos das diferentes plantas;
- d) obter a impressão digital das espécies selecionadas e se possível realizar desreplicação;
- e) avaliar o potencial de inibição *in vitro* das via COX- e LOX-dependentes dos extratos das diferentes espécies;
- f) através de análises de correlação *in silico*, determinar quais são as substâncias que contribuem para a atividade anti-inflamatória por essas vias;
- g) incrementar o banco de dados para desreplicação;
- h) desenvolver um modelo para triagem de plantas com atividade anti-inflamatória.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal

As espécies da família Asteraceae foram coletadas ou adquiridas no mercado, sendo elas do bioma Cerrado (endêmicas ou não), ou espécies com conhecida atividade anti-inflamatória, ou de importância alimentar. As espécies que foram coletadas tiveram suas exsiccatas depositadas no herbário SPF (São Paulo-SP) e no ESA (Piracicaba-SP). Aquelas que foram compradas tiveram seus respectivos laudos de autenticidade arquivados.

Foram estudadas as folhas de todas as espécies, salvo casos no grupo de espécies com conhecida atividade anti-inflamatória e que os princípios ativos

ocorrem em outro órgão da planta; nestes casos, além do extrato foliar, foi obtido o extrato de tais órgãos.

O número da Autorização de Acesso e de Remessa de Amostra de Componente do Patrimônio Genético: 010055/2012-6.

3.2. Secagem, armazenamento e investigação de tricomas glandulares

As folhas coletadas em campo foram secas em estufa de ar circulante, sob temperatura de 40 °C. Após secas, foram armazenadas em sacos plásticos com fechamento hermético contendo sílica azul desidratada e ao abrigo da luz. Espécies adquiridas no mercado foram armazenadas da mesma forma. A presença de tricomas glandulares nos órgãos vegetais estudados foi investigada em esteromicroscópio binocular (Zeiss) e as imagens com 10x de aumento foram registradas. Esta investigação foi realizada devido ao fato de LST geralmente serem armazenadas nesses tricomas em espécies da família Asteraceae^{22,26} e, portanto, tal informação foi utilizada para corroborar os resultados da desreplicação.

3.3. Preparo dos extratos

Os extratos foram obtidos a partir do pó (20 mg; 0,42 mm de diâmetro) das folhas secas previamente pulverizadas em moinho analítico (IKA®). Lotes de pó de algumas plantas foram extraídos por diferentes sistemas de solventes (2 mL), solventes selecionados (grau de pureza para análises de CLAE) em diferentes proporções, a fim de se definir a melhor forma de extração capaz de remover o máximo possível de substâncias. Foram testados etanol-água e metanol-água nas proporções de 1:1, 3:7 e 7:3 (v/v). Estes solventes foram utilizados para realizar extrações através de maceração e remaceração em agitador orbital (25 °C e 110 rpm), por 24 h, ou em banho de ultrassom por 10 min. Todos os extratos foram realizados em eppendorfs.

Todos os extratos foram particionados com *n*-hexano para remover o material graxo (ceras, pigmentos lipofílicos, etc.), filtrados em filtro de politetrafluoroetileno de 20 µm e então analisados por cromatografia líquida acoplada a detector de UV-DAD (CLAE-UV-DAD). O melhor solvente e a melhor forma de extração, indicados pelos cromatogramas e cálculo de rendimento, foram aqueles utilizados para a extração padronizada de todas as demais espécies. O método selecionado foi aquele com extração utilizando etanol-água 7:3 (v/v) por maceração durante 24 h.

Para a análise cromatográfica através da cromatográfica líquida de ultra performance, acoplada a detector de UV-DAD e espectrometria de massas, este com ionização por eletrospray e detecção por alta resolução por transformada de Fourier (UPLC-UV-ESI-HRFTMS), os extratos foram solubilizados em 1000 μL de água. Para avaliação da atividade anti-inflamatória, os extratos foram também solubilizados em água, seguido da diluição seriada nas respectivas soluções tampões até se chegarem às concentrações finais desejadas para os ensaios (100, 10, 1, 0,1 e 0,01 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

3.4. Ensaios anti-inflamatórios *in vitro* - COX e LOX

Foram utilizados *kits* de triagem de inibidores da COX (nº de catálogo 560101, Cayman Chemical) e LOX (nº de catálogo 760700 e 60401, Cayman Chemical) a fim de detectar inibição das principais vias envolvidas na inflamação COX- e LOX-dependentes. A triagem dos extratos inibidores foi realizada de acordo com as instruções dos fabricantes dos *kits*, após ensaios piloto com extratos de algumas plantas e substâncias padrão. Os ensaios piloto foram realizados a fim de se definir as doses a serem testadas e a padronização das técnicas no laboratório. Os métodos foram padronizados como se segue.

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

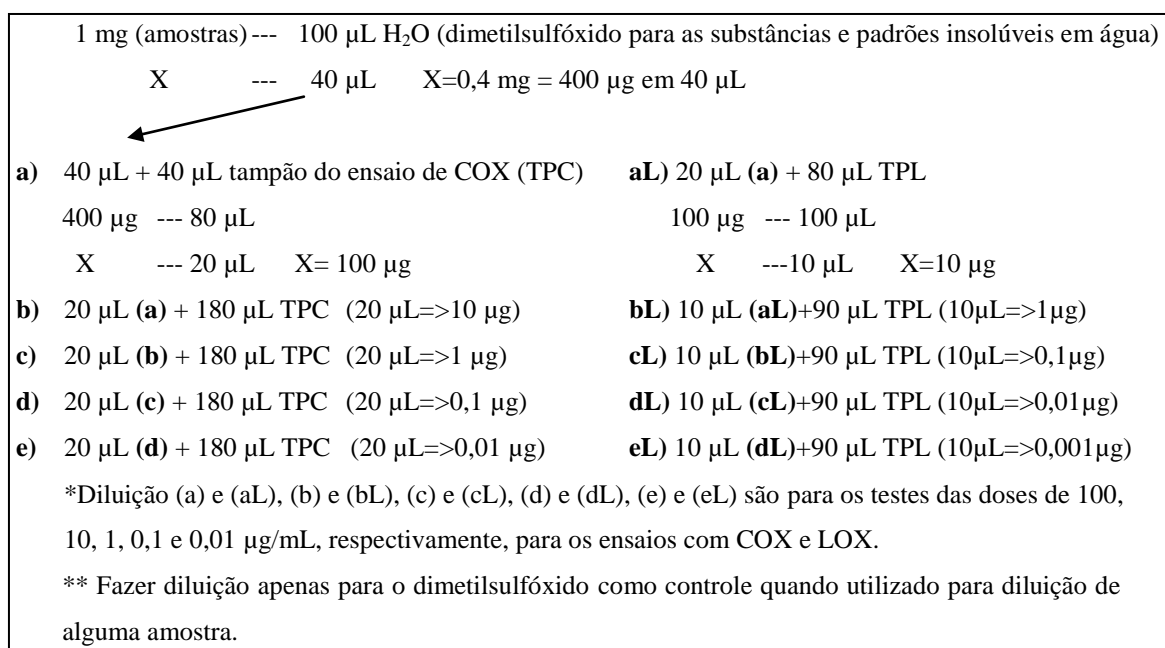


Figura 1. Procedimento de diluição das amostras (extratos, substâncias ou padrões) para os ensaios de triagem de inibidores da COX e LOX.

O ponto chave da padronização deste ensaio, além da definição das doses a serem testadas, foi a cronometragem de toda esta reação, a qual não era explícita na literatura^{50,51} assim como nas instruções do respectivo kit. Para tal, foram então realizadas reações de uma série de cinco amostras por vez (as cinco doses de cada extrato, padrão ou substância), seguindo o procedimento de cronometragem descrito na Figura 2. O motivo é que parte dos reagentes, por serem instáveis, necessitam ser preparados durante a reação, em intervalos muito pequenos. Nestes intervalos também deve ser considerado o preparo para o próximo passo que consiste em preparar as pipetas, ponteiros, além de deixar o reagente a ser aplicado já pipetado, pois toda a etapa de reação é um ensaio enzimático, portanto sendo extremamente influenciado pelo tempo.

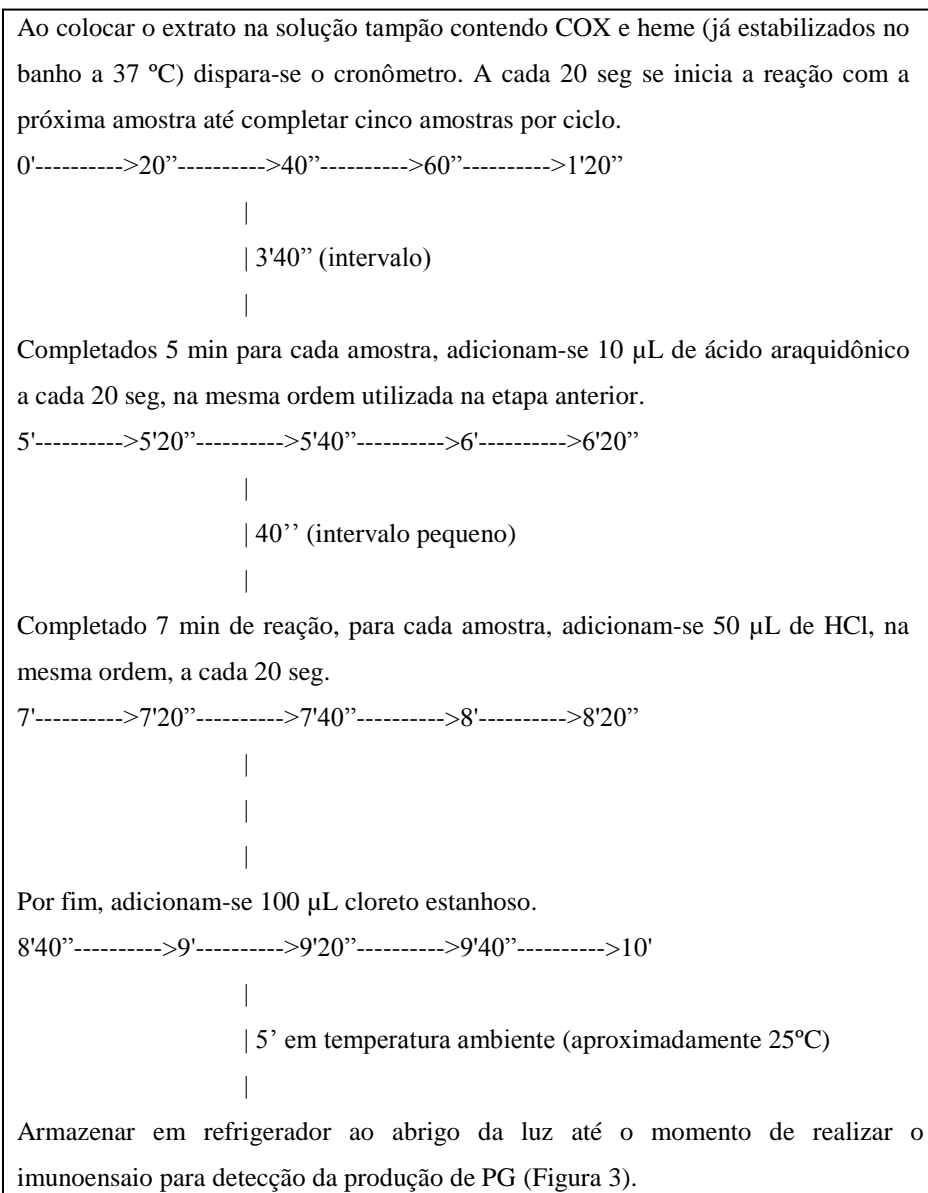


Figura 2. Procedimento de cronometragem da etapa de reação do ensaio de triagem de inibidores da COX.

A produção de PG na etapa de reação descrita na Figura 2 foi dosada em imunoenensaio (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* - ELISA; Figura 3), baseado na competição entre PG e PG conjugada à enzima acetilcolinesterase (PG-conj) pelo limitado número de anticorpos anti-PG ligados na placa de 96 poços. Assim, a ligação de PG-conj é inversamente proporcional à quantidade de PG. Esta etapa foi realizada exatamente como o descrito no kit, na diluição recomendada de 1:2000. As placas de 96 poços foram lavadas com tampão lavagem para remover reagentes não ligados aos poços pelos anticorpos anti-PG. O reagente de Elman que contém substrato para acetilcolinesterase foi adicionado a cada poço. O produto da reação

enzimática é amarelo e a intensidade desta cor foi lida em leitor de placa no comprimento de onda de 405 nm. A intensidade da cor é proporcional à quantidade de PG-conj ligada e inversamente proporcional à quantidade de PG incubada; assim uma maior densidade ótica indica maior poder de inibição da produção de PG por inibição da COX-1 pelos extratos/substâncias/padrões. A quantidade de PG foi mensurada por interpolação da densidade ótica obtida em curva de densidade ótica por concentração de PG. As porcentagens de inibição foram determinadas e com elas foi realizado o cálculo de concentração inibitória de 50% da atividade enzimática (IC_{50}).

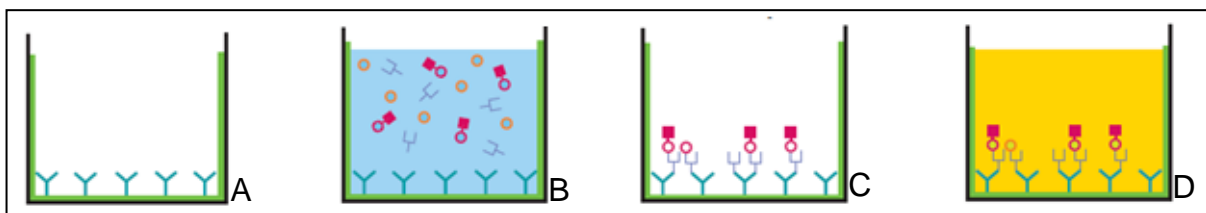


Figura 3. Etapa de ELISA para a dosagem da produção de produção de PG na etapa de reação do ensaio de triagem de inibidores da COX (Figura 2). **A)** Placas de 96 poços com anticorpos monoclonais anti anticorpo. **B)** Incubação das amostras produzidas na etapa de reação (PG desenhado como círculos laranja), devidamente diluídas, com os anticorpos anti-PG e PG conjugadas (PG-conj) com enzima acetilcolinesterase (desenhada de vermelho). **C)** Lavagem da placa para remoção dos reagentes não ligados. **D)** Adição do reagente de Elman (que contém acetilcolina, substrato para acetilcolinesterase). Imagem retirada do manual do respectivo kit (Cayman Chemical, nº de catálogo 560101), com alterações.

Para avaliar a inibição da via LOX-dependente os extratos foram dissolvidos da mesma forma que para o ensaio de COX, a fim de se chegar às mesmas doses (considerando pipetar 10 μ L num volume total de 100 μ L, que ocorre a etapa de inibição; Figura 1), porém utilizando o tampão do respectivo kit. As doses dos extratos a serem avaliadas (10 μ L), a enzima 5-LOX em solução tampão (90 μ L) e solução contendo ácido araquidônico (10 μ L) foram mantidas nas placas de 96 poços em agitador por 5 min. Solução cromógena (100 μ L) foi adicionada aos poços e as placas foram mantidas em agitador por mais 5 min. A atividade da LOX foi mensurada pela produção de hidroperóxidos que absorvem no comprimento de onda de 490 nm. A leitura das densidades óticas foi obtida por leitor de placas; menores densidades óticas indicam maior inibição da 5-LOX pelos extratos/substâncias/padrões. As porcentagens de inibição foram determinadas e a partir delas foi calculado os valores de IC_{50} .

3.5. Metabolômica

Um método cromatográfico que resolvesse a maioria dos picos dos extratos das plantas a serem estudadas foi previamente desenvolvido em CLAE-UV-DAD (Shimadzu®). Ele foi desenvolvido utilizando-se: matrizes vegetais sabidamente complexas; coluna cromatográfica contendo alto número de pratos teóricos, adequada para a análise de extratos brutos (C-18 monolítica, 3 x 100 mm - Phenomenex®); como fase móvel um gradiente de acetonitrila (MeCN)-água: 0%-45% de MeCN em 60 min, seguido de 45%-100% de MeCN em 5 min e terminado com 100% de MeCN por 5 min. O método cromatográfico foi definido utilizando duas colunas em série e acrescentando 1% de ácido acético na fase móvel e o fluxo de 1,4 mL/min. Os solventes utilizados foram todos de grau HPLC e a água mili-Q.

Foram avaliados por este método os extratos do ensaio piloto para definir o melhor solvente extrator e a melhor forma de extração. Uma desreplicação preliminar também foi realizada por comparação dos dados de tempo de retenção (t_R) e curvas de absorção no UV com os do AsterDB. Essa desreplicação foi realizada com cerca de 50% das amostras (33) apenas para avaliar a variabilidade dos metabólitos secundários nas diferentes espécies estudadas.

Para a avaliação de todos os extratos em UPLC-UV-HRFTMS (Thermo Scientific Exactive™ equipado com tecnologia Orbitrap™, Thermo Scientific®) o método cromatográfico foi redefinido: coluna cromatográfica de um menor tamanho de diâmetro de partícula - 3 μm (C18 - 150 x 3 mm; ACE®), um fluxo de 0,3 mL/min de um gradiente MeCN/água; 0,1% ácido fórmico na água, 5% de MeCN em 5 min, 5%-100% de MeCN em 50 min; a temperatura da coluna foi controlada em 30 °C.

O espectrômetro foi operado utilizando os seguintes parâmetros: modo positivo e negativo concomitante; faixa de varredura de 75-1.200 m/z ; alta resolução: 50.000; microvarredura: 1; *lock mass* (íon de m/z conhecida presente nas amostras, que permite a correção, em tempo real, de desvios de leitura de m/z , 83,0604 m/z do dímero de MeCN + H) no modo positivo; máximo tempo de injeção: 250 ms. Os parâmetros da fonte de ionização por ESI foram: taxa do fluxo de gás: 50; taxa do fluxo de gás auxiliar: 17; voltagem no spray: + e - 4,5 kV; corrente no spray: 1,4 MA; temperatura capilar: 320 °C; voltagem no capilar: + e - 30 V; voltagem na lente: + e - 90 V; voltagem no cone (*skimmer*): + e - 20 V.

Antes da sequência de análises, uma calibração do aparelho foi realizada para cada polaridade, 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®). As amostras foram analisadas randomicamente, sendo que uma amostra e um branco foi analisado no início, meio e fim da sequência de análises cromatográficas. A desrepliação foi, então, realizada para todas as amostras por comparação dos precisos dados de massas com os do *Dictionary of Natural Products*® (DNP), do AsterDB e da literatura (SciFinder Scholar®). Essa desrepliação foi realizada com o auxílio do software MZmine (tópico 3.7).

3.6. Pesquisa de substâncias precipitadoras de proteínas

Algumas substâncias, como taninos, podem exercer precipitação de proteínas e, portanto, promover uma inibição inespecífica em enzimas, como a COX e a LOX. Então, foi executado o clássico teste de precipitação de gelatina^{52,53} nos extratos que deram resultados positivos para inibição de qualquer uma das enzimas ou ambas. Eles foram ressuspensos em água (1 mg/100 µL), adicionada 1 gota de HCl (10%) e gotas de uma solução de gelatina (2,5%) até o surgimento de turvação ou precipitado. Como controle positivo foi utilizado o ácido tânico (Sigma-Aldrich).

Além disso, foi realizada a pesquisa destas substâncias durante as etapas de desrepliação.

3.7. Análises de correlação *in silico* e desrepliação

Com o emprego do software MZmine 2.10 (MZmine Development Team) os cromatogramas dos diferentes extratos foram decodificados, tiveram os seus isótopos eliminados, picos idênticos nos diferentes extratos alinhados e os espaços vazios preenchidos. Depois que os dados cromatográficos foram tratados, ainda foi realizada a desrepliação como anteriormente mencionado, sendo que este software é capaz de utilizar bibliotecas de banco de dados de massa de alta resolução e t_R . No caso, foi utilizado o abrangente banco de dados DNP e o específico de substâncias da família Asteraceae, o AsterDB. Os parâmetros utilizados no MZmine estão descritos no Apêndice I.

A fim de que a desrepliação fosse ainda mais confiável, a confrontação com dados da literatura foi realizada pela construção de um banco de dados a partir da composição química já descrita na literatura para cada espécie já estudada, ou seu gênero, no caso de espécies que estão sendo estudadas pela primeira vez. Esse

banco de dados foi construído baixando-se as informações de massa monoisotópica através do SciFinder Scholar[®]. Desta forma, o AsterDB foi incrementado.

A partir dos resultados de atividade anti-inflamatória (IC_{50}) e dos dados cromatográficos de cada extrato (previamente tratados no MZmine e exportados deste software em formato `.csv` – Apêndice I) foram realizadas as análises de correlação *in silico* com análises estatísticas multivariadas supervisionadas realizadas nos softwares Weka 3.6.9 (Universidade de Waikato) e SIMCA-P 13.0.2.0[®] (Unmetrics).

Os softwares Sieve 2.0.180[®] (Thermo Scientific[®]) e MZmine trabalham muito similarmente, executando desde a etapa de tratamento dos dados à etapa de desreplicação. Porém, ambos apresentam a limitação de realizar apenas a análise estatística multivariada não supervisionada por PCA. A PCA é útil no escopo deste trabalho apenas para verificar as características metabolômicas dos extratos independentemente das suas propriedades anti-inflamatórias e detecção de *outliers* ou tendências. Assim, todos os passos foram realizados em ambos os softwares para confrontar os resultados obtidos. Os parâmetros utilizados no software Sieve foram os padrões do software.

No Sieve ainda é possível verificar as diferenças quantitativas das substâncias por análise estatística univariada: *t-test*. Tal análise foi realizada para detectar diferenças de concentração das substâncias entre os extratos inibidores da COX e LOX e os não inibidores (considerados, neste caso, como os extratos não ativos e os inibidores apenas da LOX ou da COX). A partir dos dados tratados no MZmine foi realizada a mesma abordagem para confrontação ou união dos resultados.

Entretanto, para a pesquisa, de fato, dos biomarcadores da atividade anti-inflamatória, foram utilizadas análises estatísticas multivariadas supervisionadas para as propriedades anti-inflamatórias investigadas: no Weka foi realizada a seleção de atributos através de algoritmos genéticos (após eliminação dos atributos – variáveis x – com mínima ou nula variação entre as amostra; etapa realizada no software R utilizando os parâmetros padrões do pacote `caret`) seguida da busca de biomarcadores através da árvore de decisão J48; no SIMCA-P foi realizado o PLS e o OPLS. Os parâmetros utilizados para seleção de atributos por algoritmos genéticos e construção das árvores de decisão J48 no software Weka foram descritos no Apêndice II. Os parâmetros utilizados no software SIMCA-P para as

análises estatísticas PLS e OPLS foram os padrões do software, sendo os dados avaliados sem normalização e com as normalizações disponíveis no próprio software: UVar (*unit variance*) e Pareto. Sendo considerado para escolha do tipo de normalização dos dados (ou ausência), aquele que gerar o melhor modelo estatístico.

Todas as análises estatísticas foram realizadas com os dados cromatográficos com detecção de massas nos modos positivo e negativo separadamente, fossem elas análises univariadas ou multivariadas. Os melhores modelos estatísticos (OPLS) construídos no SIMCA-P para pesquisa de biomarcadores foram validados para predição de atividade de inibição da COX e da LOX por novos extratos. Modelos de redes neurais artificiais (RN) para a mesma finalidade foram construídos no software Weka, sendo os parâmetros das RN descritos no Apêndice III. A validação destes modelos foi realizada por meio de validação cruzada e validação externa. Para isso, as amostras foram divididas em um conjunto de dados para o treino e um conjunto para os grupos de testes e validação destes modelos, sendo os grupos descritos no Apêndice IV. Foram utilizados os mesmos grupos e fonte de dados para a construção de todos os modelos de forma que os resultados pudessem ser comparados.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Espécies e locais de coleta

As espécies obtidas, seus respectivos códigos de identificação e locais de coleta estão descritos na Tabela 1. Pode-se observar na Tabela 1 que foram selecionadas plantas de diversos níveis de evolução dentro da família Asteraceae (diversas tribos, Tabela 1 e Figura 4), estas dispersas nos três grupos deste trabalho: **(1)** espécies do cerrado endêmicas **(2)** espécies com relato científico ou com histórico etnofarmacológico para atividade anti-inflamatória; **(3)** espécies de importância alimentar com potencial nutracêutico.

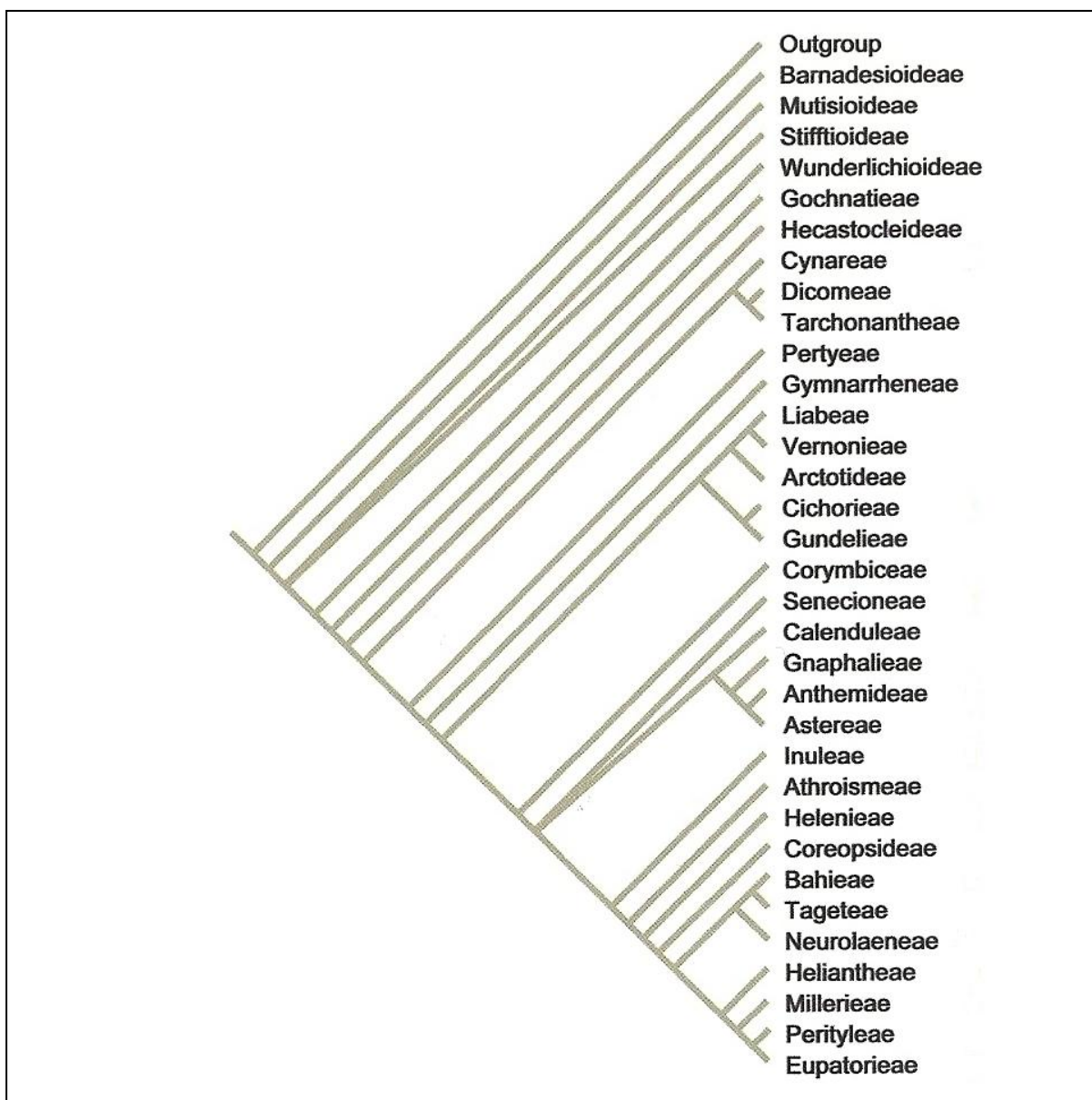


Figura 4. Tribos da família Asteraceae de importância econômica (alimentícia, tóxica ou etnofarmacológica) organizadas filogeneticamente. Esta figura foi retirada do livro do Funk et al. 2009⁵⁴.

Tabela 1. Espécies vegetais locais de coleta, grupos, tribos, rendimento de seus extratos e o código dos mesmos.

Grupo	Espécie	Código	Tribo	Local de coleta	Rendimento (%)
(2)	<i>Achillea millefolium</i> Ledeb. (mil-folhas) ^{31,44}	1	Anthemideae Cass.	Jardinópolis-SP 21°S e 47°W	3,6
(2)	<i>Achyrocline satureioides</i> (Lam.) DC. (marcela) ^{29,55}	2	Gnaphalieae (Cass.) Lecoq & Juill.	Comercial	1,7
(3)	<i>Acmella oleraceae</i> (L.) R.K. Jansen (jambú) ⁵⁶	3	Heliantheae Cass.	Comercial	3,9
(2)	<i>Ageratum conyzoides</i> L. (mentrasto) ⁵⁷	4	Eupatorieae Cass.	Jardinópolis-SP 21°S e 47°W	3,6
(1)	<i>Anteremanthus hatschbachii</i> H. Rob. ⁵⁸	5	Vernonieae Cass.	Cristália-MG 16°35'37.6'' S e 42°54'07.7'' W	3,3
(2)/(3)	<i>Arctium lappa</i> L. (bardana) ^{59,60}	6	Cynareae Less.	Jardinópolis-SP 21°S e 47°W	2,5
(2)/(3)	<i>Arctium lappa</i> L. (bardana) (Raiz) ^{59,60}	7	Vernonieae Cass.	Jardinópolis-SP 21°S e 47°W	4,2
(2)	<i>Arnica montana</i> L. (arnica) ²⁷	8	Heliantheae Cass.	Comercial	3,8
(2)	<i>Artemisia absinthium</i> L. (losna) ⁶¹	9	Anthemideae Cass.	Jardinópolis-SP 21°S e 47°W	3,0
(2)	<i>Artemisia annua</i> L. ^{62,63}	10	Anthemideae Cass.	Jardinópolis-SP 21°S e 47°W	16,9
(2)	<i>Baccharis dracunculifolia</i> D.C. (alecrim do campo) ⁶⁴	12	Astereae Cass.	Jardinópolis-SP 21°S e 47°W	22,8
(2)	<i>Baccharis trimera</i> (Less.) DC. (carqueja) ^{65,66}	13	Astereae Cass.	Jardinópolis-SP 21°S e 47°W	4,7
(2)	<i>Bidens pilosa</i> L. (picão) ⁶⁷⁻⁶⁹	14	Coreopsideae Lindl.	Jardinópolis-SP 21°S e 47°W	3,2
(1)	<i>Calea cuneifolia</i> DC. ⁵⁸	15	Neurolaeneae Rydb.	Altinópolis-SP Morro do Forno	2,9
(2)	<i>Calendula officinalis</i> L. (calêndula) ^{70,71}	16	Calenduleae Cass.	Jardinópolis-SP 21°S e 47°W	7,0
(2)	<i>Calendula officinalis</i> L. (calêndula) (Inflorescência) ⁷⁰⁻⁷²	17	Calenduleae Cass.	Jardinópolis-SP 21°S e 47°W	22,5
(1)	<i>Chronopappus bifrons</i> (DC. ex Pers.) DC. ^{58,73}	18	Vernonieae Cass.	Santo Antônio do Itambé-MG	3,8
(3)	<i>Cichorium intybus</i> L. (chicória) ⁵⁴	19	Cichorieae Lam. & DC.	Comercial	7,3
(3)	<i>Cynara scolymus</i> L. (alcachofra) ⁵⁴	20	Cardueae Cass.	Comercial	2,9
(1)	<i>Dasyphyllum brasiliense</i> var. <i>latifolium</i> (D. Don) Cabrera (espinho-agulha) ^{58,74}	21	Barnadesieae D. Don	Furnas-MG 20°39'50'' S e 46°21'79.3'' W	6,8
(2)	<i>Echinacea purpurea</i> (L.) Moench (equinácea) ⁷⁵	22	Heliantheae Cass.	Jardinópolis-SP 21°S e 47°W	3,5
(2)	<i>Emilia sonchifolia</i> L. DC (emília) ⁷⁶	23	Senecioneae Cass.	Jardinópolis-SP 21°S e 47°W	8,6
(1)	<i>Eremanthus polycephalus</i> (DC.) MacLeish ⁵⁸	24	Vernonieae Cass.	Diamantina-MG 18°11'52.5'' S e 43°37'33.1'' W	1,5
(1)/(2)	<i>Gymnanthemum amygdalinum</i> (Delile) Sch. Bip. ex Walp (boldo da Bahia) ^{58,77}	25	Vernonieae Cass.	Jardinópolis-SP 21°S e 47°W	3,1
(3)	<i>Helianthus annuus</i> L. (girassol) ⁵⁴	26	Heliantheae Cass.	Comercial	3,7

continua na próxima página

continuação da página anterior

(1)	<i>Heterocoma gracilis</i> Loeuille, J. N. Nakaj. & Semir (espécie nova) ^{58,73}	27	Vernonieae Cass.	São Gonçalo do Rio Preto-MG	4,5
(3)	<i>Lactuca sativa</i> L. (alface) ⁵⁴	28	Cichorieae Lam. & DC.	Comercial	3,8
(1)	<i>Lychnophora diamantinana</i> Coile & S.B. Jones ⁵⁸	29	Vernonieae Cass.	Diamantina-MG 18°11'52.5'' S e 43°37'33.1'' W	1,6
(1)	<i>Lychnophora ericoides</i> Mart. (arnica-da-serra) ^{78,79*}	30	Vernonieae Cass.	Jardinópolis-SP 21°S e 47°W	12,9
(1)	<i>Lychnophora ericoides</i> Mart. (arnica-da-serra) (Inflorescência) ^{78,79}	31	Vernonieae Cass.	Jardinópolis-SP 21°S e 47°W	11,7
(1)	<i>Lychnophora ericoides</i> Mart. (arnica-da-serra) (Caule) ^{78,79}	32	Vernonieae Cass.	Jardinópolis-SP 21°S e 47°W	2,5
(1)	<i>Lychnophora ericoides</i> Mart. (arnica-da-serra) ^{78,79*}	33	Vernonieae Cass.	Jardinópolis-SP 21°S e 47°W	4,8
(1)	<i>Lychnophora tomentosa</i> (Mart. ex DC.) Sch. Bip. ^{58,73}	34	Vernonieae Cass.	Diamantina-MG 18°12'52.9'' S e 43°35'44.1'' W	2,0
(2)	<i>Matricaria chamomilla</i> L. (camomila) ^{31,70}	35	Anthemideae Cass.	Jardinópolis-SP 21°S e 47°W	6,2
(2)	<i>Matricaria chamomilla</i> L. (camomila) (Inflorescência) ^{31,70}	36	Anthemideae Cass.	Jardinópolis-SP 21°S e 47°W	5,4
(2)	<i>Mikania glomerata</i> Sprengl. (guaco) ⁸⁰	37	Eupatorieae Cass.	Jardinópolis-SP 21°S e 47°W	1,8
(1)	<i>Mikania hirsutissima</i> DC. ⁵⁸	38	Eupatorieae Cass.	Jardinópolis-SP 21°S e 47°W	1,9
(2)	<i>Mikania laevigata</i> Schultz Bip. ex Baker (guaco-cheiroso) ⁸⁰	39	Eupatorieae Cass.	Jardinópolis-SP 21°S e 47°W	3,0
(1)	<i>Minasia scapigera</i> H. Rob. ⁵⁸	40	Vernonieae Cass.	Diamantina-MG 18°12'52.9'' S e 43°35'44.1'' W	2,1
(1)	<i>Piptolepis monticola</i> Loeuille (espécie nova) ^{58,73}	41	Vernonieae Cass.	Santo Antônio do Itambé-MG	12,5
(1)	<i>Prestelia eriopus</i> Sch. Bip. ^{58,73}	42	Vernonieae Cass.	Santana do Riacho-MG 19°17'28.1'' S e 43°36'01.5'' W	2,8
(2)	<i>Pucea guttoc</i> D.C. ⁸¹	43	Inuleae Cass.	Jardinópolis-SP 21°S e 47°W	4,2
(2)/(3)	<i>Smilax sonchifolius</i> (Poepp. & Endl.) H. Robinson (yacón) ^{54,82,83}	45	Heliantheae Cass.	Jardinópolis-SP 21°S e 47°W	2,3
(2)	<i>Solidago microglossa</i> DC. (arnica brasileira) ⁸⁴	46	Astereae Cass.	Jardinópolis-SP 21°S e 47°W	4,0
(2)	<i>Solidago microglossa</i> DC. (arnica brasileira) (Inflorescência) ⁸⁴	47	Astereae Cass.	Jardinópolis-SP 21°S e 47°W	5,3
(3)	<i>Sonchus oleraceus</i> L. (serralia) ⁸⁵	48	Cichorieae Lam. & DC.	Jardinópolis-SP 21°S e 47°W	3,1
(1)	<i>Sphagneticola trilobata</i> (L.) Pruskei (mal-me-quer) ⁵⁸	49	Heliantheae Cass.	Campus USP Ribeirão Preto	1,9
(3)	<i>Stevia rebaudiana</i> (Bertoni) Bertoni (estévia) ⁸⁶	50	Eupatorieae Cass.	Comercial	5,9
(1)	<i>Tridax procumbens</i> L. ⁵⁸	51	Heliantheae Cass.	Campus USP Ribeirão Preto	2,8
(2)	<i>Tanacetum parthenium</i> L. (feverfew) ^{28,44,87,88}	52	Anthemideae Cass.	Jardinópolis-SP 21°S e 47°W	22,4
(2)	<i>Tanacetum parthenium</i> L. (feverfew) (Inflorescência) ^{28,44,87,88}	53	Anthemideae Cass.	Jardinópolis-SP 21°S e 47°W	24,0
(2)	<i>Tanacetum vulgare</i> L. ⁸⁹	54	Anthemideae Cass.	Jardinópolis-SP 21°S e 47°W	3,9

continua na próxima página

continuação da página anterior

(2)	<i>Taraxacum officinale</i> Weber ex FH Wigg. (dente-de-leão) ⁹⁰	55	Cichorieae Lam. & DC.	Jardinópolis-SP 21°S e 47°W	3,1
(2)	<i>Tithonia diversifolia</i> (Hemsl.) A. Gray (margaridão) ^{22,91,92}	56	Heliantheae Cass.	Jardinópolis-SP 21°S e 47°W	3,6
(1)	<i>Vernonia herbaceae</i> (Vell.) Rusby ⁵⁸	57	Vernonieae Cass.	Mogi Guaçu-SP 22°14'59.0" S e 47°09'23.3" W	10,4
(1)	<i>Vernonia platensis</i> (Spreng.) Less. ⁵⁸	58	Vernonieae Cass.	Botucatu-SP 22°53'25.9" S e 48°30'05.2" W	8,5
(2)	<i>Vernonia polyanthes</i> Less. (assa-peixe) ³⁰	59	Vernonieae Cass.	Estrada Sacramento a Araxá-MG 19°52'47,8" S e 47°21'18.1" W	23,0
(1)	<i>Vernonia rubriramea</i> Mart. Ex DC. ⁵⁸	60	Vernonieae Cass.	Jardinópolis-SP 21°S e 47°W	23,4
(1)	<i>Viguiera arenaria</i> Baker ⁵⁸	61	Heliantheae Cass.	Itirapina-SP 22° 13' S e 47° 54' W	3,6
(1)	<i>Viguiera bracteata</i> Gardner ⁵⁸	62	Heliantheae Cass.	Estrada Curvelo-MG	3,1
(1)	<i>Viguiera discolor</i> Baker ⁵⁸	63	Heliantheae Cass.	Estrada Altinópolis-MG	2,6
(1)	<i>Viguiera filifolia</i> Sch. Bip. Ex Baker ⁵⁸	64	Heliantheae Cass.	Alto Paraíso de Goiás-GO 25°22'53,4" S e 49°48'24,0" W	2,9
(1)	<i>Viguiera linearifolia</i> Chodat & Hassl. ⁵⁸	65	Heliantheae Cass.	Ponta Porã-MS 22°16'38,5" S e 55°40'28,8" S	2,0
(1)/(2)	<i>Viguiera robusta</i> Gardner ^{25,58}	66	Heliantheae Cass.	Mogi Guaçu-SP 22°16' S e 47°11' W	3,6
(1)	<i>Viguiera trichophylla</i> Dusén ⁵⁸	67	Heliantheae Cass.	Palmeira-PR 25°22'53,4" S e 49°48'21,0" W	3,5

(1) espécies do cerrado; (2) espécie com relato científico ou etnofarmacológico como anti-inflamatório; (3) espécies de importância alimentar. Foram estudados os extratos foliares de todas as espécies, salvo casos no grupo de espécies com conhecida atividade anti-inflamatória e que os princípios ativos ocorrem em outro órgão da planta. *Amostras códigos 30 e 33 são de espécies identificadas pelo especialista como idênticas, mas suspeita-se de diversidade metabólica entre elas (devido às mudas mãe serem de origens geográficas diferentes); diante da importância desta espécie para este trabalho, amostras de indivíduos de ambas as populações foram incluída neste trabalho.

4.2. Preparo dos extratos

O estudo piloto realizado para se definir a melhor metodologia para extração de todas as plantas deste projeto, o qual fosse capaz de extrair uma maior diversidade substâncias de interesse maior possível, incluiu primeiramente duas espécies de conhecida complexidade metabólica: *Tithonia diversifolia*²² (Td) e *Viguiera gardneri*²³ (Vg). Este estudo permitiu observar que o rendimento dos extratos, após a partição com *n*-hexano, é maior para os extratos obtidos em banho de ultrassom (10 min) comparado ao rendimento dos extratos obtidos por maceração em agitador por 24 h (Tabela 2).

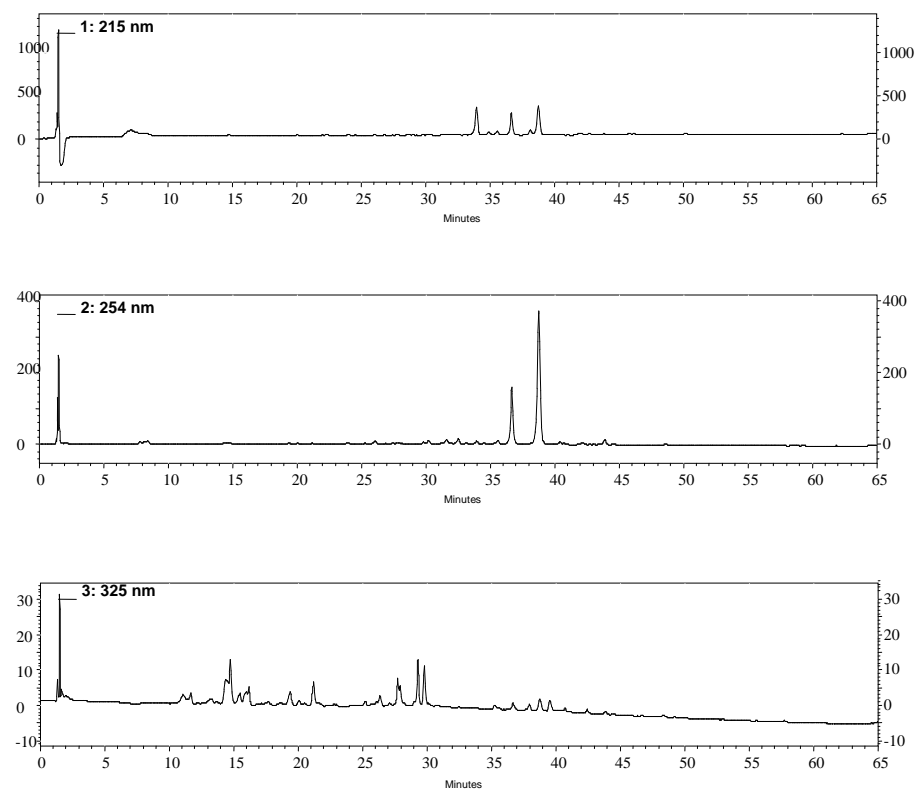
Porém, através da análise dos cromatogramas obtidos por CLAE-UV-DAD observa-se maior intensidade dos picos (relativa à massa) e uma maior diversidade de substâncias nos extratos obtidos por meio de maceração em agitador por 24 h (Figuras 5, 6 e 7). Nestas figuras constam os cromatogramas dos extratos de *T. diversifolia* extraídos com etanol-água. Aqueles extratos extraídos com metanol-água, por demonstrarem resultados similares, foram omitidos. Pelo mesmo motivo, os extratos de *V. gardneri* também foram omitidos.

Sendo assim, considerando que todos os extratos partiram da mesma massa inicial de pó de planta, empregando-se o mesmo volume inicial de solvente, foram secados e depois foram ressuspensos em um mesmo volume de solvente antes da injeção no cromatógrafo, e que todos tiveram o mesmo volume de injeção (20 µL), pode se concluir que os extratos obtidos por maceração em agitador por 24 h, pela maior diversidade de substâncias extraídas e maior intensidade dos picos, são os mais adequados para os objetivos deste estudo do que os extratos realizados em banho de ultrassom.

Por outro lado, considerando a limitada abrangência da CLAE-UV-DAD essa aparente vantagem da maceração em agitador orbital por 24 h em relação a extração em banho de ultrassom pode não ser real. Outro ponto a ser considerado é se ocorre degradação gerando subprodutos nos extratos por maceração em agitador orbital por 24 h devido o maior tempo de contato da amostra com o solvente. A diferença da extração por maceração em agitador orbital por 24 h e em banho de ultrassom deve ser posteriormente investigada se tem real diferença estatística e de preferência por métodos mais abrangentes, como CLAE-EM e RMN. *A priori* o método que se mostrou mais promissor será o de escolha que é por maceração em agitador orbital por 24h.

Também foi possível observar neste estudo piloto que uma segunda maceração em agitador, por mais 24 h (remaceração), é capaz aumentar o rendimento da primeira extração (Tabela 2). Porém, esta segunda extração não demonstrou ser vantajosa do ponto de vista variabilidade química, pois é capaz de extrair basicamente os constituintes majoritários (Figura 8). Sendo assim, o extrato obtido na remaceração, se adicionado a ao extrato da maceração inicial, diluiria os constituintes minoritários. Devido ao objetivo deste trabalho ser exatamente o de estudar maior diversidade de substâncias, inclusive os constituintes minoritários, o método de extração selecionado foi através de maceração em agitador orbital (110 rpm a 25 °C) durante 24 h, dentre os métodos aqui avaliados.

Extrato de Td em etanol-água 3:7 (v/v) e em agitador orbital



Extrato de Td em etanol-água 3:7 (v/v) e em banho de ultrassom

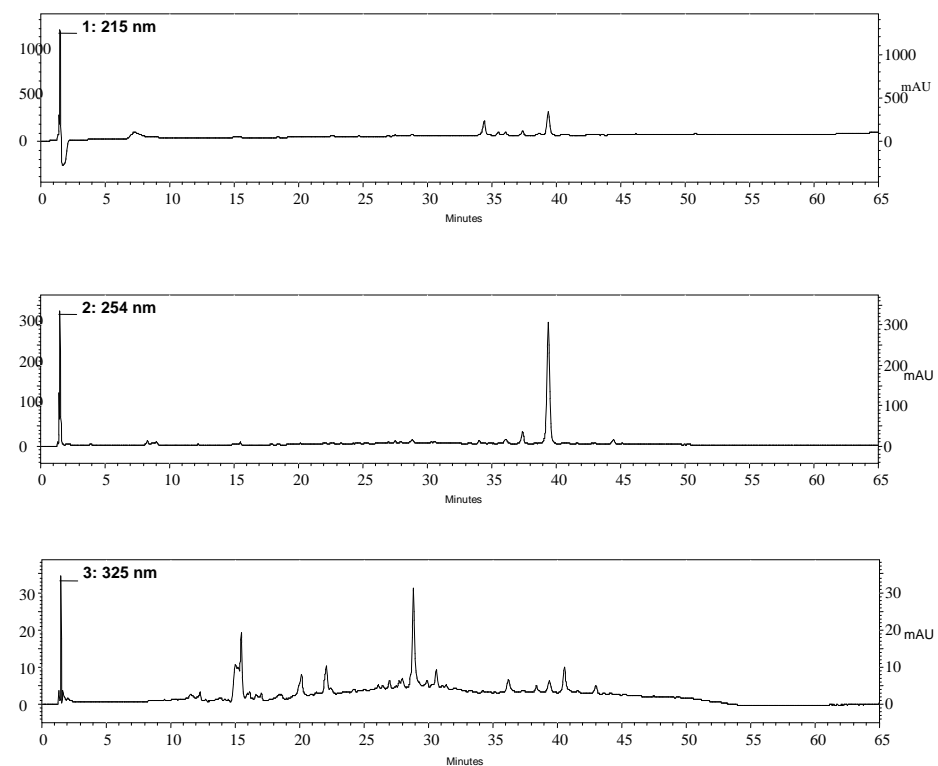
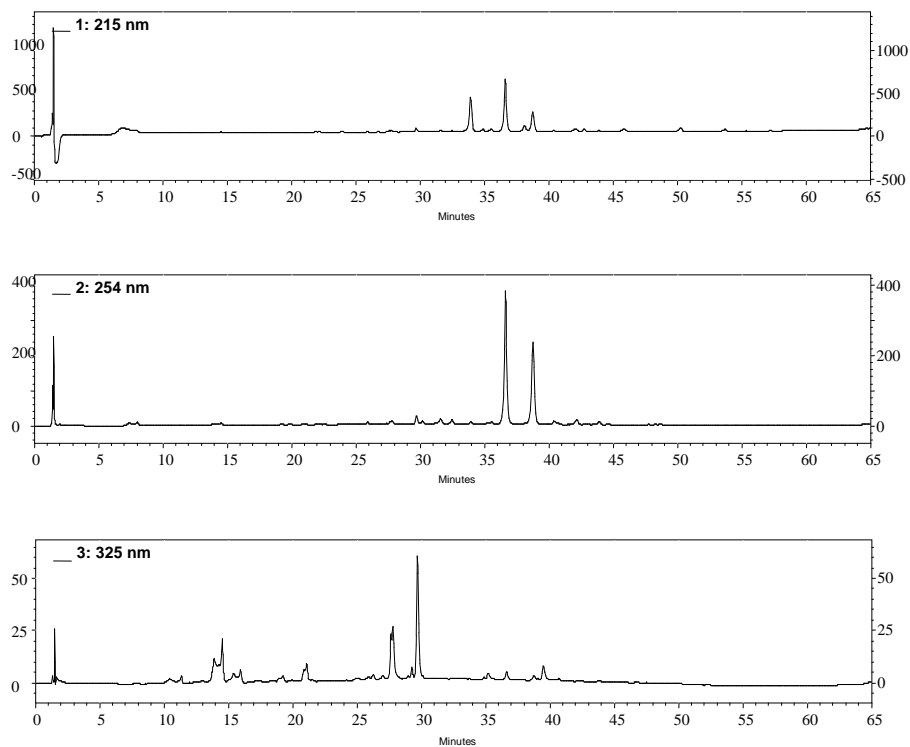


Figura 5. Cromatogramas obtidos por CLAE-UV-DAD (0-45% de MeCN em 60 min; 0,5% ácido acético; coluna monolítica C18; 1,4 mL/min) de extratos de *T. diversifolia* (Td) obtidos em agitador orbital (24 h) e em banho de ultrassom (10 min), utilizando etanol-água 3:7 (v/v) como solvente extrator. Os cromatogramas foram registrados em três comprimentos de onda: 215, 254 e 325 nm.

Extrato de Td em etanol-água 1:1 (v/v) e em agitador orbital



Extrato de Td em etanol-água 1:1 (v/v) e em banho de ultrassom

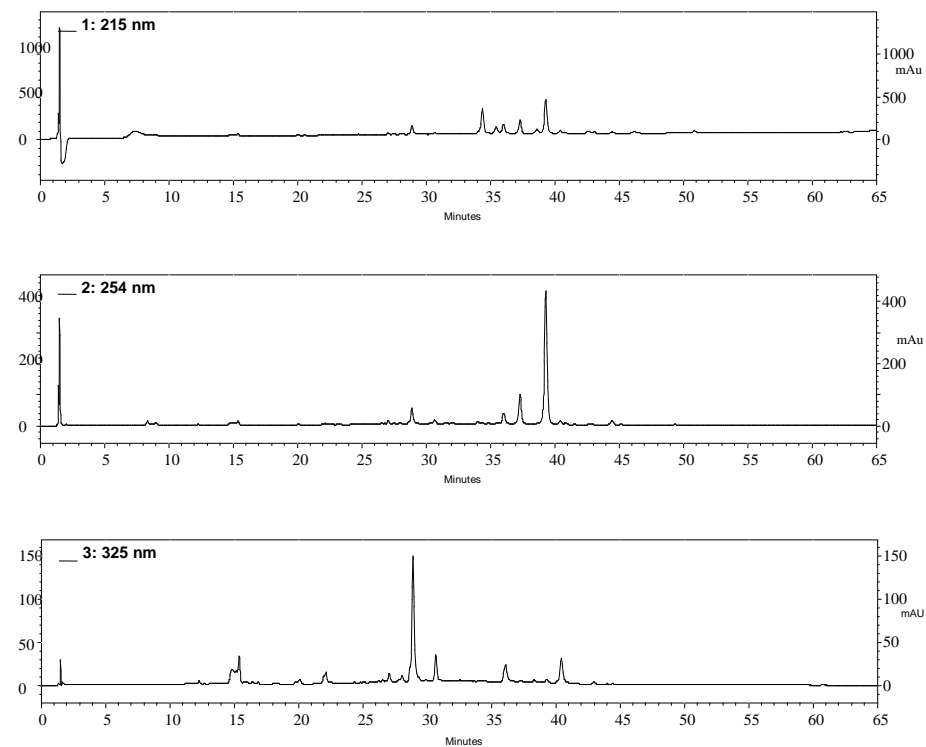
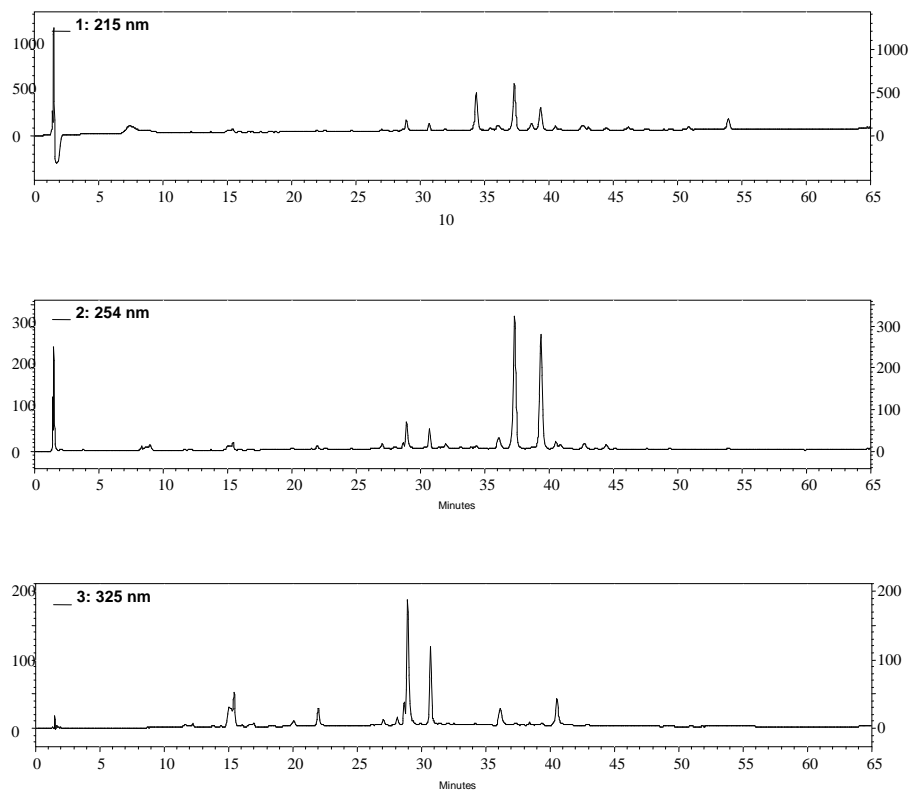


Figura 6. Cromatogramas obtidos por CLAE-UV-DAD (0-45% de MeCN em 60 min; 0,5% ácido acético; coluna monolítica C18; 1,4 mL/min) de extratos de *T. diversifolia* (Td) obtidos em agitador orbital (24 h) e em banho de ultrassom (10 min), utilizando etanol-água 1:1 (v/v) como solvente extrator. Os cromatogramas foram registrados em três comprimentos de onda: 215, 254 e 325 nm.

Extrato de Td em etanol-água 7:3 (v/v) e em agitador orbital



Extrato de Td em etanol-água 7:3 (v/v) e em banho de ultrassom

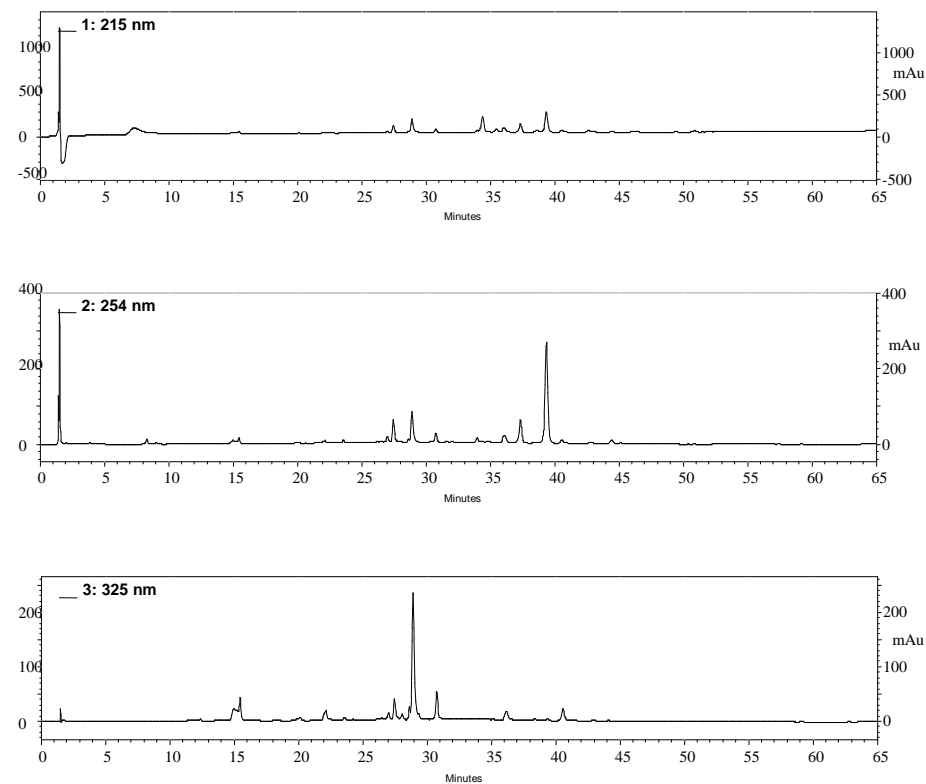


Figura 7. Cromatogramas obtidos por CLAE-UV-DAD (0-45% de MeCN em 60 min; 0,5% ácido acético; coluna monolítica C18; 1,4 mL/min) de extratos de *T. diversifolia* (Td) obtidos em agitador orbital (24 h) e em banho de ultrassom (10 min), utilizando etanol-água 7:3 (v/v) como solvente extrator. Os cromatogramas foram registrados em três comprimentos de onda: 215, 254 e 325 nm.

Tabela 2. Rendimento (mg) dos extratos de *T. diversifolia* (Td) e *V. gardneri* (Vg) obtidos em agitador orbital ou em banho de ultrassom. Parte do estudo piloto para desenvolvimento do melhor método extrator.

	Td/agitador (mg)		Vg/agitador (mg)		Td/ultrassom (mg)		Vg/ultrassom (mg)	
	maceração	remaceração	maceração	remaceração	maceração	remaceração	maceração	remaceração
etanol-água	2,8	1,8	2,6	1,4	3,9	1,6	3,6	2,5
	3,0	1,5	2,9	2,2	4,7	2,0	4,4	2,0
	3,7	1,4	2,8	1,4	4,0	1,6	3,9	2,5
metanol-água	2,5	1,8	2,9	1,4	4,1	1,7	3,5	1,9
	2,7	1,6	2,6	1,5	3,8	1,7	3,9	2,9
	2,7	1,3	2,6	1,7	3,8	1,1	4,1	1,9
Média	2,9	1,5	2,7	1,6	4,0	1,6	3,9	2,3
Rendimento	29%	16%	27%	16%	40%	16%	39%	23%

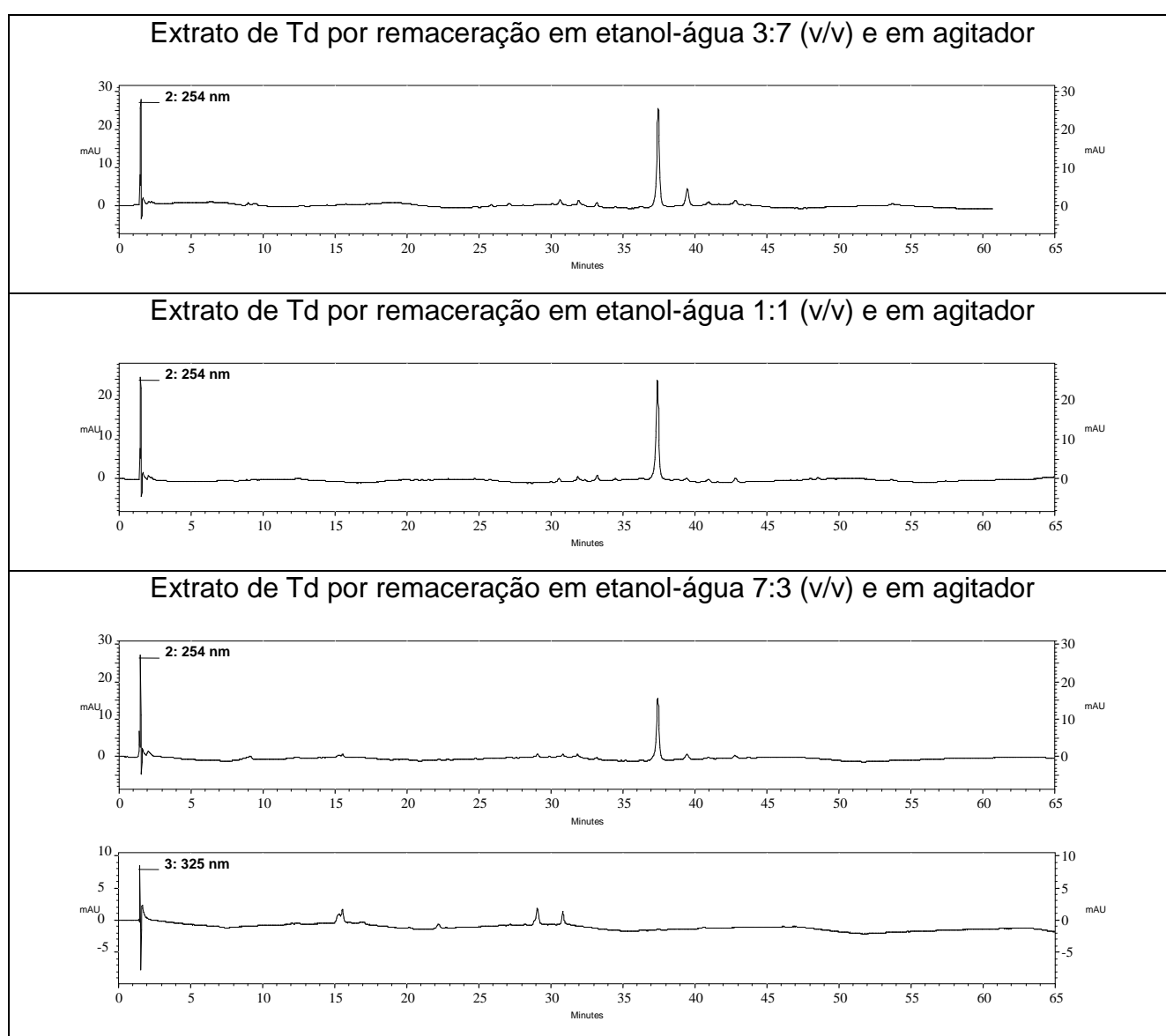


Figura 8. Cromatogramas obtidos por CLAE-UV-DAD (0-45% de MeCN; 0,5% de ácido acético; coluna monolítica C18; 1,4 mL/min) dos extratos de *T. diversifolia* (Td). Os extratos foram obtidos por remaceração em etanol-água (24 h) em diferentes proporções. Os cromatogramas foram registrados em 215, 254 e 325 nm, sendo omitidos aqueles em que não foi registrado nenhum pico.

Na Figura 8 constam os cromatogramas dos extratos de Td obtidos por remaceração em agitador, utilizando-se etanol-água como solvente extrator. Os cromatogramas dos extratos obtidos por remaceração com metanol-água como solvente extrator demonstraram resultados muito parecidos àqueles dos extratos obtidos com etanol-água e por isso foram omitidos. Já os cromatogramas dos extratos obtidos por remaceração em banho de ultrassom foram omitidos devido ao fato de terem sido registrados picos muito pouco intensos ou nenhum.

Como já mencionado anteriormente, os extratos obtidos utilizando etanol-água e metanol-água demonstraram perfis cromatográficos e rendimentos muito semelhantes (Figuras 10, 11 e 12). Entretanto, os extratos obtidos utilizando etanol-água 7:3 (v/v) demonstraram os melhores perfis cromatográficos, de acordo com os objetivos deste trabalho, resultado este muito desejável, considerando-se a maior toxicidade e preço do metanol, e daí o esforço em substituí-lo por etanol.

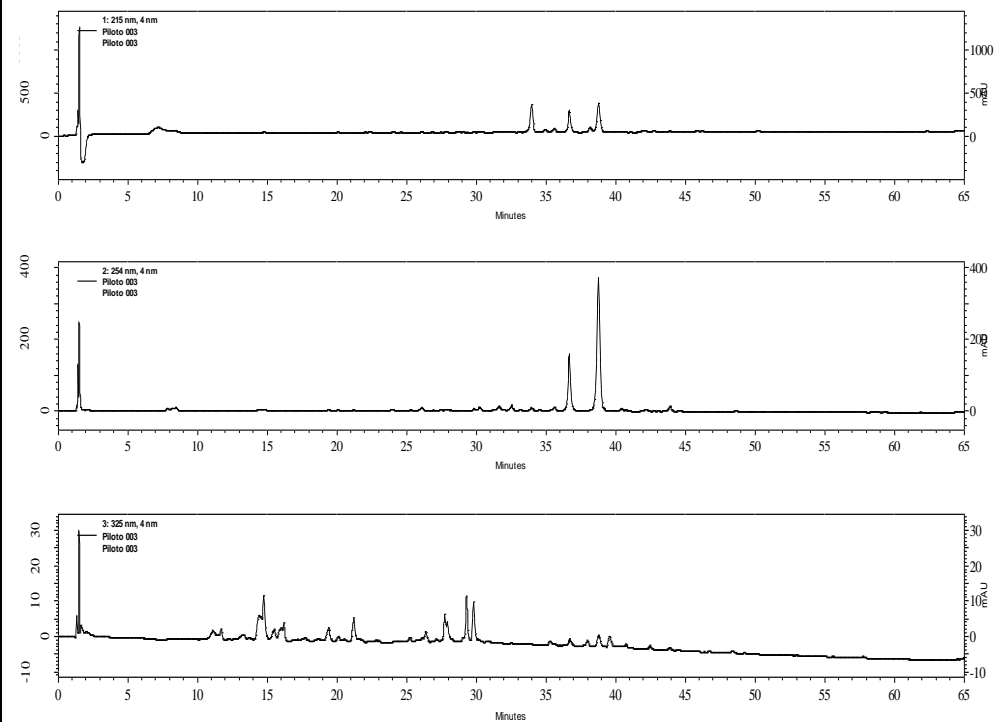
Com base nos resultados deste primeiro estudo piloto, que envolveu a análise de 48 matrizes vegetais (Figura 9), definiu-se como mais adequado propor o seguinte método extrativo, segundo a finalidade deste projeto: extração por 24 h, em agitador orbital, utilizando etanol-água 7:3 (v/v) como solvente extrator.

Td	etanol-água	3:7 (v:v)	ultra-som 10'
Vg	metanol-água	1:1 (v:v)	<i>shaker</i> orbital 24h
		7:3 (v:v)	remaceração em ultra-som 10'
			remaceração em <i>shaker</i> orbital 24h
Total:48 amostras			

Figura 9. Total de amostras do primeiro ensaio piloto.

Após este primeiro estudo piloto, um segundo foi realizado com um n maior de espécies com o intuito de se confirmar a melhor proporção dos solventes extratores escolhidos. Então, foi testada a extração de *B. pilosa*, *M. laevigata*, *S. sonchifolius* e *V. filifolia* com as seguintes misturas de solventes: etanol-água 3:7, 1:1 e 7:3 (v/v). Este estudo piloto, juntamente com o primeiro, totalizou seis espécies (considerando *T. diversifolia* e *V. gardneri*) extraídas com estas misturas de solvente, espécies estas de diferentes tribos da família Asteraceae (Tabela 1 e Figura 4).

Extrato de Td obtido em etanol-água 3:7 (v/v) e em agitador orbital



Extrato de Td obtido em metanol-água 3:7 (v/v) e em agitador orbital

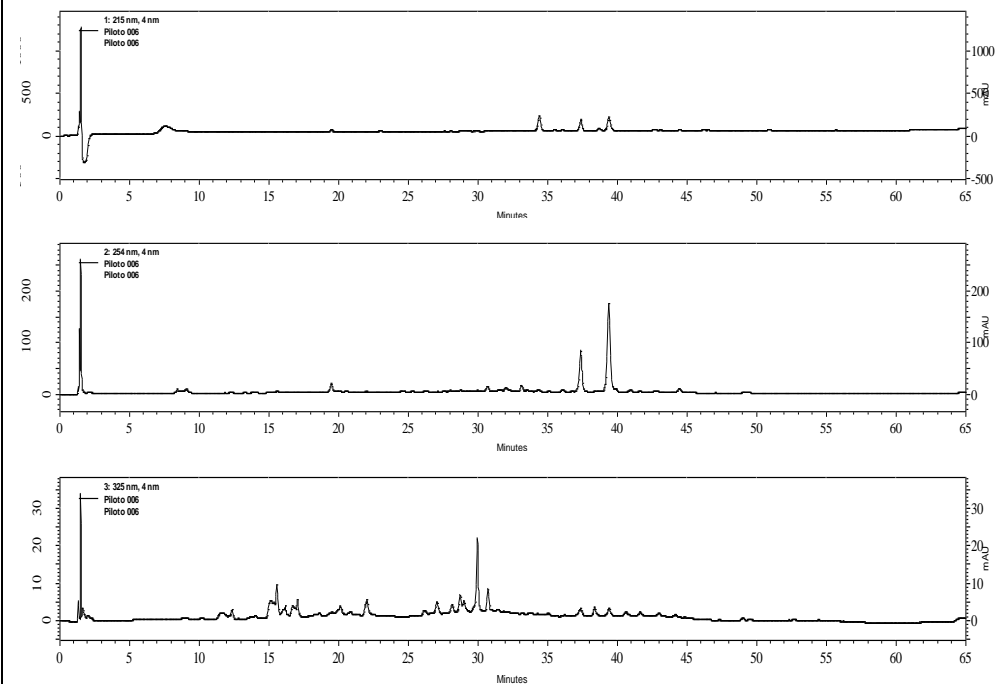
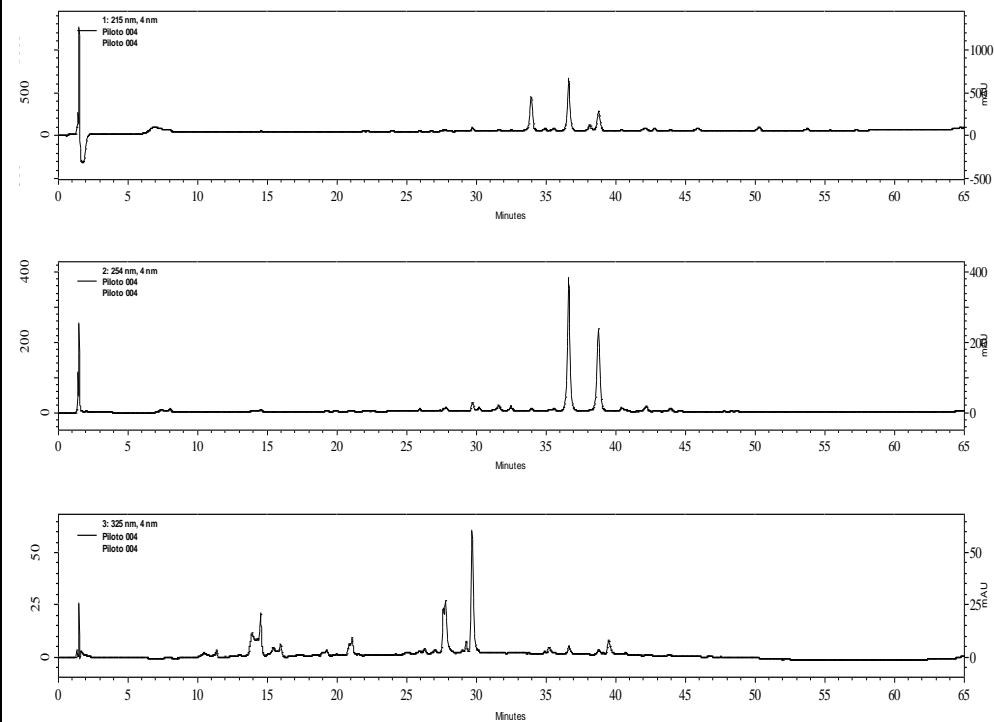


Figura 10. Cromatogramas obtidos por CLAE-UV-DAD (0-45% de MeCN; 0,5% de ácido acético; coluna monolítica C18; 1,4 mL/min) dos extratos de *T. diversifolia* (Td) para comparação do efeito dos solventes extratores etanol-água e metanol-água 3:7 (v/v). Os cromatogramas foram registrados em 215, 254 e 325 nm.

Extrato de Td obtido em etanol-água 1:1 (v/v) e em agitador orbital



Extrato de Td obtido em metanol-água 1:1 (v/v) e em agitador orbital

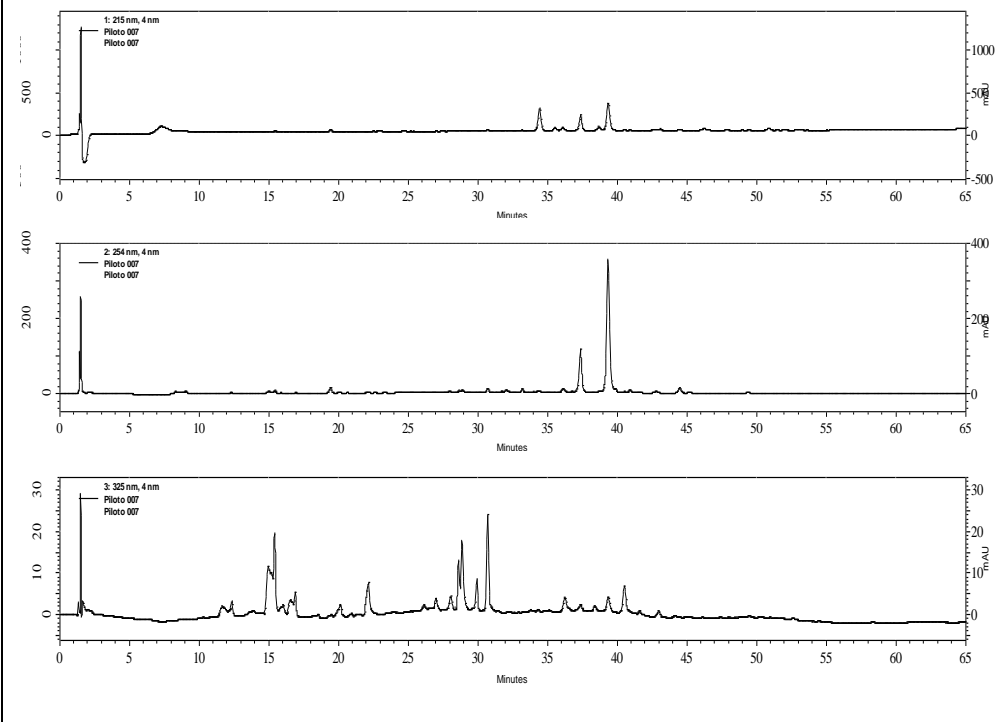
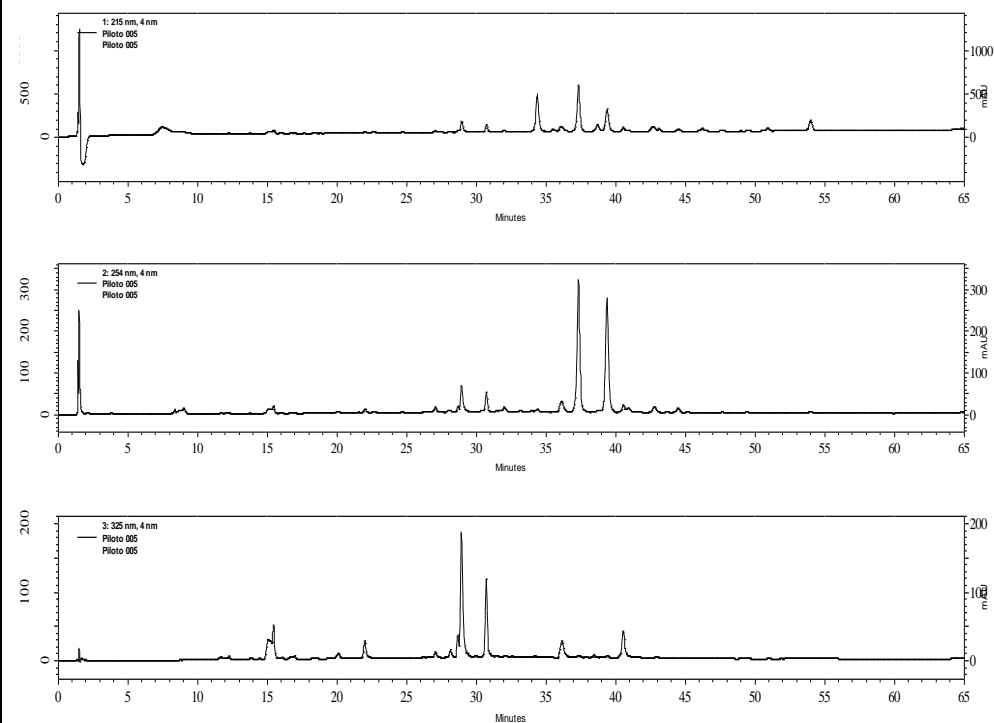


Figura 11. Cromatogramas obtidos por CLAE-UV-DAD (0-45% de MeCN; 0,5% de ácido acético; coluna monolítica C18; 1,4 mL/min) dos extratos de *T. diversifolia* (Td) para comparação do efeito dos solventes extratores etanol-água e metanol-água 1:1 (v/v). Os cromatogramas foram registrados em 215, 254 e 325 nm.

Extrato de Td obtido em etanol-água 7:3 (v/v) e em agitador orbital



Extrato de Td obtido em metanol-água 7:3 (v/v) e em agitador orbital

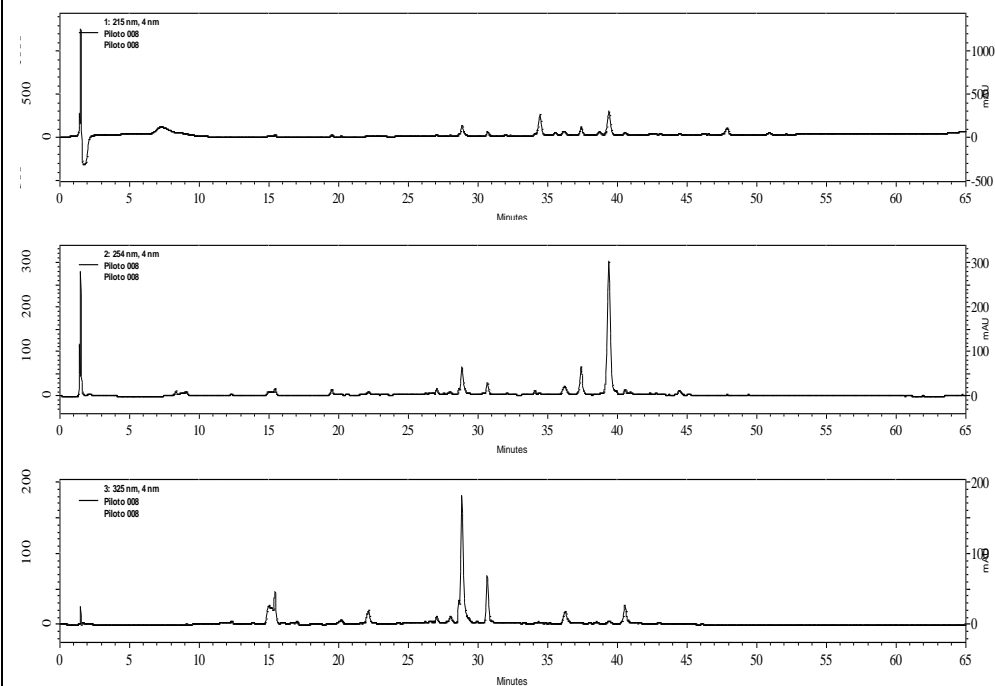


Figura 12. Cromatogramas obtidos por CLAE-UV-DAD (0-45% de MeCN; 0,5% de ácido acético; coluna monolítica C18; 1,4 mL/min) dos extratos de *T. diversifolia* (Td) para comparação do efeito dos solventes extratores etanol-água e metanol-água 7:3 (v/v). Os cromatogramas foram registrados em 215, 254 e 325 nm.

Este estudo confirmou o resultado do primeiro no qual, dentre as misturas testadas, a mistura etanol-água 7:3 (v/v) como solvente extrator é a que mais atende os objetivos deste projeto, sendo capaz de extrair uma maior diversidade de substâncias de interesse (metabólitos secundários de média e alta polaridade desta família) e em maior quantidade.

Definido o método de extração, foi realizada a extração das demais espécies por maceração, em agitador orbital (110 rpm, 25 °C), utilizando etanol-água 7:3 (v/v) como solvente extrator, sendo que os rendimentos estão descritos na Tabela 1. O rendimento dos extratos variou de 1,9 % a 22,8% de acordo com a espécie.

O que é importante salientar a este respeito, é que mesmo com o pequeno rendimento dos extratos de algumas espécies, foi possível realizar todos os experimentos propostos neste projeto. Então, para realizar estudos metabolômicos e ensaios *in vitro* como foi aqui proposto pode-se, realmente, partir de pequena quantidade de amostra vegetal inicial (20 mg de pó da planta). Este fato é interessante não apenas do ponto de vista econômico, como também ambiental, sendo que este estudo envolve espécies endêmicas e menor quantidade de solvente e energia é despendida para a obtenção dos extratos, além de se consumir o mínimo possível de amostras.

4.3. Investigação de tricomas glandulares

A maioria das espécies estudadas neste trabalho possuem tricomas glandulares nos órgãos vegetais (Tabela 3 e Figura 13), como era de se esperar para espécies da família Asteraceae^{22,26,91}. Porém, em algumas delas, estas estruturas não foram detectadas, portanto, provavelmente estas espécies não devem possuir LST, ou as possuem em pequeníssima quantidade⁷⁴. Geralmente a atividade anti-inflamatória de espécies da família Asteraceae é a elas atribuída. Tal fato ocorre pelas LST pertencerem a uma classe de substâncias conhecidas como altamente bioativas^{22,26,91,93} e por serem usualmente parte de seus constituintes majoritários, podendo chegar a até 2% de seu peso seco^{26,93}.

Desta forma, a seleção de plantas deste projeto foi bem sucedida, pois havendo tanto espécies ricas, como aquelas sem LST, possivelmente poderá se avaliar a atribuição da atividade anti-inflamatória a esta classe de substâncias. Como foi relatado recentemente, outros metabólitos secundários de espécies dessa família podem também contribuir para a atividade anti-inflamatória, e até mesmo serem os

principais responsáveis por ela, ao invés das LST^{22,74,94}. Além disto, foram selecionadas plantas de diversos níveis de evolução dentro da família Asteraceae (diversas tribos, Tabelas 1 e 3, Figura 4) que, por sua vez, refletirá numa adequada diversidade metabômica. Essa diversidade permitirá as análises de correlação *in silico* a fim de se investigar os biomarcadores da atividade anti-inflamatória investigada.

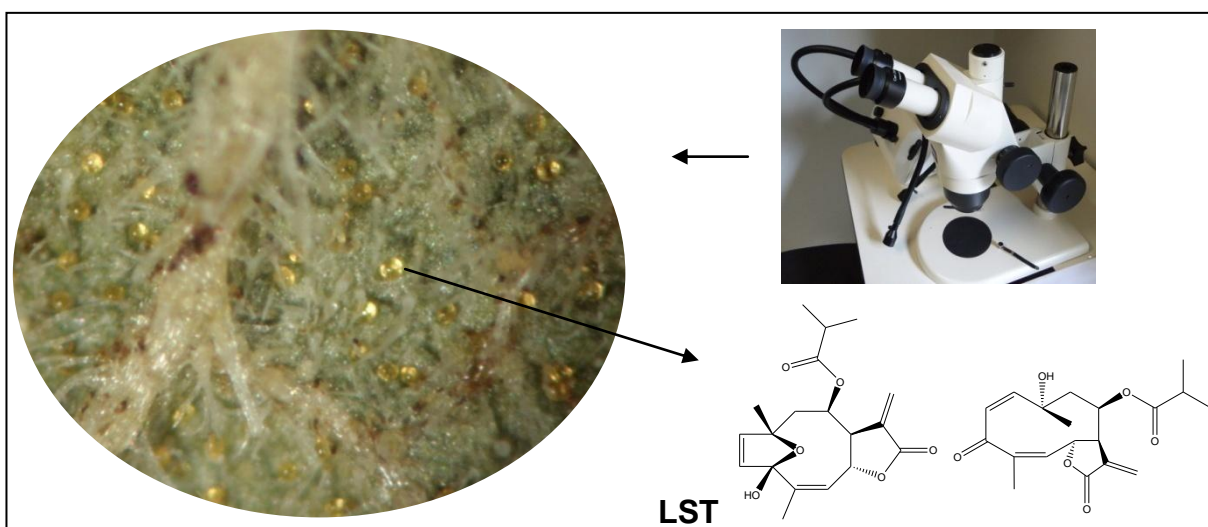


Figura 13. Pesquisa de tricomas glandulares na face abaxial das folhas em estereomicroscópio no aumento de 10x. Esses tricomas, comuns em espécies da família Asteraceae, biossintetizam e armazenam lactonas sesquiterpênicas (LST). Exemplo: *V. gardneri*. Foto: D.P.V. Faleiro.

Tabela 3. Resultados dos ensaios de inibição da COX e LOX, resultados da investigação de tricomas glandulares e a relação das tribos das espécies estudadas.

Código	Espécie	Grupo	Tribo	Tricoma glandular	LOX IC ₅₀ (µg/mL)	COX IC ₅₀ (µg/mL)
1	<i>Achillea millefolium</i> Ledeb. (mil-folhas)	(2)	Anthemideae Cass.	(+)/raro	(-)	(-)
2	<i>Achyrocline satureioides</i> (Lam.) DC. (marcela)	(2)	Gnaphalieae (Cass.) Lecoq & Juill.	(-)	(-)	(-)
3	<i>Acmella oleraceae</i> (L.) R.K. Jansen (jambú)	(3)	Heliantheae Cass.	(-)/raro	(-)	(-)
4	<i>Ageratum conyzoides</i> L. (mentrasto)	(2)	Eupatorieae Cass.	(+)	(-)	(-)
5	<i>Anteremanthus hatschbachii</i> H. Rob.	(1)	Vernonieae Cass.	(+)	(-)	(-)
6	<i>Arctium lappa</i> L. (bardana)	(2)/(3)	Cynareae Less.	(+)	17,6	(-)
7	<i>Arctium lappa</i> L. (bardana) (Raiz)	(2)/(3)	Vernonieae Cass.	(+)	28,8	(-)
8	<i>Arnica montana</i> L.	(2)	Heliantheae Cass.	(+)	0,009	(-)
9	<i>Artemisia absinthium</i> L. (losna)	(2)	Anthemideae Cass.	(+)	13,18	(-)
10	<i>Artemisia annua</i> L.	(2)	Anthemideae Cass.	(+)/raro	(-)	(-)
12	<i>Baccharis dracunculifolia</i> D.C. (alecrim do campo)	(2)	Astereae Cass.	(+)	(-)	(-)
13	<i>Baccharis trimera</i> (Less.) DC. (carqueja)	(2)	Astereae Cass.	(+)	(-)	(-)
14	<i>Bidens pilosa</i> L. (picão)	(2)	Coreopsidae Lindl.	(+)	(-)	(-)
15	<i>Calea cuneifolia</i> DC.	(1)	Neurolaeneae Rydb.	(+)	(-)	(-)

continuação na página seguinte

continuação da página anterior

16	<i>Calendula officinalis</i> L. (calêndula)	(2)	Calenduleae Cass.	(+)	(-)	0,1
17	<i>Calendula officinalis</i> L. (calêndula) (Inflorescência)	(2)	Calenduleae Cass.	(+)	(-)	0,2
18	<i>Chronopappus bifrons</i> (DC. ex Pers.) DC	(1)	Vernonieae Cass.	(+)	(-)	4,6
19	<i>Cichorium intybus</i> L. (chicória)	(3)	Cichorieae Lam. & DC.	(-)	0,3	3,6
20	<i>Cynara scolymus</i> L. (alcachofra)	(3)	Cardueae Cass.	(+)	(-)	0,4
21	<i>Dasyphyllum brasiliense</i> var. <i>latifolium</i> (D. Don) Cabrera (espinho(-)agulha)	(1)	Barnadesieae D. Don	(-)	(-)	0,02
22	<i>Echinacea purpurea</i> (L.) Moench (equinácea)	(2)	Heliantheae Cass.	(-)	12,29	(-)
23	<i>Emilia sonchifolia</i> L. DC (emília)	(2)	Senecioneae Cass.	(-)	(-)	(-)
24	<i>Eremanthus polycephalus</i> (DC.) MacLeish	(1)	Vernonieae Cass.	(+)	(-)	0,006
25	<i>Gymnanthemum amygdalinum</i> (Delile) Sch. Bip. ex Walp (boldo da Bahia)	(1)	Vernonieae Cass.	(+)	(-)	(-)
26	<i>Helianthus annuus</i> L. (girassol)	(3)	Heliantheae Cass.	(+)	(-)	(-)
27	<i>Heterocoma gracilis</i> Loeuille, J. N. Nakaj. & Semir (espécie nova)	(1)	Vernonieae Cass.	(+)	(-)	50,0
28	<i>Lactuca sativa</i> L. (alface)	(3)	Cichorieae Lam. & DC.	(-)	13,7	(-)
29	<i>Lychnophora diamantinana</i> Coile & S.B. Jones	(1)	Vernonieae Cass.	(+)	17,5	(-)
30	<i>Lychnophora ericoides</i> Mart. (arnica-da-serra)*	(1)	Vernonieae Cass.	(+)	(-)	(-)
31	<i>Lychnophora ericoides</i> Mart. (arnica-da-serra) (Inflorescência)	(1)	Vernonieae Cass.	(+)	2,2	(-)
32	<i>Lychnophora ericoides</i> Mart. (arnica-da-serra) (Caule)	(1)	Vernonieae Cass.	(+)	0,4	(-)
33	<i>Lychnophora ericoides</i> Mart. (arnica-da-serra)*	(1)	Vernonieae Cass.	(-)	0,6	(-)
34	<i>Lychnophora tomentosa</i> (Mart. ex DC.) Sch. Bip.	(1)	Vernonieae Cass.	(+)	16,6	(-)
35	<i>Matricaria chamomilla</i> L. (camomila)	(2)	Anthemideae Cass.	(-)/raro	0,7	(-)
36	<i>Matricaria chamomilla</i> L. (camomila) (Inflorescência)	(2)	Anthemideae Cass.	(+)	2,0	(-)
37	<i>Mikania glomerata</i> Sprengl. (guaco)	(2)	Eupatorieae Cass.	(-)	2,6	(-)
38	<i>Mikania hirsutissima</i> DC.	(1)	Eupatorieae Cass.	(-)	1,9	(-)
39	<i>Mikania laevigata</i> Schultz Bip. ex Baker (guaco(-))cheiroso)	(2)	Eupatorieae Cass.	(-)	8,1	(-)
40	<i>Minasia scapigera</i> H. Rob.	(1)	Vernonieae Cass.	(+)	4,6	5,6
41	<i>Piptolepis monticola</i> Loeuille (espécie nova)	(1)	Vernonieae Cass.	(+)	4,8	6,7
42	<i>Prestelia eriopus</i> Sch. Bip.	(1)	Vernonieae Cass.	(+)	20,6	6,7
43	<i>Pucea guttoc</i> D.C.	(2)	Inuleae Cass.	(+)	(-)	(-)
45	<i>Smallanthus sonchifolius</i> (Poepp. & Endl.) H. Robinson (yacón)	(2)/(3)	Heliantheae Cass.	(+)	(-)	0,001
46	<i>Solidago microglossa</i> DC. (arnica brasileira)	(2)	Astereae Cass.	(-)/peq	0,08	5,5
47	<i>Solidago microglossa</i> DC. (arnica brasileira) (Inflorescência)	(2)	Astereae Cass.	(-)/peq	0,09	(-)
48	<i>Sonchus oleraceus</i> L. (serralia)	(3)	Cichorieae Lam. & DC.	(-)	0,92	(-)
49	<i>Sphagneticola trilobata</i> (L.) Pruskei (mal-me-quer)	(1)	Heliantheae Cass.	(+)	12,2	11,9
50	<i>Stevia rebaudiana</i> (Bertoni) Bertoni (estévia)	(3)	Eupatorieae Cass.	(-)	0,01	(-)
51	<i>Tridax procumbens</i> L.	(1)	Heliantheae Cass.	(+)	0,046	(-)
52	<i>Tanacetum parthenium</i> L. (feverfew)	(2)	Anthemideae Cass.	(+)	(-)	(-)
53	<i>Tanacetum parthenium</i> L. (feverfew) (Inflorescência)	(2)	Anthemideae Cass.	(+)	0,01	(-)
54	<i>Tanacetum vulgare</i> L.	(2)	Anthemideae Cass.	(+)	(-)	(-)
55	<i>Taraxacum officinale</i> Weber ex FH Wigg. (dente-de-leão)	(2)	Cichorieae Lam. & DC.	(-)	(-)	0,002
56	<i>Tithonia diversifolia</i> (Hemsl.) A. Gray (margaridão)	(2)	Heliantheae Cass.	(+)	11,6	28,7
57	<i>Vernonia herbaceae</i> (Vell.) Rusby	(1)	Vernonieae Cass.	(+)	24,6	0,2
58	<i>Vernonia platensis</i> (Spreng.) Less.	(1)	Vernonieae Cass.	(+)	15,85	0,1
59	<i>Vernonia polyanthes</i> Less. (assa-peixe)	(2)	Vernonieae Cass.	(+)	2,96	0,06
60	<i>Vernonia rubriramea</i> Mart. Ex DC.	(1)	Vernonieae Cass.	(+)	1,79	0,03
61	<i>Viguiera arenaria</i> Baker	(1)	Heliantheae Cass.	(+)/peq	16,5	(-)
62	<i>Viguiera bracteata</i> Gardner	(1)	Heliantheae Cass.	(+)/raro	3,6	(-)

continua na próxima página

continuação da página anterior

63	<i>Viguiera discolor</i> Baker	(1)	Heliantheae Cass.	(+)	8,4	(-)
64	<i>Viguiera filifolia</i> Sch. Bip. Ex Baker	(1)	Heliantheae Cass.	(-)/raro	5,6	(-)
65	<i>Viguiera linearifolia</i> Chodat & Hassl.	(1)	Heliantheae Cass.	(+)/raro	(-)	(-)
66	<i>Viguiera robusta</i> Gardner	(1)/(2)	Heliantheae Cass.	(+)	36,02	0,1
67	<i>Viguiera trichophylla</i> Dusén	(1)	Heliantheae Cass.	(-)/raro	4,0	2,6

Sendo (1) espécies do cerrado, (2) espécie com relato científico ou etnofarmacológico como anti-inflamatório, (3) espécies de importância alimentar e (-) valores de $IC_{50} > 50 \mu\text{g/mL}$. No caso de tricomas glandulares (+) significa presente e (-) ausente. $IC_{50} < 4 \mu\text{g/mL}$ (em vermelho) foram considerados de extratos muito ativos, atividade comparável a do padrão. *Amostras códigos 30 e 33 são de espécies identificadas pelo especialista como idênticas, mas suspeita-se de diversidade metabólica entre elas (devido às mães serem de origens geográficas diferentes); diante da importância desta espécie para este trabalho, amostras de indivíduos de ambas as populações foram incluídas neste trabalho. Os códigos das amostras podem ser verificados na Tabela 1. IC_{50} dos inibidores de referência veja na Tabela 4.

4.4. Ensaios anti-inflamatórios *in vitro* – COX e LOX

Dentre os extratos das 57 espécies estudadas, 41 (71,9 %) apresentaram alguma atividade inibitória nos alvos avaliados (Tabela 3), considerando-se apenas os resultados com IC_{50} menor que $50 \mu\text{g/mL}$. Algumas espécies revelaram potencial para inibição de apenas uma das enzimas, mas não da outra: 21 inibiram apenas a LOX (36,8 %) e sete apenas a COX (12,3%). Dentre estas, algumas se destacaram por serem capazes de causar potente inibição (realçado em vermelho na Tabela 3 e Tabela 4), pois seus extratos apresentaram IC_{50} similar ou inferior ao das substâncias de referência^{47,50,51,95}. Pelo fato de se tratarem de extratos, os constituintes ativos provavelmente são muito potentes, caso não esteja ocorrendo sinergismo, o que não é tão provável, já que nestes estudos investigam-se ensaios enzimáticos e não ensaios *in vivo* ou *ex vivo* (ensaios *in vitro* utilizando células).

Além disso, 13 espécies (22,8%) revelaram potencial para inibição das duas enzimas ao mesmo tempo, ou seja, inibição das vias de COX e LOX, portanto apresentando o mecanismo de ação duplo (Tabela 3 e Figura 14). Vale lembrar que se acredita que tal mecanismo seja superior ao dos anti-inflamatórios atuais quanto à eficácia, assim como pela menor toxicidade associada (Figura 14)^{38,40–43,96–100}. Apenas 16 (28,1%) das espécies apresentaram extratos com fraca ou nenhuma atividade inibitória.

Pode ser ainda observado que espécies de diferentes tribos, ou seja, de diversos graus evolutivos dentro de sua família, apresentaram potencial para as atividades investigadas (Tabela 3 e Figura 4). Observou-se ainda que espécies dos diferentes grupos de plantas deste trabalho, plantas do cerrado (1), com relato científico ou etnofarmacológico para atividade anti-inflamatória (2), e alimentícia (3), revelaram o potencial anti-inflamatório, inclusive para o mecanismo de ação requerido (Tabela 3).

Sendo assim, o conjunto de todos esses resultados veio corroborar o histórico potencial da família Asteraceae para atividade anti-inflamatória. Foi possível também evidenciar que algumas das plantas utilizadas na alimentação realmente podem ser utilizadas como nutracêuticos (ex. chicória, Tabela 3) e, não menos importante, que algumas espécies do cerrado, com ou sem histórico etnofarmacológico, de fato apresentam potencial (Tabela 3). Interessantemente, a maior parte das espécies cujos extratos apresentaram o mecanismo de ação requerido foi do grupo daquelas do cerrado e não do grupo de espécies com prévio relato de propriedade anti-inflamatória ou etnofarmacológico. Duas delas merecem atenção, as espécies *Heterocoma gracilis* Loeuille, J. N. Nakaj. & Semir e *Piptolepsis monticola* Loeuille, por serem espécies novas investigadas pela primeira vez pelo nosso grupo de pesquisa⁷³.

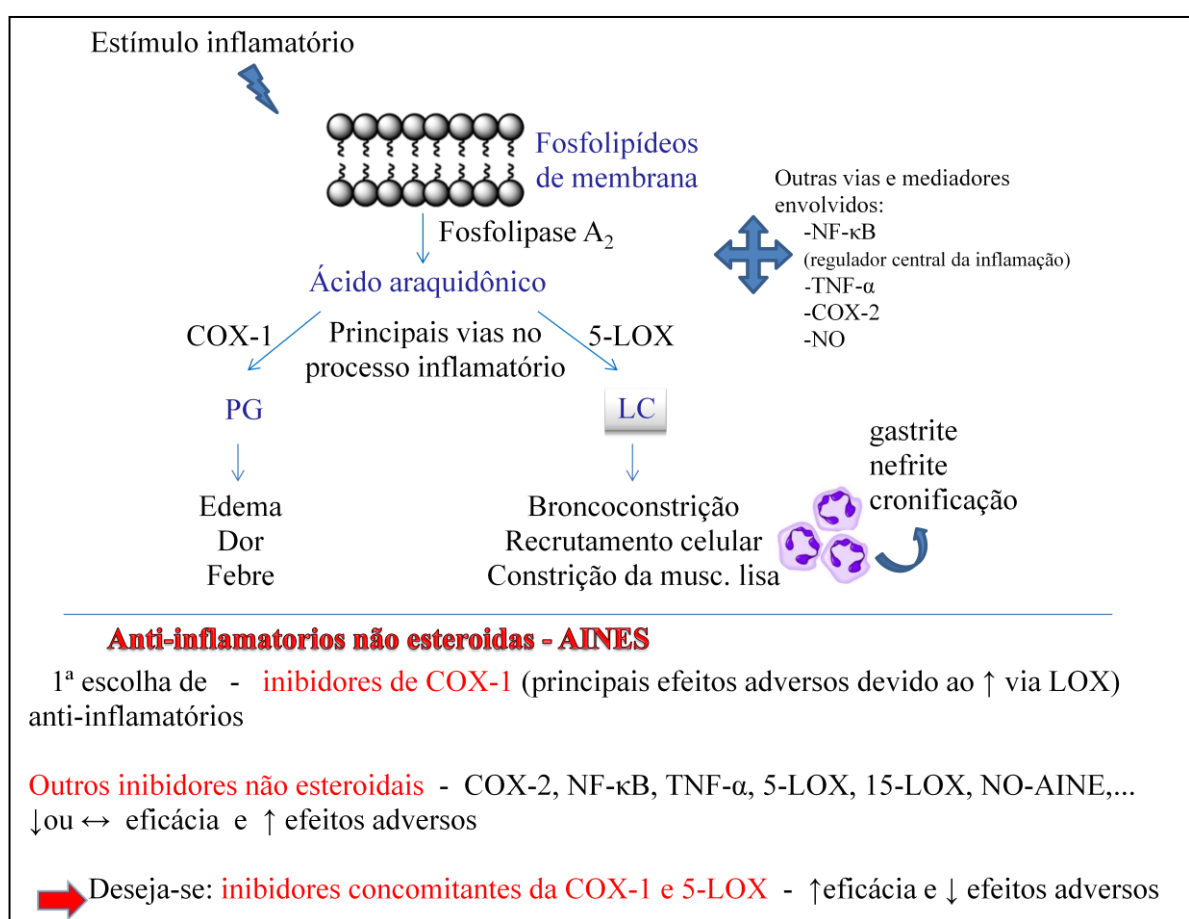


Figura 14. Anti-inflamatórios não esteroidais e as principais vias envolvidas nos processos inflamatórios.

Além dos inibidores de referência, foram testadas nos alvos LOX e COX algumas outras substâncias nunca testadas anteriormente (Tabela 4, Apêndice V).

Tal fato é relevante para contribuir no encontro das respostas buscadas neste trabalho e ainda gerar subsídios para um estudo adicional de relação quantitativa estrutura-atividade (QSAR). Os valores de IC₅₀ encontrados para os inibidores de referência ou substâncias já anteriormente estudadas foram similares ao descrito na literatura⁹⁵ e aqueles com IC₅₀ < 0,4 foram destacados revelando potente inibição.

Tabela 4. Substâncias avaliadas nos ensaios anti-inflamatórios *in vitro*: controles ou avaliadas pela primeira vez.

Inibidor de referência ou classe do metabólito secundário	Substância	LOX* µM	COX* µM	Código da amostra
Inibidor de referência da COX	indometacina ⁹⁵	(-)	0,1	88
Inibidor de referência da LOX	NDGA ⁹⁵	0,8	(-)	150
Composto fenólico	ácido cafeico ^{47,50}	21,7	0,2	95
Composto fenólico	ácido <i>E</i> -cinâmico	3,8	0,004	90
Cumarina	cumarina	3,0	0,002	89
Diterpeno	ácido caurenóico	11,6	0,2	87
Flavonoide	hesperidina	(-)	0,05	80
Flavonoide	luteolina	2,3	64,3	85
Flavonoide	quercetina ^{47,95}	8	0,8	151
LST	11-13-diidro-lichnofolido	(-)	(-)	74
LST	15-acetóxi-eremantolido C	0,02	15,1	69
LST	15-desóxi-goiazensolido	(-)	134,5	82
LST	15-hidróxi-4β-5-diidro-eremantolido C	3,5	75,9	71
LST	15-hidróxi-eremantolido C	0,08	47,5	70
LST	15-triisopropilsilil éter-4β-5-diidro-eremantolido C	2,7	(-)	72
LST	15-triisopropilsilil éter-eremantolido C	24,2	(-)	73
LST	16-(1-metil-1-propenil)-eremantolido	(-)	0,6	75
LST	4β,5-diidro-15-desóxi-goiazensolido	0,31	24,1	68
LST	budleína A	62,6	0,1	77
LST	enidrina	(-)	47,9	79
LST	partenolido	(-)	24,3	78
LST	tagitinina A	93,9	(-)	83
LST	tagitinina C	(-)	30,1	76
LST	tagitinina F	18,5	0,001	84
LST	uvedalina	(-)	0,1	81

Sendo (-) valores de IC₅₀ > 150 µM. *IC₅₀ expresso em µM, aqueles < 4 µM (em vermelho) foram considerados sendo de potentes inibidores e os menores que 50 µM foram considerados ativos. NDGA : *nordihydroguaiaretic acid*. Estruturas químicas das substâncias estão presentes no Apêndice V.

Assim, dentre as substâncias ensaiadas, alguns compostos fenólicos destacaram-se por inibir ambas as enzimas potentemente, logo apresentando o mecanismo de ação anti-inflamatório requerido (Tabela 4, Apêndice V e Figura 14). Tal resultado sugere que elas possam ser os princípios ativos de extratos com resultados positivos. No entanto, pelo fato de serem substâncias ubíquas^{22,39} e, portanto, presentes em quase todas as plantas do reino vegetal, então nem todos os extratos apresentaram tal mecanismo de ação devido às diferenças de concentração. Neste raciocínio, se de fato, através dos estudos de correlação *in*

silico, estas substâncias se mostrarem correlacionadas com tal propriedade, provavelmente a concentração das mesmas nos extratos deve ser crucial para atividade.

Sendo as LST substâncias consideravelmente bioativas devido ao grupamento altamente reativo – α -metileno- γ -lactona ou grupos enona/ciclopentenona conjugados – nelas presentes (Figuras 13 e 15)^{26,93,101}, mesmo com tais grupamentos, estas demonstraram seletividade para uma ou a outra enzima (Tabela 4). Essa diferença de comportamento mostra que tal grupamento não é o único envolvido neste mecanismo de ação e que outras diferenças estruturais nestas substâncias exercem influência sobre a atividade. Logo, esta informação nos permitirá realizar um estudo de QSAR.

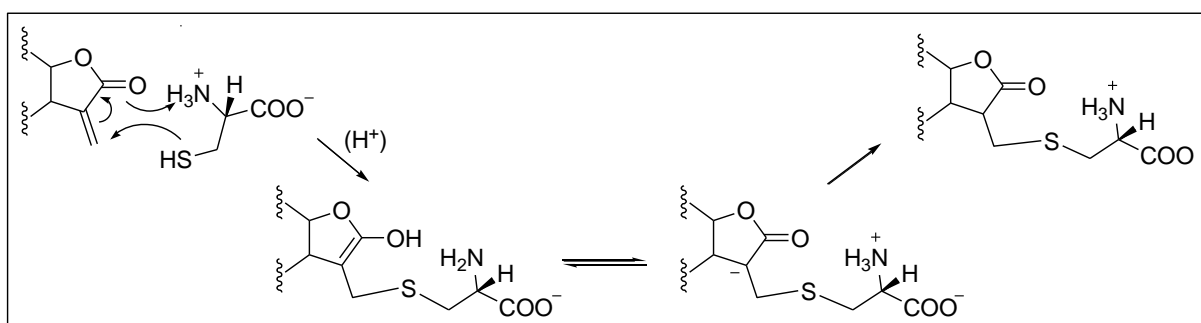


Figura 15. Reação de adição do tipo Michael do grupo α -metileno- γ -lactônico com resíduo de cisteína livre. Esta mesma reação ocorre com proteínas, daí LST serem substâncias tão bioativas.

O estudo de LST sempre se mostra intrigante, cercado de controvérsias a respeito de suas atividades e utilidade farmacológica^{26,91,93}. A exemplo, a budleína A (Tabela 4), substância que demonstrou forte inibição da COX, e embora não tenha inibido a LOX, sabe-se que inibe o recrutamento celular, por outra via^{25,102}, e então não deixa de indiretamente apresentar o mecanismo de ação requerido. Portanto, este resultado vem corroborar seu potencial anti-inflamatório já evidenciado por ensaios *in vivo*²⁵. Também vem a confrontar com subestimação da propriedade inibitória das LST diretamente nesses alvos^{26,47,103}, pois se acreditava até então que a inibição fosse indiretamente por outras vias, como no caso budleína A e outras LST¹⁰³; daí a importância de estudos enzimáticos e não apenas em células ou *in vivo*⁴⁷.

Ainda com respeito às LST, pôde-se se levantar a hipótese da maioria delas não serem os únicos ou principais princípios ativos de Asteraceae anti-inflamatórias,

como geralmente se conclui através de vários estudos fitoquímicos clássicos aliados a bioensaios^{23,25,26,102}. Pela triagem inicial de substâncias de diferentes classes de metabólitos secundários (Tabela 4), pôde-se perceber que não apenas as LST são capazes de inibir LOX e COX^{47,104}. Esta evidência é corroborada pelo fato de que algumas das plantas que apresentaram tal mecanismo de ação provavelmente não possuem LST por não apresentarem tricomas glandulares (estruturas onde usualmente estas substâncias são biossintetizadas e armazenadas –Tabela 3 e Figura 13; dado confirmado pelos estudos descritos nos próximos tópicos -4.5 e 4.6).

Por outro lado, não se descarta a possibilidade de que as LST ou substâncias de outras classes, que são seletivas para uma outra enzima, possam exercer algum nível de contribuição para tal propriedade nos extratos ativos, considerando possíveis sinergismos, que podem ocorrer *in vivo*, entre elas ou com substâncias de outras classes, e por diferentes mecanismos de ação, ou ainda por se tratarem de pró-fármacos, ou até mesmo *in vitro*, uma agindo em uma enzima e outra substância agindo em outra enzima ao mesmo tempo. De qualquer forma, estes achados ainda deverão ser confirmados pelos resultados dos estudos metabolômicos, de correlação *in silico* e desrepliação, que serão discutidos nos próximos itens.

4.5. Estudos metabolômicos

Um método cromatográfico que resolvesse a maioria dos picos de todos os extratos de todas as plantas a serem estudadas foi desenvolvido utilizando-se extratos de espécies sabidamente complexas com relação a seus constituintes químicos. Foi utilizada uma coluna monolítica C18 logo no início por saber-se que se trata de uma coluna própria para análise de extratos complexos e por conter alto número de pratos teóricos. Testou-se inicialmente a seguinte fase móvel sistema de gradiente: 0-100% de MeCN em 60 min, seguidos de 5 min de 100% de MeCN, com 0,1 % de ácido acético na fase móvel. Tal adição de ácido se deveu ao fato de que as espécies a serem estudadas neste trabalho provavelmente eram ricas em substâncias ácidas^{22,39,78,104}, sendo necessário que a fase móvel fosse acidificada para que estas substâncias fossem separadas com adequada resolução. Ainda foi avaliada a utilização de duas colunas monolíticas C18 acopladas em série, o que resultou em um aumento de resolução.

No entanto, embora abrangente, a fase móvel ainda precisou ser adaptada, pois muitos picos ficaram aglomerados, sobrepostos e todos ocorrendo antes de 30 min de eluição cromatográfica (Figura 16). Os 30 min restantes seriam desperdício.

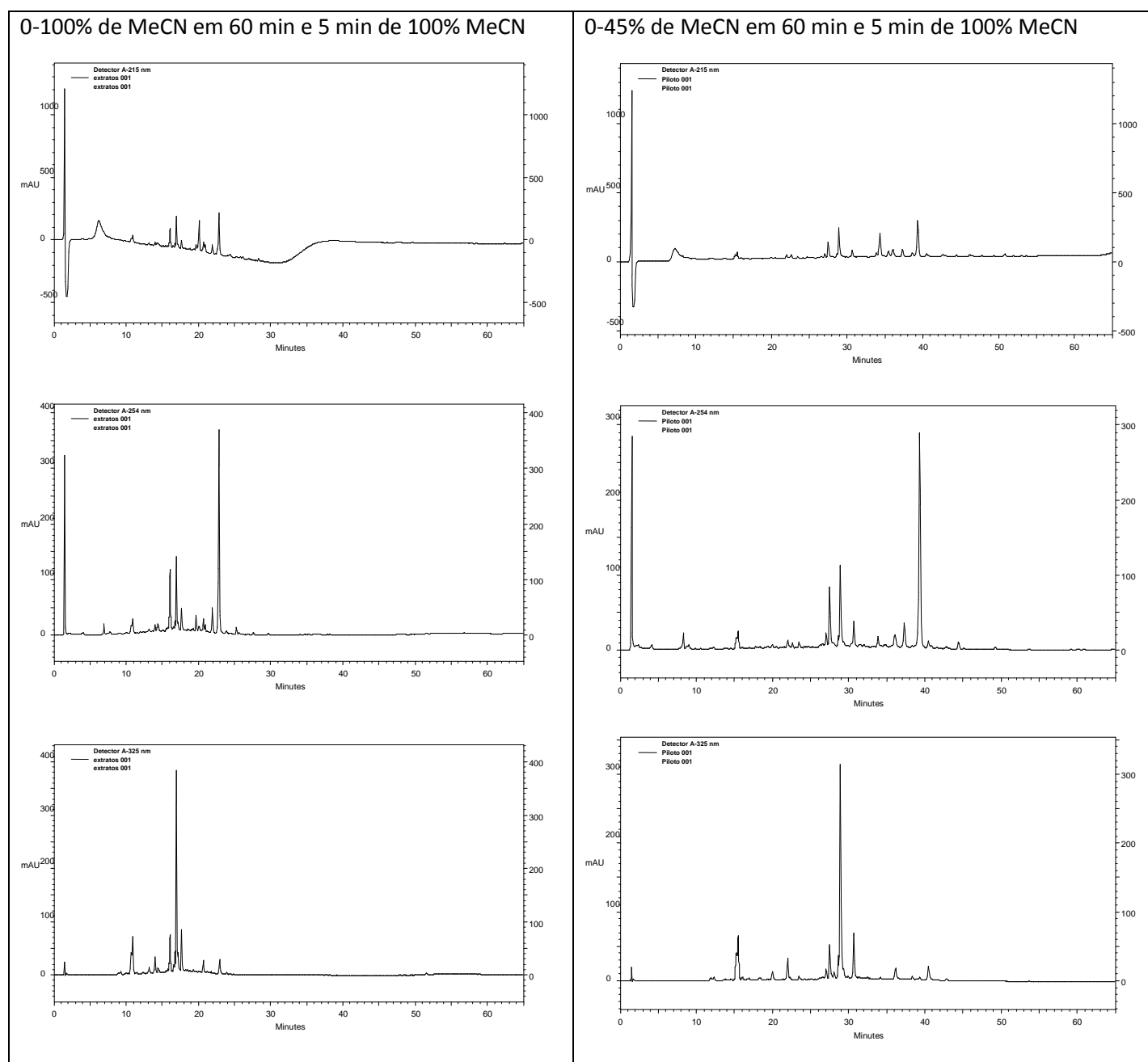


Figura 16. Cromatogramas do ensaio piloto para desenvolvimento de fase móvel contendo 0,1% de ácido acético. Os cromatogramas do extrato de Td foram obtidos por CLAE-UV-DAD em coluna monolítica C18 e registrados em três comprimentos de onda: 215, 254 e 325 nm (dispostos em sequência de cima para baixo).

Sendo assim, testou-se então a seguinte fase móvel: 0-45% de MeCN, 5 min de 100% de MeCN, com 0,1 % de ácido acético. Esta fase móvel, a princípio, demonstrou bom resultado e boa resolução entre os picos (Figura 16). Contudo, ao

analisar o extrato de *S. sonchifolius*, percebeu-se a necessidade de aumentar a acidez da fase móvel, sendo que nem mesmo 0,5% de ácido acético na fase móvel permitiu uma boa resolução dos picos dos compostos ácidos presentes no extrato desta planta. Foi necessária então a adição de 1% de ácido acético na fase móvel para que o perfil metabólico de todas as espécies ficasse com a resolução desejável entre os picos.

Definida então a fase móvel e a coluna cromatográfica (duas monolíticas C18 acopladas em série), as impressões digitais metabólicas dos extratos foram obtidas por CLAE-UV-DAD. Com isso foi possível iniciar a desreplicação preliminar por meio de comparação dos dados de tempos de retenção e curvas de absorção no UV com os dados do banco de AsterDB, todos avaliados no mesmo método cromatográfico.

Esta desreplicação, de cerca de 50% dos extratos das plantas deste estudo, permitiu verificar que as classes de substâncias predominantes nestes extratos são: derivados do ácido cafeico e flavonoides, dentre outros compostos fenólicos. As LST foram detectadas em quantidade menor que o esperado, sendo que, até então eram consideradas substâncias majoritárias em plantas da família Asteraceae, podendo corresponder a mais 2% do peso seco das folhas⁹³. Por outro lado, elas podem ter sido subestimadas devido à análise preliminar ter sido analisada apenas por CLAE-UV-DAD, e então dependente de seus grupos cromóforos, o que será descrito mais adiante. Uma outra hipótese é que as LST pudessem ocorrer em menor concentração nas espécies selecionadas para este estudo, ao contrário de outras descritas na literatura. Já os poliacetilenos foram raramente encontrados nos extratos. Considerando-se que esse tipo de metabólito secundário normalmente se encontra em maior quantidade nas raízes e em baixa concentração nas folhas⁹³, nossos resultados corroboram os dados da literatura, uma vez que os extratos analisados neste trabalho foram a partir das folhas. As curvas de absorção no UV características de substâncias pertencentes a estas classes estão ilustradas na Figura 17.

Os compostos fenólicos apresentam pico máximo de absorção no UV em torno de 250 nm, sendo consideradas as variações decorrentes da presença de substituintes (auxócromos) ligados aos grupos cromóforos que exerçam deslocamento batocrômico ou hipsocrômico e efeito hipercrômico ou hipocrômico¹⁰⁵. No entanto, outras classes de metabólitos secundários podem apresentar pico máximo de absorção em torno de 250 nm, tais como as LST que contenham

grupamento enona ou duplas conjugadas homoanular como grupos cromóforos^{22,78,105} (Figuras 17, 13 e 18). Logo, para a identificação das substâncias e/ou de suas classes químicas foi importante levar em consideração o t_R de substâncias do AsterDB. Informações das análises por UPLC-UV-HRFTMS irão confirmar as identificações preliminares.

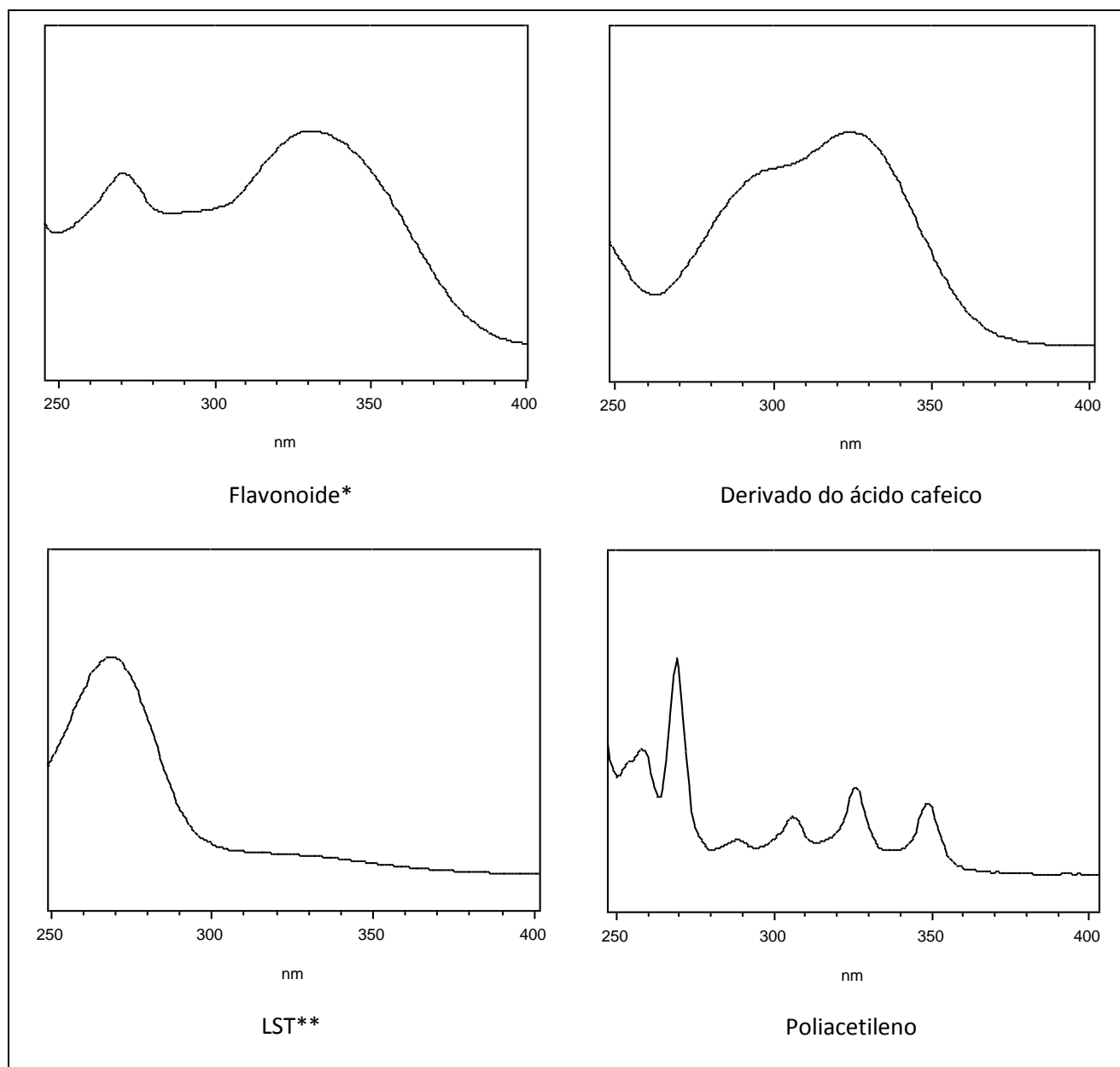


Figura 17. Curvas de absorção no UV características dos metabólitos secundários mais frequentes nos extratos das plantas avaliadas. *A curva de absorção no UV do flavonoide neste exemplo é uma flavona. **A curva de absorção no UV do exemplo é uma LST contendo enona como cromóforo.

Algumas LST podem não possuir grupos cromóforos relevantes (Figura 18)^{26,101} e, por isso, podem não terem sido detectadas nas análises por CLAE-UV-

DAD (fase móvel: MeCN-água; espectro no UV avaliados: 200-700 nm) e foram subestimadas nos extratos. Outras LST possuem cromóforos e absorvem intensamente ou não no UV, como mencionado no parágrafo anterior, ou ainda podem possuir outros cromóforos como, por exemplo, duplas conjugadas heteroanulares ou duplas exocíclicas conjugadas à carbonila^{26,101} (absorvem em torno de 220 nm¹⁰⁵).

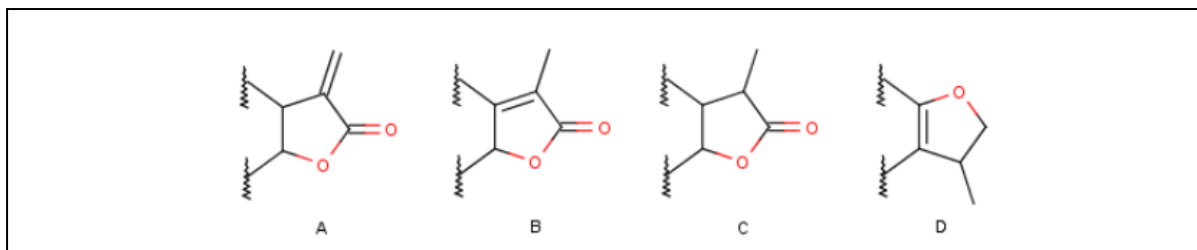


Figura 18. Exemplos de anéis γ -lactônicos. A e B são α,β -insaturados com ligações duplas exo- e endocíclicas conjugadas à carbonila, respectivamente, presentes na grande maioria das LST. C e D são exemplos de anéis modificados e, portanto, de ocorrência menos frequente.¹⁰⁶⁻¹⁰⁹

Por sua vez, os derivados do ácido cafeico, como os ácidos clorogênicos e ácidos cafeoil-altráricos, muito frequentes nos extratos, apresentam caracteristicamente dois picos de absorção máxima: um em torno de 300 e outro em torno de 320 nm^{22,78,105} (Figura 17). Os flavonoides também apresentam picos de absorção no UV máximos característicos (Figura 17), um em 230-295 (banda II) e outro em 300-560 (banda I), com variações que dependem do tipo de flavonoide e do efeito dos auxócromos (já mencionados)^{22,78,105}. Dependendo do tipo de flavonoide, uma das bandas pode ser muito fraca ou nem mesmo detectada, como as flavanonas e os diidroflavonois, em que a banda I aparece apenas como um ombro (pico muito pouco intenso)^{78,105}. Variadas classes de flavonoides foram detectadas nos extratos destas plantas. Ambos, flavonoides e derivados do ácido cafeico, absorvem fortemente no UV, portanto, sendo facilmente detectados por CLAE-UV-DAD, e identificados por comparação com dados de t_R e absorção no UV de substâncias do banco de padrões.

Os poliacetilenos apresentam também curva de absorção no UV característica (Figura 17), com vários picos de absorção em aproximadamente 243, 270, 288, 307 e 330 nm, sendo o que ocorre em aproximadamente 270 nm é aquele com intensidade superior.

Assim, através dessa abordagem preliminar de desreplificação, pôde-se ter uma visão geral de quais são as substâncias predominantes nos extratos. Elas são

exatamente aquelas esperadas para a grande maioria das espécies dessa família⁹³ e com potencial para a atividade anti-inflamatória investigada^{47,104}. Além disso, ficaram evidentes algumas substâncias ubíquas e outras presentes apenas em alguns extratos. Esta diversidade, juntamente com os resultados variados de atividade anti-inflamatória, são um bom indício de que seria possível realizar os estudos de correlação *in silico* e, portanto, dar prosseguimento ao estudo proposto.

É importante salientar que, além disso, algumas substâncias foram detectadas pela primeira vez em algumas espécies, enquanto outras espécies nunca haviam sido fitoquimicamente avaliadas. Por outro lado, todos os extratos das 57 espécies deste trabalho foram posteriormente analisadas por UPLC-UV-HRFTMS, e portanto com muito mais subsídio para desreplicação. No entanto, o foco principal deste trabalho não era a desreplicação de todos os extratos, mas sim obter as impressões digitais metabólicas e, a partir delas, juntamente com as análises *in silico*, encontrar as substâncias correlacionadas com a propriedade inibitória da COX e LOX.

Ainda com relação a esta desreplicação, pode-se sintetizar que os extratos aleatoriamente avaliados, com um n= 33, portanto, mais que a metade, tiveram a maioria de seus compostos majoritários desreplicados pelos dados do AsterDB e confirmados pela literatura. Um total de 49 substâncias foram desreplicadas nestes extratos através desta abordagem (Tabela 5), sendo que as informações de todas as amostras vegetais foram reunidas na Tabela 5. Como exemplo, apenas uma amostra de cada grupo (uma espécie do cerrado, uma de importância alimentícia e uma com prévia evidência anti-inflamatória) será descrita em maiores detalhes na sequência das páginas a seguir. As espécies selecionadas nos três exemplos foram *Viguiera arenaria*, *Smallanthus sonchifolius* e *Mikania glomerata*, respectivamente.

Tabela 5. Lista de substância identificadas por CLAE-UV-DAD, AsterDB e literatura, em 33 amostras vegetais aleatoriamente selecionadas.

t _R (min)	Substâncias	Picos de absorção máx. no UV (nm)	Amostras vegetais*
2,5	ácido gálico	276	21, 61
3,4	ácido mono- <i>O-E</i> -cafeoilaltrárico	302 e 327	45
4,6	ácido protocatecuico	257 e 294om	1, 5, 6, 21, 25, 29, 34, 56, 61
5,5	ácido mono- <i>O-E</i> -cafeoilaltrárico	302 e 327	45
7,0	ácido mono- <i>O-E</i> -cafeoilaltrárico	302 e 327	45
8,2	ácido 3- <i>O-E</i> -cafeoilquinico	297 e 324	1, 5, 6, 9, 13, 14, 16, 21, 24, 34, 37,38, 39, 40, 43, 56, 61, 62

continuação na página seguinte

continuação da página anterior

8,8	ácido mono- <i>O-E</i> -cafeoilaltrárico	302 e 327	45
10,5	aesculina	280 e 324om	45, 55, 62
11,6	ácido 5- <i>O-E</i> -cafeoilquínico	295 e 325	1, 5, 6, 9, 13, 14, 15, 16, 21, 22, 24, 25, 34, 37, 40, 43, 45, 48, 55, 56, 61
13,0	ácido 4- <i>O-E</i> -cafeoilquínico	295 e 325	1, 5, 9, 13, 14, 15, 21, 25, 34, 37, 38, 40, 45, 56, 61
14,3	ácido-3- <i>O-E</i> -cumaroilquínico	295 e 323	24, 37
15,1	ácido mono- <i>O-E</i> -cafeoilchiquímico	300 e 324	15, 21
15,3	ácido cumárico	299 e 324	29, 37, 61
15,4	ácido cafeoilchiquímico	280 e 316	21
16,0	ácido cafeoilchiquímico	280 e 316	21
17,8	ácido ferúlico	300 e 325	9, 22, 61
18,5	mono- <i>O</i> -cafeoilpentose	300 e 327	22, 56
22,1	hiperosídeo	286	1, 9, 13, 14, 21, 62
22,3	quercetrina	264 e 338	1, 5, 6, 9, 13, 14, 15, 21, 24, 34, 38, 61
22,6	isoquercetrina	251, 265 e 344	1, 9, 13, 15, 21, 22, 24, 25, 34, 39, 45, 55, 62
24,9	ácido di- <i>O-E</i> -cafeoilaltrárico	300 e 327	45
25,2	ácido 3,4-di- <i>O-E</i> -cafeoilquínico	298 e 326	1, 5, 6, 9, 13, 14, 15, 16, 21, 22, 24, 25, 29, 34, 37, 38, 39, 43, 56, 61
25,9	ácido 3,5-di- <i>O-E</i> -cafeoilquínico	298 e 326	1, 13, 21, 22, 29, 56
27,5	ácido 4,5-di- <i>O-E</i> -cafeoilquínico	298 e 326	1, 5, 6, 9, 13, 14, 15, 21, 22, 24, 25, 29, 34,37, 39, 43, 55, 56, 61
28,1	ácido tri- <i>O-E</i> -cafeoilaltrárico	293 e 329	45
28,8	ácido tri- <i>O-E</i> -cafeoilaltrárico	293 e 329	45
29,3	ácido tri- <i>O-E</i> -cafeoilaltrárico	293 e 329	45
31,0	ácido tri- <i>O-E</i> -cafeoilaltrárico	293 e 329	45
31,8	quercetina	253, 265 e 349	1, 5, 13, 21, 24, 38, 55
32,1	nepetina	252 e 339	15, 56
32,2	luteolina	274 e 334	13, 21
32,5	goyazensolido	268	24
32,6	isorhamnetina	252, 268, 331	24, 29, 34, 39, 40
32,6	3- <i>O</i> -metilquercetina	266 e 327	1
32,9	arctina	237	5
34,0	hispidulina	270 e 334	13, 37, 25
35,0	tagitinina C	249	56
35,2	ácido 3,4,5-tri- <i>O</i> -cafeoilquínico	300 e 325	1, 5, 13, 24, 34, 43
35,8	apigenina	270 e 334	1, 24, 37
36,0	hesperetina	285, 331om	15
36,6	crisoeriol	250, 265 e 345	5, 24, 56
40,8	3',4',5-triidroxi-7-metoxiflavanona	288	45
40,9	4,5-diidro-15-desoxigoyazensolido	264	40
42,7	enidrina	232	45
44,1	eremantolido C	267	40
44,2	3',5,7-triidroxi-3,4'-dimetoxiflavona	253, 266 e 352	45

continuação na página seguinte

continuação da página anterior

48,9	uvedalina	236	45
52,2	ácido 8 β -angelóxi-germacra-1(10)Z,4E,11(13)-trien-6 α ,12-olido-14-oico	234	45
60,3	sonchifolina	242	45

*Códigos dos extratos - Tabela 1. om:ombro.

O extrato foliar de *Viguiera arenaria* (código 61) teve 10 substâncias identificadas pelo AsterDB: compostos fenólicos, derivados do ácido cafeico e flavonoides (Tabela 6). Observa-se curva de absorção no UV que sugere ser LST (Tabela 6 e Figura 17), o que poderá se confirmar pelas análises por UPLC-UV-HRFTMS. Não se trata de um extrato complexo e, apesar de possuir diversos picos minoritários, é composto basicamente por poucas substâncias (Tabela 6, Figuras 19 e 20). Nada consta na literatura sobre a fitoquímica do extrato foliar desta espécie, sendo então uma planta do cerrado pela primeira vez investigada.

A desreplicação do extrato foliar de *Smallanthus sonchifolius* (código 45), o yacón (espécie de importância alimentícia), foi facilitada, embora o extrato seja complexo, sendo possível identificar 25 substâncias por comparação com os dados do AsterDB (Tabela 7). O extrato apresenta em sua constituição compostos fenólicos, derivados do ácido cafeico, flavonoides, cumarina e LST do tipo melampolido (Figuras 21 e 22, e Tabela 7). Estes resultados estão coerentes com as informações encontradas na literatura^{83,110,111}, embora não se tenha detectado diterpenos da classe dos cauranos como descrito na literatura¹¹², possivelmente devido a pouca sensibilidade a estes compostos pela metodologia empregada. Entretanto, tal problema não ocorrerá na análise por UPLC-UV-HRFTMS.

A desreplicação da *Mikania glomerata* (código 37), uma das espécies com conhecida propriedade anti-inflamatória, permitiu a identificação preliminar de nove substâncias. Revelou-se um extrato composto basicamente por compostos fenólicos, derivados do ácido cafeico e flavonoides (Tabela 8, Figuras 23 e 24). Na literatura é descrita a presença da cumarina e diterpenos¹¹³, os quais poderão ser detectados na análise que será realizada por UPLC-UV-HRFTMS. LST não foram observadas, nem neste trabalho e nem mesmo na literatura sobre esta espécie. De fato, não se esperava encontrar esta classe de substância também porque é uma espécie que não possui tricomas glandulares (Tabela 3).

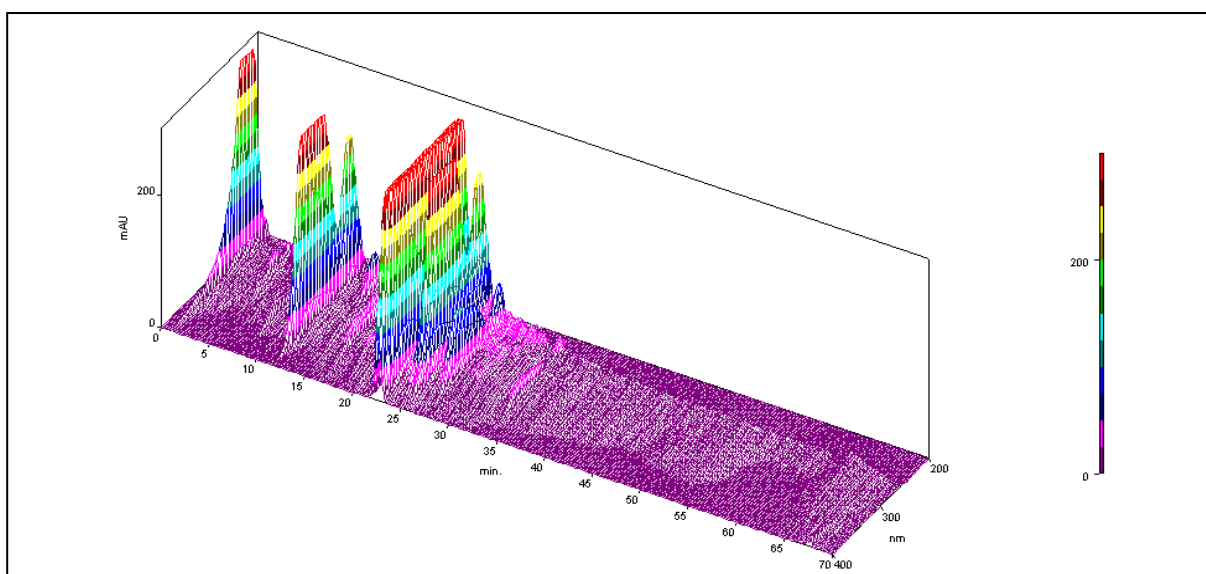


Figura 19. Impressão digital metabólica em 3D do extrato de *Viguiera arenaria* obtida por CLAE-UV-DAD (0-45% de MeCN em 60 min, 45-100% em 5 min, 100% por 5 min; 1% de ácido acético; 1,4 mL/min, e 2 colunas monolíticas C18 em série).

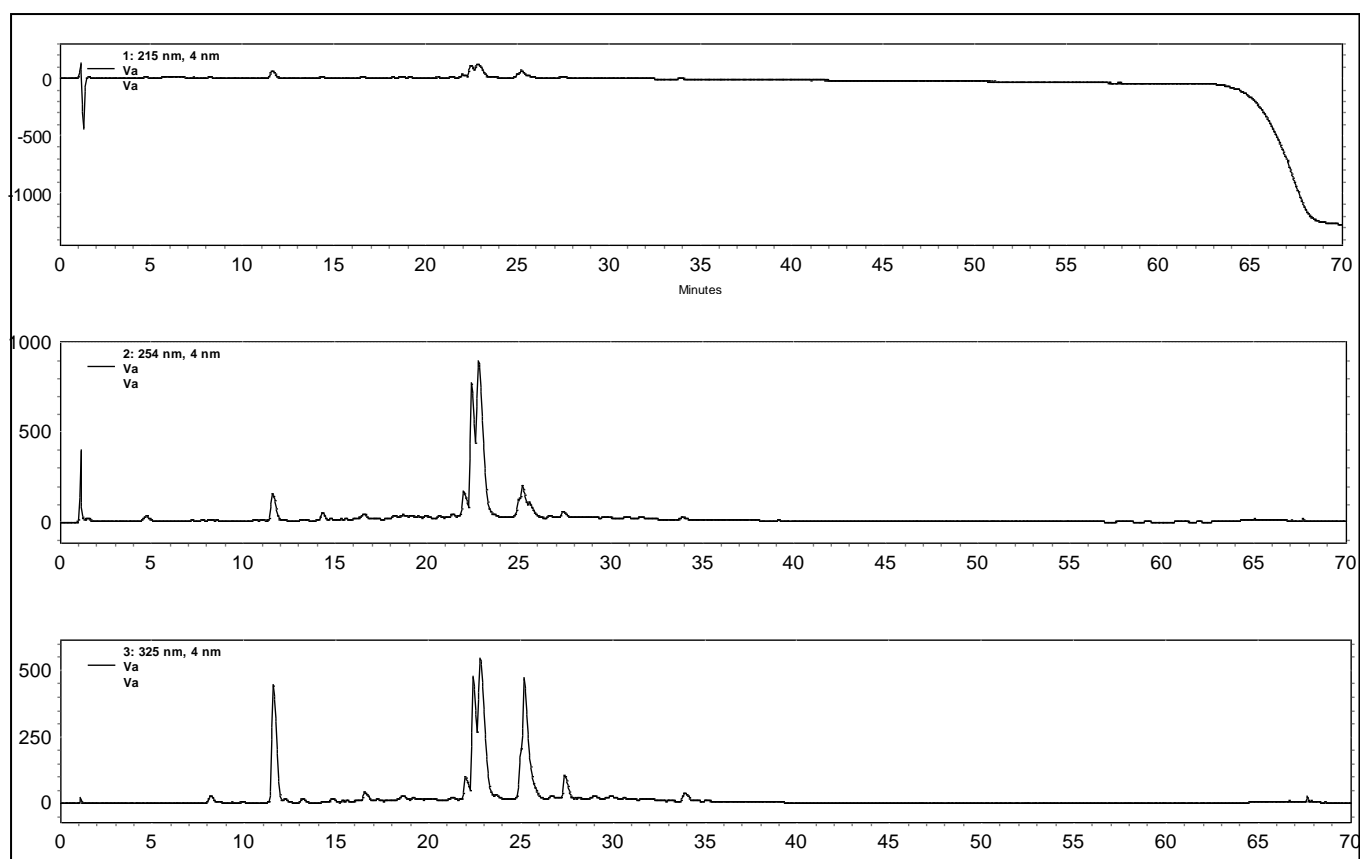


Figura 20. Impressão digital metabólica em 215, 254 e 325 nm do extrato de *Viguiera arenaria* obtida por CLAE-UV-DAD (0-45% de MeCN em 60 min, 45-100% em 5 min, 100% por 5 min; 1% de ácido acético; 1,4 mL/min e 2 colunas monolíticas C18 em série).

Tabela 6. Desreplificação do extrato foliar de *Viguiera arenaria*.

Picos	t _R (min)	Curva de absorção no UV característico	Picos de absorção máx. no UV	Substância provável
1	2,0	fenólico	262	ácido gálico
2	4,7	fenólico	257 e 291	ácido protocatecuico
3	6,0	não identificada	229	n.i.
4	8,2	derivado do ácido cafeico	300 e 325	ácido 3- <i>O-E</i> -cafeoilquínico
5	11,6	derivado do ácido cafeico	300 e 324	ácido 5- <i>O-E</i> -cafeoilquínico
6	13,1	derivado do ácido cafeico	300 e 324	ácido 4- <i>O-E</i> -cafeoilquínico
7	14,3	LST	239	n.i.
8	15,3	derivado do ácido cafeico	299 e 328	ácido cumárico
9	16,5	flavonoide	270, 284 e 326	n.i.
10	17,2	derivado do ácido cafeico	298 e 321	ácido ferúlico
11	18,2	flavonoide	261, 298 e 331	n.i.
12	18,6	flavonoide	261, 298 e 331	n.i.
13	19,1	flavonoide	261, 298 e 331	n.i.
14	19,5	flavonoide	261, 298 e 331	n.i.
15	19,9	flavonoide	261, 298 e 331	n.i.
16	20,6	flavonoide	261, 298 e 331	n.i.
17	21,0	flavonoide	261, 298 e 331	n.i.
18	21,9	flavonoide	254, 263 e 352	n.i.
19	22,4	flavonoide	254, 263 e 352	quercetrina
20	22,8	flavonoide	254, 263 e 352	n.i.
21	23,6	flavonoide	264 e 337	n.i.
22	25,0	derivado do ácido cafeico	300 e 325	n.i.
23	25,1	derivado do ácido cafeico	300 e 325	ácido 3,4-di- <i>O-E</i> -cafeoilquínico
24	25,5	flavonoide	264, 295 e 329	n.i.
25	27,4	derivado do ácido cafeico	299 e 326	ácido 4,5-di- <i>O-E</i> -cafeoilquínico
26	33,8	derivado do ácido cafeico	296 e 326	n.i.

A intensidade de absorção no UV pelas substâncias do extrato está indicada pelo sombreamento das células da tabela referente aos respectivos picos da Figuras 19 e 20: laranja> verde escuro> verde claro> não sombreada; de forma decrescente indicam-se picos muito intensos a picos de difícil detecção. t_R: tempo de retenção e n.i.: substância não identificada. Picos minoritários não identificados foram omitidos, exceto alguns representativos de determinada classe (curva absorção no UV característica; Figura 17).

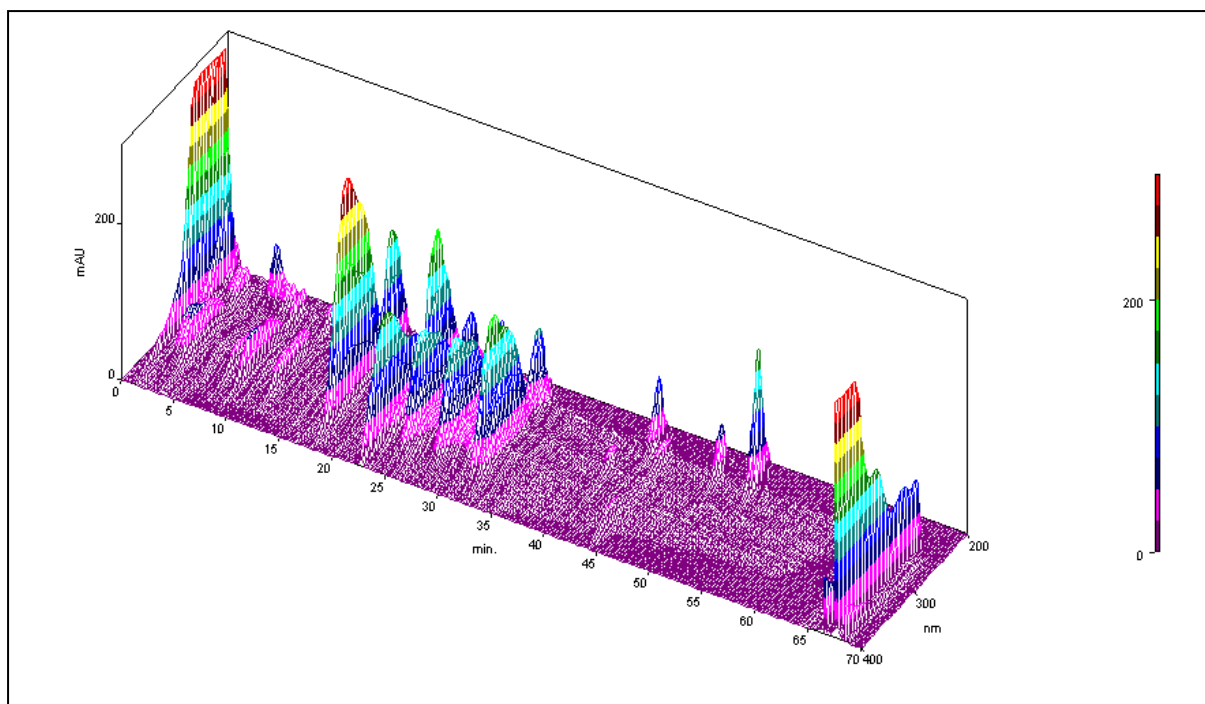


Figura 21. Impressão digital metabólica em 3D do extrato de *Smilax sonchifolia* obtida por CLAE-UV-DAD (0-45% de MeCN em 60 min, 45-100% em 5 min, 100% por 5 min; 1% de ácido acético; 1,4 mL/min e 2 colunas monolíticas C18 em série).

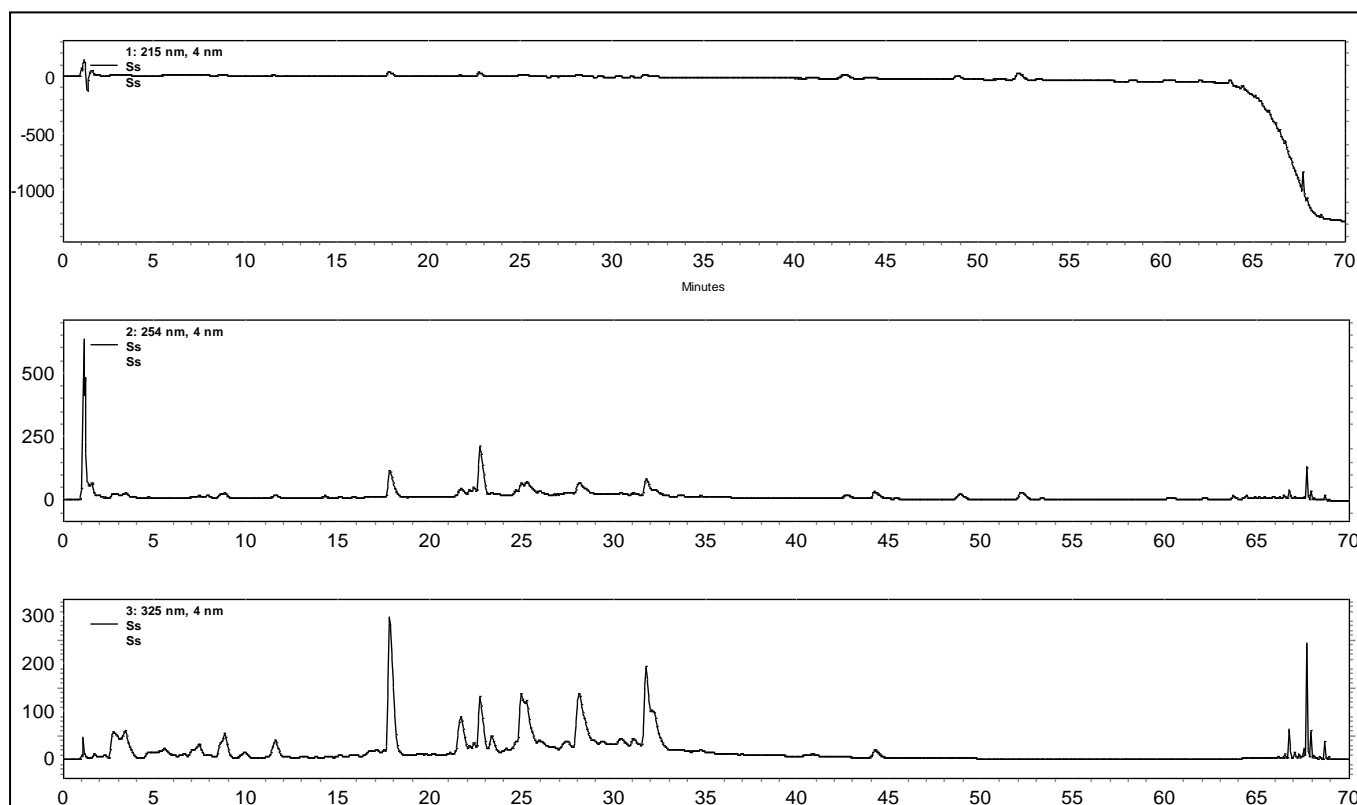


Figura 22. Impressão digital metabólica em 215, 254 e 325 nm do extrato de *Smilax sonchifolia* obtida por CLAE-UV-DAD (0-45% de MeCN em 60 min, 45-100% em 5 min, 100% por 5 min; 1% de ácido acético; 1,4 mL/min e 2 colunas monolíticas C18 em série).

Tabela 7. Desrepliação do extrato foliar de *Smallanthus sonchifolius*.

Pico	t _R (min)	Curva de absorção no UV característico	Picos de absorção máx. no UV	Substância provável
1	2,7	derivado do ácido cafeico	301 e 327	n.i.
2	3,4	derivado do ácido cafeico	302 e 327	ácido mono- <i>O-E</i> -cafeoilaltrárico
3	4,7	fenólico	300 e 323	ácido protocatecuico
4	5,5	derivado do ácido cafeico	301 e 323	ácido mono- <i>O-E</i> -cafeoilaltrárico
5	6,2	derivado do ácido cafeico	293 e 322	n.i.
6	7,0	derivado do ácido cafeico	294 e 322	ácido mono- <i>O-E</i> -cafeoilaltrárico
7	7,4	derivado do ácido cafeico	295 e 322	n.i.
8	8,8	derivado do ácido cafeico	302 e 332	ácido mono- <i>O-E</i> -cafeoilaltrárico
9	10,5	cumarina glicosilada	280 e 324om	aesculina
10	11,5	derivado do ácido cafeico	290 e 321	ácido 5- <i>O-E</i> -cafeoilquínico
11	13,00	derivado do ácido cafeico	286 e 322	ácido 4- <i>O-E</i> -cafeoilquínico
12	17,0	derivado do ácido cafeico	297 e 327	ácido di- <i>O-E</i> -cafeoilaltrárico
13	17,8	derivado do ácido cafeico	302 e 327	ácido di- <i>O-E</i> -cafeoilaltrárico
14	21,7	derivado do ácido cafeico	307 e 327	ácido di- <i>O-E</i> -cafeoilaltrárico
15	22,7	flavonoide	253, 264 e 350	isoquercetrina
16	23,3	derivado do ácido cafeico	300 e 328	n.i.
17	24,9	derivado do ácido cafeico	300 e 327	ácido di- <i>O-E</i> -cafeoilaltrárico
18	25,2	derivado do ácido cafeico	293 e 329	ácido 3,4-di- <i>O-E</i> -cafeoilquínico
19	25,9	derivado do ácido cafeico	293 e 329	ácido 3,5-di- <i>O-E</i> -cafeoilquínico
20	28,1	derivado do ácido cafeico	293 e 329	ácido tri- <i>O-E</i> -cafeoilaltrárico
21	28,8	derivado do ácido cafeico	293 e 329	ácido tri- <i>O-E</i> -cafeoilaltrárico
22	29,3	derivado do ácido cafeico	293 e 329	ácido tri- <i>O-E</i> -cafeoilaltrárico
23	29,8	derivado do ácido cafeico	293 e 329	n.i.
24	31,0	derivado do ácido cafeico	293 e 329	ácido tri- <i>O-E</i> -cafeoilaltrárico
25	31,7	derivado do ácido cafeico	303 e 327	n.i.
26	32,1	derivado do ácido cafeico	297 e 322	n.i.
27	40,8	flavonoide	288	3',4',5-triidroxi-7-metoxiflavanona
28	42,7	LST	232	enidrina
29	44,2	flavonoide	253, 266 e 352	3',5,7-triidroxi-3,4'-dimetoxiflavona
30	48,9	LST	236	uvedalina
31	52,2	LST	234	ácido 8β-angelóxi-germacra-1(10)Z,4E,11(13)-trien-6α,12-olido-14-oico
32	60,3	LST	242	sonchifolina

A intensidade de absorção no UV pelas substâncias do extrato está indicada pelo sombreado das células da tabela referentes aos respectivos picos: laranja> verde escuro> verde claro> não sombreada; de forma decrescente indicam picos muito intensos a picos de difícil detecção. t_R: tempo de retenção, om: picos de baixa intensidade denominados de ombro e n.i.: substância não identificada. Picos minoritários não identificados foram omitidos, exceto alguns representativos de determinada classe (curva absorção no UV característica).

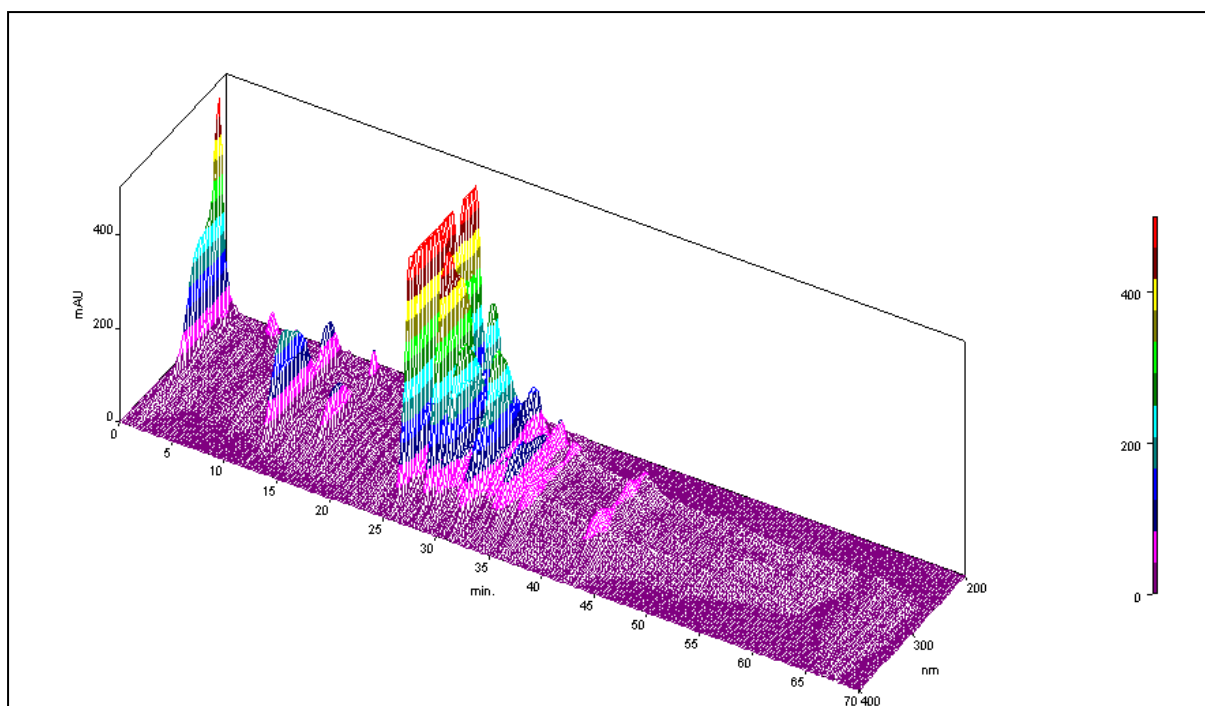


Figura 23. Impressão digital metabólica em 3D do extrato de *Mikania glomerata* obtida por CLAE-UV-DAD (0-45% de MeCN em 60 min, 45-100% em 5 min, 100% por 5 min; 1% de ácido acético; 1,4 mL/min e 2 colunas monolíticas C18 em série).

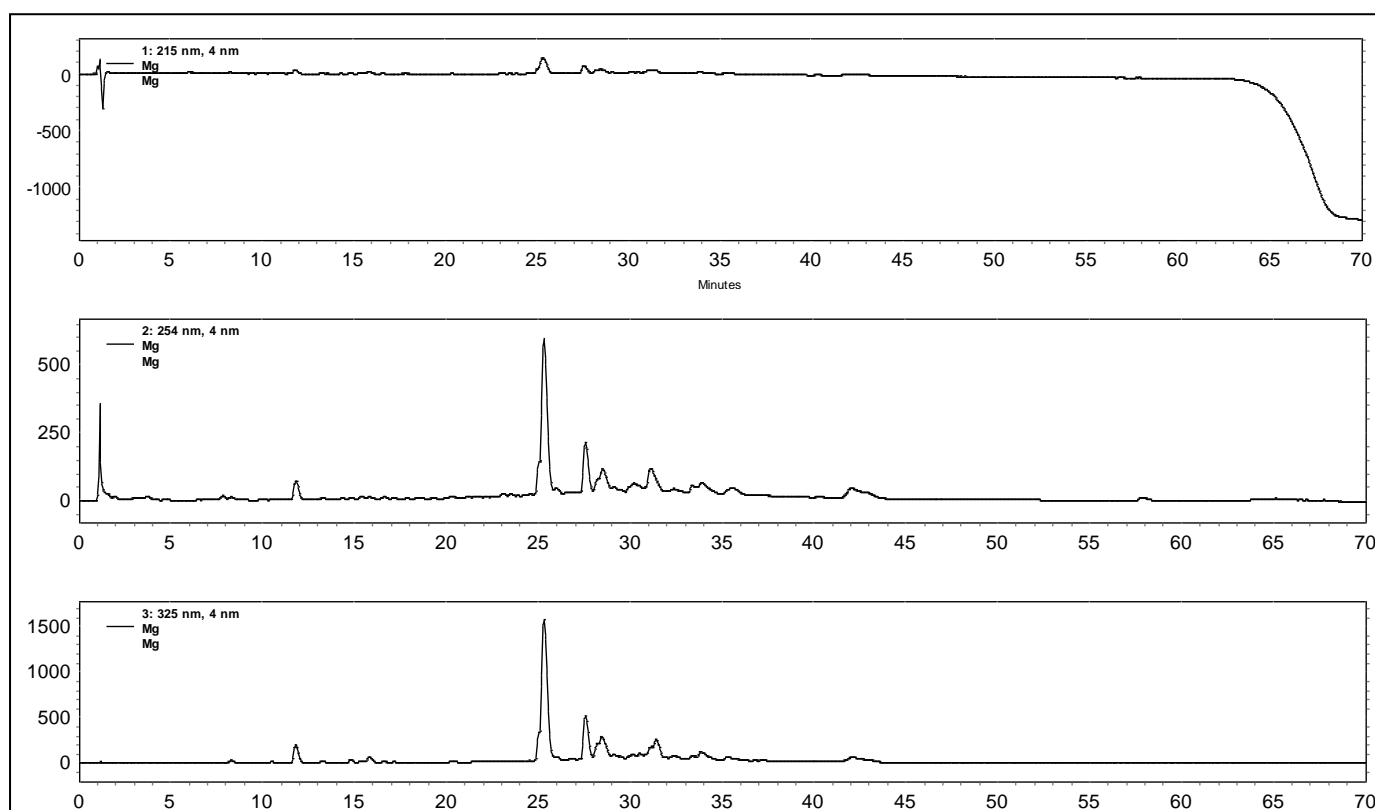


Figura 24. Impressão digital metabólica em 215, 254 e 325 nm do extrato de *Mikania glomerata* obtida por CLAE-UV-DAD (0-45% de MeCN em 60 min, 45-100% em 5 min, 100% por 5 min; 1% de ácido acético; 1,4 mL/min e 2 colunas monolíticas C18 em série).

Tabela 8. Desreplicação do extrato foliar de *Mikania glomerata*.

Picos	t _R (min)	Curva de absorção no UV característico	Picos de absorção máx. no UV	Substância provável
1	6,1	fenólico	229	n.i.
2	7,8	fenólico	255	n.i.
3	8,3	derivado do ácido cafeico	300 e 325	ácido 3- <i>O-E</i> -cafeoilquínico
4	10	não identificada	278	n.i.
5	10,5	derivado do ácido cafeico	300 e 323	n.i.
6	11,8	derivado do ácido cafeico	299 e 324	ácido 5- <i>O-E</i> -cafeoilquínico
7	13,3	derivado do ácido cafeico	299 e 324	ácido 4- <i>O-E</i> -cafeoilquínico
8	14,8	derivado do ácido cafeico	299 e 324	ácido 3- <i>O</i> -cumaroilquínico
9	15,4	derivado do ácido cafeico	299 e 324	ácido cumárico
10	15,7	derivado do ácido cafeico	299 e 324	n.i.
11	16,6	flavonoide	286 e 321	n.i.
12	17,8	flavonoide	278 e 312	n.i.
16	22,11	flavonoide	284 e 325	n.i.
21	25	derivado do ácido cafeico	299 e 324	n.i.
22	25,3	derivado do ácido cafeico	299 e 324	ácido 3,4-di- <i>O-E</i> -cafeoilquínico
25	27,6	derivado do ácido cafeico	299 e 324	ácido 4,5-di- <i>O-E</i> -cafeoilquínico
26	28,2	derivado do ácido cafeico	300 e 318	n.i.
27	28,4	derivado do ácido cafeico	300 e 318	n.i.
29	30,1	flavonoide	269, 300 3 327	n.i.
30	30,5	derivado do ácido cafeico	300 e 325	n.i.
32	31,4	derivado do ácido cafeico	300 e 313	n.i.
35	33,9	flavonoide	276 e 321	hispidulina
36	35,2	derivado do ácido cafeico	300 e 325	n.i.
37	35,5	flavonoide	250, 274 e 330	apigenina
38	42	flavonoide	273 e 333	n.i.

A intensidade de absorção no UV pelas substâncias do extrato está indicada pelo sombreamento das células da tabela referentes aos respectivos picos: laranja> verde escuro> verde claro> não sombreada; de forma decrescente indicam picos muito intensos a picos de difícil detecção. t_R: tempo de retenção e n.i.: substância não identificada.

O método cromatográfico teve que ser redefinido novamente, sendo que o fluxo (1,4 mL/min) e a quantidade de ácido acético na fase móvel foram considerados muito altos para análises no UPLC-UV-HRFTMS. Tal condição interferiria na sensibilidade das análises. A resolução entre os picos, no nível requerido para análises em CLAE-UV-DAD, não é tão indispensável quando se realiza UPLC-UV-HRFTMS, considerando que são obtidos dados de massa de alta resolução e picos sobrepostos podem ser tratados com o software MZmine. Logo, testou-se uma fase móvel próxima à anteriormente estabelecida, alterando basicamente apenas para uma menor quantidade de ácido na fase móvel e menor fluxo, como era requerido. Utilizou-se também coluna C18, porém com partícula de

menor diâmetro (3 μm , alto número de pratos teóricos, adequada para estudos metabômicos) e menor comprimento a fim de diminuir o tempo de corrida cromatográfica. No entanto, tanto utilizando a coluna de 3 x 100, quanto a de 3 x 150, não foram obtidos resultados satisfatórios, pois um considerável número de picos de interesse ficou aglomerado no final da corrida, na parte de limpeza da coluna (Figura 25 e Tabela 9).

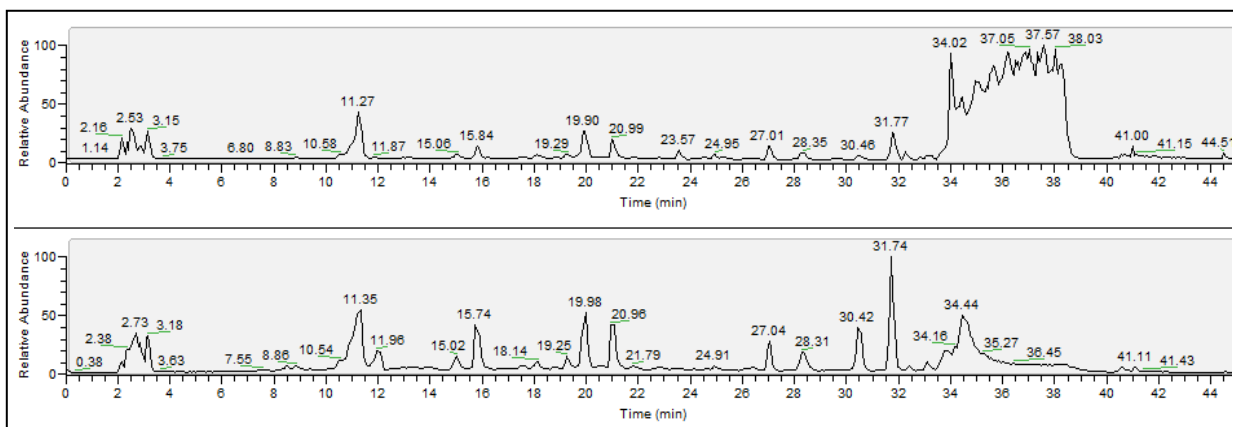


Figura 25. Cromatograma de análise em UPLC-UV-HRFTMS, utilizando o método piloto: coluna C18 (150 x 3 mm), temperatura controlada a 30 °C, fluxo de 0,3 mL/min, gradiente de 5-40% de MeCN em 31 min, 90% MeCN de 31-36 min, seguido de 5% de MeCN por mais 5 min, 0,1% de ácido fórmico na fase móvel. O cromatograma superior é no modo negativo e o inferior no modo positivo.

Então, depois destes resultados, definiu-se o método utilizando uma fase móvel mais abrangente e forte (gradiente MeCN/água; 0,1% de ácido fórmico na água, 5% de MeCN em 5 min, 5%-100% de MeCN em 50 min), que se mostrou necessária quando se utiliza fluxo tão pequeno (0,3 mL/min, a fim de não afetar a sensibilidade na detecção). Utilizando este método, todas as impressões digitais metabólicas foram obtidas para todas as espécies, sendo os seus constituintes bem distribuídos por todo o cromatograma (Figura 26). Além disso, por ser bem abrangente, o método estabelecido será de grande utilidade como um método padrão no laboratório, sendo que é adequado para a análise de uma grande diversidade de extratos. Um grande banco de dados para desreplicação está sendo construído baseado neste método e, assim, tanto este banco como o método desenvolvido, poderão ser utilizados para outros trabalhos.

Tabela 9. Desreplicação de dois extratos complexos (*T. diversifolia* e *S. sonchifolius*; 30 hits: substância identificada por dado de biblioteca de dados) no MZmine utilizando a biblioteca de dados AsterDB e o DNP. Os dados cromatográficos foram obtidos através do método piloto para UPLC-UV-HRFTMS.

Nome	t _R (min)
11-trideceno-3,5,7,9-tetraeno-1,2,13-triol	5,05
ácido protocatecuico	8,53
ácido 5- <i>O-E</i> -cafeoilquínico	11,26
3',4',5-trihidroxi-3,6,7-trimetoxiflavona	11,69
ácido cafeico	13,15
(<i>E</i>)-form-1- <i>O</i> -glucopiranosídeo	17,10
isoquercitrina	17,88
ácido 4,5-di- <i>O-E</i> -cafeoilquínico	19,20
1-(4-hidroxifenil)-1,2-propanediol	19,63
quercetina-3- <i>O-α</i> -1-ramnopiranosídeo	19,79
erucifolina	20,88
ácido 3,4,5-tri- <i>O-E</i> -cafeoilquínico	26,13
luteolina	26,13
tamarixetina	26,35
tagitinina A	27,05
tagitinina E	28,33
(5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,8 <i>R</i>)-3-one-4β,10α-dihidroxi-8β-metilpropanoiloxi-guaia-11(13)-en-6α,12-olido	28,26
onetina	28,76
crisoeriol	30,12
1β, 2α-epoxitagitinina C	33,06
niveusina A	31,72
desacetilviguiestenina	31,72
erioflorina	33,57
ácido 9-hidroxi-10, 2-octadecadienoico	36,12
3,3',4',5,7-pentahidroxiflavona	34,03
enidrina	33,71
uvedalina	34,54
angelato de acantospermolido	34,54
ácido 2,4-tetradecadienoico	36,09

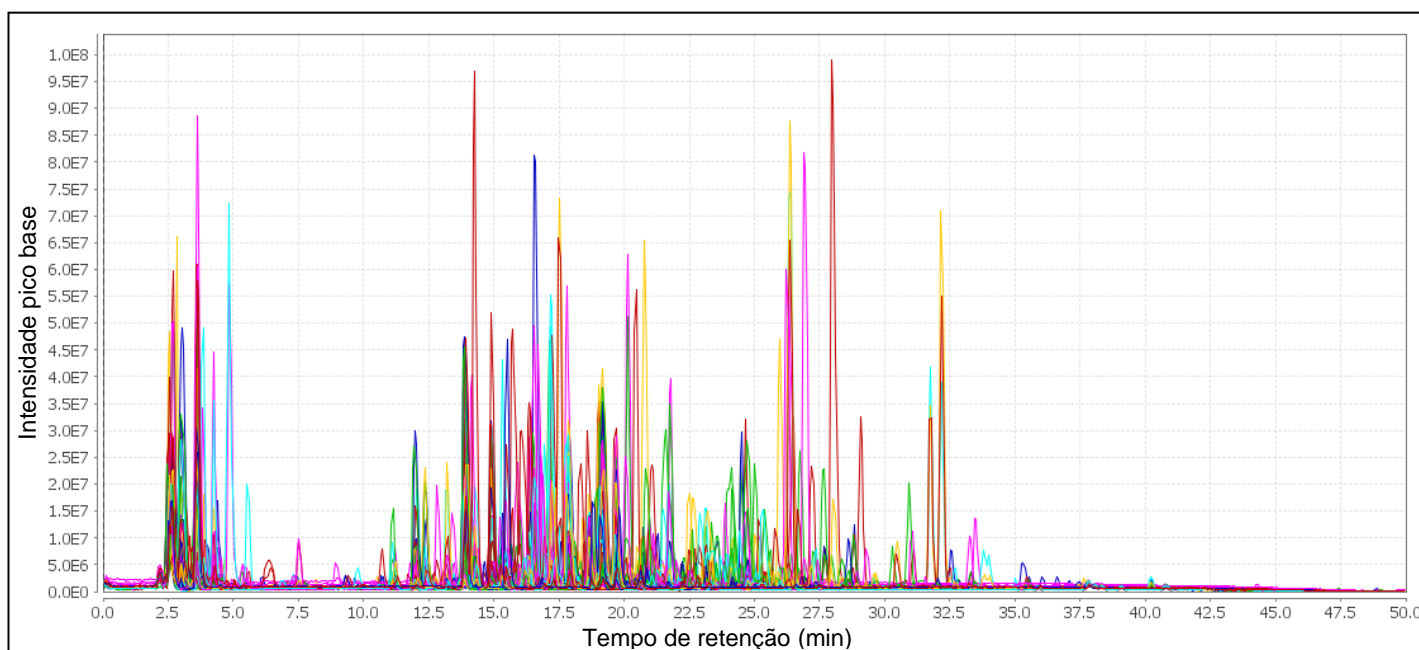


Figura 26. Cromatogramas (modo negativo) de todos os extratos sobrepostos, obtidos através de UPLC-UV-HRFTMS, no método definitivo (fluxo 0,3 mL/min, gradiente MeCN/água; 0,1% ácido fórmico na água, 5% de MeCN em 5 min, 5%-100% de MeCN em 50 min, temperatura da coluna 30 °C, coluna C18, 3 µm, 150 x 3 mm).

4.6. Pesquisa de substâncias precipitadoras de proteínas

Nenhuma amostra demonstrou resultado positivo no ensaio de precipitação de proteínas, exceto o controle positivo - ácido tânico. Os extratos sequer geraram qualquer turvação. Mesmo assim, realizou-se centrifugação a fim de se confirmar a completa ausência de precipitação. Nos estudos metabolômicos também não se encontrou substâncias conhecidas por causarem precipitação de proteínas, as quais poderiam interferir nos ensaios anti-inflamatórios *in vitro*, seja nas análises dos resultados por CLAE-UV-DAD ou UPLC-UV-HRFTMS.

Já se sabe que os taninos condensados e hidrolisáveis, famosos pela propriedade de precipitação de proteínas^{52,53}, não são comuns em espécies da família Asteraceae⁹³, embora algumas substância fenólicas monoméricas e alguns derivados do ácido clorogênico possam se comportar de modo análogo¹¹⁴. Portanto, nossos resultados corroboram os dados da literatura. Por outro lado, agora esta confirmação veio a ser feita não apenas pelas clássicas metodologias fitoquímicas, mas também pela sensível abordagem metabolômica associada à desreplcação com o abrangente banco de dados DNP.

4.7. Análises de correlação *in silico* e desreplcação

Após a obtenção das impressões digitais metabólicas de todas as espécies (Figura 26), os dados foram tratados de uma única vez no software MZmine (Figura

27). Assim, após os devidos tratamentos (desconvolução, eliminação dos isótopos, alinhamento e preenchimento dos espaços vazios)^{10,18,19,115}, os dados foram exportados deste software (no formato .txt) para serem analisados no software SIMCA. Foram realizadas no SIMCA as análises estatísticas multivariadas não supervisionadas PCA e HCA, porém os resultados não contribuiriam para o objetivo deste projeto. Os *clusters* (agrupamentos) encontrados foram de acordo com a composição química das espécies e não quanto às suas propriedades anti-inflamatórias, como se desejava. O mesmo resultado foi encontrado quando a PCA foi realizada no software SIEVE (Figura 28). A análise neste software foi a partir dos dados brutos, sendo que toda a etapa de tratamento dos dados cromatográficos é realizada diretamente nele; logo, o resultado corrobora os estudos realizados via MZmine e SIMCA.

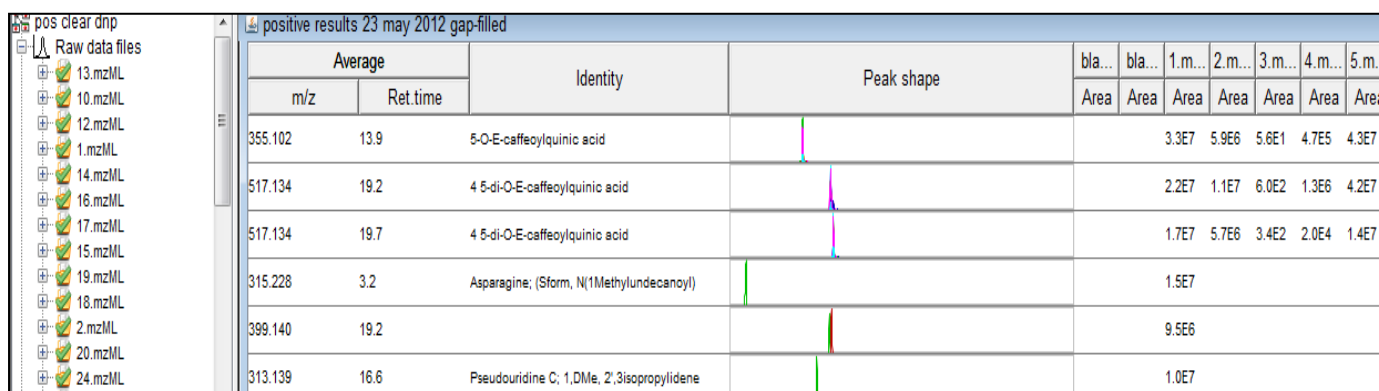


Figura 27. Tratamento dos dados cromatográficos de todos os extratos no software MZmine. Neste tratamento inclui-se a desconvolução, eliminação dos isótopos, alinhamento até a desreplicação. Apenas pela *m/z* não é possível distinguir isômeros como o isômeros de di-*O-E*-cafeoilquínicos.

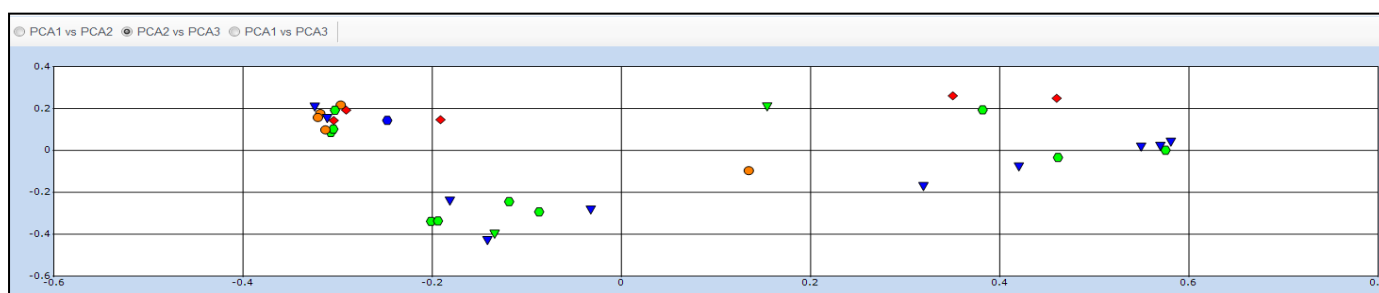


Figura 28. PCA no software SIEVE. Os agrupamentos observados foram baseados na composição química dos extratos e não nas suas propriedades anti-inflamatórias (verde: extratos capazes de inibir COX e LOX ao mesmo tempo, laranja: extratos capazes de inibir apenas LOX, vermelho: extratos capazes de inibir apenas COX, azul: extratos inativos).

Este resultado é o esperado considerando que as análises estatísticas multivariadas não supervisionadas são capazes de resumir a variação entre os dados revelando *outliers*, tendências e grupos. Contudo, geralmente é necessária a

construção de modelo através de métodos estatísticos multivariados supervisionados lineares, como OPLS e PLS, para classificação de novas amostras e determinação de biomarcadores (diretamente do *loading plot*). Isso porque as classes de cada amostra (no caso, suas propriedades anti-inflamatórias, ou IC₅₀) são informadas previamente para construção do modelo e a significância estatística é diretamente relacionada à importância das correspondentes variáveis para o modelo construído. Os métodos estatísticos multivariados não lineares como as RN (redes neurais artificiais) usualmente são, até mesmo, superiores para classificação de novas amostras, porém não são muito úteis para determinação de biomarcadores.^{18,19,116}

De fato, realizando OPLS foi possível encontrar uma clara separação entre os grupos de acordo com suas propriedades anti-inflamatórias (Figura 29). Os valores de R² encontrados foram de 0,97 e 0,92, os quais se referem ao grau de separação entre os quatro grupos de extratos testados (Figura 29) a partir dos dados previamente tratados das análises de UPLC-HRFTMS em modo negativo e positivo, respectivamente. Este resultado foi surpreendente, sendo que quanto mais próximo de 1,0 for o R², melhor o grau de separação, sendo que normalmente é muito difícil encontrar valores tão próximos a 1,0 em estudos metabolômicos. Em tais estudos, considerando-se a alta complexidade das amostras, os valores de R² acima de 0,5 já são considerados aceitáveis¹¹⁷⁻¹²¹. Isso significa que existe real diferença entre a composição dos extratos de diferentes grupos enquanto há similaridades nos extratos dentro destes grupos.

Então, através do *loading-plot*, foi possível verificar as características dos extratos que estão correlacionados com as respectivas propriedades anti-inflamatórias (Figura 30). Os pontos no *loading-plot*, próximos ao seu respectivo *cluster* no *score-plot*, estão correlacionados à propriedade dos extratos que compõem este *cluster*^{15,118,122,123}. As substâncias consideradas correlacionadas com a inibição da COX e da LOX que, no caso, seriam os biomarcadores desta propriedade, tiveram sua busca priorizada. Muitas foram as substâncias apontadas no *loading-plot* como correlacionadas a esta propriedade.

Portanto, foram considerados ainda os valores de "VIP" e os "coeficientes de correlação com Y" para as variáveis X (substâncias) selecionadas no *loading-plot*; valores VIP > 1,0 indicam quem são as variáveis importantes para o modelo, e os "coeficientes de correlação com Y" expressam quão fortemente a propriedade está

correlacionada às variáveis selecionadas¹¹⁷. Assim, foram encontradas seis substâncias detectadas no modo negativo e sete substâncias detectadas no modo positivo (das análises por UPLC-HRFTMS; Tabela 10).

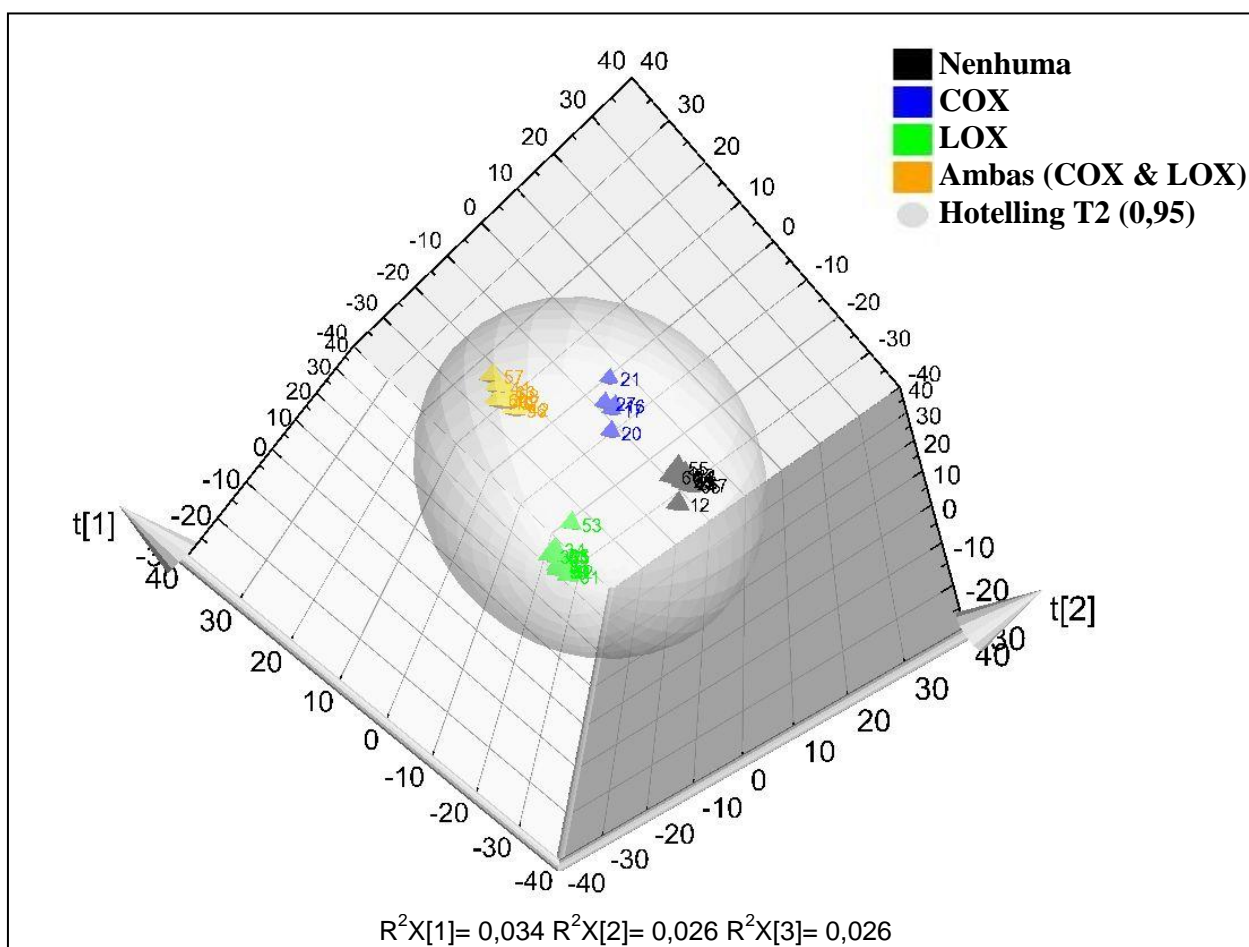


Figura 29. OPLS da composição química dos extratos que exibiram inibição para COX, LOX, ambas as enzimas ou nenhuma delas. $R^2 = 0,97$. A elipse é a região definida com 95% de confiança da variação do modelo, definida por Hotelling T2 (um *t*-test multivariado)^{19,116}.

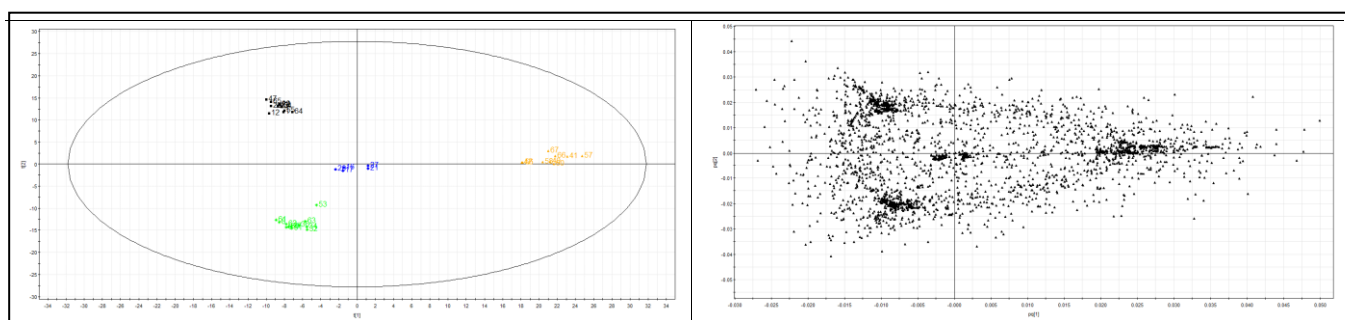


Figura 30. Score-plot (à esquerda; mostra a distribuição dos extratos de acordo com a propriedade anti-inflamatória - variáveis Y) e loading-plot (à direita; mostra a distribuição das substâncias - variáveis X) obtidos na análise por OPLS (Figura 29; componente 1 vs 2) da composição química dos extratos (UPLC- HRFTMS) supervisionada pelas propriedades anti-inflamatória: extratos laranja apresentam propriedade inibitória para COX e LOX, azul apenas para COX, verde apenas para LOX, e preta nenhuma inibição.

Então, através da união de todos esses dados, chegou-se a conclusão que estas substâncias estão altamente correlacionadas com a propriedade anti-inflamatória requerida, ou seja, de inibição da COX e da LOX. A desreplicação destas substâncias foi priorizada e, dentre elas, algumas não tiveram nenhum *hit*, mesmo utilizando duas abrangentes bibliotecas de dados (DNP e AsterDB); logo, provavelmente, estas podem se tratar de substâncias inéditas (Tabela 10).

Tabela 10. Substâncias correlacionadas com a inibição de COX e LOX.

	ID	<i>m/z</i>	<i>t_R</i>	<i>Hits</i>	+H ⁺	Formula			
Modo negativo	671	487.1255794	20.0	flavonoide ou composto fenólico	488.1334043	C ₂₄ H ₂₄ O ₁₁			
	694	415.1255039	15.6	composto fenólico ou cumarina	416.1333289	C ₁₈ H ₂₄ O ₁₁			
	2054	359.0778354	14.2	flavonoide ou composto fenólico	360.0856604	C ₁₈ H ₁₆ O ₈			
	2488	679.1505363	16.4	flavonoide	680.1583613	C ₃₀ H ₃₂ O ₁₈			
	3913	341.0882863	12.2	composto fenólico ou cumarina	342.0961113	C ₁₅ H ₁₈ O ₉			
	5001	431.1930947	18.7	-	432.2009197	C ₂₀ H ₃₂ O ₁₀			
	ID	<i>m/z</i>	<i>t_R</i>	<i>Hits</i>	-H ⁺	Formula	<i>Hits</i>	-Na ⁺	Formula
Modo positivo	1190	611.1399698	20.0	Flavonoide	610.1321448	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₄	-	734.2081542	-
	1273	361.1642853	32.0	LST, diterpeno ou composto fenólico	360.1564603	C ₂₀ H ₂₄ O ₆	composto fenólico	588.1501998	C ₂₈ H ₂₈ O ₁₄
	1282	261.1118544	32.1	flavonoide, compostos fenólico ou LST	260.1040294	C ₁₅ H ₁₆ O ₄	composto fenólico	338.1745153	C ₁₈ H ₂₆ O ₆
	1436	418.1857408	33.9	-	417.1779158	C ₁₉ H ₂₉ O ₁₀	-	238.1220844	-
	1615	363.1799055	30.5	LST, diterpeno e composto fenólico	362.1720805	C ₂₀ H ₂₆ O ₆	-	395.1959708	-
	1623	426.2120257	27.9	-	425.2042007	C ₁₈ H ₃₃ O ₁₁	composto fenólico	340.1901355	C ₁₈ H ₂₈ O ₆
	1637	349.1642519	28.2	LST, diterpeno ou composto fenólico	348.1564269	C ₁₉ H ₂₄ O ₆	LST ou composto fenólico	326.1744819	C ₁₇ H ₂₆ O ₆

ID - identificação das substâncias determinada inicialmente no MZmine referente a um pico que tem uma *m/z* (massa/carga), um tempo de retenção (*t_R*; min), desreplicação e fórmula molecular correspondentes. Desreplicação considerando variações < 2 ppm.

A confirmação das estruturas químicas das substâncias desreplicadas ainda será realizada por análises de UPLC-MS/MS com a comparação de padrões de fragmentação e, se possível coinjeção com substâncias puras. Se necessário, as mesmas poderão ser isoladas em quantidade adequada e, em seguida, será realizada a confirmação de suas atividades biológicas através dos ensaios de COX e LOX. As substâncias possivelmente inéditas, que também demonstraram ser correlacionadas com a propriedade requerida, serão investigadas da mesma forma, assim que as mesmas forem isoladas e tiverem suas respectivas estruturas químicas determinadas.

Ainda sobre estas substâncias, as quais demonstraram ser correlacionadas à propriedade de inibição concomitante de COX e LOX, pode-se observar que não fazem parte dos constituintes majoritários dos extratos. Na Tabela 11 pode-se observar a área sob os picos destas substâncias e, na Figura 26, ter-se uma noção da área média dos picos das substâncias majoritárias ($> 1,0^6$). Esta observação vem mais uma vez sugerir que tais constituintes sejam potentes neste mecanismo de ação, e que, além disso, puderam ser detectados devido à utilização de técnicas bastante sensíveis. Os picos de tais substâncias só podem ser observados quando se amplia os cromatogramas. Se o estudo não tivesse contado com a sensibilidade do UPLC -HRFTMS e análises *in silico*, de fato não teria sido possível determinar os biomarcadores.

Pode-se notar também que os biomarcadores são sim comuns a várias espécies bioativas, mesmo em espécies de tribos distintas (Tabelas 1 e 11, Figuras 31 e 32). Isso vem corroborar a hipótese de que são substâncias presentes em diversas espécies, concomitantemente ao potencial da família Asteraceae em apresentar o mecanismo de ação duplo requerido (Tabela 3). Outro ponto a ser notado é que nenhum biomarcador está presente em todas as espécies inibidoras de COX e LOX ao mesmo tempo (Tabela 11, Figuras 31 e 32). Isso vem a sugerir que existem diferentes substâncias com o mecanismo de ação em questão e que, provavelmente, agem independentemente e não sinergicamente.

Logo, com estes resultados é importante considerar todos os biomarcadores apontados e a enorme variedade de espécies que foram investigadas. Assim, a seleção de espécies deste trabalho foi realmente satisfatória, embora audaciosa, considerando que a maioria dos estudos metabolômicos, a fim de se encontrar biomarcadores, geralmente não envolvem espécies com metabolomas tão distintos. Ao contrário, comumente estes estudos envolvem diferentes extratos de uma mesma espécie, ou extratos de espécies do mesmo gênero^{8,15,117,124}.

Tabela 11. Área sob os picos das substâncias correlacionadas com a propriedade de inibição de COX e LOX dos extratos ativos.

ID das substâncias	Código dos extratos												
	19	40	41	42	46	49	56	57	58	59	60	66	67
1190	0	9,06E+03	1,22E+02	2,39E+03	1,08E+01	0	0	3,18E+01	0	0	0	0	0
1273	0	2,27E+04	4,86E+04	1,61E+04	0	9,65E+01	7,17E+01	0	0	2,12E+01	1,40E+01	0	0
1282	0	1,54E+03	3,23E+03	2,39E+03	8,50E+00	1,70E+01	9,36E+01	0	8,98E+00	0	0	1,13E+03	0
1436	0	2,19E+02	4,45E+02	6,31E+03	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1615	0	1,97E+03	4,31E+07	1,03E+05	6,07E+00	1,88E+03	1,77E+03	9,46E+01	0	1,21E+02	4,15E+01	0	3,76E+01
1623	0	4,02E+02	1,25E+07	2,42E+03	0	2,20E+02	2,50E+01	0	0	1,04E+02	4,39E+01	0	0
1637	0	1,70E+03	6,59E+06	1,24E+03	0	3,74E+02	5,14E+06	0	0	0	0	9	0
671	0	1,78E+03	1,92E+06	3,70E+06	3,78E+02	1,11E+03	6,49E+03	2,01E+03	1,03E+04	3,16E+06	3,97E+06	1,51E+04	6,64E+02
694	0	5,14E+03	7,70E+03	4,80E+03	6,68E+01	1,14E+02	6,31E+02	1,41E+03	7,39E+02	5,12E+02	2,02E+02	3,91E+03	1,92E+02
2054	5,40E+02	4,57E+03	1,50E+03	5,92E+04	2,79E+03	1,87E+03	1,48E+07	1,86E+07	1,38E+04	5,46E+07	2,06E+07	2,81E+07	3,33E+06
2488	0	1,18E+03	1,69E+03	1,05E+03	0	5,70E+01	0	5,31E+01	1,17E+02	1,75E+02	6,47E+02	6,75E+01	2,22E+01
3913	1,02E+04	2,43E+03	1,04E+04	1,77E+04	1,03E+04	1,03E+04	2,48E+04	6,55E+06	6,43E+06	6,90E+06	3,60E+06	7,64E+06	3,64E+04
5001	2,63E+03	1,07E+03	1,50E+04	6,92E+03	2,00E+03	3,08E+04	2,70E+04	3,21E+04	7,06E+03	2,15E+03	8,24E+03	2,10E+04	1,25E+04

ID - identificação das substâncias determinada inicialmente no MZmine referente a um pico que tem uma m/z (massa/carga), um tempo de retenção (RT), desreplicação e fórmula molecular correspondentes (Tabela 10).

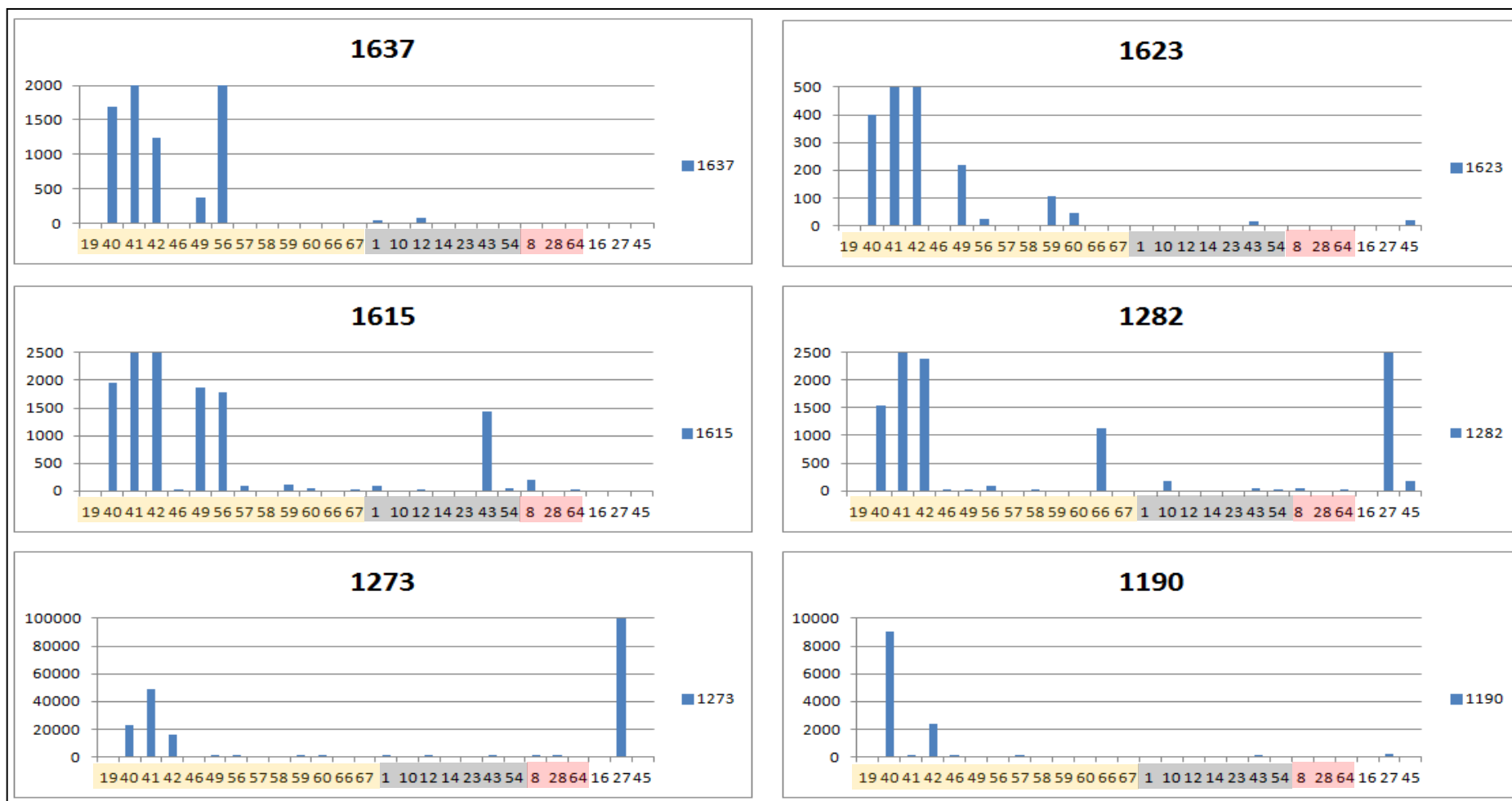


Figura 31. Gráficos de áreas sob os picos referentes às substâncias correlacionadas com a propriedade de inibição de COX e LOX. Detecção no modo positivo das análises por UPLC-HRFTMS. Eles foram ordenados de acordo com os valores de correlação, de maior para menor, de cima para baixo; o pico 1436 foi omitido por ser muito parecido com o 1273 (Tabela 11). Nenhuma substância detectada no modo positivo, inclusive as destes gráficos, teve $p < 0,05$ em análise *t-test* comparando a área dos extratos ativos (amarelo: inibidores de COX e LOX) e os demais (cinza: extratos que não inibem nenhuma das enzimas; rosa: extratos que inibem apenas a LOX; e incolor: aqueles que inibem apenas a COX).

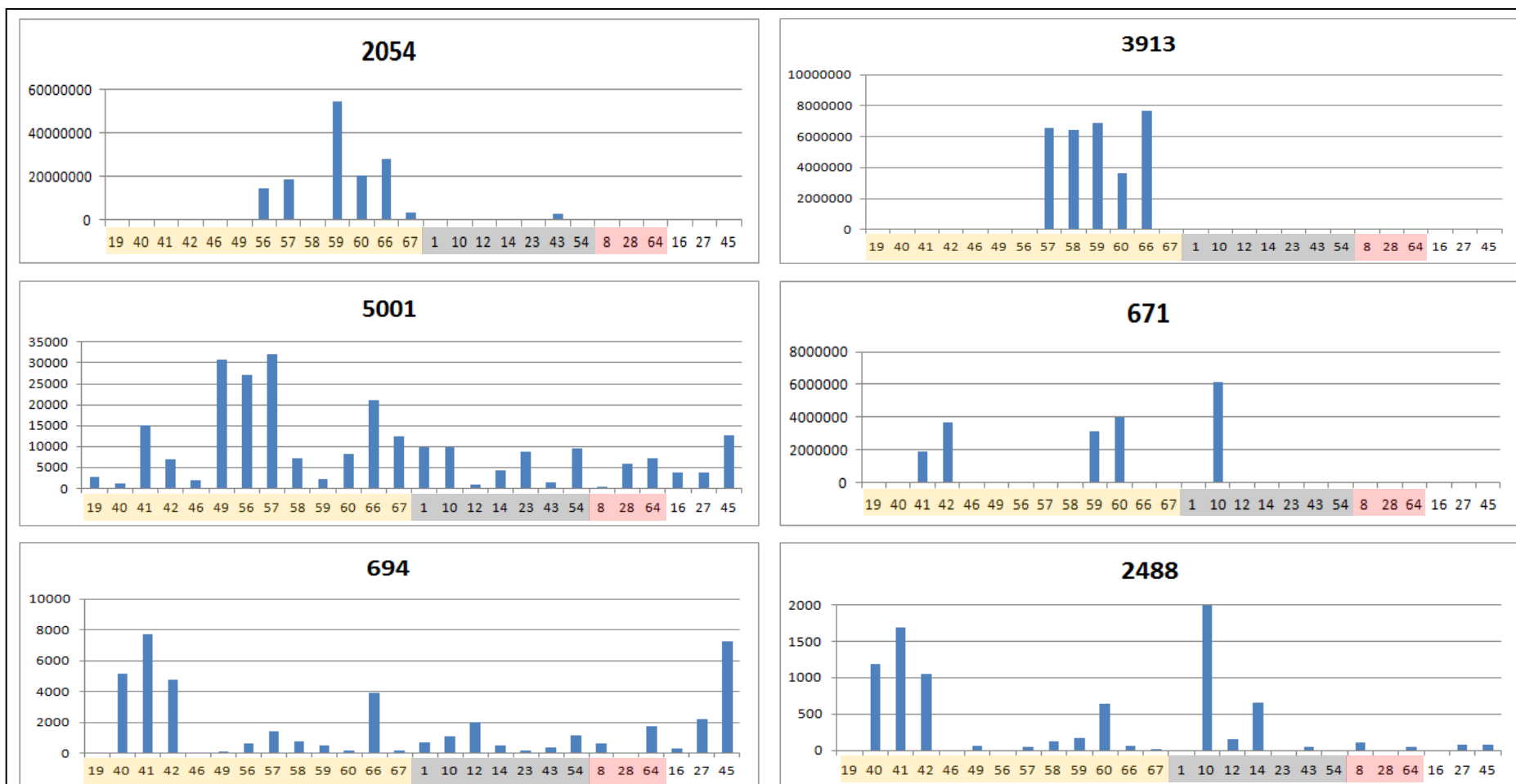


Figura 32. Gráficos de áreas sob os picos referentes às substâncias correlacionadas com a propriedade de inibição de COX e LOX. Detecção no modo negativo das análises por UPLC-HRFTMS. Eles foram ordenados de acordo com os valores de correlação, de maior para menor, de cima para baixo. Todas essas substâncias tiveram $p < 0,05$ em análise *t-test* comparando a área dos mesmos nos extratos ativos (amarelo: inibidores de COX e LOX) e os demais (cinza: extratos que não inibem nenhuma das enzimas; rosa: extratos que inibem apenas a LOX; e incolor: aqueles que inibem apenas a COX).

As análises para busca de biomarcadores, via PLS, no software SIMCA-P, não teve bom resultado como aquele via OPLS. Tal fato já era de se esperar, considerando-se a superioridade do algoritmo de OPLS. Este é capaz de remover as variáveis X não correlacionadas com nenhuma variável Y, denominadas como variação ortogonal, gerando, portanto, melhores modelos, de mais fácil análise e interpretação.^{18,19,116}

As análises de *t-test*, uma análise estatística univariada, útil para verificar diferença entre dois grupos, avaliando uma variável de cada vez, foi realizada no Excel da Microsoft com os dados tratados no MZmine e no Sieve a partir dos dados tratados nele mesmo. Os dados do modo positivo obtidos por UPLC-HRFTMS não demonstraram sequer uma substância significativamente diferente entre o grupo de inibição de COX e LOX e os demais grupos (nenhuma inibição, inibição apenas de COX ou de LOX; Figura 31). A análise a partir dos dados do modo negativo demonstrou diferença significativa ($P < 0,05$) para alguns constituintes, dentre eles os biomarcadores determinados pelo modelo de OPLS (Figura 32). Então, por permitir a comparação de apenas dois grupos e uma variável de cada vez, e não o conjunto de todos os dados, de todos os grupos, foi possível apenas corroborar as análises estatísticas multivariadas, no caso dos dados obtidos no modo negativo. Por outro lado, evidenciou a diferença e utilidade das análises multivariadas em relação às univariadas, diante da limitação frente ao estudo dos resultados do modo positivo. Os resultados foram idênticos para análises *t-test* via Sieve ou MZmine e Excel, assegurando-se a reprodutibilidade da etapa de tratamento dados.

O tratamento de dados realizado no MZmine foi avaliado não apenas com a comparação dos resultados de tratamento de dados e análises em diferentes softwares, mas também pela observação dos picos alinhados (Figuras 27 e 33) e a coincidência dos picos do mesmo extrato injetado no início, no meio e no final da sequência das análises cromatográficas (Figura 34). Ainda foi realizada a aferição das áreas sob a curva e o tempo de retenção dos biomarcadores nos dados cromatográficos brutos no software Xcalibur (Thermo Scientific®), sendo que todos foram coerentes aos dados tratados. A comparação dos resultados de diferentes análises em diferentes softwares também foi interessante, por assim considerar os demais parâmetros do tratamento de dados (desconvolução, eliminação de isótopos, e preenchimento dos espaços vazios), garantindo, então, a reprodutibilidade.

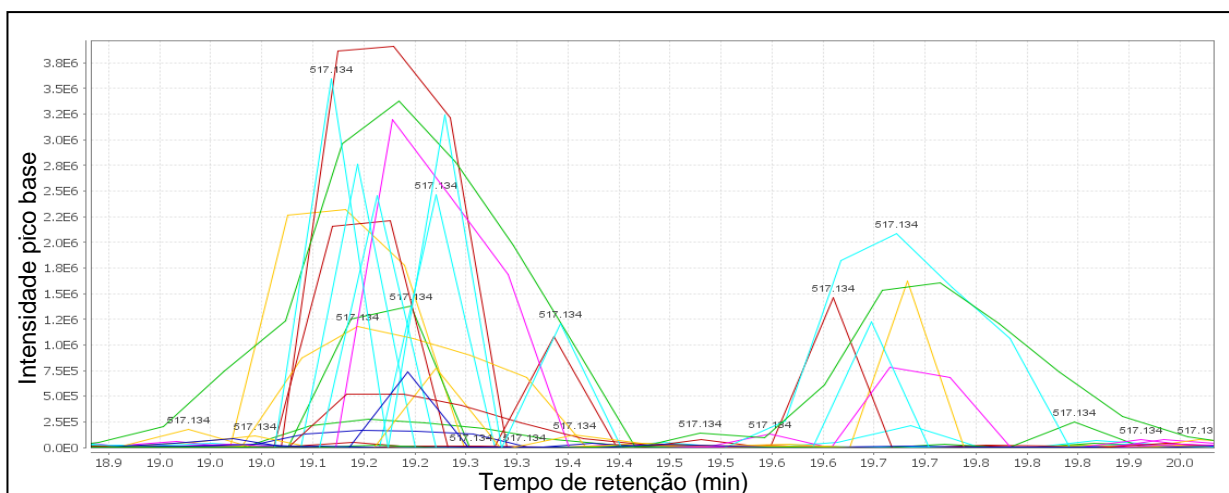


Figura 33. Ampliação de picos de dois distintos ácidos clorogênicos (ácidos 4,5-di-*O-E*-cafeoilquínico isômeros, m/z 355,102 no modo positivo) em seus respectivos t_R , antes do alinhamento no MZmine. O correto alinhamento em dois picos distintos desses mesmos metabólitos foi mostrado na Figura 27.

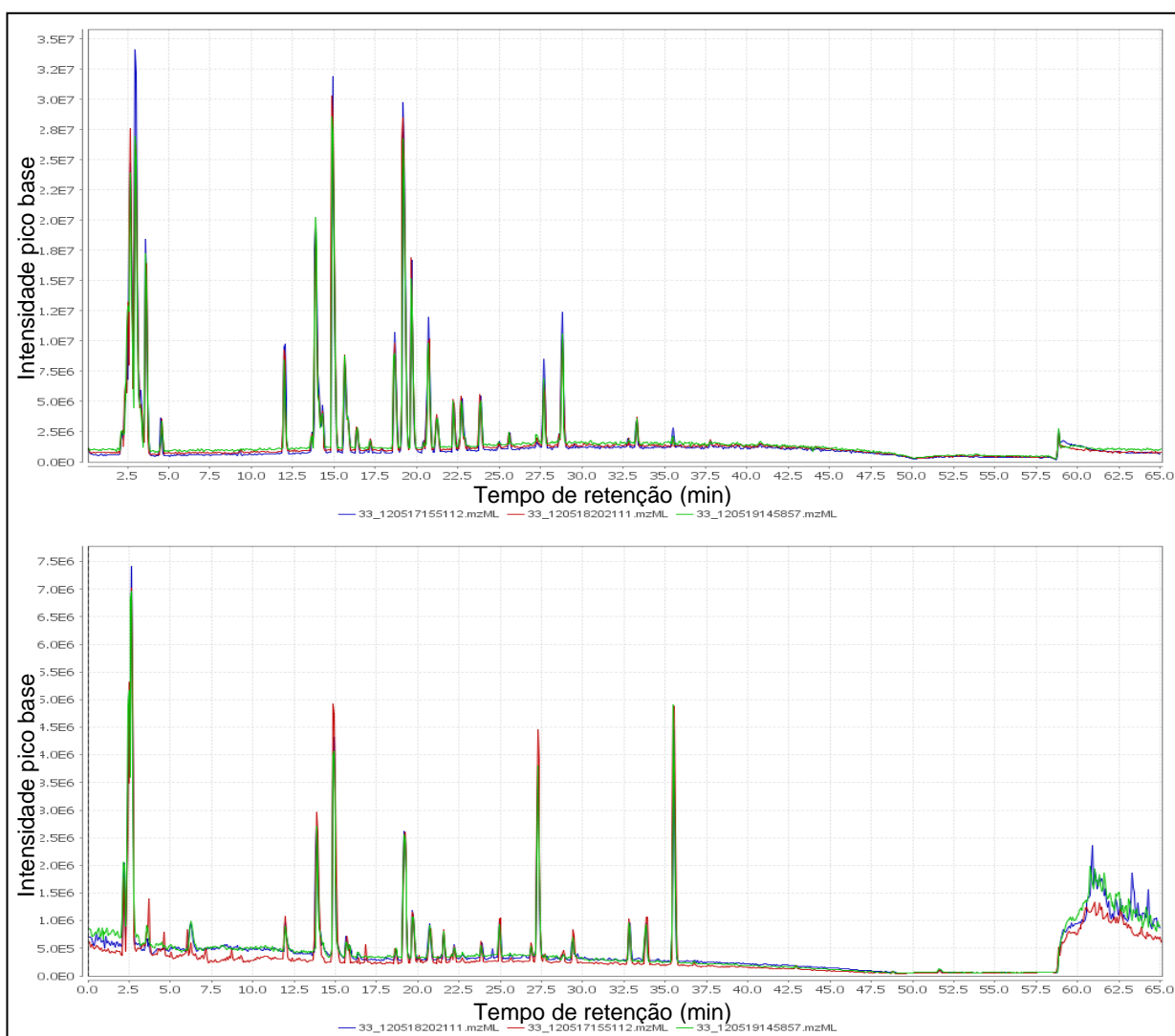


Figura 34. Controle de reprodutibilidade entre as diferentes análises, sobreposição dos cromatogramas da amostra de código 33 injetados no início, no meio e no fim de toda a sequência aleatória de injeções cromatográficas deste trabalho (amostras códigos: 1-67). Cromatogramas obtidos no modo negativo e positivo, respectivamente, acima e abaixo.

Não apenas a reprodutibilidade dos tratamentos de dados foi avaliado, as análises por HPLC-HRFTMS também foram certificadas pelo resultado da injeção desta amostra (código 33) no início, meio e fim da sequência de injeções. Foi encontrada uma mínima variação no grau de ionização e t_R nas análises em diferentes tempos, assegurando então que as análises foram bastante reprodutíveis (Figura 34).

Ainda com relação aos modelos de OPLS já construídos, que demonstraram separação ($R^2 > 0,9$) dos grupos adequada para identificação dos biomarcadores (Figura 29), não mostraram bom poder de predição. Os valores de Q^2 (coeficiente de determinação) obtidos por validação cruzada foram inferiores a $0,5^{117-121}$ para ambos os modelos (OPLS a partir dos dados do modo positivo e negativo). No entanto, ao se reparar os valores de erro médio quadrático da validação cruzada (RMSECV- *Root-Mean-Square Error of Cross-Validation*), nota-se que o maior valor de erro foi para o grupo de extratos inibidores apenas de LOX e o menor foi para o grupo de interesse, ou seja, os extratos inibidores de COX e LOX (Tabela 12). Isso indica que, neste caso, trabalhar com os dados de LOX é o fator mais complicado, principalmente para realizar predição. Portanto, por essa propriedade não ser o foco principal deste trabalho, os próximos estudos de busca por biomarcadores e de predição não incluirão este grupo, a fim de se encontrar melhores resultados.

Tabela 12. Valores de erro médio quadrático da validação cruzada dos modelos de OPLS.

Grupos de extratos inibição	RMSECV	
	OPLS- a partir dos dados do modo positivo	OPLS - a partir dos dados do modo negativo
Nenhuma	0,41	0,43
Apenas de LOX	0,43	0,45
Apenas de COX	0,32	0,32
COX e LOX	0,31	0,31

Também optou-se por realizar a busca de biomarcadores empregando-se uma metodologia alternativa da seguinte forma: considerando os grupos de extratos inibidores de ambas as enzimas, inibidores de COX, e inibidores de LOX e não inibidores como um grupo só. Esta busca foi realizada através da construção de uma árvore de decisão J48 no software *open source* Weka (Figuras 36 e 37). Esta análise estatística multivariada não é capaz de eliminar os constituintes não correlacionados (variação ortogonal) com as propriedades anti-inflamatórias (no caso as variáveis Y), diferentemente do OPLS^{18,19,116}. Então, foi realizado um prévio

tratamento de dados a fim de se eliminar as variáveis com mínima variação a partir dos dados exportados do tratamento no MZmine.

Esse tratamento extra de dados foi feito empregando-se o pacote “caret” do software *open source* R, seguido da pesquisa, por algoritmos genéticos (no software Weka), das variáveis X mais significativas para cada propriedade anti-inflamatória (variáveis Y). De um total de 5046 e 1169, foram então selecionadas 1006 e 235 substâncias, respectivamente, do modo de detecção negativo e positivo das análises por UPLC-HRFTMS (Figura 35). Vale ressaltar que essa seleção de dados não é um pré-requisito para construção da árvore de decisão e demais análises estatísticas, mas pode possibilitar a obtenção de modelos mais simples.

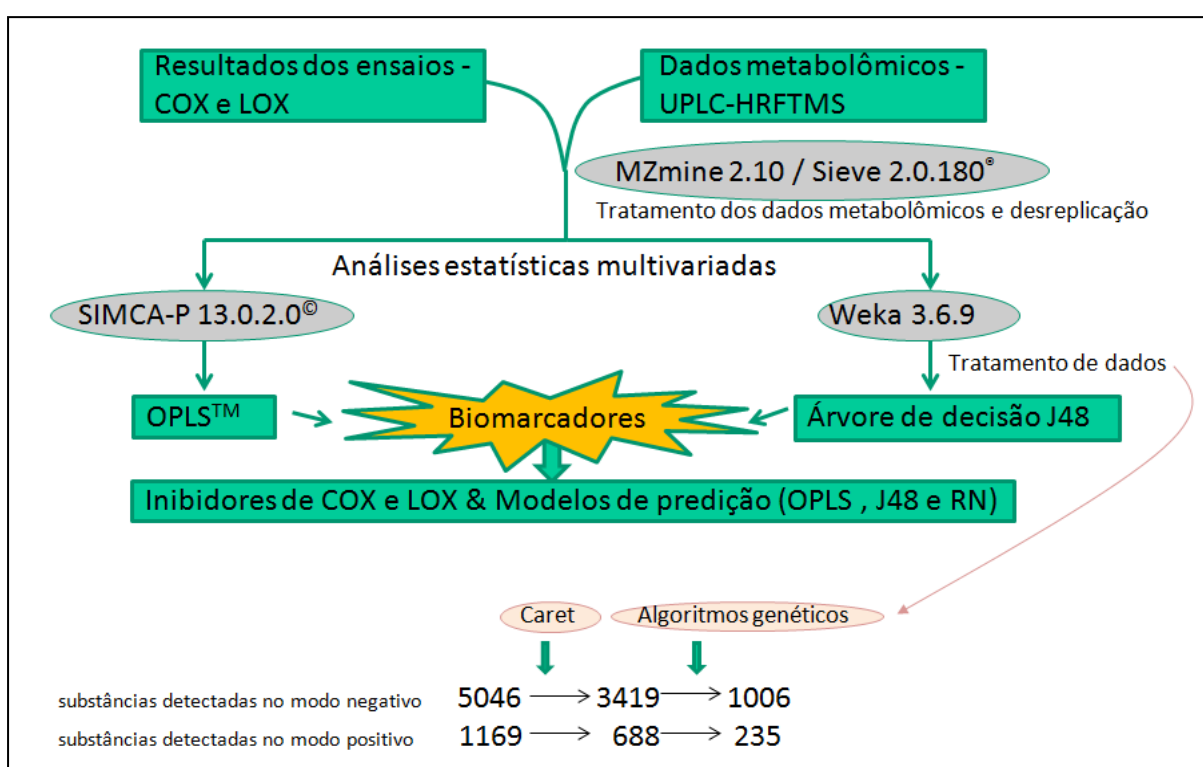


Figura 35. Estratégias para pesquisa de biomarcadores de inibição de COX e LOX e construção de modelos para predição.

As árvores de decisão foram então construídas com base nas áreas sobre as curvas das substâncias nos diferentes grupos e, novamente, se observou que os biomarcadores fazem parte dos constituintes minoritários dos extratos (Figuras 36 e 37). Por exemplo, o biomarcador 3.144 tem que ter a área apenas $> 85,07$ para conferir inibição de COX e LOX.

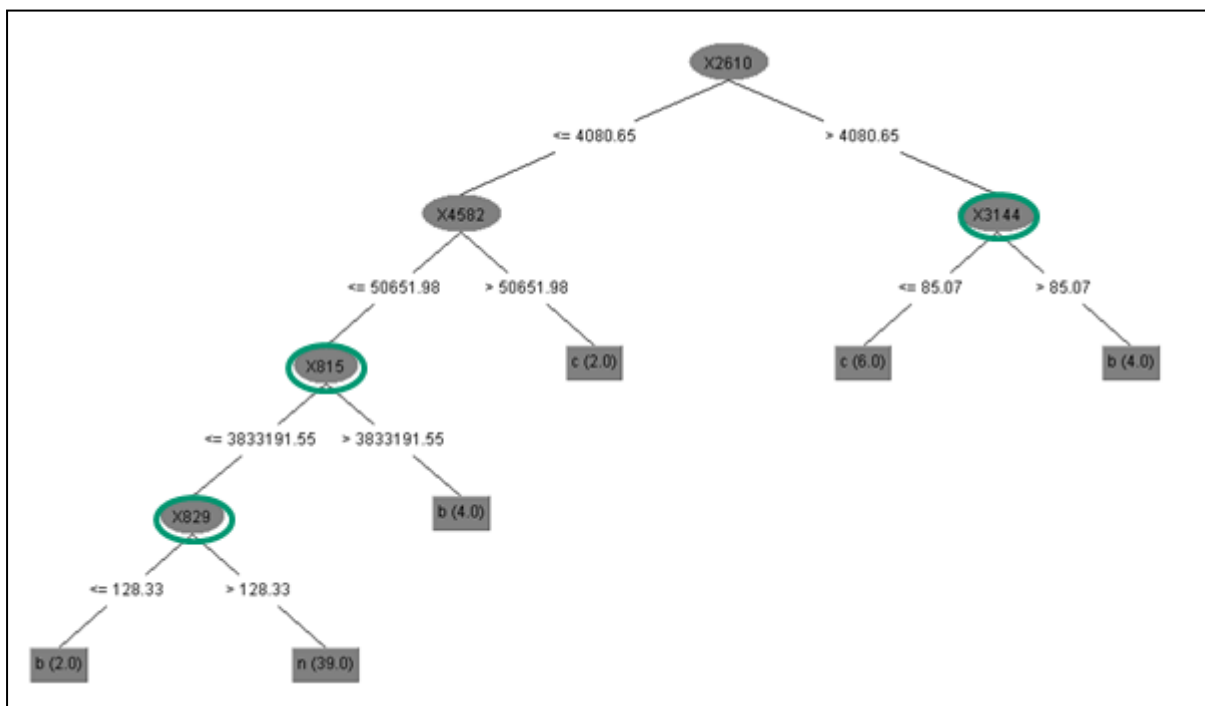


Figura 36. Árvore de decisão J48 a partir dos dados de detecção no modo negativo previamente tratado e os de propriedade anti-inflamatória (b: inibidor de ambas as enzimas, n: inibidor de nenhuma das enzimas ou apenas de LOX, e c: inibidor apenas de COX. $R^2 = 1,0$ e $Q^2 = 0,7$. Círculos verdes sobre os biomarcadores da inibição de ambas as enzimas COX e LOX.

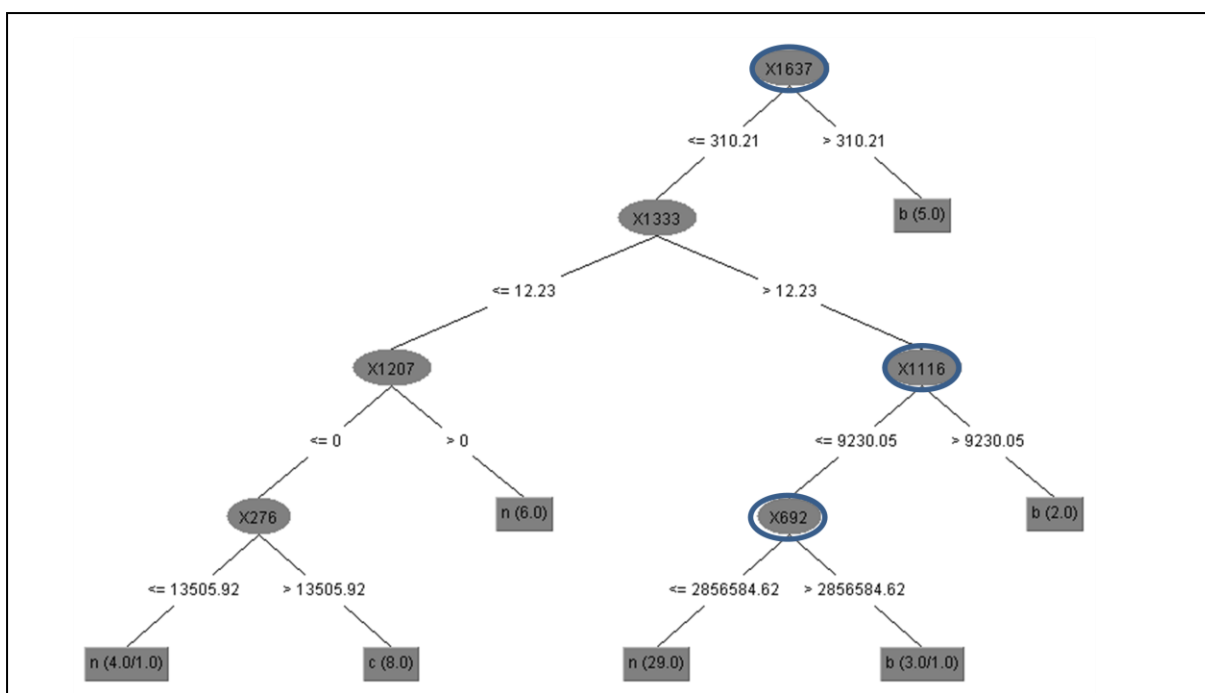


Figura 37. Árvore de decisão J48 a partir dos dados de detecção no modo positivo previamente tratados e os de propriedade anti-inflamatória (b: inibidor de ambas as enzimas, n: inibidor de nenhuma das enzimas ou apenas de LOX, e c: inibidor apenas de COX. $R^2 = 0,9$ e $Q^2 = 0,6$. Círculos verdes sobre os biomarcadores da inibição de ambas as enzimas COX e LOX.

Tabela 13. Biomarcadores das propriedades anti-inflamatórias determinadas pela árvore de decisão J48.

	ID	<i>m/z</i>	<i>t_R</i>	<i>Hits</i>	+H ⁺	Formula			
Modo negativo	815	509,2246000	16,9	ácido glicosilado	510,2324250	C ₂₂ H ₃₈ O ₁₃			
	829	411,1797000	25,3	LST, triterpeno, cumarina ou compostos fenólicos	412,1875250	C ₂₄ H ₂₈ O ₆			
	2610	447,1305870	17,5	compostos fenólicos, isocumarina, flavonoides ou LST	448,1384120	C ₂₂ H ₂₄ O ₁₀			
	3144	513,2714390	19,0	diterpenos	514,2792640	C ₂₆ H ₄₂ O ₁₀			
	4582	470,9872900	12,4	-	471,9951150	C ₂₄ H ₂ O ₇ N ₅			
	ID	<i>m/z</i>	<i>t_R</i>	<i>Hits</i>	-H ⁺	Formula	<i>Hits</i>	-Na ⁺	Formula
Modo positivo	276	415,2112519	34,5	LST ou diterpenos	414,2034269	C ₂₄ H ₃₀ O ₆	LST e diterpeno	392,2214819	C ₂₂ H ₃₂ O ₆
	692	449,1075653	19,0	flavonoides	448,0997403	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	xantona	426,1177953	C ₁₉ H ₂₂ O ₁₁
	1116	600,2654479	16,8	-	599,2576229	C ₂₇ H ₃₅ O ₈ N ₈	-	577,2756779	C ₂₈ H ₃₅ O ₅ N ₉
	1333	270,1696844	29,1	-	269,1618594	C ₁₂ H ₂₁ O ₃ N ₄	-	247,1799144	C ₁₃ H ₂₁ N ₅
	1207	509,1290488	20,6	flavonoides	508,1212238	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₃	compostos fenólicos	486,1392788	C ₂₁ H ₂₆ O ₁₃
1637	349,1642519	28,2	LST ou compostos fenólicos	348,1564269	C ₁₉ H ₂₄ O ₆	LST ou compostos fenólicos	326,1744819	C ₁₇ H ₂₆ O ₆	

ID - identificação das substâncias determinada inicialmente no MZmine referente a um pico *m/z*, *t_R* (min), desreplicação e fórmula molecular correspondentes. Desreplicação considerando variações < 2 ppm. Estão em vermelho os biomarcadores correlacionados com inibição de COX e LOX.

Nestas árvores de decisão incluem-se os biomarcadores de todas as propriedades anti-inflamatórias consideradas: inibidores de COX, de ambas as enzimas, de nenhuma delas ou apenas de LOX. Então, no caso dentre os biomarcadores descritos na Tabela 13, apenas o 815, 829 e 3144, detectados no modo negativo, e o 692, 1116 e 1637, detectados no modo positivo, são de fato biomarcadores da propriedade de inibição de COX e LOX. Todos estes biomarcadores devem ser considerados juntamente com aqueles evidenciados pelo OPLS (Tabela 10).

Atenção deve ser dada ao biomarcador 1637, que foi indicado tanto pela árvore de decisão (Figura 37 e Tabela 13) como pelo modelo OPLS (Tabela 10). Tal fato ocorreu mesmo com as diferenças entre as análises estatísticas multivariadas realizadas, em seus distintos algoritmos, e empregando-se diferentes pesos para as variáveis. Assim, esta substância se mostra altamente correlacionada com a propriedade de inibição de COX e LOX. Logo, esta deve ser priorizada para confirmação de sua identidade, sendo que pela desreplicação, utilizando os bancos de dados DNP e AsterDB, encontrou-se vários *hits*. Sabe-se, *a priori*, que deve se tratar provavelmente de uma LST ou um composto fenólico. Porém, com base no histórico de substâncias que comumente ocorrem nas espécies ativas^{21,91}, supõe-se

que a substância em questão se trate da LST tagitinina F. Além disso, esta foi uma das substâncias testadas *in vitro* que apresentou inibição da COX e LOX (Tabela 4).

Esta LST foi uma das que foram recentemente descritas no trabalho de mestrado de Chagas-Paula¹²⁵, estando, portanto, disponível na biblioteca de substâncias do AsterBioChem. Logo, a confirmação de sua desreplicação, através de coinjeção e comparação do padrão de fragmentação do biomarcador em questão (1637) será enormemente facilitada. As confirmações de identificação e das respectivas propriedades anti-inflamatórias também serão realizadas para os demais biomarcadores assim que possível. Este trabalho não tem o enfoque reducionista, ou seja, de se encontrar as substâncias responsáveis pela atividade em questão, nem o enfoque oposto - holista, em que a soma das partes (substâncias) não é capaz de explicar o todo (as propriedades do sistema). Pretende-se considerar todas as substâncias que, isoladamente ou em conjunto, possam desempenhar tanto a inibição da COX como a da LOX nos extratos ativos.

O biomarcador 1637, de fato, demonstrou ser bastante importante para tal propriedade, sendo que foi evidenciado ao se utilizar diferentes análises estatísticas. Por outro lado, há extratos ativos sem a presença do mesmo. Diante disso, sabe-se, de antemão, que evidentemente há diferentes substâncias ativas nestes extratos (Figura 32 e Tabela11). Logo, esta observação vem corroborar as discussões anteriores, assim como informações da literatura, nas quais se afirma que, em muitos casos, os extratos desempenham melhores resultados do que as substâncias isoladas (consideradas como seus princípios ativos)^{9,63,126}. Como exemplo, pode-se citar a artemisinina (LST), que sabe-se ser o princípio ativo contra o parasita *Plasmodium falciparum*, causador da malária, mas o extrato de sua fonte, *Artemisia annua* L. (Asteraceae), exerce melhor resultado do que a substância pura, tanto no quesito eficácia quanto suscetibilidade a desenvolvimento de resistência¹²⁶. Entretanto, ainda não se sabe se a causa é devido ao sinergismo, ocorrência de mais de uma substância ativa, ou ainda ações em conjunto. Então, o que consideramos importante é levar em conta, a princípio, todos os biomarcadores determinados pelas estratégias metabolômicas.

Adicionalmente aos resultados, foram desenvolvidos modelos de predição baseados em todos eles, ao mesmo tempo. Este procedimento foi realizado para que, diante de um novo extrato (ainda não testado frente às enzimas), em que a propriedade anti-inflamatória em questão seja desconhecida e utilizando os modelos

construídos, se possa prever se este extrato exerce ou não atividade inibitória da COX e LOX, antes mesmo da realização de qualquer ensaio.

As árvores de decisão, utilizadas para busca de biomarcadores, já demonstraram bons valores de predição ($Q^2 > 0,5$, Figuras 36 e 37). Logo, recomenda-se sua utilização para realizar predições independentemente do uso de qualquer software, predições estas baseadas apenas na consulta das áreas sob os picos dos biomarcadores (Figuras 36 e 37). Isso quer dizer que uma vez o modelo construído, não se necessita mais do software para realizar predição ou classificação de novas amostras, por exemplo pela árvore de decisão da Figura 37 pode-se classificar qualquer nova amostra que tenha biomarcador 1637, com a área do pico $> 310,21$, como inibidor de ambas as enzimas COX e LOX. As amostras com a área desse mesmo biomarcador $< 310,21$ podem ainda ter a mesma propriedade anti-inflamatória se tiver a área do pico do biomarcador 1333 $> 12,33$, desde que também apresentem a área do pico do biomarcador 1116 $> 9.230,05$ ou do biomarcador 692 $> 2856.584,62$ (Figura 37). Essa aplicação posterior da árvore de decisão construída, independentemente do software utilizado para sua construção, é uma grande vantagem desse modelo estatístico, além de ele ser simples e compreensível para leigos em análises estatísticas multivariadas.

Os modelos de OPLS, assim como foram construídos para busca de biomarcadores, não demonstraram bom poder de predição. Como já foi discutido anteriormente, isso ocorreu provavelmente devido ao erro inserido pelo grupo de extratos inibidores da LOX, o qual não estava presente nas árvores de decisão. Então, os modelos de OPLS tiveram que ser otimizados para predição, portanto com foco na predição de inibição da COX e LOX.

Os modelos de OPLS para predição, desta forma, obtiveram ótimos valores pela validação cruzada (Q^2), assim como pela validação externa (Tabela 14). Além disso, no modelo a partir dos dados do modo negativo, 100% da predição de extratos inibidores de ambas as enzimas foi correta, nas três validações externas, ou seja, obteve-se 0% de resultado falso positivo, sendo os erros decorrentes de resultados falso negativos. Isso indica que alguns extratos ativos poderão até ser subestimados por este modelo, mas aqueles extratos indicados como ativos apresentam grande probabilidade de serem, de fato, inibidores de COX e LOX.

Os modelos de OPLS foram construídos a partir dos dados metabolômicos dos extratos dos grupos não inibidores de qualquer enzima e dos inibidores de

ambas, tratados previamente pelo “caret”, e após seleção por algoritmos genéticos (Figura 35). A partir dos mesmos dados foram construídos os modelos de predição por RN (Figura 38), que também demonstraram valores ótimos de predição (Tabela 14), porém, estes, apenas com os biomarcadores determinados pelas árvores de decisão (Tabela 13 e Figura 38).

Tabela 14. Valores dos modelos de predição por OPLS e RN.

	Dados metabolômicos	R ²	Q ²	RMSECV	Validação externa -1	Validação externa -2	Validação externa -3
OPLS	Modo negativo	1,00	0,84	0,19	0,70	0,80	0,80
	Modo positivo	1,00	0,70	0,26	0,60	0,60	0,60
RN	Modo negativo	0,81	0,72	0,30	0,77	0,57	0,54
	Modo positivo	0,90	0,81	0,20	0,66	0,85	0,90

Como já foi mencionado, embora se saiba que RN são geralmente superiores para classificação e/ou predição de novas amostras, por fazerem parte das análises estatísticas multivariadas não lineares^{18,19,116}, não mostraram vantagens em relação ao OPLS. Enquanto a taxa de acerto das predições dos extratos ativos foi 100% correta pelo modelo de RN criado a partir dos metabólitos detectados no modo positivo, a mesma taxa foi encontrada pelo modelo de OPLS criado a partir dos metabólitos detectados no modo negativo. Diante de todo esse cenário, e inclusive considerando todos os demais valores favoráveis aos modelos (Tabela 14), pode-se dizer que ambos os modelos de predição, seja por OPLS ou RN, apresentam um bom poder de predição, sendo até mesmo complementares.

Com todos estes resultados, pode-se, mais uma vez, confirmar a determinação dos biomarcadores (Tabela 10 e 13), sendo que os modelos de predição construídos com base neles apresentaram-se robustos, validados inclusive por três grupos externos. O terceiro grupo de amostras utilizado na validação externa-3, além de amostras de extratos com propriedades pertencentes ao modelo (não inibidores ou inibidores de COX e LOX), incluía dados de extratos inibidores de COX ou LOX. Mesmo assim, nenhum deles foi classificado como inibidor de COX e de LOX. Os outros dois grupos de validação continham apenas amostras pertencentes aos mesmos grupos de propriedade anti-inflamatória consideradas no treino.

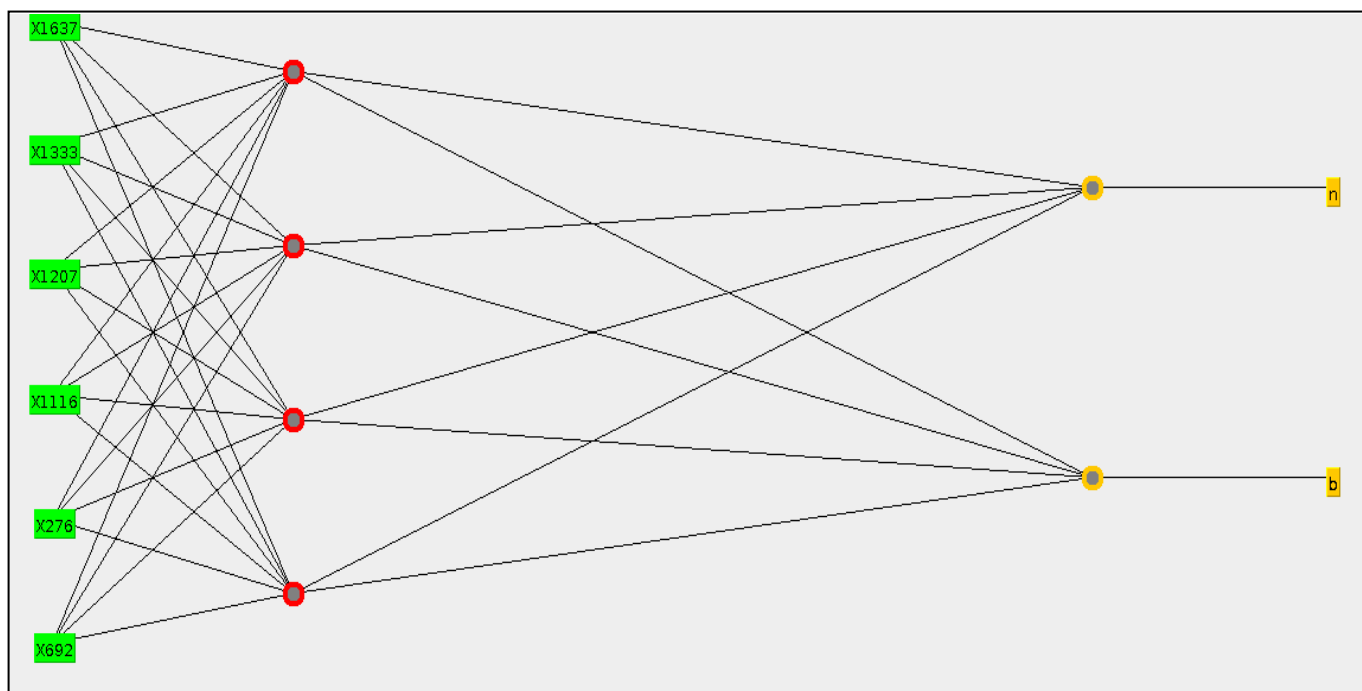


Figura 38. Modelo de redes neurais artificiais (RN) para predição de inibição de COX e LOX - b ou inatividade - n. Assim os dados de entrada são as áreas sob os picos dos biomarcadores definidos pela árvore de decisão para os dados metabolômicos obtidos no modo positivo. Os dados de saída são as predições n e b.

Ainda com relação aos modelos de predição construídos, pode-se dizer que valores de Q^2 acima de 0,7, como os encontrados, não são comuns em estudos metabolômicos (Tabela 14), assim como os de R^2 anteriormente discutido^{116,117,119}. Nestes casos, valores acima de 0,5 já são considerados aceitáveis. Modelos para predição de inibição de LOX e COX e seus biomarcadores poderão ainda ser estabelecidos em futuras publicações a partir dos resultados obtidos neste trabalho.

Os ótimos valores de R^2 dos modelos estatísticos podem sugerir que esteja ocorrendo o indesejável super ajuste (*overfitting*) dos mesmos, porém além de ter se usado diferentes análises estatísticas, mais ou menos suscetíveis a esse super ajuste^{18,127}, foi realizado ainda validações externas nos modelos. Sendo que os valores estatísticos destas validações externas são similares as da validação cruzada, a hipótese de superajuste pode então ser descartada^{18,127}.

A desreplcação completa de todos os extratos das plantas deste estudo ainda não foi descartada. Planeja-se concluí-las futuramente com a análise dos dados cromatográficos obtidos por UPLC-UV-HRFTMS associada à coinjeção de substâncias puras e análise de seus dados de fragmentação MS/MS obtidos em equipamento compatível, além do emprego dos bancos de dados DNP e AsterDB (o qual se encontra em ampliação). A desreplcação realizada até o momento

confirmou a identificação das substâncias nos cromatogramas de CLAE-UV-DAD. Os extratos são compostos basicamente pelas seguintes classes de substâncias: derivados fenólicos, flavonoides e LST. Por essa abordagem, foi possível desreplicar centenas de substâncias, com maior acurácia e agilidade que a desreplicação das 49 que foram identificadas inicialmente apenas pelos dados CLAE-UV-DAD. Porém, algumas delas requerem confirmação por apresentarem mais de um *hit* e outras não puderam ser desreplicadas, sendo estas possivelmente substâncias inéditas. Este foi o caso daquelas correlacionadas com o mecanismo de ação de inibição de COX e LOX. De qualquer forma, uma biblioteca de dados bem maior está sendo construída e será incorporada ao AsterDB. Esta conterá tempos de retenção, dados de UV, de RMN ¹H, de massas de alta resolução e suas espécies de origem, o que será de grande utilidade para futuras desreplicações, em especial de extratos de espécies da família Asteraceae.

Vale a pena salientar que, independente da desreplicação, a própria obtenção das impressões digitais metabólicas se justifica, etapa esta já concluída por UPLC-UV-HRFTMS. Estas podem ser usadas em futuros estudos de correlação e predição *in silico*, que são comumente usados para controle de qualidade de plantas ou estudos de quimiosistemática^{6,7}. Para as plantas do cerrado, gerou-se conhecimento sobre espécies nunca antes estudadas, ou aquelas ainda muito pouco estudadas. Em todo caso, uma cuidadosa desreplicação dos extratos continua em andamento e gerará mais informações, as quais serão descritas minuciosamente em futuras publicações.

5. CONCLUSÃO

Através deste trabalho, empregando-se estudos metabolômicos, avaliação do potencial anti-inflamatório e estudos de correlação *in silico*, foi possível determinar os biomarcadores da propriedade anti-inflamatória investigada a partir de 57 extratos vegetais de Asteraceae. Foi possível ainda geração de muito conhecimento sobre os metabólitos das espécies estudadas, inclusive algumas investigadas fitoquimicamente pela primeira vez. Revelou-se várias espécies com promissora propriedade anti-inflamatória, capazes de inibir potentemente a COX e LOX, ao mesmo tempo, mecanismo de ação este superior aos AINES atuais. Tais resultados foram obtidos seja para espécies alimentícias, de conhecida propriedade anti-inflamatória, ou do cerrado. Ainda foi possível realizar a

construção de robustos modelos de predição desta propriedade anti-inflamatória para novos extratos. Os objetivos deste trabalho não apenas foram atendidos em sua plenitude, mas as informações aqui obtidas serão muito úteis para futuros estudos, como o de QSAR, desreplicação, quimiosistemática de Asteraceae, os quais em breve estarão em andamento.

6. REFERÊNCIAS

1. Sumner, L. W., Mendes, P. & Dixon, R. A. Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. *Phytochemistry* **62**, 817–836 (2003).
2. Villas-Bôas, S. G., Rasmussen, S. & Lane, G. A. Metabolomics or metabolite profiles? *Trends in Biotechnology* **23**, 385–6 (2005).
3. Villas-Bôas, S. G., Mas, S., Akesson, M., Smedsgaard, J. & Nielsen, J. Mass spectrometry in metabolome analysis. *Mass Spectrometry Reviews* **24**, 613–46 (2005).
4. 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* **70**, 151–61 (2006).
5. Van der Kooy, F., Maltese, F., Choi, Y. H., Kim, H. K. & Verpoorte, R. Quality control of herbal material and phytopharmaceuticals with MS and NMR based metabolic fingerprinting. *Planta Medica* **75**, 763–75 (2009).
6. 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* **14**, 1808–1832 (2010).
7. Kim, H. K. et al. Metabolic classification of South American *Ilex* species by NMR-based metabolomics. *Phytochemistry* **71**, 773–84 (2010).

8. Yuliana, N. D., Khatib, A., Choi, Y. H. & Verpoorte, R. Metabolomics for bioactivity assessment of natural products. *Phytotherapy Research* **25**, 157–69 (2011).
9. Verpoorte, R., Choi, Y. H. & Kim, H. K. Ethnopharmacology and systems biology: a perfect holistic match. *Journal of Ethnopharmacology* **100**, 53–6 (2005).
10. Weckwerth, W. & Morgenthal, K. Metabolomics: from pattern recognition to biological interpretation. *Drug Discovery Today* **10**, 1551–1558 (2005).
11. 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* **71**, 1595–9 (2008).
12. Safer, S. et al. Metabolic fingerprinting of *Leontopodium* species (Asteraceae) by means of ¹H NMR and HPLC-ESI-MS. *Phytochemistry* **72**, 1379–89 (2011).
13. Bedair, M. & Sumner, L. W. Current and emerging mass-spectrometry technologies for metabolomics. *Trends in Analytical Chemistry* **27**, 238–250 (2008).
14. Holčapek, M., Jirásko, R. & Lída, M. Recent developments in liquid chromatography-mass spectrometry and related techniques. *Journal of Chromatography A* **1259**, 3–15 (2012).
15. 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* **642**, 257–65 (2009).
16. Zubarev, R. A. & Makarov, A. Orbitrap mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **85**, 5288–96 (2013).
17. Katajamaa, M. & Oresic, M. Data processing for mass spectrometry-based metabolomics. *Journal of Chromatography A* **1158**, 318–28 (2007).
18. Madsen, R., Lundstedt, T. & Trygg, J. Chemometrics in metabolomics—a review in human disease diagnosis. *Analytica Chimica Acta* **659**, 23–33 (2010).

19. Trygg, J., Holmes, E. & Lundstedt, T. Chemometrics in metabonomics. *Journal of Proteome Research* **6**, 469–79 (2007).
20. Shyur, L.-F. & Yang, N.-S. Metabolomics for phytomedicine research and drug development. *Current Opinion in Chemical Biology* **12**, 66–71 (2008).
21. Ambrósio, S. R. et al. Constituents of glandular trichomes of *Tithonia diversifolia*: relationships to herbivory and antifeedant activity. *Phytochemistry* **69**, 2052–60 (2008).
22. Chagas-Paula, D. A. et al. Chlorogenic acids from *Tithonia diversifolia* demonstrate better anti-inflammatory effect than indomethacin and its sesquiterpene lactones. *Journal of Ethnopharmacology* **136**, 355–62 (2011).
23. 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* **60**, 733–740 (2002).
24. Siedle, B. et al. Quantitative structure-activity relationship of sesquiterpene lactones as inhibitors of the transcription factor NF- κ B. *Journal of Medicinal Chemistry* **47**, 6042–54 (2004).
25. Valério, D. a R. et al. Anti-inflammatory and analgesic effects of the sesquiterpene lactone budlein A in mice: inhibition of cytokine production-dependent mechanism. *European Journal of Pharmacology* **562**, 155–63 (2007).
26. Schmidt, T. J. Toxic activities of sesquiterpene lactones: structural and biochemical aspects. *Current Organic Chemistry* **3**, 608 (1999).
27. Knuesel, O., Weber, M. & Suter, A. *Arnica montana* gel in osteoarthritis of the knee: an open, multicenter clinical trial. *Advances in Therapy* **19**, 209–218 (2002).
28. Ernst, E. & Pittler, M. H. The efficacy and safety of feverfew (*Tanacetum parthenium* L.): an update of a systematic review. *Public Health Nutrition* **3**, 509–14 (2000).

29. Boscolo, O. H. & Valle, L. D. S. Plantas de uso medicinal em Quissamã , Rio de Janeiro , Brasil. *Iheringia - Série Botânica* **63**, 263–277 (2008).
30. Rodrigues, V. E. G. & Carvalho, D. A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do Alto Rio Grande -Minas Gerais. *Ciências Agrotecnicas* **25**, 102–123 (2001).
31. Trouillas, P. et al. Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative properties of sixteen water plant extracts used in the Limousin countryside as herbal teas. *Food Chemistry* **80**, 399–407 (2003).
32. Ripoll, C. et al. Anti-inflammatory effects of a sesquiterpene lactone extract from chicory (*Cichorium intybus* L.) roots. *Natural Product Communications* **0**, 1–6 (2007).
33. Boonen, J. et al. LC-MS profiling of N-alkylamides in *Spilanthes acmella* extract and the transmucosal behaviour of its main bio-active spilanthol. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **53**, 243–9 (2010).
34. Wu, L.-C. et al. Anti-inflammatory effect of spilanthol from *Spilanthes acmella* on murine macrophage by down-regulating LPS-induced inflammatory mediators. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**, 2341–9 (2008).
35. Prachayasittikul, S. et al. Bioactive metabolites from *Spilanthes acmella* Murr. *Molecules* **14**, 850–67 (2009).
36. Araruna, K. & Carlos, B. Anti-inflammatory activities of triterpene lactones from *Lactuca sativa*. *Phytopharmacology* **1**, 1–6 (2010).
37. Siedle, B., Hrenn, A. & Merfort, I. Natural compounds as inhibitors of human neutrophil elastase. *Planta Medica* **73**, 401–20 (2007).
38. Parente, L. Pros and cons of selective inhibition of cyclooxygenase-2 versus dual lipoxygenase/cyclooxygenase inhibition: is two better than one? *The Journal of Rheumatology* **28**, 2375–82 (2001).
39. Calixto, J. B., Campos, M. M., Otuki, M. F. & Santos, A. R. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. *Planta Medica* **70**, 93–103 (2004).

40. Fiorucci, S., Meli, R., Bucci, M. & Cirino, G. Dual inhibitors of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase. A new avenue in anti-inflammatory therapy? *Biochemical Pharmacology* **62**, 1433–1438 (2001).
41. Hawkey, C. COX-2 inhibitors. *The Lancet* **353**, 307–314 (1999).
42. Gaddi, A., Cicero, A. F. G. & Pedro, E. J. Clinical perspectives of anti-inflammatory therapy in the elderly: the lipoxigenase (LOX)/cyclooxygenase (COX) inhibition concept. *Archives of Gerontology and Geriatrics* **38**, 201–12 (2004).
43. Ferreira, S. H. & Vane, J. R. New aspects of the mode of action of nonsteroid anti-inflammatory drugs. *Annual Review of Pharmacology* 57–73 (1974).
44. Schneider, I. & Bucar, F. Lipoxygenase inhibitors from natural plant sources. Part 1: Medicinal plants with inhibitory activity on arachidonate 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase/cyclooxygenase. *Phytotherapy Research* **19**, 81–102 (2005).
45. Li, Q., You, Y., Chen, Z. & Zou, P. COX-2/12-LOX dual pathway, a novel strategy for treatment of multiple myeloma? *Bioscience Hypotheses* **2**, 81–84 (2009).
46. Yamamoto, Y. & Gaynor, R. B. Therapeutic potential of inhibition of the NF- κ B pathway in the treatment of inflammation and cancer. *The Journal of clinical investigation* **107**, 135–42 (2001).
47. Werz, O. Inhibition of 5-lipoxygenase product synthesis by natural compounds of plant origin. *Planta Medica* **73**, 1331–57 (2007).
48. Schmitz, M. L. & Bacher, S. Novel molecular targets in the search for anti-inflammatory agents. *Phytochemistry Reviews* **4**, 19–25 (2005).
49. Klink, C. A. & Machado, R. B. Conservation of the Brazilian Cerrado. *Conservation Biology* **19**, 707–713 (2005).
50. Chowdhury, M. A. et al. Synthesis of celecoxib analogs that possess a N-hydroxypyrid-2(1H)one 5-lipoxygenase pharmacophore: biological evaluation as

dual inhibitors of cyclooxygenases and 5-lipoxygenase with anti-inflammatory activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **18**, 6138–41 (2008).

51. Praveen Rao, P. N., Amini, M., Li, H., Habeeb, A. G. & Knaus, E. E. Design, synthesis, and biological evaluation of 6-substituted-3-(4-methanesulfonylphenyl)-4-phenylpyran-2-ones: a novel class of diarylheterocyclic selective cyclooxygenase-2 inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* **46**, 4872–82 (2003).
52. Hagerman, A. E. & Butler, L. G. Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **26**, 809–812 (1978).
53. Van Buren, J. P. & Robinson, W. B. Formation of complexes between protein and tannic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **17**, 772–777 (1969).
54. Funk, V. A., Susanna, A., Stuessy, T. F. & Bayer, R. J. *Systematics, evolution, and biogeography of Compositae*. 1–1000 (International Association for Plant Taxonomy: Vienna, 2009).
55. Retta, D., Dellacassa, E., Villamil, J., Suárez, S. a. & Bandoni, A. L. Marcela, a promising medicinal and aromatic plant from Latin America: A review. *Industrial Crops and Products* **38**, 27–38 (2012).
56. Nascimento, A. M. et al. Gastroprotective effect and structure of a rhamnogalacturonan from *Acmella oleracea*. *Phytochemistry* **85**, 137–42 (2013).
57. Simões, C. M. O., Schenkel, E. P., Bauer, L. & Langeloh, A. Pharmacological investigations on *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC., Compositae. *Journal of Ethnopharmacology* **22**, 281–293 (1988).
58. Nakajima, J. et al. Asteraceae in *Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro*. (2010). <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB000055>>

59. Ferracane, R., Graziani, G., Gallo, M., Fogliano, V. & Ritieni, A. Metabolic profile of the bioactive compounds of burdock (*Arctium lappa*) seeds, roots and leaves. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **51**, 399–404 (2010).
60. Liu, S., Chen, K., Schliemann, W. & Strack, D. Isolation and identification of arctiin and arctigenin in leaves of burdock (*Arctium lappa* L.) by polyamide column chromatography in combination with HPLC-ESI/MS. *Phytochemical Analysis* **16**, 86–9 (2005).
61. Omer, B., Krebs, S., Omer, H. & Noor, T. O. Steroid-sparing effect of wormwood (*Artemisia absinthium*) in Crohn's disease: a double-blind placebo-controlled study. *Phytomedicine* **14**, 87–95 (2007).
62. Han, J. et al. Characterization of phenolic compounds in the Chinese herbal drug *Artemisia annua* by liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **47**, 516–25 (2008).
63. Phillipson, J. D. Phytochemistry and medicinal plants. *Phytochemistry* **56**, 237–43 (2001).
64. Dos Santos, D. a et al. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) in different experimental models. *Journal of Ethnopharmacology* **127**, 543–50 (2010).
65. Gené, R. M. et al. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Baccharis trimera*: identification of its active constituents. *Planta Medica* **62**, 232–5 (1996).
66. Simões-Pires, C. A., Queiroz, E. F., Henriques, A. T. & Hostettmann, K. Isolation and on-line identification of anti-oxidant compounds from three *Baccharis* species by HPLC-UV-MS/MS with post-column derivatisation. *Phytochemical Analysis* **16**, 307–314 (2005).
67. Akula, U. S. & Odhav, B. In vitro 5-Lipoxygenase inhibition of polyphenolic antioxidants from undomesticated plants of South Africa. *Journal of Medicinal Plants Research* **2**, 207–212 (2008).

68. Chiang, Y.-M. et al. Ethyl caffeate suppresses NF- κ B activation and its downstream inflammatory mediators, iNOS, COX-2, and PGE2 in vitro or in mouse skin. *British Journal of Pharmacology* **146**, 352–63 (2005).
69. Chiang, Y.-M. et al. Metabolite profiling and chemopreventive bioactivity of plant extracts from *Bidens pilosa*. *Journal of Ethnopharmacology* **95**, 409–19 (2004).
70. Sartori, L. R., Ferreira, M. S., Perazzo, F. F., Lima, L. M. & Carvalho, J. C. T. Atividade antiinflamatória do granulado de *Calendula officinalis* L. e *Matricaria recutita* L. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **13**, 17–19 (2003).
71. Della Loggia, R. et al. The role of triterpenoids in the topical anti-inflammatory activity of *Calendula officinalis* flowers. *Planta Medica* **60**, 516–20 (1994).
72. Akihisa, T. et al. Triterpene alcohols from the flowers of Compositae and their anti-inflammatory effects. *Phytochemistry* **43**, 1255–60 (1996).
73. Loeuille, B. F. P. *Towards a phylogenetic classification of Lychnophorinae (Asteraceae: Vernoniae)*. Tese (Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 2011).
74. Castelucci, S. et al. Anti-inflammatory activity of *Dasyphyllum brasiliensis* (Asteraceae) on acute peritonitis induced by beta-glucan from *Histoplasma capsulatum*. *Journal of Ethnopharmacology* **112**, 192–8 (2007).
75. Raso, G. M. et al. In-vivo and in-vitro anti-inflammatory effect of *Echinacea purpurea* and *Hypericum perforatum*. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* **54**, 1379–83 (2002).
76. Muko, K. N. & Ohiri, F. C. A preliminary study on the anti-inflammatory properties of *Emilia sonchifolia* leaf extracts. *Fitoterapia* **71**, 65–8 (2000).
77. Agra, M. F., Silva, K. N., Basílio, I. J. L. D., Freitas, P. F. & Barbosa-Filho, J. M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **18**, 472–508 (2008).
78. Gobbo-Neto, L. & Lopes, N. P. 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* **56**, 1193–204 (2008).
79. Gobbo-Neto, L. et al. Differential metabolic and biological profiles of *Lychnophora ericoides* Mart. (Asteraceae) from different localities in the Brazilian “campos rupestres”. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **21**, 750–759 (2010).
 80. Suyenaga, E. S. et al. Antiinflammatory investigation of some species of *Mikania*. *Phytotherapy Research* **16**, 519–23 (2002).
 81. Barros, I. M. C. et al. Anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of *Pluchea quitoc* (DC.) ethanolic extract. *Journal of Ethnopharmacology* **106**, 317–20 (2006).
 82. Oliveira, R., Chagas-Paula, D., Gasparato, T., Faccioli, L. & Da Costa, F. Effect of *Smallanthus sonchifolius* extracts on croton oil-induced oedema and neutrophil migration to the ear skin tissue of mice. *Planta Medica* **76**, P363 (2010).
 83. De Oliveira, R. B. et al. Renal toxicity caused by oral use of medicinal plants: the yacon example. *Journal of Ethnopharmacology* **133**, 434–41 (2011).
 84. Di Stasi, L. C. et al. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. *Fitoterapia* **73**, 69–91 (2002).
 85. Schaffer, S., Schmitt-Schillig, S., Müller, W. E. & Eckert, G. P. Antioxidant properties of mediterranean food plant extracts: geographical differences. *Journal of Physiology and Pharmacology* **56**, 115–124 (2005).
 86. Melis, M. S. Effects of chronic administration of *Stevia rebaudiana* on fertility in rats. *Journal of Ethnopharmacology* **67**, 157–61 (1999).
 87. Jain, N. K. & Kulkarni, S. K. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Tanacetum parthenium* L. extract in mice and rats. *Journal of Ethnopharmacology* **68**, 251–9 (1999).
 88. Sumner, H., Slan, U., Knight, D. W. & Houtt, J. R. S. Inhibition of 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase in leukocytes by feverfew involvement of sesquiterpene

- lactones and other components. *Biochemical Pharmacology* **43**, 2313–2320 (1992).
89. Williams, C. A., Harborne, J. B., Geiger, H. & Hoult, J. R. The flavonoids of *Tanacetum parthenium* and *T. vulgare* and their anti-inflammatory properties. *Phytochemistry* **51**, 417–23 (1999).
 90. Jeon, H.-J. et al. Anti-inflammatory activity of *Taraxacum officinale*. *Journal Of Ethnopharmacology* **115**, 82–8 (2008).
 91. Chagas-Paula, D. A., Oliveira, R. B., Rocha, B. A. & Da Costa, F. B. Ethnobotany, chemistry, and biological activities of the genus *Tithonia* (Asteraceae). *Chemistry & Biodiversity* **9**, 210–35 (2012).
 92. Chagas-Paula, D. et al. The disconnection approach: integrationism and reductionism in the study of medicinal plants. *Planta Medica* **76**, (2010).
 93. Heinrich, M., Robles, M., West, J. E., Ortiz de Montellano, B. R. & Rodriguez, E. Ethnopharmacology of Mexican Asteraceae (Compositae). *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **38**, 539–65 (1998).
 94. Sur, R. et al. Anti-inflammatory activity of parthenolide-depleted feverfew (*Tanacetum parthenium*). *Inflammopharmacology* **17**, 42–9 (2009).
 95. Chi, Y. S. et al. Effects of naturally occurring prenylated flavonoids on enzymes metabolizing arachidonic acid: cyclooxygenases and lipoxygenases. *Biochemical Pharmacology* **62**, 1185–91 (2001).
 96. Mukherjee, D. Risk of cardiovascular events associated with selective COX-2 inhibitors. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* **286**, 954–959 (2001).
 97. Wu, K. K.-Y. Biochemical pharmacology of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Biochemical Pharmacology* **55**, 543–547 (1998).
 98. Taha, A. S. et al. Neutrophils, *Helicobacter pylori*, and nonsteroidal anti-inflammatory drug ulcers. *Gastroenterology* **116**, 254–258 (1999).

99. Wallace, J. L. & Soldato, P. Del The therapeutic potential of NO-NSAIDs. *Fundamental and Clinical Pharmacology* **17**, 11–20 (2003).
100. Wallace, J. L., Keenan, C. M. & Granger, D. N. Gastric ulceration induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs is a neutrophil-dependent process. *American journal of physiology gastrointestinal and liver physiology* **259**, G462–G467 (1990).
101. Merfort, I. Review of the analytical techniques for sesquiterpenes and sesquiterpene lactones. *Journal of Chromatography A* **967**, 115–30 (2002).
102. Nicolete, R. et al. Budlein A from *Viguiera robusta* inhibits leukocyte-endothelial cell interactions, adhesion molecule expression and inflammatory mediators release. *Phytomedicine* **16**, 904–15 (2009).
103. Rüngeler, P. et al. Study of three sesquiterpene lactones from *Tithonia diversifolia* on their anti-inflammatory activity using the transcription factor NF- κ B and enzymes of the arachidonic acid pathway as targets. *Planta Medica* **64**, 588–93 (1998).
104. Calixto, J. B., Otuki, M. F. & Santos, A. R. S. 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* **69**, 973–83 (2003).
105. Silverstein, R., Bassler, G. & Morrill, T. *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*. (Editora Guanabara Dois: Rio de Janeiro, 1979).
106. Dewick, P. M. *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. (Jonh Wiley & Sons Ltd: United Kingdom, 2009).
107. Fischer, H., Fischer, N., Frank, R. & Oliver, E. *Progress in the chemistry of organic natural products* **38** (Springer-Verlag: Wien-New York, 1979).
108. De Kraker, J. W., Franssen, M. C., Dalm, M. C., De Groot, A. & Bouwmeester, H. J. Biosynthesis of germacrene A carboxylic acid in chicory roots. Demonstration of a cytochrome P450 (+)-germacrene a hydroxylase and NADP⁺-dependent sesquiterpenoid dehydrogenase(s) involved in sesquiterpene lactone biosynthesis. *Plant Physiology* **125**, 1930–40 (2001).

109. Schmidt, T. J. Structure-activity relationships of sesquiterpene lactones. *Studies in Natural Products Chemistry* **33**, 309–392 (2006).
110. Hong, S. S. et al. Melampolides from the leaves of *Smallanthus sonchifolius* and their inhibitory activity of LPS-induced nitric oxide production. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **56**, 199–202 (2008).
111. Simonovska, B., Vovk, I., Andrenšek, S., Valentová, K. & Ulrichová, J. Investigation of phenolic acids in yacon (*Smallanthus sonchifolius*) leaves and tubers. *Journal of Chromatography A* **1016**, 89–98 (2003).
112. Dou, D.-Q. et al. Studies on chemical constituents of the leaves of *Smallanthus sonchifolius* (yacon): structures of two new diterpenes. *Natural Product Research* **24**, 40–7 (2010).
113. Vilegas, J. H. Y., De Marchi, E. & Lancas, F. M. Extraction of low-polarity compounds (with emphasis on coumarin and kaurenoic acid) from *Mikania glomerata* (“guaco”) leaves. *Phytochemical Analysis* **8**, 266–270 (1997).
114. Prigent, S. V. E. et al. Effects of non-covalent interactions with 5-O-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid) on the heat denaturation and solubility of globular proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 5088–95 (2003).
115. Castillo, S., Gopalacharyulu, P., Yetukuri, L. & Orešič, M. Algorithms and tools for the preprocessing of LC–MS metabolomics data. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **108**, 23–32 (2011).
116. Bylesjö, M. et al. OPLS discriminant analysis: combining the strengths of PLS-DA and SIMCA classification. *Journal of Chemometrics* **20**, 341–351 (2006).
117. 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* **83**, 6902–6 (2011).

118. 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* **35**, 117–26 (2004).
119. Tropsha, A. & Golbraikh, A. Predictive QSAR modeling workflow, model applicability domains, and virtual screening. *Current Pharmaceutical Design* **13**, 3494–504 (2007).
120. Golbraikh, A. & Tropsha, A. Beware of q²! *Journal of Molecular Graphics & Modelling* **20**, 269–76 (2002).
121. Eriksson, L., Trygg, J. & Wold, S. CV-ANOVA for significance testing of PLS and OPLS® models. *Journal of Chemometrics* **22**, 594–600 (2008).
122. Lin, C. Y., Wu, H., Tjeerdema, R. S. & Viant, M. R. Evaluation of metabolite extraction strategies from tissue samples using NMR metabolomics. *Metabolomics* **3**, 55–67 (2007).
123. t'Kindt, R., Morreel, K., Deforce, D., Boerjan, W. & Van Bocxlaer, J. Joint GC-MS and LC-MS platforms for comprehensive plant metabolomics: repeatability and sample pre-treatment. *Journal of chromatography B* **877**, 3572–80 (2009).
124. Cheng, X. et al. HPLC fingerprints combined with principal component analysis, hierarchical cluster analysis and linear discriminant analysis for the classification and differentiation of *Peganum* sp. indigenous to China. *Phytochemical Analysis* **21**, 279–89 (2010).
125. Chagas-Paula, D. A. *Atividade anti-inflamatória e caracterização fitoquímica do chá e de diferentes extratos de Tithonia diversifolia (Asteraceae)*. **Dissertação** (Departamento de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2010).
126. De Donno, A. et al. First-time comparison of the in vitro antimalarial activity of *Artemisia annua* herbal tea and artemisinin. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **106**, 696–700 (2012).
127. Hawkins, D. M. The problem of overfitting. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* **44**, 1-12 (2004).

APÊNDICE I - Parâmetros utilizados no software MZmine

Import – Importa os dados das análises por HPLC-HRFTMS obtidos no software Xcalibur (*.raw), porém previamente separados em dados de detecção no modo negativo e positivo e transformados no formato *.mzXML pelo software MSFileReader (Thermo Fisher Scientific). Importa os dados de cada modo de detecção separadamente.

Peak detection

Mass detection = Exact mass: Noise level = 10,000 (1.0E4)

Filtering = FTMS shoulder peaks filter:

Mass resolution = 50,000

Peak model function = Lorentzian extended

Chromatogram builder

Min time span = 0.3 min (18 s)

Min height = 5.0E4 (50,000)

m/z tolerance = 0.001

Chromatogram deconvolution

Peak recognition = Local minimum search:

Chromatographic threshold = 5%

Search minimum in RT range = 0.2 min (12 s)

Minimum relative height = 15%

Minimum absolute height = 50,000 (5.0E4)

Min ratio of peak top/edge = 5

Peak duration range = 0.3-10.0 min

Deisotope

Deisotope:

m/z tolerance = 0.001

RT tolerance = 0.1 absolute (6 s)

Maximum charge = 2

Representative isotope = most intense

Alignment

Join aligner:

m/z tolerance = 1 ppm

Weight for m/z = 15

Retention time (RT) tolerance type = Absolute

Absolute RT tolerance = 0.5 min (30 s)

Weight for RT = 10

Isotope pattern score threshold level = 65%

Gap filling

Peak finder:

Intensity tolerance = 1%

m/z tolerance = 0.001

Retention time tolerance type = Absolute

Absolute RT tolerance = 0.5 min (30 s)

Export

Export to CSV file

Export MZMine ID, m/z, retention time and peak area

Identification (optional; using DNP and AsterDB)

- Adduct search

For Positive:

[M+Na-H] 21.982 m/z

[M+K-H] 37.956 m/z

[M+NH₃] 17.026 m/z

[M+acetonitrile+H] 41.027 m/z

RT tolerance = 0.1 min (6 s)

m/z tolerance = 0.001

Max adduct peak height = 50%

For Negative:

[M+acetonitrile+H] 41.027 m/z

RT tolerance = 0.1 min (6 s)

m/z tolerance = 0.001

Max adduct peak height = 50%

-Complex search

Ionization method: +H for positive and –H for negative

RT tolerance = 0.1 min (6 s)

m/z tolerance = 0.001

Max complex peak height = 50%

Obs. – Os dados do modo negativo e positivo, uma vez exportados (em **Export**), podem ser reunidos externamente em qualquer software de planilha de dados.

APÊNDICE II - Parâmetros utilizados para seleção de atributos por algoritmos genéticos e construção da árvore de decisão J48 no software Weka

Parâmetros para seleção de atributos por algoritmos genéticos

Open file: Abre os dados exportados do software MZmine e posteriormente tratados pelo pacote caret no software R. Dados no formato `.csv` contendo a informação das classes de atividade anti-inflamatória (seleção supervisionada).

Select Attributes:

Attribute evaluator= CfsSubsetEval

Search Method= GeneticSearch

PopulationSize= Z= 50

MaxGenerations= G= 100

CrossoverProb= C= 0.6

MutationProb= M= 0.033

ReportFrequency= R= 20

Seed= S= 1

Parâmetros utilizados para a construção da árvore de decisão J48

Open file: Abre os atributos selecionados por algoritmos genéticos e as classes de atividade anti-inflamatória.

Classify:

Classifier= Trees - J48

BinarySplits= False

ConfidenceFactor= C= 0.25

Debug= False

MinNumObj= 2

NumFolds= 3

ReducedErrorPruning= False

SaveInstanceData= False

Seed= 1

SubtreeRaising= true

Unpruned= False

UseLaplace= False

APÊNDICE III - Parâmetros utilizados para construção das RNs no software Weka

Parâmetros para construção da RN a partir dos dados dos biomarcadores determinados no modo positivo das análises por HPLC-HRFTMS

Open file: Abre os dados dos IDs: 1637, 1333, 1207, 1116, 276, 692 (Tabela 13, Figura 37) e classes de atividade anti-inflamatória das amostras selecionadas para o modelo (Apêndice IV).

Classify:

Classifier= MultilayerPerceptron

Gui= False or True

AutoBuild= True

Debug= False

Decay= False

HiddenLayers= H= 4

LearningRate= L= 0.3

Momentum= M= 0.2

NominalToBinaryFilter= True

NormalizeAttributes= True

NormalizeNumericClass= True

Reset= False

Seed= S= 0

TrainingTime= N= 500

ValidationSetSize= V= 0

ValidationThreshold= E= 20

Parâmetros para construção da RN a partir dos dados dos biomarcadores determinados no modo negativo das análises por HPLC-HRFTMS

Open file: Abre os dados dos IDs: 2610, 4582, 3144, 815, 829 (Tabela 13, Figura 36) e classes de atividade anti-inflamatória das amostras selecionadas para o modelo (Apêndice IV).

Classify:

Classifier= MultilayerPerceptron

Gui= False or True

AutoBuild= True

Debug= False

Decay= False

HiddenLayers= H= 3

LearningRate= L= 0.25

Momentum= M= 0.25

NominalToBinaryFilter= True

NormalizeAttributes= True

NormalizeNumericClass= True

Reset= False

Seed= S= 0

TrainingTime= N= 500

ValidationSetSize= V= 0

ValidationThreshold= E= 20

APÊNDICE IV - Grupos para treino dos modelos de predição (OPLS e RN) e grupos teste para validação dos mesmos modelos

Código das amostras (Tabela 1, Tabela 14 e Figura 38):

Grupos para treino

n- Nenhuma atividade: 1, 43, 10, 12, 14, 23, 54

b- Inibição de ambas as enzimas: 40, 41, 56, 57

Grupos para teste de validação

Grupo I - contém amostras dos grupos incluídos no treino do modelo:

n: 13, 15, 26, 25, 53, 52

b: 66, 67, 49, 46

Grupo II - contém amostras também incluídas no treino do modelo:

n: 13, 25

b: 58, 60, 19, 42 46

Grupo III - contém amostras não incluídas no treino, que são inibidoras apenas de LOX (l) ou de COX (c), afim de verificar qual seria o tipo de predição em não ativas ou em inibidoras de ambas as enzimas. Dessa forma permitiu verificar uma baixa taxa de resultados falso positivos para inibição de ambas as enzimas.

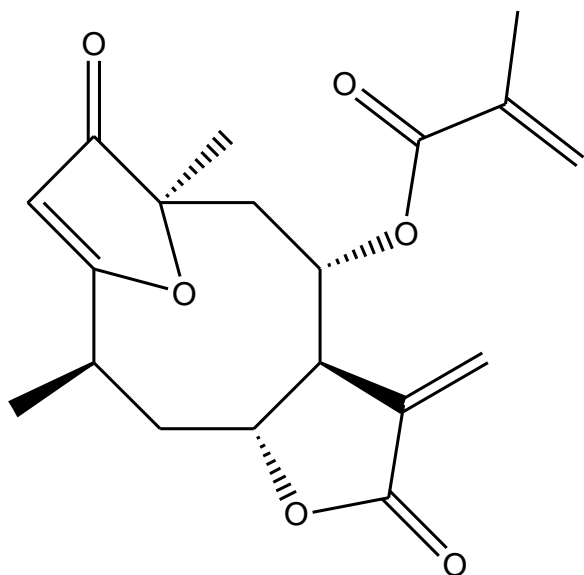
n- 13, 15, 25

l- 9, 29, 22

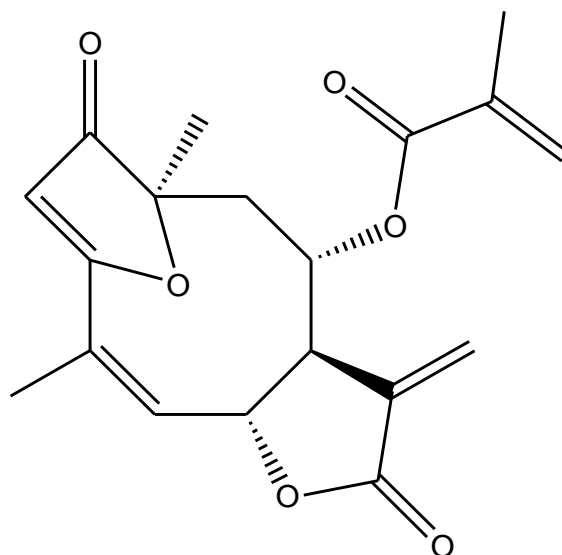
c- 24

b- 19, 42, 46

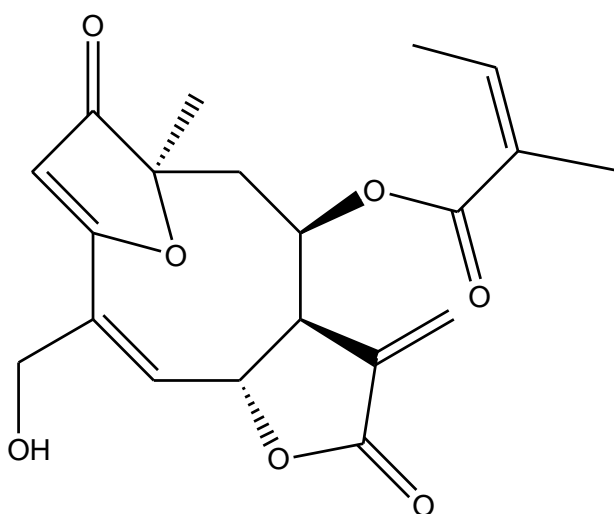
APÊNDICE V - Estruturas das substâncias avaliadas nos ensaios anti-inflamatórios



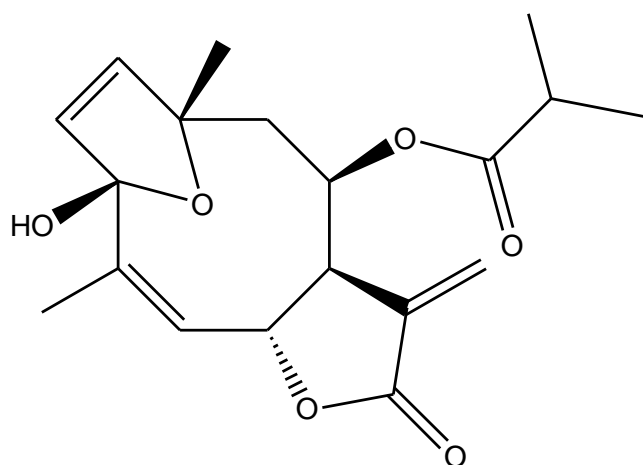
Código da amostra: 68
4β,5-diidro-15-desóxi-goiazensolido
IC₅₀ (μM): LOX 0,31; COX 24,1



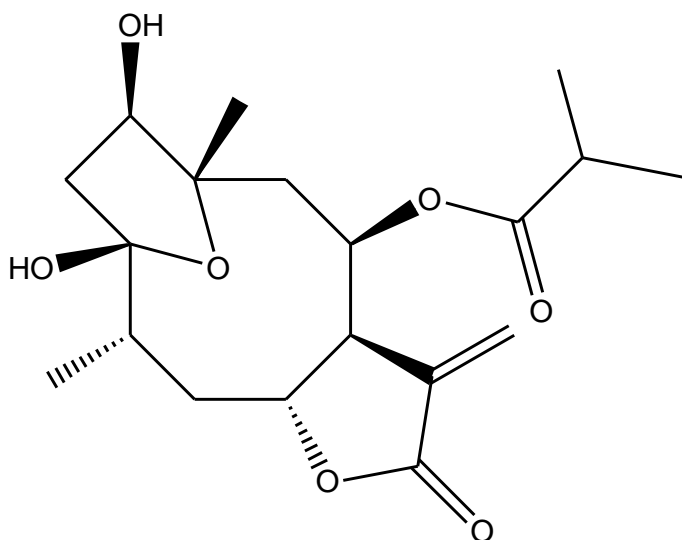
Código da amostra: 82
15-desóxi-goiazensolido
IC₅₀ (μM): LOX (-); COX 134,5



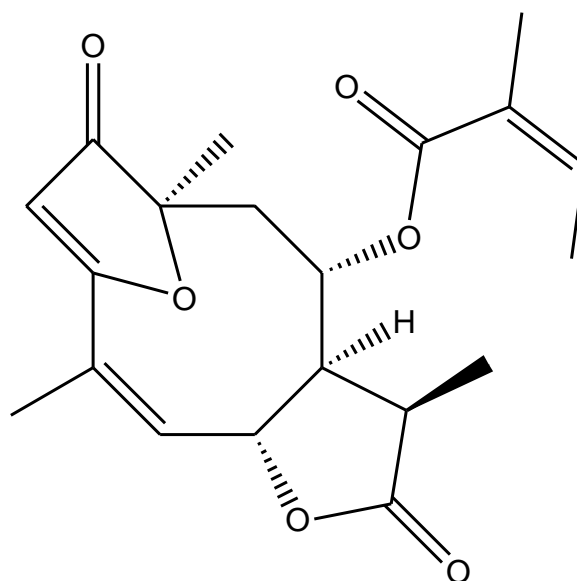
Código da amostra: 77
budleína A
IC₅₀ (μM): LOX 62,6; COX 0,1



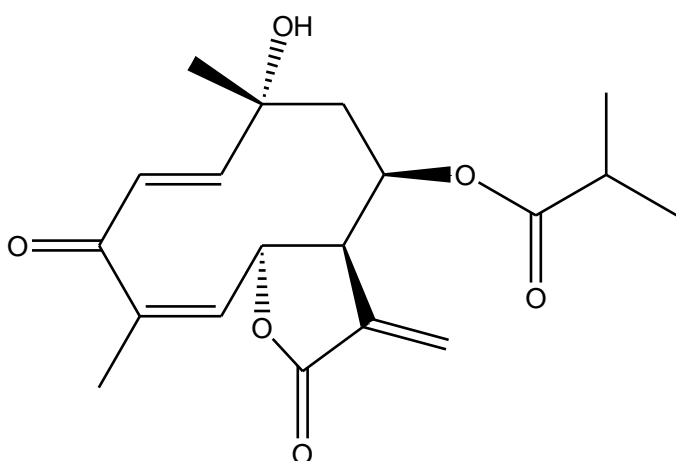
Código da amostra: 84
tagitinina F
IC₅₀ (μM): LOX 18,5; COX 0,001



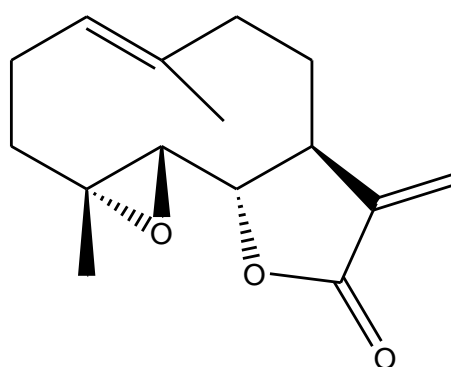
Código da amostra: 83
tagitinina A
IC₅₀ (μM): LOX 93,9; COX (-)



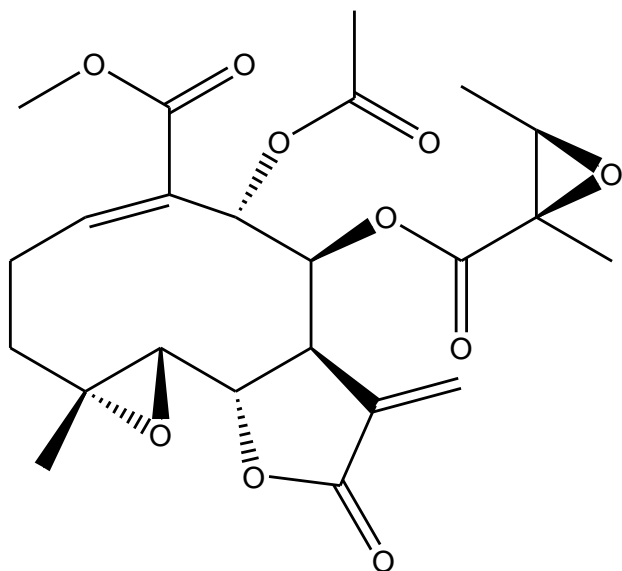
Código da amostra: 74
11-13-diidro-lichnofolido
IC₅₀ (μM): LOX (-); COX (-)



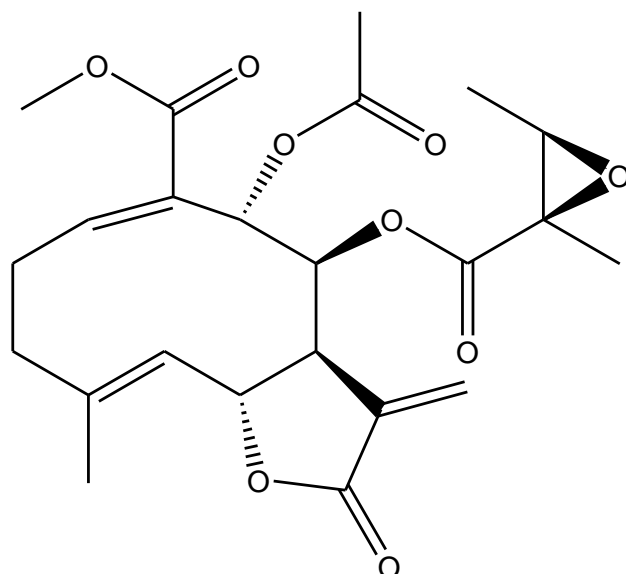
Código da amostra: 76
tagitinina C
IC₅₀ (μM): LOX (-); COX 30,1



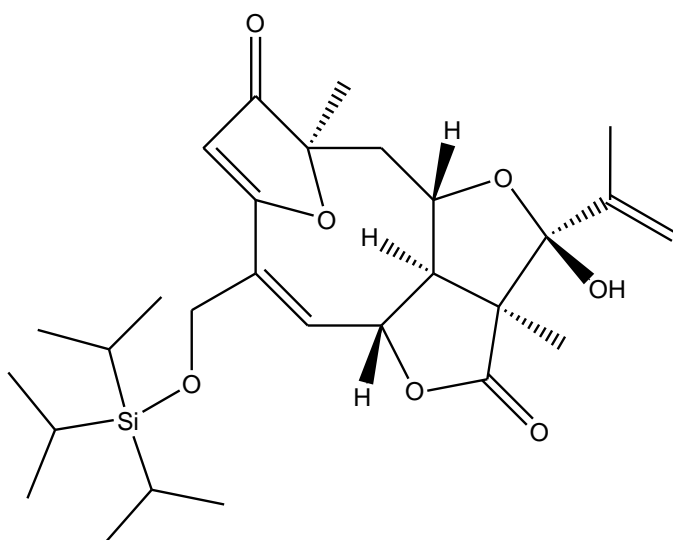
Código da amostra: 78
partenolido
IC₅₀ (μM): LOX (-); COX 24,3



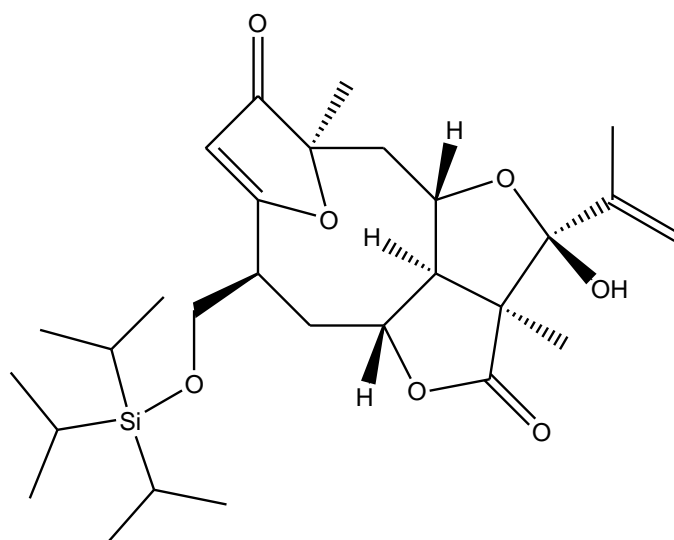
Código da amostra: 79
 enidrina
 IC_{50} (μM): LOX (-); COX 47,9



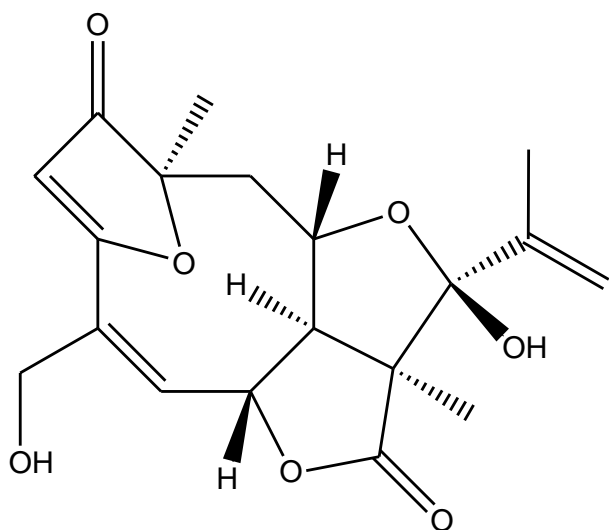
Código da amostra: 81
 uvedalina
 IC_{50} (μM): LOX (-); COX 0,1



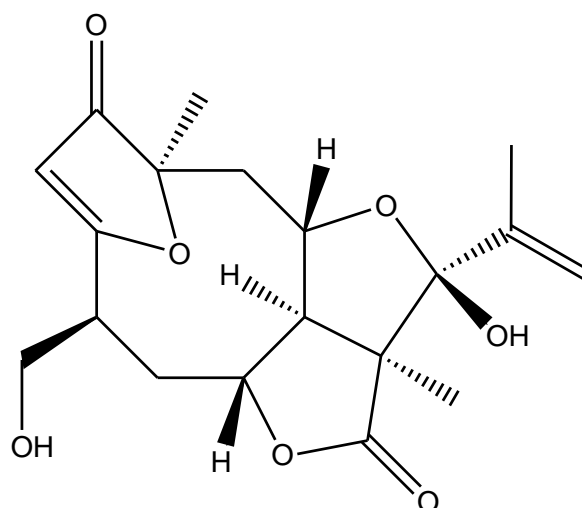
Código da amostra: 73
 15-trisopropilsilil éter-eremantolido C
 IC_{50} (μM): LOX 24,2; COX (-)



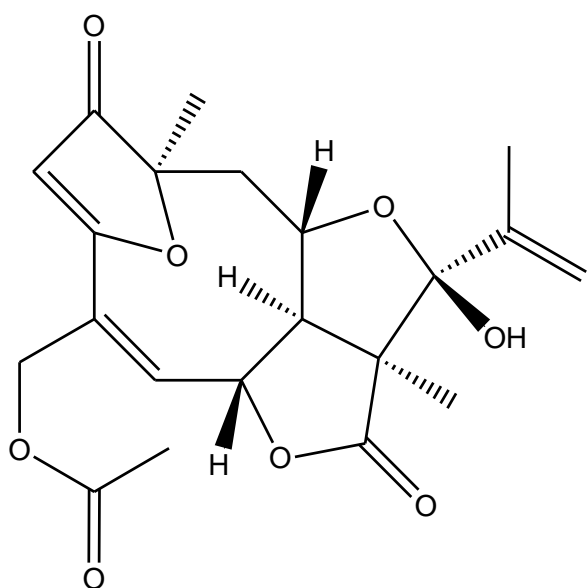
Código da amostra: 72
 15-trisopropilsilil éter-4β-5-diidro-eremantolido C
 IC_{50} (μM): LOX 2,7; COX (-)



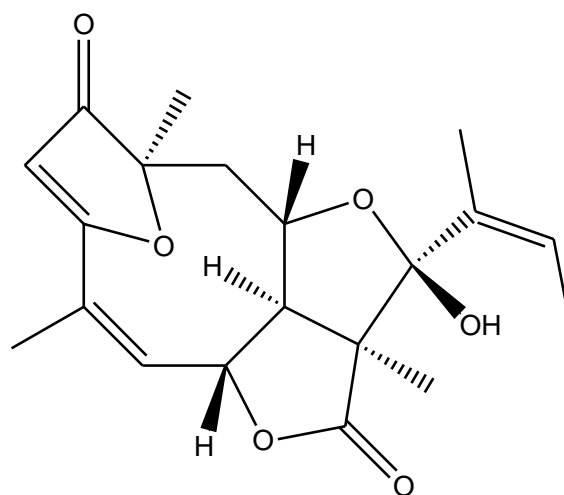
Código da amostra: 70
15-hidróxi-eremantolido C
IC₅₀ (μM): LOX 0,08; COX 47,5



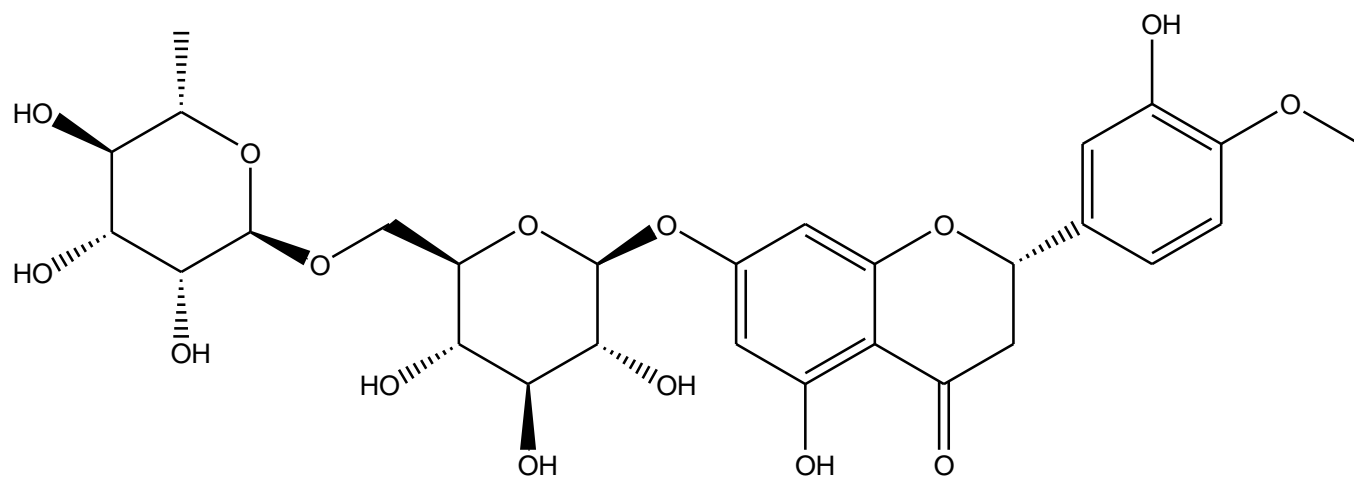
Código da amostra: 71
15-hidróxi-4β-5-dihidro-eremantolido C
IC₅₀ (μM): LOX 3,5; COX 75,9



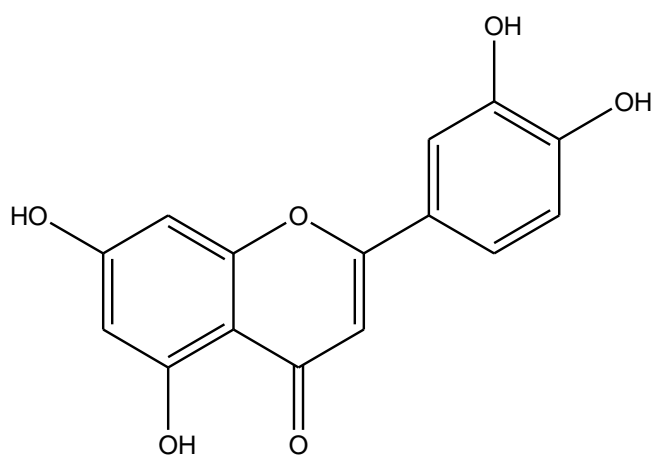
Código da amostra: 69
15-acetóxi-eremantolido C
IC₅₀ (μM): LOX 0,02; COX 15,1



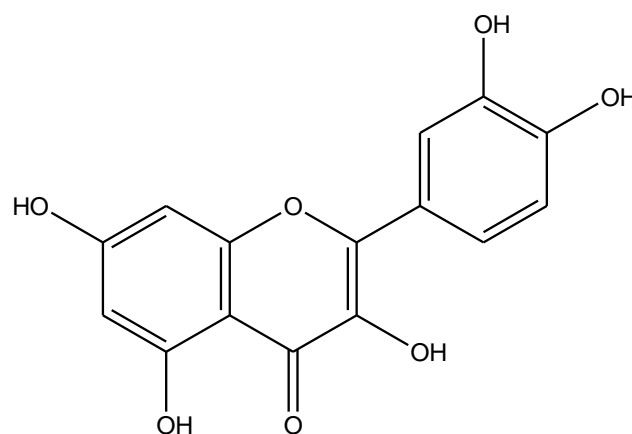
Código da amostra: 75
16-(1-metil-1-propenil)-eremantolido
IC₅₀ (μM): LOX (-); COX 0,6



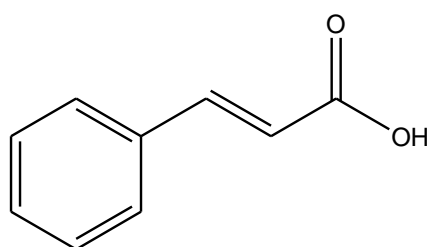
Código da amostra: 80
hesperidina
IC₅₀ (μM): LOX (-); COX 0,05



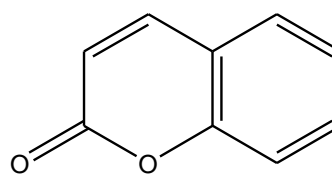
Código da amostra: 85
luteolina
IC₅₀ (μM): LOX 2,3; COX 64,3



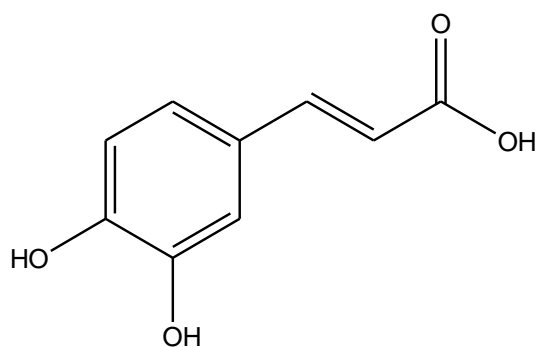
Código da amostra: 151
quercetina
IC₅₀ (μM): LOX 8; COX 0,8



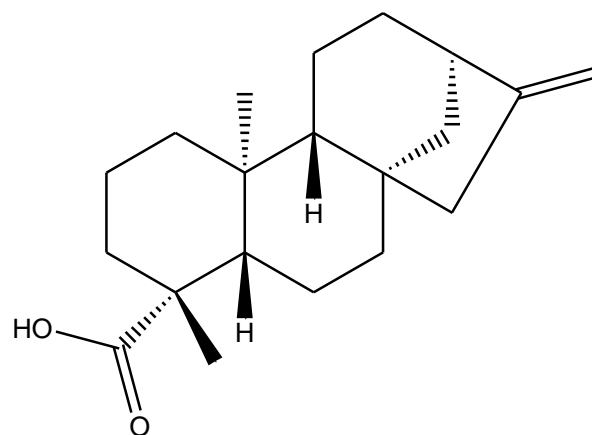
Código da amostra: 90
ácido *E*-cinâmico
IC₅₀ (μM): LOX 3,8; COX 0,004



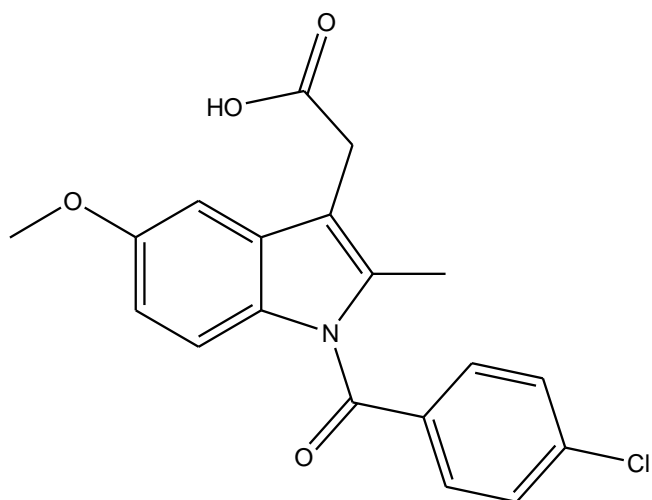
Código da amostra: 89
cumarina
IC₅₀ (μM): LOX 3,0; COX 0,002



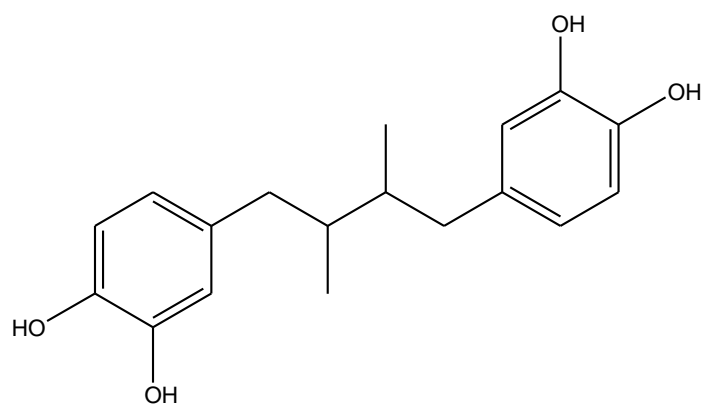
Código da amostra: 95
 ácido cafeico
 IC_{50} (μM): LOX 21,7; COX 0,2



Código da amostra: 87
 ácido caurenoico
 IC_{50} (μM): LOX 11,6; COX 0,2



Código da amostra: 88
 indometacina
 IC_{50} (μM): LOX (-); COX 0,1



Código da amostra: 150
 NDGA
 IC_{50} (μM): LOX 0,8; COX (-)