

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

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

Danniela Príscylla Vasconcelos Faleiro

Ribeirão Preto
2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

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

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

Área de Concentração: Produtos Naturais
e Sintéticos

Orientada: Danniela Príscylla
Vasconcelos Faleiro

Orientador: Prof. Dr. Fernando Batista da
Costa

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

Ribeirão Preto
2014

RESUMO

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

O gênero *Viguiera* Kunth é o maior entre os representantes da subtribo Helianthinae (tribo Heliantheae, Asteraceae). As mudanças evolutivas da tribo tem feito a reconstrução filogenética e a circunscrição do gênero tema de grande debate. Considerando-se resultados das análises filogenéticas baseadas em dados moleculares e em caracteres morfológicos, as espécies sul-americanas foram transferidas para o gênero *Aldama* La Llave. A fim de poder contribuir com estudos que visem dar subsídios para a classificação taxonômica de *Aldama*, como, por exemplo, dados químicos, bem como encontrar metabólitos bioativos, foi proposto investigar espécies de *Aldama* utilizando perfis metabólicos obtidos por *Ultra High Performance Liquid Chromatography* (UHPLC) acoplada a detector no ultravioleta (UV) e espectrometria de massas (*Mass Spectrometry*, MS), bem como técnicas de desreplicação e métodos de estatística multivariada, além de avaliar o potencial de inibição *in vitro* das enzimas cicloxigenase (COX) e lipoxigenase (LOX) de extratos. Para isso, foram coletadas 24 espécies e seus respectivos extratos foram obtidos por maceração de folhas, lavagem foliar e dissolução de tricomas glandulares. As impressões digitais obtidas por UHPLC-UV-MS revelaram substâncias como ácidos clorogênicos, flavonoides e lactonas sesquiterpênicas. Dentre os extratos estudados, 19 foram avaliados *in vitro*, três (15,8%) apresentaram a atividade de inibição concomitante das enzimas COX-1 (IC₅₀ >100; 0,1 e 2,6) e 5-LOX (IC₅₀ 67,2; 36 e 4), respectivamente os de *A. pilosa*, *A. robusta* e *A. trichophylla*. Os dados de UHPLC-MS no modo de ionização negativo foram normalizados, combinados com os resultados dos ensaios do potencial anti-inflamatórios *in vitro* e analisados por *Orthogonal Partial Least Square Discriminant Analysis* (OPLS-DA), sendo possível obter um modelo com habilidade preditiva de validação cruzada de 66,67% (R²= 0,98 e Q²= 0,51). Os dados do modelo revelaram que os biomarcadores que exercem maior influência para que o extrato de *A. robusta* fosse ativo são os ácidos 3-O-E-cafeoilquínico e 3,4-dimetoxicinâmico, a rutina e a 3-O-metilquercetina. Os resultados deste trabalho auxiliarão na construção da taxonomia para o gênero *Aldama*.

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

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

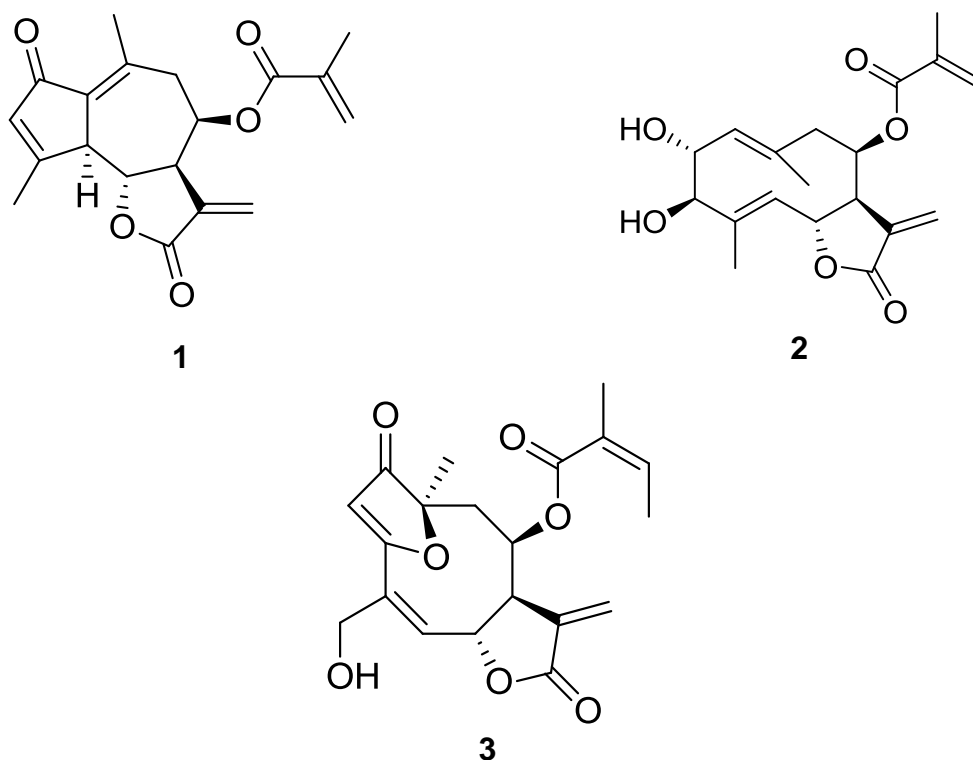


Figura 1 - Estruturas de lactonas sesquiterpênicas (LST) de diferentes classes encontradas em espécies brasileiras de *Aldama*. 1. Guaianolido, 2. Germacrolido e 3. Heliangolido (budleína A).

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

Através de estímulos mecânicos, químicos, físicos ou através de outros mediadores, os fosfolípidos das membranas celulares liberam o ácido araquidônico, a partir da ativação da enzima fosfolipase A₂. O ácido araquidônico livre pode ser metabolizado por duas classes principais de enzimas: as cicloxigenases (COX) resultando na produção de eicosanoides (PG, TBX e prostacilinas) e as

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CONCLUSÃO

5. CONCLUSÃO

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

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

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

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

REFERÊNCIAS

6. REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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