

**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 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

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 comezinho 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 realizada 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 IC<sub>50</sub> (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 IC<sub>50</sub> (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 <i>T. diversifolia</i> (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 <i>T. diversifolia</i> (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 <i>T. diversifolia</i> (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 <i>T. diversifolia</i> (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 <i>T. diversifolia</i> (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 <i>T. diversifolia</i>	

(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 $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -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 $\gamma$ -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 desreplcação.....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 <sub>50</sub>	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 <sub>R</sub>	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**

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\mu$	Micro
™	Trademark
®	Marca Registrada
©	Copyright

## SUMÁRIO

<b>Resumo</b> .....	<b>I</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>II</b>
<b>Lista de figuras</b> .....	<b>III</b>
<b>Lista de tabelas</b> .....	<b>VIII</b>
<b>Lista de abreviaturas e siglas</b> .....	<b>IX</b>
<b>Lista de símbolos</b> .....	<b>XI</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>6</b>
2.1. Objetivo Geral.....	6
2.2. Os Objetivos Específicos .....	6
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>6</b>
3.1. Material vegetal .....	6
3.2. Secagem, armazenamento e investigação de tricomas glandulares .....	7
3.3. Preparo dos extratos.....	7
3.4. Ensaios anti-inflamatórios <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 desreplificação .....	13
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>15</b>
4.1. Espécies e locais de coleta.....	15
4.2. Preparo dos extratos.....	20
4.3. Investigação de tricomas glandulares.....	30
4.4. Ensaios anti-inflamatórios <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 desreplificação.....	53
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	<b>72</b>
<b>6. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>72</b>
<b>APÊNDICE I</b> - Parâmetros utilizados no software MZmine.....	<b>86</b>
<b>APÊNDICE II</b> - Parâmetros utilizados para seleção de atributos por algoritmos genéticos e construção da árvore de decisão J48 no software Weka.....	<b>88</b>
<b>APÊNDICE III</b> - Parâmetros utilizados para construção das RNs no software Weka.....	<b>89</b>
<b>APÊNDICE IV</b> - Grupos para treino dos modelos de predição (OPLS e RN) e grupos teste para validação dos mesmos modelos.....	<b>91</b>
<b>APÊNDICE V</b> - Estruturas das substâncias avaliadas nos ensaios anti-inflamatórios.....	<b>92</b>

## 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<sup>1,2</sup>. Os estudos metabolômicos ou estudos do metaboloma englobam três diferentes abordagens: metabolômica, perfil metabólico e impressão digital metabólica<sup>3,4</sup>.

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.<sup>3,4</sup>

Apenas a impressão digital metabólica já permite uma série de aplicações importantes como, por exemplo, no controle de qualidade de plantas<sup>5,6</sup>. Quando aliado a análises estatísticas adequadas permite, por exemplo, auxiliar na solução de problemas filogenéticos com o agrupamento de plantas que possuem perfis químicos relacionados<sup>7</sup>. 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.<sup>2,6,8-10</sup>

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.<sup>3,6,8,9,11</sup>

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<sup>1,3,5,8,9,12</sup>. 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<sup>3,5,6,13-16</sup>.

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<sup>14,16</sup>. 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<sup>14,16</sup>.

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<sup>10,17,18</sup>.

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*<sup>TM</sup>). 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<sup>8,10,11,17,19,20</sup>.

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<sup>21,22</sup>. 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<sup>23,24</sup>, sendo que uma delas, a budleína A, também apresentou atividade anti-inflamatória *in vivo* e teve seu mecanismo de ação investigado<sup>25</sup>. Vale lembrar que as LST destas espécies são biossintetizadas e armazenadas em tricomas glandulares presentes em diferentes órgãos<sup>22,26</sup>.

A família Asteraceae possui espécies com consagradas propriedades anti-inflamatórias, tais como a arnica (*Arnica montana* L.)<sup>27</sup>, o tanaceto ou feverfew (*Tanacetum parthenium* L.)<sup>28</sup>, o guaco (*Mikania glomerata* Sprengl.)<sup>29,30</sup>, a carqueja [*Baccharis trimera* (Less.) DC.]<sup>29,30</sup>, o assa-peixe (*Vernonia polyanthes* Less.)<sup>30</sup> e a marcela [*Achyrocline satureioides* (Lam.) DC.]<sup>29,30</sup>, dentre outras. Há ainda nesta família espécies com importância alimentícia, como o girassol (*Helianthus annuus* L.)<sup>29</sup>, a alcachofra (*Cynara scolymus* L.)<sup>31</sup>, a chicória (*Cichorium intybus* L.)<sup>32</sup>, o jambú [*Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen]<sup>33-35</sup> e o alface (*Lactuca sativa* L.)<sup>36</sup> 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<sup>25,37</sup>. 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 substâncias<sup>38-41</sup>.

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<sup>38,42</sup>. 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<sup>38,42,43</sup>.

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) atuais são capazes de inibir as COX e não são capazes de inibir as LOX<sup>29,34</sup>. 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<sup>38,40</sup>. Recentemente, destacou-se a importância de procurar agentes que sejam capazes de inibir tanto a COX-1 como a 5-LOX<sup>38,40,44,45</sup>. 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<sup>38,39,42,45-48</sup>.

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<sup>38,45,46</sup>. 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<sup>44,47</sup>, 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 conservação<sup>49</sup>.

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.

## 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 <sup>1</sup>H 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. Shyr, 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-kB. *Phytochemistry* **60**, 733–740 (2002).
24. Siedle, B. et al. Quantitative structure-activity relationship of sesquiterpene lactones as inhibitors of the transcription factor NF-kB. *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 lipoxygenase (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- $\kappa$ 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-kB 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. & Hoult, 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- $\kappa$ 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 kB (NF-kB). *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<sup>+</sup>-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 <sup>1</sup>H 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 q<sup>2</sup>! *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).