



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

Programa de Pós-graduação em Química



ANDREZA APARECIDA RIBEIRO

ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE
Jungia floribunda Less.

ALFENAS/MG
2024

ANDREZA APARECIDA RIBEIRO

ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE
Jungia floribunda Less.

Tese apresentada como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutora em Química pelo
Programa de Pós-Graduação em Química da
Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Química Orgânica

Orientadora: Profa. Dra. Marisi Gomes Soares

Co-orientadora: Profa. Dra. Daniela Chagas de Paula

ALFENAS/MG
2024

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Ribeiro, Andreza Aparecida .
Estudo Fitoquímico e atividade anti-inflamatória de *Jungia floribunda*
Less. / Andreza Aparecida Ribeiro. - Alfenas, MG, 2024.
105 f. : il. -

Orientador(a): Marisi Gomes Soares.
Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Alfenas,
Alfenas, MG, 2024.
Bibliografia.

1. *Jungia*. 2. Asteraceae. 3. Anti-inflamatório. I. Soares, Marisi Gomes ,
orient. II. Título.

ANDREZA APARECIDA RIBEIRO

“ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE JUNGIA FLORIBUNDA LESS”

A Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Química Orgânica

Aprovada em: 21 de fevereiro de 2024.

Profa. Dra. Marisi Gomes Soares
Presidente da Banca Examinadora
Instituição: Universidade Federal de Alfenas - Unifal

Dra. Susanne Christine Therese Soares de Grootte
Instituição: Empresa De Grootte – Desenvolvimento em Energia Ltda

Profa. Dra. Luciana de Azevedo
Instituição: Universidade Federal de Alfenas - Unifal

Prof. Dr. Welton Rosa
Instituição: Secretaria do Estado da Educacao de Minas Gerais

Profa. Dra. Karen de Jesus Nicácio
Instituição: Universidade Federal do Mato Grosso



Documento assinado eletronicamente por **Marisi Gomes Soares, Professor do Magistério Superior**, em 09/04/2024, às 15:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1191192** e o código CRC **1D4C1720**.

AGRADECIMENTOS

Os meus agradecimentos à Deus, que sempre esteve ao meu lado. As minhas amigas e irmãs do Sul de Minas Bianca, Aline, Cristiane, Joana e Aparecida que foram essenciais para esta conquista. Aos meus colegas de laboratório que me ajudaram na realização deste projeto. A professora Daniela Chagas, Daniele Dias e a minha orientadora Marisi Gomes Soares. Ao programa de pós-graduação de Química, UNIFAL. A minha família pelo carinho nas horas difíceis e aos órgãos de fomentos CNPq e FAPEMIG pelo apoio a ciência.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

A todos que de alguma forma contribuíram nesta jornada os meus agradecimentos.

RESUMO

Jungia floribunda Less é um arbusto que pertence à família Asteraceae e se encontra em domínios fitogeográficos como Cerrado e Mata Atlântica. Esta planta segundo o uso popular é de caráter medicinal, as infusões de suas folhas são utilizadas como anti-inflamatório e antidiabético em países da América do Sul como o Paraguai. No Sul de Minas Gerais, o seu uso popular se dá no tratamento de entorse, com suas folhas maceradas em etanol. Não há estudo científico sobre a composição química e atividade anti-inflamatória desta espécie, então o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade anti-inflamatória e a constituição dos extratos e óleo essencial de suas folhas. Para isso foram realizados ensaios anti-inflamatórios *in vitro* e *in vivo*, assim como análise dos extratos por UPLC-HRMS. Foi possível determinar que os extratos de lavagem foliar, aquoso (infuso) e hidroetanólico são compostos por substâncias fenólicas e lactonas sesquiterpênicas por desreplicação e comparação dos resultados de UPLC-HRMS com os dados da literatura. A desreplicação do óleo essencial demonstrou a presença de estruturas químicas conhecidas na literatura com propriedades anti-inflamatórias como β -cariofileno, α -cariofileno e óxido de cariofileno. Da aplicação tópica dos extratos somente o hidroetanólico demonstrou atividade anti-inflamatória no ensaio *in vivo* de edema de orelha em camundongos. Entretanto os três extratos apresentaram inibição *in vitro* da enzima elastase em diferentes concentrações. Assim, diferentes substâncias podem agir por diferentes mecanismos, o que pode ter relação com o uso da planta para o tratamento de doenças anti-inflamatórias. Estudos de toxicidade *in vitro* realizados nos extratos em células de fibroblasto humano demonstraram que os extratos foram classificados como toxicidade moderada. Portanto, a planta apresenta um potencial anti-inflamatório o que justifica o seu uso medicinal pela população no Sul de Minas, Brasil.

Palavras-chave: *Jungia*; Asteraceae; anti-inflamatório

ABSTRACT

Jungia floribunda Less is a shrub that belongs to the Asteraceae family and is found in phytogeographical areas such as Cerrado and Atlantic Forest. This plant, according to popular usage, is medicinal in nature, as infusions of its leaves are used as anti-inflammatory and antidiabetic drugs in South American countries such as Paraguay. In the south of Minas Gerais, its folkloric use provide treatment for sprains with its leaves macerated in ethanol. There is no study on the chemical composition and anti-inflammatory activity of this species, so the objective of this work was to evaluate the anti-inflammatory activity and the constitution of the extracts and essential oil of its leaves. To this end, *in vitro* and *in vivo* anti-inflammatory assays were carried out, as well as analysis of the extracts by UPLC-HRMS. It was possible to determine that the leaf wash, aqueous (infusion) and hydroethanolic are composed of phenolic substances, flavonoids and sesquiterpene lactones by dereplication and comparison of UPLC-HRMS results with literature data. The dereplication of the essential oil demonstrated the presence of chemical structures known with anti-inflammatory properties such as β -caryophyllene, α -caryophyllene and caryophyllene oxide. From the topical application of the extracts, only the hydroethanolic extract demonstrated anti-inflammatory activity in the ear edema test in mice. However, the three extracts demonstrated *in vitro* inhibition of the elastase enzyme at different concentrations. Thus, different substances can act through different mechanisms, which may be related to the use of the plant for the treatment of anti-inflammatory diseases. *In vitro* toxicity studies carried out on the extracts in human fibroblast cells demonstrated that extracts were classified as moderate toxicity. Therefore, the plant has anti-inflammatory potencial, which justifies its medicinal use by population in the south of Minas, Brazil.

Key words: *Jungia*; Asteraceae; anti-inflammatory

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Jungia floribunda</i> Less.....	13
Figura 2 - Substâncias isoladas no gênero <i>Jungia</i>	14
Figura 3 - Tricomas glandulares identificados em estereomicroscópio ZEISS STEM i305.	33
Figura 4 - Folha sem tricomas glandulares identificados em estereomicroscópio.	34
Figura 5 - Extração do óleo essencial de <i>Jungia floribunda</i> Less..	26
Figura 6 - Estruturas identificadas no óleo essencial da <i>Jungia floribunda</i> Less..	42
Figura 7 - Proposta de fragmentação para o β -cariofileno.....	43
Figura 8 - Principais rotas de biossíntese de compostos voláteis.	45
Figura 9 - Biossíntese de terpenos: via Mevalonato	46
Figura 10 - Rede molecular no GNPS. Modo positivo.....	48
Figura 11 - Biossíntese dos principais grupos de lactonas sesquiterpênicas.	49
Figura 12 - Possíveis fragmentos para a estrutura o costunolido.....	49
Figura 13 - Espectros referente a estrutura $C_{15}H_{20}O_2$	50
Figura 14 - Estruturas de lactonas com cinco anéis com bandas de absorção.....	51
Figura 15 - Agrupamento α –metileno – lactona	51
Figura 16 - Espectro de IV do extrato infuso.....	52
Figura 17 - Espectro de IV do extrato rico em lactonas da espécie <i>Artemisia</i>	53
Figura 18 - Espectros referente a estrutura $C_{25}H_{24}O_{12}$	54
Figura 19 - Possíveis fragmentos para a estrutura 1,3 – ácido decadeoilquínico.	54
Figura 20 - Proposta de fragmentação para o ácido clorogênico..	56
Figura 21 - Espectros referente a estrutura $C_{21}H_{18}O_{12}$	58
Figura 22 - Espectros referente a estrutura $C_{15}H_{20}O_4$	59
Figura 23 - Estruturas da quercetina.	60
Figura 24 - Espectros referente a estrutura $C_{27}H_{30}O_{16}$	61
Figura 25 - Espectros referente a estrutura $C_{15}H_{10}O_6$	62
Figura 26 - Variação de inibição em função da concentração do infuso.....	77
Figura 27 -Variação de inibição em função da concentração do extrato de lavagem foliar. ...	79
Figura 28 - Gráfico da percentagem da enzima elastase.....	79
Figura 29 - Precipitação do DMSO com a solução tampão fosfato de sódio	81
Figura 30 - Ensaio edema de orelha.....	84
Figura 31 - Curva dose/resposta dos extratos.....	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAT	Antitripsina
Abs	Absorbância
BDE	Energia de Dissociação
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CG – EM	Espectrometria de Massa Acoplada a Cromatografia Gasosa
COX	Ciclo-oxigenase
EF	Extrato de Lavagem Foliar
ESI	Ionização por <i>Eletrospray</i>
fmLP	N-formil-metionil-leucil-fenilalanina
FPP	Difosfato de farnesila
GNPS	<i>Global Natural Products Social Molecular Networking</i>
His-Ser-Asp	Histidina – Serina – Aspartato
HMDB	Banco de dados de metaboloma humano
HNE	Elastase neutrófila humana
IC50	Concentração de Inibição Média de 50%
KEGG	Enciclopédia de genes e genomas de Kyoto
KI	<i>Kovats Index</i>
KEGG	Enciclopédia de genes e genomas de Kyoto
LF	Extrato Foliar Livre de Tricomas
LOX	Lipo-oxigenase
MPO	Mieloperoxidase
mDa	milidaltón
NIST	Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia

PAF	Fator de ativação plaquetária
PPE	Elastase pancreática porcina
SisGen	Sistema Nacional do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional
SLs	Lactonas sesquiterpênicas
SRB	Sulfurodamina B
TOF	<i>Time of flight</i>
tR	Tempo de retenção
UHPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
UPLC	Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas de alta resolução

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição do óleo essencial das folhas de <i>Jungia floribunda</i>	44
Tabela 2 - Estrutura de acordo com o GNPS - Infuso	63
Tabela 3 - Estrutura de acordo com o MetFrag - Infuso.....	65
Tabela 4 - Estruturas de acordo com o programa da Bruker	66
Tabela 5 - Estruturas de acordo com o GNPS – Extrato de Lavagem Foliar	67
Tabela 6 - Estruturas de acordo com o MetFrag – Extrato de Lavagem Foliar	71
Tabela 7 - Estruturas de acordo com o programa da Bruker – Extrato de Lavagem Foliar ..	71
Tabela 8 - Estruturas de acordo com o GNPS – Extrato Hidroetanólico.....	72
Tabela 9 - Estruturas de acordo com o MetFrag – Extrato Hidroetanólico	76
Tabela 10 - Estruturas de acordo com o programa da Bruker	76
Tabela 11 - Ensaio de edema de orelha.....	82
Tabela 12 - Resultados dos testes biológicos utilizando os extratos de <i>J. floribunda</i>	85

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1	A FAMÍLIA ASTERACEAE E O GÊNERO <i>Jungia</i>	14
2.2	INFLAMAÇÃO E ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA	19
2.3	ELASTASE.....	20
2.4	CITOTOXICIDADE.....	22
2.5	FITOQUÍMICA	24
2.6	METABOLÔMICA.....	27
3	JUSTIFICATIVA	30
4	OBJETIVO	31
4.1	OBJETIVO GERAL.....	31
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
5	METODOLOGIA	32
5.1	OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL <i>J. floribunda</i> Less.....	32
5.2	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS.....	32
5.2.1	Infuso	32
5.2.2	Extrato de lavagem foliar	32
5.2.3	Extrato hidroetanólico	32
5.3	INSTRUMENTO E METODOLOGIA DE ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL.....	34
5.4	INFLAMAÇÃO.....	36
5.4.1	Elastase <i>in vitro</i>	36

5.4.1.1	Materiais.....	36
5.4.1.2	Medidas cinéticas.....	36
5.4.2	Edema de orelha.....	37
5.5	CITOTOXICIDADE.....	38
5.5.1	Cultura de CCDD1059K.....	38
5.5.2	Ensaio de viabilidade celular sulforodamina B.....	38
5.6	ANÁLISE DOS EXTRATOS POR UHPLC – ESI- HRMS.....	39
5.6.1	Tratamento de dados.....	40
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
6.1	ANÁLISE DOS COMPONENTES DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>J. floribunda</i> Less.....	42
6.2	DESREPLICAÇÃO DO INFUSO.....	47
6.3	DESREPLICAÇÃO DO EXTRATO DE LAVAGEM FOLIAR.....	59
6.4	DESREPLICAÇÃO DO EXTRATO HIDROETANÓLICO.....	61
6.5	ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA.....	77
6.5.1	Enzima elastase.....	77
6.5.2	Edema de orelha.....	81
6.6	CITOTOXICIDADE.....	86
7	CONCLUSÃO.....	88
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89
9	ANEXOS.....	101

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais vêm sendo usadas popularmente desde os primórdios da civilização, com diferentes fins, principalmente para cura e prevenção de doenças. Esse conhecimento foi passado de geração para geração e é uma importante fonte para a descoberta de novos princípios ativos (Santos *et al.*, 2011; Pedroso *et al.*, 2021). De acordo com Newmam e Cragg (2007) cerca de 25 a 30% das drogas avaliadas como agentes terapêuticos são provenientes de produtos naturais. O Brasil apresenta um grande potencial como fonte de espécies medicinais, possuindo mais de 20% de todas as espécies vegetais do mundo. Segundo Guerra e Nodari (2010) a grande biodiversidade no Brasil permite apresentar uma vasta pesquisa na área de princípios ativos. A maioria dos princípios ativos encontrados nos extratos vegetais e que tem importância farmacológica, de maneira geral, é procedente de um grande número de metabólitos secundários que possuem uma constituição complexa. Sendo assim, servem de alvos terapêuticos em diversas doenças humanas (Ferreira e Pinto, 2010). Entre as espécies vegetais pertencentes à família Asteraceae e a tribo Mutisieae, ressalta-se a *Jungia floribunda* Less., utilizada popularmente como anti-inflamatória, antitussígena e hipoglicemiante em países da América do Sul como a Argentina, Brasil, Paraguai e Uruguai. É popularmente usada em abundância na forma de infusão no Paraguai (Dujak *et al.*, 2010, Mouga *et al.*, 2012, Soria e Ramos, 2015).

No Brasil ela ocorre no Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso, Rio de Janeiro, São Paulo, Minas Gerais, Rio Grande do Sul, em domínios fitogeográficos como o Cerrado e Mata Atlântica. Atualmente encontram-se estudos anatômicos da folha de *J. floribunda* Less. e um breve estudo da fitoquímica das folhas, oriunda de Goiás, mas nenhum estudo que abranja substâncias identificadas nos extratos das folhas e sua atividade biológica (Dujak *et al.*, 2010; Souza Vinícius, 2014). Um estudo sobre a composição química e atividade anti-inflamatória foi realizado em *Jungia paniculata* (DC.) A. Gray onde foram descritos polifenóis e os flavonoides presentes na planta (D'Agostino *et al.*, 1995; Casado *et al.*, 2010). Acosta Leon *et al.* (2019) relatam a presença de flavonoides nas folhas de *Jungia rugosa* Less. e seu potencial hipoglicemiante. Verdugo *et al.* (2023) isolaram cumarinas das folhas de *J. rugosa* e atribuíram às cumarinas a atividade anti-inflamatória. Considerando a ausência de evidências científicas sobre *J. floribunda* e o potencial anti-inflamatório no gênero *Jungia*, propõe-se um estudo fitoquímico das folhas de *J. floribunda* Less., coletada no Sul do estado de Minas Gerais, e avaliação de sua atividade anti-inflamatória.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A FAMÍLIA ASTERACEAE E O GÊNERO *Jungia*

Asteraceae é uma importante família que compõe o extrato arbóreo-arbustivo do Cerrado (Almeida *et al.*, 2005; Lopes *et al.*, 2020) com cerca de 250 gêneros e aproximadamente 2000 espécies no Brasil, é subdividida em 17 tribos, sendo as tribos Vernonieae, Eupatorieae, Heliantheae, Astereae, Mutisieae e Senecioneae as mais importantes no Brasil (Judd *et al.*, 2008). É a maior família dentre as Angiospermas, com aproximadamente 22.000 espécies e 1600 gêneros, cerca de 10% da flora mundial (Lopes *et al.*, 2020). Seus metabólitos secundários possuem múltiplas atividades farmacológicas já descritas, como antioxidantes, antiprotozoárias, antimicrobianas, citotóxicas, anti-inflamatórias, antidiabéticas, hepatoprotetores e etc. Essa família é uma das mais utilizadas na medicina popular da América do Sul e tem como uma das aplicações o seu uso como anti-inflamatório pela população (Barbosa *et al.*, 2009; Hurrel e Pontes, 2013 ; Lopes *et al.*, 2020).

No Sul de Minas Gerais encontra-se a cidade de Inconfidentes. A região faz parte da bacia hidrográfica do Rio Moji Guaçu, possui uma vegetação típica de montanha (clima tropical de altitude), com muitas áreas remanescentes de Mata Atlântica (Bueno, 2005). Algumas espécies da Asteraceae têm sido utilizadas pela população com fins medicinais nessa região, tem-se a *Ageratum conyzoides* L., erva de São João, utilizada para tratamento de reumatismo; *Achillea millefolium* L., mil folhas, utilizada para doenças nos rins e a *Mikania glomerata* Spreng., guaco, utilizada como expectorante pela população (Bueno, 2005). A espécie *J. floribunda* Less. (FIGURA 1) muito comum na região tem suas folhas maceradas no etanol pela população e é utilizada como anti-inflamatório no tratamento da entorse. Ela é conhecida pela população local como “arnicão”. É uma planta subarborescente, ereta atingindo até 1,5 m de altura em fase vegetativa e atingindo até 2,5 m em floração (Souza Vinícius, 2014).

No Paraguai têm-se alguns trabalhos já publicados sobre a sua importância medicinal (Hirschmann e Bordas, 1990; Dujak *et al.*, 2010; Soria e Ramos, 2015; Acosta-Recalde *et al.* 2018) mas nenhum trabalho sobre substâncias químicas identificadas nos extratos das folhas e a atividade biológica de *J. floribunda* Less. No Brasil, tem-se o trabalho de Souza Vinícius (2014) em que foi realizada uma prospecção fitoquímica para detecção das principais classes de metabólitos secundários e constatando a presença de diterpenos, flavonoides, cumarinas, corroborando com o trabalho de Barbosa *et al.*, (2009) em que a família Asteraceae apresenta uma variedade de constituintes químicos biologicamente ativos tais como terpenoides,

poliacetilenos, flavonoides, polissacarídeos. Lajter (2015) menciona que os principais constituintes químicos dessa família incluem diterpenos, compostos acetilênicos, flavonoides, diterpenoides, benzofuranos, benzopiranos e fenilpropanos os quais ocorrem provavelmente em todas as tribos. Vestena *et al.* (2019) isolaram a substância perezona, uma sesquiterpeno quinona das raízes de *J. floribunda* coletada no Rio Grande do Sul, porém nenhum trabalho detalhado foi realizado sobre os óleos essenciais, atividade anti-inflamatória dos extratos das folhas e inibição da enzima elastase.

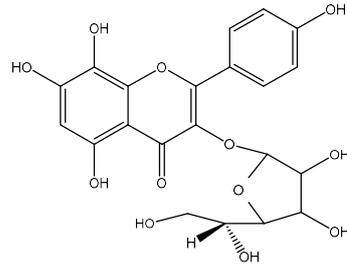
Figura 1- *J. floribunda* Less.



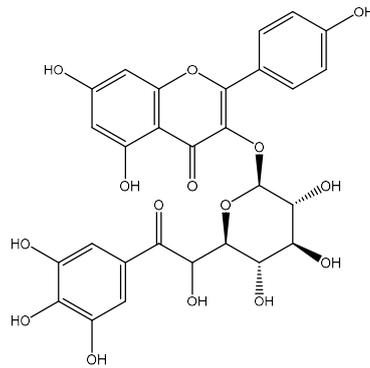
Fonte: Do autor.

O gênero *Jungia* pertence à subtribo Nassauviinae e a tribo Mutisieae. Há cerca de trinta e uma espécies do gênero, sendo que as espécies *Jungia paniculata* (D.C) A. Gray, *Jungia herzogiana* Beauverd ex J. Kost., *Jungia malvifolia* Muschl., *Jungia polita* Griseb., *Jungia seleriana* Muschl., *Jungia stuebelii* Hieron. e *Jungia spectabilis* D. Don já foram estudadas fitoquimicamente. A análise fitoquímica destas espécies revelou a presença de flavonoides glicosilados (FIGURA 2a,b) (D'Agostino *et al.*, 1995), poliacetilenos (Bohlmann e Zdero, 1977; Bohlmann *et al.*, 1984), sesquiterpenos (FIGURA 2c-i) do tipo isocedreno, guaiano, pseudoguaiano, nortrixano, trixano e trixano glicosilado (Bohlmann e Zdero, 1977; 1979; Bohlmann *et al.*, 1983; Ybarra *et al.*, 1992; Azevedo *et al.*, 2016), flavonoides aglicanos (Acosta-leon *et al.*, 2019) e derivados cumarínicos (FIGURA 2j - m) (Bohlmann e Zdero, 1979; Verdugo *et al.*, 2023). Todas estas classes de metabólitos secundários descritos na família Asteraceae, comumente conhecidas também por apresentarem diferentes atividades biológicas.

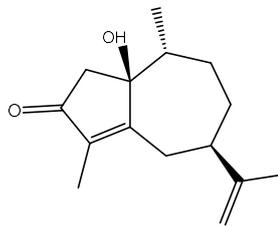
Figura 2 - Substâncias isoladas no gênero *Jungia*



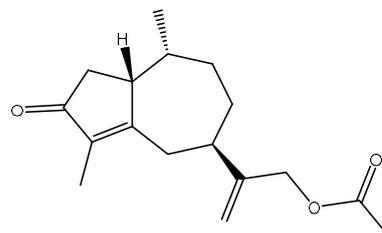
(a) Flavonol glicosilado – $C_{21}H_{20}O_{12}$



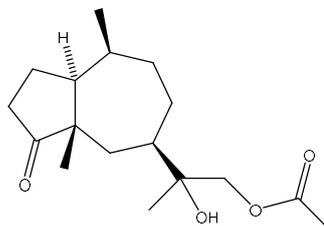
(b) Kaempferol glicosilado – $C_{28}H_{24}O_{15}$



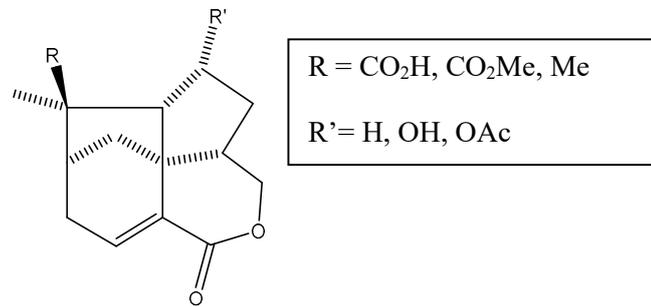
(c) Terpeno do tipo guaiano - $C_{15}H_{22}O_2$



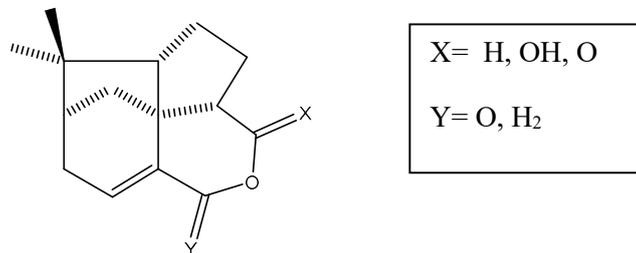
(d) Terpeno do tipo guaiano $C_{17}H_{24}O_3$



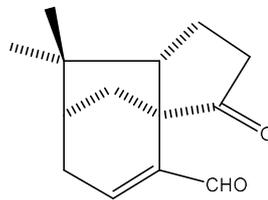
(e) Terpeno do tipo pseudoguaiano – $C_{17}H_{28}O_4$



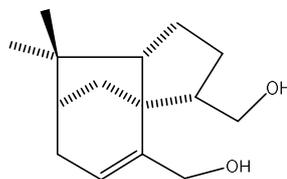
(f) Derivado de isocedreno



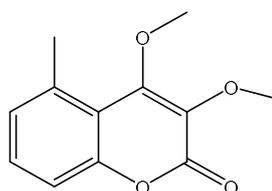
(g) Derivado de isocedreno



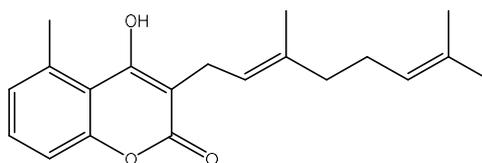
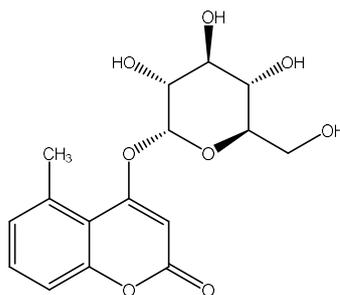
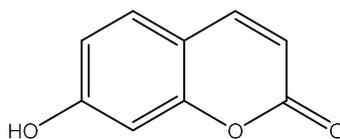
(h) Derivado de isocedreno – $C_{14}H_{18}O_2$



(i) Derivado de isocedreno – $C_{17}H_{26}O_3$



(j) Derivado de cumarina – $C_{12}H_{12}O_4$

(k) Derivado de cumarina – C₂₀H₂₄O₃(l) Derivado de cumarina – C₁₆H₁₈O₈(m) Derivado de cumarina – C₉H₆O₃

Fonte: D'Agostino *et al.*, 1995 (2a, b), Bohlmann e Zdero, 1977, 1979, Bohlmann *et al.*, 1983, Ybarra *et al.*, 1992, Azevedo *et al.*, 2016, Acosta-leon *et al.*, 2019 (2c, i); Bohlmann e Zdero, 1979, Verdugo *et al.*, 2023 (2j,m)

Ensaio realizados em camundongos de substâncias isoladas do extrato das folhas de *J. paniculata* (D.C) A. Gray e *J. sellowii* Less apresentaram um potencial anti-inflamatório. Casado *et al.*, (2010) demonstraram o efeito anti-inflamatório e antioxidante de *J. paniculata* (D.C) A. Gray. e estes resultados foram correlacionados com a presença de polifenóis e flavonoides. Estudos fitoquímicos de Nader (2014) permitiram o isolamento de dois compostos, o ácido succínico (AS) e o ácido láctico (AL) a partir da fração aquosa obtida do extrato das folhas de *J. sellowii* Less. Esta classe química, mais especificamente os ácidos graxos, apresentou uma atividade anti-inflamatória. O trabalho de Wilches *et al.*, (2015) utilizou o extrato das folhas de *J. rugosa* Less. que apresentou resultados eficazes como agente anti-inflamatório em modelos de inflamação aguda e crônica, em camundongos. Isso corrobora o trabalho de Enciso e Arroyo (2011) no qual a fração rica em flavonoides do extrato de folhas de *J. rugosa* apresentou uma diminuição de 43,8% na inflamação no ensaio de edema de pata em camundongos, apoiando o seu uso tradicional.

Estudos realizados na extração de óleos essenciais das folhas de *J. polita* (Duschatzky *et al.*, 2005) apresentaram resultados nos ensaios anti-inflamatórios *in vitro*. Os principais

componentes identificados na desreplicação dos óleos essenciais de *J. polita* (Duschatzky *et al.*, 2005) e *J. paniculata* (Ruiz *et al.*, 2015) analisados por CG-MS foram óxido de cariofileno, α -cariofileno, β -cariofileno, α -humuleno e curcumeno. Em um estudo realizado por Calvopiña *et al.*, (2021) as principais substâncias identificadas na desreplicação do óleo essencial de *J. rugosa* foram γ -curcumeno e β -sesquifelandreno. Assim, estas substâncias conhecidas com propriedades anti-inflamatórias, possivelmente podem contribuir para atividade farmacológica (Fernandes *et al.*, 2007; Sain *et al.*, 2014; Machado *et al.*, 2018).

2.2 INFLAMAÇÃO E ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

A inflamação é uma resposta imune a um trauma físico, à ação de uma substância química nociva ou a agentes microbiológicos. É uma resposta dos tecidos vivos lesionados que sofrem o acúmulo do líquido plasmático e células sanguíneas, sendo que a área afetada é caracterizada por vermelhidão e aumento na temperatura local, causada pelo aumento no fluxo sanguíneo. A região torna-se sensível a dor, além de apresentar formação de edema devido às alterações na permeabilidade vascular. Contusões, tendinites, doenças respiratórias, asma, doenças autoimunes, dentre muitas outras, estão relacionados com os processos inflamatórios. Apesar da inflamação ser um mecanismo de defesa do organismo, durante uma reação inflamatória pode ocorrer a indução e o agravamento de doenças (Tubaro, 2002).

Os processos inflamatórios são mediados por citocinas, pequenas proteínas liberadas por todos os tipos de células, que, ao sofrerem qualquer desregulação, causam um agravamento na patologia ou um aumento na inflamação (Keyel, 2014). No local da inflamação, o aumento na sensibilidade e dor é causado por mediadores químicos, como exemplo, os eicosanoides, que abrangem as prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos. Os eicosanoides são originados a partir do ácido araquidônico, um dos principais constituintes das membranas celulares (Meirer; Steinhilber; Proschak, 2014). Esses mediadores químicos atuam nos tecidos alvo, causando, por exemplo, vasodilatação nos vasos sanguíneos ou recrutamento de neutrófilos (Medzhitov, 2010). A dor pode ser caracterizada como uma sensação subjetiva, sendo manifestada devido ao sistema nervoso central, que recebe os sinais de agressão e determina a extensão da dor (Trowbridge e Emling, 1996).

A maioria dos anti-inflamatórios age na cascata do ácido araquidônico, através da inibição de duas enzimas, as ciclo-oxigenases (COX-1 e COX-2) e as lipoxigenases (LOX), principais responsáveis pelo metabolismo do ácido araquidônico, causando, conseqüentemente, a inibição dos mediadores químicos (Meirer; Steinhilber; Proschak, 2014). Para o tratamento

de patologias inflamatórias, utilizam-se anti-inflamatórios. Dentre eles, os anti-inflamatórios não esteroidais, utilizados para tratar a inflamação crônica e aguda são responsáveis por diversos efeitos colaterais, como: ulceração gastroduodenal, broncoespasmo e efeitos cardiovasculares adversos. Esses anti-inflamatórios não esteroidais inibem as vias da COX-1 e COX-2 (Pérez *et al.*, 2014). Devido aos efeitos indesejados dos anti-inflamatórios utilizados atualmente e às limitações quanto a eficácia para o tratamento de algumas doenças, há a necessidade de buscar por medicamentos capazes de inibir concomitantemente as vias COX-1 ou COX-2 e LOX, uma vez que estes possam ser mais eficientes e possivelmente associados a menores efeitos indesejados. Os produtos naturais têm sido descritos na literatura como possíveis substituintes ou fontes de compostos bioativos eficientes. Para a análise da atividade anti-inflamatória, pode-se utilizar o teste do edema de orelha, que mede a ação vasodilatadora e permite observar o aumento na quantidade de prostaglandinas na área afetada. As prostaglandinas estão envolvidas no processo inflamatório e na resposta do sistema imunológico a lesões e infecções. Outro teste utilizado é a avaliação das Mieloperoxidases (MPO). As MPO são enzimas encontradas em neutrófilos e em menor quantidade em monócitos e macrófagos. Através da quantificação desta enzima é possível avaliar o recrutamento de neutrófilos no tecido inflamado. A MPO reage com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), gerando radicais livres e substâncias oxidantes, que atacam os agentes infecciosos. Porém, esses mesmos radicais livres e substâncias oxidantes podem causar dano oxidativo no tecido, podendo promover úlcera, aterosclerose, disfunção endotelial, dentre outras consequências (Krawisz; Sharon; Stenson, 1984; Dai; Harada; Takamatsu, 2015).

2.3 ELASTASE

Elastases constituem um grupo de serino proteases que possuem a capacidade de clivar a proteína elastina que é amplamente distribuída nos tecidos conjuntivos dos vertebrados como pulmões, artérias, pele e ligamentos (Kim *et al.*, 2004; Jakimiuki *et al.*, 2021). Essas proteases incluem a elastase de neutrófilos (NE), também conhecida como elastase de leucócitos, a elastase pancreática (PPE), a elastase de macrófagos (MMP-12) e a elastase de fibroblastos. A elastase de neutrófilos humanos (HNE) está presente nos grânulos de leucócitos polimorfonucleares e é essencial para a fagocitose e a defesa contra microorganismos invasores (Kawabata *et al.*, 2002). A elastase pancreática é encontrada em tecido animal e humano e é a única entre as enzimas proteolíticas em tecido animal que hidrolisa rapidamente a elastina escleroproteica, devido à sua especificidade única em degradar a elastina (Largman *et al.*, 1976; Oliveira e Salgado, 2013).

Além da elastina, as elastases podem degradar fibronectina, colágeno, lamininas e proteoglicanos, bem como proteínas do plasma (Janoff, 1985; Siedle *et al.*, 2003). Elastases possuem sua atividade regulada por uma glicoproteína denominada α 1- antitripsina (AAT) codificada no gene SERPINA1, locus Pi, localizado no braço longo do cromossomo 14. Mutações no gene SERPINA 1, locus Pi, localizado no cromossomo 14 (14q31-32) causam deficiência da AAT (Siedle, *et al.*, 2003). O desequilíbrio entre elastase e seu inibidor geram danos severos no tecido além de contribuir para o desenvolvimento de outras enfermidades como choque séptico, falência hepática, artrite reumatóide, psoríase, câncer de pele, arteriosclerose (Gadek,1990; Johansson, 2002; Jakimiuki *et al.*, 2021). Em indivíduos saudáveis, há uma quantidade maior de AAT nos pulmões, o que garante a proteção dos alvéolos da ação da elastase neutrofílica. No entanto, cabe lembrar que a deficiência de α 1-antitripsina (AAT) ocasiona um desequilíbrio na ação protease/ antiprotease sendo que o acúmulo da enzima estimula uma degradação anormal da elastina dos pulmões impulsionando danos no tecido saudável (Siedle *et al.*, 2003). Uma vez que essas lesões teciduais são irreversíveis, podem gerar problemas como a predisposição à bronquite e enfisema pulmonar associados à inflamação neutrofílica das vias aérea (Janoff *et al.*, 1979; Travis e Salvensen, 1983; Stockley *et al.*, 2002; Abboud e Vimalanthan, 2008; Crocetti *et al.*, 2019). Em quadros de enfisema, ocorre uma redução da elasticidade dos pulmões e o comprometimento dos alvéolos que são as estruturas responsáveis pela troca gasosa entre o oxigênio e gás carbônico (Cervilha, 2014). Tendo em vista que o tecido pulmonar não pode se regenerar em um processo de enfisema, um quadro de fibrose cística pode ser desencadeado. Esta é uma doença hereditária que causa o acúmulo de muco denso e pegajoso nos pulmões, afetando crianças e adultos jovens (Reis e Damaceno,1998). O tratamento específico atualmente disponível para pacientes que apresentam a deficiência de AAT consiste em reposições intravenosa periódica que busca elevar os níveis séricos de AAT e, assim, reconstituir a defesa pulmonar contra a elastólise tecidual (Camilier *et al.*, 2008). O inibidor AAT pode assim ser considerado como um inibidor fisiológico da elastase pancreática humana que pode prevenir a degradação da elastina dos vasos sanguíneos durante a pancreatite hemorrágica aguda (Padrines *et al.*, 1992). AAT é um regulador primário de granulócitos hepáticos. Deficiências de AAT têm sido implicadas no início precoce de cirrose infantil (Morse, 1978; Werb *et al.*, 1982).

Esta pesquisa inclui a elastase pancreática suína e produtos naturais. A elastase pancreática suína (PPE; EC 3.4.21.36) foi usada por vários anos como um modelo estrutural válido para a HNE e compartilha a mesma tríade catalítica de resíduos His-Ser-Asp com a elastase de leucócitos humanos (Bode *et al.*, 1989; Hofbauer *et al.*, 2015) .

Os produtos naturais como os extratos vegetais, oferecem oportunidades para novos inibidores da protease. As plantas superiores produzem uma enorme variedade de compostos químicos para proteção contra herbívoros e insetos, muitos desses compostos são inibidores da serina protease (Wink, 1988; Cuccioloni, 2009). Os produtos de defesa química incluem os terpenoides, polifenóis, taninos, peptídeos e proteínas (Ibanez *et al.*, 2012). Muitas dessas espécies são utilizadas na medicina popular devido à atividade anti-inflamatória; assim, testes biológicos podem ser realizados com os extratos destas plantas ou substâncias isoladas com o objetivo de novos inibidores da enzima elastase.

Estudos de compostos químicos de plantas medicinais da família Asteraceae demonstraram que algumas substâncias são capazes de inibir a atividade catalítica da enzima elastase neutrófila humana (Siedle *et al.*, 2002). Assim, considerando que a espécie *J. floribunda* Less. pertence à família Asteraceae e tem seu uso popular como planta medicinal no tratamento de inflamações, então é válido investigar se extratos desta espécie possuem capacidade de inibir a atividade desta enzima, dada sua relevância potencial no tratamento de inflamações e o respaldo de evidências existentes sobre os efeitos de compostos da família da Asteraceae.

2.4 CITOTOXICIDADE

O consumo de plantas medicinais com base nas tradições familiares tem se tornado uma prática comum na medicina popular. Dois fatores podem explicar esse aumento: o primeiro é o avanço no campo da ciência, que possibilita o desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos seguros e eficazes. O segundo fator seria a procura por tratamentos alternativos em substituição a alopatia como aromaterapia, floralterapia, uso de chás, fitoterápicos, os quais estão inseridos na Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC). Nesse sentido, qualquer que seja a aplicação desejada a uma planta medicinal é importante conhecê-la de maneira mais ampla. Dessa forma, o estudo da botânica, a distribuição geográfica, a fitoquímica e a citotoxicidade são essenciais para compreender as espécies vegetais (Santana *et al.*, 2021).

O estudo da toxicidade de um fármaco ou material deve ser realizado em três etapas, sendo a primeira delas a avaliação da citotoxicidade. Na questão da saúde humana, o teste de citotoxicidade *in vitro* é o sistema biológico, em que os materiais têm contato direto com linhagens celulares com o intuito de analisar o seu efeito direto nas células (Santana *et al.*, 2021). Segundo Bretas (2011), a implantação da utilização de linhagens celulares, para avaliação da toxicidade de plantas medicinais, foi uma das maiores evoluções na história do

cultivo celular. E é definido como linhagem celular uma população celular específica proveniente de um subcultivo continuado de uma população primária. Portanto, o cultivo de linhagens celulares pode ser utilizado para obter dados, sob circunstâncias estabelecidas de armazenamento para estudos específicos. A realização dos testes de toxicidade celular propicia os primeiros conhecimentos sobre a segurança das substâncias em análise, mesmo que de maneira preliminar e que nem sempre apresenta correlação com os resultados *in vivo* (Santana *et al.*, 2021). Segundo Bretas (2011) muitos estudos de moléculas com potencial terapêuticos tem o estudo interrompido ainda em fase inicial, em razão da elevada citotoxicidade. Portanto, os testes *in vitro* de citotoxicidade são essenciais para indicar a toxicidade celular inicial (Eisenbrand *et al.*, 2002).

De acordo com Santana *et al.* (2021) os métodos direto e indireto podem ser utilizados para análise da citotoxicidade, o primeiro compreende a contagem celular. O segundo objetiva identificar estruturas celulares ou medir o metabolismo celular para dimensionar a correspondente viabilidade. Um exemplo de forma direta é a contagem de células em câmara de Neubauer, na qual utiliza-se o corante azul de tripan. A técnica fundamenta-se no fato do cromóforo ser negativamente carregado e não interagir com as células a menos que a membrana esteja danificada, por exemplo, em virtude de um extrato ou fármaco testado. Um exemplo do método indireto é o ensaio SRB, em que se utiliza a sulfurodamina B e é um teste colorimétrico que permite quantificar indiretamente o número de células e a proliferação celular. A SRB é um corante aminoxanteno rosa brilhante que possui dois grupos sulfônicos e esses se ligam à resíduos de aminoácidos básicos em condições moderadamente ácidas e se dissociam em condições básicas. A ligação da SRB é estequiométrica e por isso a quantidade de corante extraída das células coradas é diretamente proporcional à quantidade de células viáveis (Vichai e Kirtikara, 2006). Neste trabalho utilizou-se o ensaio SRB nos extratos obtidos das folhas de *J. floribunda* pertencente à família da Asteraceae.

Este estudo foi necessário, uma vez que a Asteraceae é conhecida como uma família que possui espécies citotóxicas (Campos *et al.*, 2015; Pasayeva, *et al.*, 2021), e em um estudo preliminar *J. floribunda* foi identificado tricomas glandulares (Dujak *et al.*, 2010). Os tricomas glandulares é um dos tecidos epidérmicos das plantas medicinais que atuam na síntese, armazenamento e secreção dos metabólitos secundários. A formação dos tricomas glandulares é causada pela necessidade de proteger as plantas de vários fatores bióticos e abióticos incluindo insetos herbívoros, fungos patógenos, luz extensa e altas temperaturas. Eles são encontrados principalmente nas folhas e flores de espécies na família da Asteraceae e têm a característica de sintetizar, modificar e armazenar diversos compostos do metabolismo primário e secundário

incluindo terpenos, flavonoides, alcaloides, glicosídeos, entre outros. (Balckes, 2017). Esses metabólitos secundários possuem diversas atividades farmacológicas como antitumoral, antiviral, atividades antiparasitárias, antitrombóticas e antioxidantes (Frei *et al.*, 2024).

Os tricomas glandulares são conhecidos como ricos em lactonas sesquiterpênicas as quais em muitos estudos, foram relatados atividade anti-inflamatória e citotoxicidade das lactonas (Amorim *et al.*, 2013; Padilla-Gonzalez *et al.*, 2016; Matos *et al.*, 2021; Frei *et al.*, 2024). Estudos realizados por Pasayeva *et al.* (2021) em células cancerígenas utilizando o teste SRB, atribuíram a potente atividade citotóxica dos extratos de espécies do gênero *Cousinia* (Asteraceae) à composição química destes tais como lactonas sesquiterpênicas, terpenos e esteroides. No gênero *Jungia* foram isolados flavonoides, sesquiterpenos, lactonas sesquiterpênicas e cumarinas (Bohlmann *et al.*, 1983; D'Agostino *et al.*, 1995; Azevedo *et al.*, 2016). Poucos trabalhos envolvem o estudo de citotoxicidade do gênero *Jungia* (Azevedo *et al.*, 2016; Vicente *et al.*, 2020) tornando este trabalho inédito para a espécie *J. floribunda*.

2.5 FITOQUÍMICA

A fitoquímica é uma das subáreas mais antigas da Farmácia e desempenha um papel crucial na revelação da composição química de plantas, inclusive àquelas de interesse na medicina popular. A investigação fitoquímica tem por objetivo constatar a presença de grupos de metabólitos secundários e caracterizar os constituintes químicos presentes em espécies vegetais. O método de caracterização química pode ter como alvo a identificação de grupos de metabólitos de uma espécie vegetal cuja composição química é desconhecida, a busca de um grupo específico de metabólitos em uma espécie já caracterizada previamente, direcionando ao isolamento desse metabólito de interesse e a caracterização de sua estrutura (Simões *et al.*, 2017). Para este fim, são utilizadas diferentes técnicas analíticas. Um exemplo de método de separação usualmente utilizado para a purificação de substâncias orgânicas é a cromatografia. A cromatografia é uma ferramenta importante na área de produtos naturais, pois é a base para caracterizar os constituintes presentes em matrizes complexas, como os extratos obtidos de origem vegetal (Simões *et al.*, 2017). A cromatografia pode ser classificada de acordo com o tipo de fase móvel utilizada (cromatografia líquida ou gasosa), de acordo com a fase estacionária (sólida, líquida ou quimicamente ligada), pela forma física do sistema cromatográfico (coluna ou planar) ou pelo mecanismo de separação (troca iônica, exclusão, etc) (Vieira, 1998).

A cromatografia líquida de alta e ultra eficiência (UHPLC e UPLC) são as técnicas analíticas mais utilizadas na área de produtos naturais, especialmente pela amplitude de amostras passíveis de análise por essa metodologia, assim como pela possibilidade de quantificação dos compostos de interesse. A UHPLC utiliza uma fase móvel que é forçada através da coluna com adsorvente de menores tamanhos de partícula, aumentando assim a resolução cromatográfica e reduzindo o tempo de análise. Isso possibilita análises nas fases reversa, em que se utiliza uma fase estacionária mais apolar que a fase móvel, como C18, C8, C4, ou na fase normal, em que se utiliza uma fase estacionária mais polar, como o aminopropil, cianopropil, diol. As análises utilizando a UPLC podem ser realizadas nos modos analítico (quantificações) e preparativo (isolamento) (Lakshmi, 2015).

Um avanço na UHPLC foi alcançado quando esta foi acoplada ao espectrômetro de massa o qual permitiu análises qualitativa e quantitativa com alta detectabilidade e seletividade. A Espectrometria de Massas é uma técnica de alta sensibilidade que permite a análise da composição química de uma certa substância isolada, ou de diferentes substâncias em misturas complexas com baixas concentrações, através da determinação de suas massas moleculares na forma iônica (íons positivos e negativos) conhecida como razão massa/carga (m/z). O espectrômetro de massas é constituído pelos principais módulos: fonte de ionização, analisador de massas e detector (Lanças, 2009).

A ionização é um processo em que um átomo ou molécula converte em um íon (positivo ou negativo). Este processo pode resultar em remoção/adição de um elétron resultando em íons radicais ($M^{+\cdot}$ ou $M^{-\cdot}$); protonação/desprotonação, gerando moléculas protonadas ($[M+H]^+$)/desprotonadas ($[M+H]^-$); e cationização/anionização, que resulta em moléculas cationizadas ($[M+Na]^+$)/anionizadas ($[M+Cl]^-$). Este processo vai depender da fonte ionizadora que poderá ser por *eletrospray* (ESI), ionização química à pressão atmosférica (APCI) e ionização por fótons à pressão atmosférica (APPI). A ESI é a mais utilizada no presente e opera tanto no modo de ionização positivo (modo positivo, ESI+) quanto no modo de ionização negativo (modo negativo, ESI-). No modo positivo a ionização é mais eficiente para substâncias básicas tais como compostos nitrogenados básicos, sulfóxidos e o modo negativo para substâncias ácidas que possuem grupos tais como os ácidos carboxílicos, fenóis, sulfatos, éster, nitrogenados neutros, etc. (Lanças, 2009; Rainville *et al.*, 2014, Demarque *et al.*, 2016). Na ESI uma solução contendo as moléculas da amostra é borrifada na ponta de um tubo capilar fino para dentro de uma câmara aquecida, sob pressão quase atmosférica. O tubo capilar pelo qual a solução da amostra passa tem um potencial de alta voltagem em sua superfície, e pequenas gotículas carregadas são expulsas para dentro da câmara de ionização. O processo de ionização

envolve três grandes etapas: 1) a produção da gota carregada na ponta do capilar, 2) a dessolvatação da gota carregada seguida de repetidas desintegrações para a formação de gotas menores e, 3) a formação dos íons na fase gasosa. Depois que a amostra é ionizada o feixe de elétrons é acelerado por diferença de potencial e, então entra no analisador de massa onde os íons são separados de acordo com suas razões/carga (m/z) (Pavia *et al.*, 2010). O desenvolvimento da ionização por electrospray (ESI) permite analisar compostos termolábeis e de alto peso molecular a serem ionizados e transferidos para a fase gasosa, desenvolvendo aplicações em biologia, medicina e metabolômica vegetal (Demarque *et al.*, 2016).

O analisador de massas é outro módulo importante no espectrômetro de massas. Ele tem a função de separar os íons e direcioná-los ao detector de acordo com os seus valores de m/z . No analisador do tipo tempo de voo (TOF) os íons são acelerados por meio de um potencial (V) e podem "flutuar" por um tubo até um detector. Este analisador faz uso da propriedade do tempo em que os íons de diferentes razões massa/carga (m/z) terão diferentes velocidades (Silverstein *et al.*, 2005). O TOF é de alta resolução sendo possível distinguir os íons com precisão superior a quatro unidades de massa atômica, o que permite a determinação da fórmula molecular exata do analito (Wonfender, 2009). No analisador do tipo quadrupolo, este é constituído de 4 hastes, usualmente feitas de metal. Os pares opostos das hastes estão conectados eletricamente e uma voltagem com radiofrequência de 180° fora de fase é aplicada entre eles. Em um valor específico de voltagem, íons de uma determinada razão m/z atravessam o quadrupolo descrevendo uma trajetória estável. As trajetórias dos íons são dependentes do campo elétrico produzido. Assim, os íons de determinadas m/z possuirão uma trajetória estável e chegarão ao detector e vão gerar o espectro de massas. Os íons detectados são diferenciados por uma única unidade de massa atômica (Chiriardia *et al.*, 2008; Simões *et al.*, 2017).

O detector é o ultimo componente de um espectrômetro de massas. Ele registra a carga induzida ou a corrente produzida quando um íon atravessa uma superfície ou atinge sua superfície. O sinal registrado no detector durante uma varredura em função da razão m/z ou posição do íon na varredura, irá originar um espectro de massas. Assim, um espectro de massas é um registro dos íons detectados em função da razão m/z (Lanças, 2009). Ao considerarmos o espectro de massas de um composto, este irá apresentar informações únicas como sua massa molecular e seus padrões de fragmentação. Esses dados permitem estabelecer a fórmula molecular desta substância pelo valor de massa obtido, enquanto o padrão de fragmentação permite obter informações referentes aos grupos funcionais, radicais substituintes e presença ou ausência de cadeias laterais na substância pesquisada (Demarque *et al.*, 2016).

A Cromatografia Gasosa (CG) é de maneira geral, uma técnica empregada para separação e análise de misturas cujos constituintes tenham ponto de ebulição de até 300°C e que sejam termicamente estáveis. É a metodologia de escolha para separar e quantificar substâncias componentes de óleos voláteis. A identificação dos compostos individuais pode ser realizada pela comparação do tempo de retenção, t_R , da amostra com padrões, adquirido por injeção em colunas capilares. Assim, tem-se o índice do Kovats (KI) que relaciona o tempo de retenção dos compostos ao tempo de retenção de uma série de hidrocarbonetos homólogos (Adams, 2017). A CG acoplada à espectrometria de massas permite a separação dos componentes do óleo volátil e fornece um espectro de massa para cada tipo. O espectro de massas indica a massa molecular e o padrão de fragmentação. Esse padrão de fragmentação pode ser comparado com fragmentos de substâncias constantes em um banco de dados computacional. Deste modo, o espectro da amostra é comparado com os das substâncias do banco de dados e se faz propostas de probabilidade quanto à relação da substância analisada (Adams, 2017; Simões *et al.*, 2017).

2.6 METABOLÔMICA

A metabolômica tem desempenhado um papel importante em várias áreas das ciências vegetais, oferecendo novos aspectos para o avanço da agricultura, descoberta de medicamentos, ecologia química e taxonomia. A análise metabolômica das plantas (identificação e quantificação) pode ser utilizada para compreender a relação entre os sistemas biológicos e os estímulos genéticos, patológicos e ou ambientais em termos de expressão diferencial do metabolismo. Estes estudos demandam habilidades multidisciplinares envolvendo biologia, química, estatística e ciência da computação para a extração e compreensão completa das informações (Canuto, 2018).

A metabolômica tem sido descrita como o estudo da totalidade das pequenas moléculas endógenas presentes dentro um organismo, órgão, tecido biológico ou célula (Fiehn, 2002). Devido à diversidade de classes de metabólitos, uma série de diferentes técnicas analíticas de química são necessárias para amostrar este espaço físico-químico, uma vez que nenhuma técnica analítica isolada é capaz de capturar todo o metaboloma. As três tecnologias mais utilizadas são: cromatografia líquida-espectrometria de massa, cromatografia gasosa-espectrometria de massa e ressonância magnética nuclear. Os dados produzidos a partir de cada método analítico requer diferentes ferramentas de análise de dados e fluxos de trabalho. Dentro

deste contexto para o estudo da metabolômica houve o desenvolvimento de muitas ferramentas de software (Spicer *et al.*, 2017).

O fragmentador *in silico* MetFrag, lançado em 2010 e licenciado pela GNU Lesser General, é um software que busca em banco de dados compostos e previsão de fragmentação para identificação de pequenas moléculas a partir de dados de espectrometria de massa (Spicer *et al.*, 2017). O fluxo de trabalho começa pela recuperação de estruturas candidatas a partir da base de dados de compostos PubChem, ChemSpider, HMDB (Wishart *et al.*, 2013), KEGG (Kanehisa *et al.*, 2004), ou aceitando o *upload* de um arquivo de dados de estrutura (SDF) contendo candidatos. Primeiro, realiza-se uma pesquisa em um banco de dados de moléculas candidatas com base na massa exata (dentro de uma faixa de erro dada em ppm) da molécula neutra e intacta. Em seguida o MetFrag gera todos os fragmentos topológicos possíveis de um composto candidato a fim de corresponder a massa do fragmento com os picos medidos (Wolf *et al.*, 2010). Os candidatos são então fragmentados utilizando uma abordagem de dissociação de ligação e esses fragmentos são comparados com os íons de produto no espectro de massa medido para determinar quais candidatos melhor explicam os dados medidos. A pontuação calculada [0-1] é uma função da relação massa para carga (m/z), intensidade e energia de dissociação de ligação (BDE) dos picos combinados, fornecendo indicações sobre a qualidade da atribuição do espectro candidato (Ruttkies *et al.*, 2016).

GNPS é uma plataforma baseada em dados para o armazenamento, análise e disseminação de espectros MS / MS. Ela permite o compartilhamento pela comunidade de espectros brutos, contínuos, desrepliação de dados depositados e curadoria colaborativa de espectros de referência (referidos como bibliotecas espectrais) e dados experimentais (organizados como conjuntos de dados). GNPS fornece a capacidade de analisar um conjunto de dados e compará-lo a todos os dados publicamente disponíveis. Sua infraestrutura de análise permite a desrepliação online e análise automatizada de rede molecular. Cada uma das dezenas de milhões de espectros em conjuntos de dados do GNPS são combinados com bibliotecas espectrais de referência para anotar moléculas e descobrir análogos putativos. Estas bibliotecas espectrais MS/MS disponíveis para produtos naturais e moléculas de outras fontes, incluem MassBank, Respect e NIST (Wang *et al.*, 2016).

As redes moleculares no GNPS são exibições visuais do espaço químico presente em experimentos de MS e são construídas a partir do alinhamento de espectros MS / MS entre si. As bordas (linhas) que conectam os nós (espectros MS / MS) são definidas por um esquema de pontuação (cosseno) que determina a similaridade de dois espectros MS / MS com pontuações variando de 0 (totalmente diferente) a 1 (completamente idêntico). Um nó corresponde a uma

fusão matemática de espectros MS/MS com a massa do precursor e padrões de pico quase idênticos, e é normalmente rotulado com a massa do precursor. As redes são visualizadas online no navegador ou exportadas para software de visualização como o Cytoscape (Shannon *et al.*, 2003).

O MASSBANK é um banco de dados público de dados espectrais de massa analisados sob condições experimentais não padronizadas. O seu repositório contém dados analisados com uma ampla gama de métodos de espectrometria de massa. A pesquisa espectral realizada pelo MASSBANK recupera dados MSn idênticos ou semelhantes aos dados da consulta. Os resultados da pesquisa são produzidos na ordem da pontuação de similaridade junto com o número de íons de produtos idênticos. O MassBank (<https://massbank.eu/MassBank/>) atualmente adota o algoritmo de busca de banco de dados que calcula a pontuação de similaridade com base em uma correlação de cosseno proposta por Stein e Scott (1994). A intensidade do pico é ponderada por um fator, W_i , da seguinte maneira:

$$W_i = [\text{intensidade do pico}_i]^m [\text{m/z do pico}]^n$$

Onde $n = 3$ e $m = 0,6$ foram determinados empiricamente analisando cerca de 12.000 dados EI-MS de 8.000 compostos orgânicos na biblioteca espectral de massa NIST. O programa apresenta duas ferramentas para pesquisar compostos químicos em seu repositório: pesquisa rápida e pesquisa de subestrutura. A pesquisa rápida recupera compostos químicos pelo nome químico, fórmula química, razão m/z e valores de intensidade relativa. Os resultados da pesquisa mostram os compostos químicos com seus nomes químicos, dados espectrais e estrutura química. A pesquisa de subestrutura recupera compostos químicos que contenham uma subestrutura química especificada como parte de sua estrutura química. Para obter resultados de pesquisa adequados deve-se especificar as condições de pesquisa como a tolerância de erro experimental no valor m/z , o limite de corte para picos de menor intensidade, o íon precursor pelo valor m/z , o tipo de instrumento idêntico ou que produza espectro de massa semelhante ao da consulta e modo de ionização semelhante (Horai *et al.*, 2010).

3 JUSTIFICATIVA

As plantas medicinais são amplamente consideradas como um recurso acessível no tratamento de doenças por muitas pessoas em várias partes do mundo e com a expectativa de cura para diversas enfermidades. Há muitos séculos tem-se utilizado as plantas no tratamento de doenças, os índios iniciaram o uso por meio de observações das rotinas desenvolvidas pelos animais frente a algum problema em seu organismo, por exemplo, a ingestão de raízes e folhas para combater problemas gastrointestinais; eles também notavam o rigor físico e a rapidez de outros animais que comiam algumas sementes e cascas de árvores, associando-as como estimulante, entre vários outros hábitos observados.

O poder medicinal foi sendo encontrado e associado às plantas com o passar do tempo e essas informações foram guardadas por muitos anos passando de geração para geração. Assim, surgiram pessoas que possuíam e passavam informações sobre plantas medicinais, incluindo suas formas de preparo e suas propriedades farmacológicas, os chamados raizeiros. Eles são considerados fontes de conhecimento essencial para a identificação de plantas raras e desempenham um papel fundamental na pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos.

Os produtos naturais possuem uma ampla diversidade de estruturas e funções, e tradicionalmente fornecem inspiração substancial para pesquisa de desenvolvimento de medicamentos. Uma quantidade de plantas tradicionalmente usadas exibe propriedades farmacológicas de grande potencial em aplicações terapêuticas. O processo que leva de uma planta até a descoberta de um composto bioativo inclui a seleção da planta para investigação.

As plantas podem ser selecionadas para triagem com base em informações etnofarmacológicas. Dados da literatura revelam que é muito mais provável encontrar atividade biológica em plantas orientadas pelo seu uso na medicina popular do que em plantas escolhidas ao acaso. Cerca de 75% dos compostos puros naturais empregados na indústria farmacêutica foram isolados seguindo recomendações da medicina popular (Filho e Yunes, 1998).

A família Asteraceae (Compositae), composta por cerca de 23.000 espécies distribuídas pelo mundo, é rica em uma variedade de constituintes químicos biologicamente ativos (Degen de Arrúa e González, 2014). Os metabólitos secundários das espécies podem ser considerados como materiais iniciais promissores para novas descobertas farmacêuticas, devido ao seu potencial farmacológico e anti-inflamatório (Lajter, 2015), o que justifica investigar a composição química dos constituintes da espécie e realizar testes *in vitro* e *in vivo* para avaliar a atividade anti-inflamatória de *J. floribunda* Less. (Asteraceae).

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a atividade anti-inflamatória e composição química de *J. floribunda*.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Obter o perfil químico do óleo essencial das folhas de *J. floribunda* por cromatografia gasosa;
- b) Identificar os diferentes compostos no perfil cromatográfico dos extratos através dos softwares Compass Data Analysis da Bruker, MetFrag e o GNPS;
- c) Comparar os fragmentos das possíveis estruturas no MetFrag e GNPS com os compostos químicos identificados na literatura do gênero *Jungia*, da tribo Mutisieae e na família Asteraceae;
- d) Investigar mecanismos de ação anti-inflamatórios, tais como inibição da enzima elastase;
- e) Avaliar o potencial anti-inflamatório *in vivo* da aplicação tópica dos extratos das folhas de *J. floribunda*: infuso, extrato de lavagem foliar (EF), extrato foliar livre de tricomas glandulares (LF) (extrato hidroetanólico), óleo essencial;
- f) Avaliar citotoxicidade *in vitro* dos extratos.

5 METODOLOGIA

5.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

J. floribunda foi coletada no ano de 2018 no mês de Junho na cidade de Inconfidentes, MG, Brasil; coordenadas geográficas: latitude 22°19'27,95 "S, longitude 46°19'44,84" W, altitude 894,00 m. Um espécime foi depositado no herbário da Universidade Federal de Alfenas sob o número 3106 e um registro foi realizado no SisGen sob o número A7A55E. A planta (FIGURA 1) foi identificada pelo Biólogo José Carlos Bueno sob o registro CRBio MG70266.

5.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

5.2.1 Extrato aquoso (Infuso)

O infuso foi preparado com 200 mL de água destilada em ebulição, os quais foram vertidos em 8 gramas de folha seca pulverizada. O recipiente foi então fechado e deixado em repouso por 20 min. Posteriormente, o material foi filtrado em papel filtro comum, seguido de congelamento a -20°C e liofilização em Lyophilizer LJJ04 Scientific.

5.2.2 Extrato de Lavagem Foliar

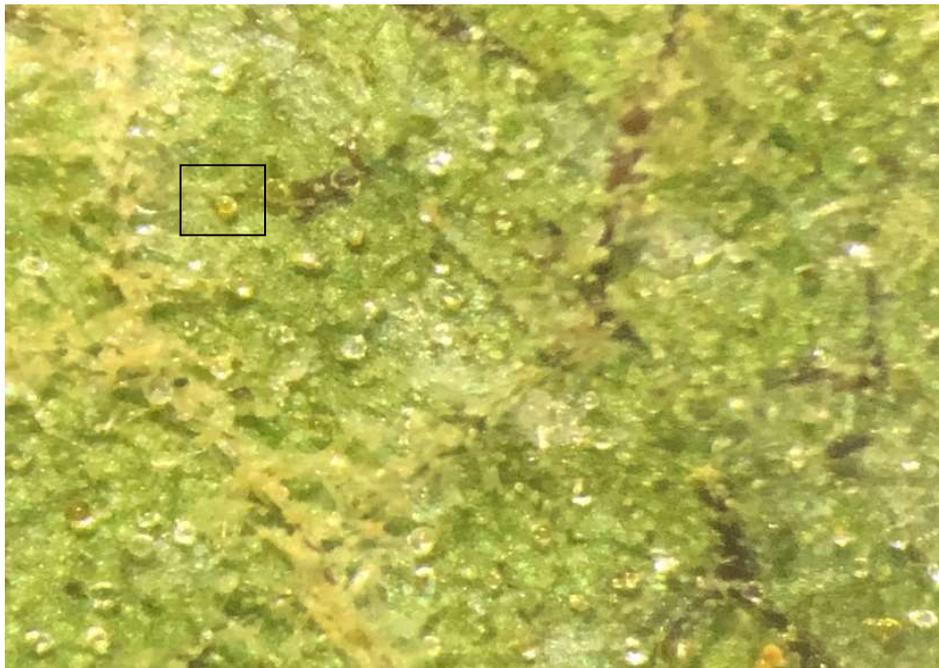
Para a obtenção do extrato de lavagem foliar contendo tricomas glandulares (FIGURA 3) foram seguidos os procedimentos de Chagas-Paula (2010) através da lavagem de cada folha seca, cerca de 155,5 gramas de folhas, com acetona PA por cerca de 20 segundos com o objetivo de remover substâncias encontradas nos tricomas glandulares os quais estavam localizados na superfície das folhas, na face abaxial (FIGURA 4). O extrato obtido foi filtrado utilizando papel de filtro comum e o solvente evaporado em rotaevaporador, resultando em um extrato seco de cor mel.

5.2.3 Extrato Hidroetanólico

O extrato hidroetanólico foi preparado utilizando as folhas lavadas do processo anterior (5.2.2). Estas foram secas e em seguida pulverizadas. Foram obtidos cerca de 155,5 g de pó o qual foi adicionado 1,5 L de etanol-água 7:3 v/v e submetidas ao processo de maceração

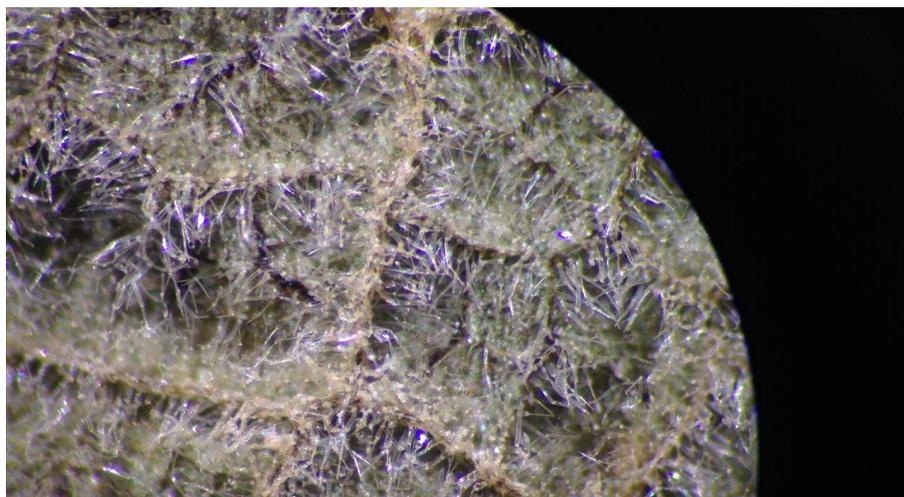
por 24 horas, posteriormente o extrato foi filtrado e concentrado em um rotaevaporador. Esse processo foi repetido por mais duas vezes, com adição de etanol-água, filtragem e rotaevaporação por 24 horas. O extrato hidroetanólico bruto foi rotaevaporado, congelado, posteriormente liofilizado e armazenado a -20°C até o momento do uso.

Figura 3 - Tricomas glandulares identificados em estereomicroscópio ZEISS
STEM i305.



Fonte: Do autor. Aumento de 20X e 40X, de cima para baixo. Imagem da parte abaxial da folha antes da lavagem com acetona.

Figura 4 - Folha sem tricomas glandulares identificados em estereomicroscópio.



Fonte: Do autor. Aumento 40X. Imagem da parte abaxial da folha após a lavagem com acetona.

5.3 INSTRUMENTO E METODOLOGIA DE ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL

O óleo essencial de *J. floribunda* foi obtido por hidrodestilação (FIGURA 5), durante 3 horas. Foram utilizadas 280 gramas de folhas frescas, resultando em cerca de 0,1mL de óleo essencial. Para uso posterior, o óleo essencial foi armazenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento das análises. Para a análise em CG-EM utilizou-se um cromatógrafo a gás Shimadzu GC-17A conectado a um espectrômetro de massas MS-QP-5050A, com injetor automático split (Shimadzu AOC-20i), coluna capilar RtX-5 (5% phenyl, 95% polydimethylsiloxane, 30 m X 0,32 mm X 0,25 μm ; Restek, Bellefonte, PA, USA) e o tratamento de dados foi através do software GC-MS Solution. Esta análise foi realizada injetando 1,0 μL da amostra, a uma temperatura de $225\text{ }^{\circ}\text{C}$, modo Split, split ratio, 50:1; a temperatura da interface foi de $250\text{ }^{\circ}\text{C}$, sendo Hélio o gás carregador utilizado com uma velocidade de 46,1 cm/s linear e pressão de 99.3 KPa; temperatura do detector foi de $240\text{ }^{\circ}\text{C}$, operando com o seguinte programa de temperatura do forno: $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ mantida durante 2 minutos, elevando-se a $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até $240\text{ }^{\circ}\text{C}$, mantida durante 5 min. A temperatura da fonte foi de $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ e a temperatura da interface de $250\text{ }^{\circ}\text{C}$. As análises em EI-MS foram conduzidas sob uma voltagem de 70 eV e a temperatura da fonte ionizadora foi de $200\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Figura 5 - Extração do óleo essencial de
J. floribunda Less.



Fonte: Do autor.

As identificações das substâncias majoritárias correspondentes aos picos foram determinadas considerando uma área maior que 2% no cromatograma, o índice de Kovats (KI) calculados com base na equação abaixo, dados da literatura de Adams (2017) e espectros de massa do software MASSBANK com uma pontuação acima de 80%. A comparação dos índices de Kovats calculados com a literatura foi utilizada para auxiliar na identificação. O software MASSBANK (Horai *et al.*, 2010) e achados da literatura do gênero *Jungia* foram utilizados como ferramentas auxiliares na identificação das substâncias.

$$IK = \{ (Tr_x - Tr_{C_{n-1}}) \cdot (C_n - C_{n-1}) \cdot 100 / (Tr_x - Tr_{C_{n-1}}) \} + 100 \cdot C_{n-1}$$

Equação de Van Den Dool e Kratz (1963)

Onde TR é o tempo de retenção e n é o número de átomos de carbonos

- C_n = número de carbonos do n-alcano que elui após a substância analisada
- C_{n-1} = número de carbonos do n-alcano que elui antes da substância analisada
- Tr_x = tempo de retenção da substância analisada
- $Tr_{C_{n-1}}$ = tempo de retenção do n-alcano que elui antes da substância analisada

5.4 INFLAMAÇÃO

5.4.1 Elastase *in vitro*

5.4.1.1 Materiais

A elastase de pâncreas suíno (E.C 3.4.21.36, ≥ 4 U / mg) e N-Succinil-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilida e (-) galato de epigalocatequina foram adquiridos de Sigma Aldrich.

Neste trabalho adotamos a Elastase Pancreática Suína (PPE) como modelo estrutural pela sua alta homologia com a elastase neutrófila humana (HNE), principalmente no sítio ativo (Gerace, *et al.*, 2023). Os procedimentos para a realização do teste são apresentados abaixo (5.4.1.2).

5.4.1.2 Medidas Cinéticas Na_3PO_4 (50 mM, pH 8)

Para medir os parâmetros de inibição, a elastase (concentrações finais de 10 μg / mL) foi incubada com o infuso em concentrações crescentes (as concentrações finais foram 15, 30, 60, 120 e 240 μg) em um volume final de 1 mL utilizando tampão de fosfato de sódio Na_3PO_4 (50 mM, pH 8) 25°C. Após 30 minutos, a reação foi iniciada com a adição do substrato cromogênico N-Succinil-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilida (concentração final de 20 mM). A hidrólise de substratos cromogênicos por 5 minutos foi monitorada em um comprimento de onda de 410 nm usando um espectrofotômetro V-M5 Bel Photonics. (-) Galato de epigalocatequina foi utilizado como controle positivo e tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 8 como controle negativo. Valores IC_{50} , concentração do extrato que inibe 50% da atividade da enzima, foram determinados a partir de gráficos de porcentagem de inibição versus log da concentração do inibidor e calculados por regressão não linear utilizando o programa Grafit (Leatherbarrow, 1992). A porcentagem de inibição foi calculada como:

$$\% \text{ de inibição} = (| \text{Controle de Abs} - \text{Extratos de Abs} | / \text{Controle de Abs}) \times 100\%.$$

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os dados foram apresentados como média \pm erro médio padrão.

Para o ensaio utilizando o extrato de lavagem foliar rico em lactonas sesquiterpênicas, a elastase (concentrações finais de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi incubada com o extrato em concentrações

finais de 3,3, 7,5, 13,0, 26,0, 52,0 $\mu\text{g/mL}$. A solução estoque foi preparada utilizando 1,3 mg de extrato de lavagem foliar em 1,0 mL de DMSO. Ao substrato N-Succinil-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilida foram adicionados 20 μl de DMSO. Os mesmos procedimentos descritos acima para análise do infuso foram seguidos. Utilizou-se concentrações menores do extrato de lavagem foliar no DMSO porque a solução se precipita em concentrações maiores ao adicionar Na_3PO_4 .

No ensaio para o extrato livre de tricomas glandulares (hidroetanólico), a elastase (concentrações finais de 10 $\mu\text{g/mL}$) foi incubada com o extrato em concentrações finais de 2,0, 10,0, 20,0, 100,0, 200,0 $\mu\text{g/mL}$. A solução estoque foi preparada utilizando 2,0 mg de extrato em 1,0 mL de etanol. Ao substrato N-Succinil-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilida foi adicionado 20 μl de etanol. Os mesmos procedimentos descritos acima para análise do infuso foram seguidos.

5.4.2 Edema de Orelha

Os animais foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo da UNIFAL-MG e mantidos com temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) em ciclos claro-escuro de 12 horas, com água e ração *ad libitum*. Foram utilizados camundongos albinos Swiss machos, adultos (25-35 g) aclimatados às condições do laboratório, sendo agrupados em grupos de 10 animais, conforme descrito no projeto aprovado pelo comitê de ética (Processo CEUA 013/2019).

O teste para avaliar a atividade anti-inflamatória *in vivo* de edema de orelha foi realizado conforme a metodologia revisada por Tubaro *et al.*, (1986). A inflamação cutânea foi induzida na orelha esquerda dos camundongos (n=10) pela aplicação tópica, através de uma pipeta, de 20 μL da solução irritante de óleo de cróton (5% v/v) dissolvida em acetona. Na orelha direita foi aplicada somente a acetona. Trinta minutos após a aplicação do óleo de cróton, foi realizado tratamento tópico com os extratos brutos na dose de 0,5 mg/orelha. O grupo controle negativo recebeu a aplicação do veículo (acetona); os controles positivos foram a dexametasona (0,5 mg/orelha) e indometacina (0,5 mg/orelha). Todas as amostras foram dissolvidas no mesmo veículo: solução 20% (v / v) de água em glicerina. Após 6 horas da indução da inflamação, os animais foram eutanasiados, por inalação de isoflurano. Para tal, um algodão embebido em isoflurano foi colocado em ambiente hermeticamente fechado com os animais, porém sem contato direto com os mesmos. Utilizou-se um *punch* para a retirada de um fragmento (6 mm) de ambas as orelhas. A avaliação do edema foi verificada pela diferença de peso entre os fragmentos da orelha esquerda e direita analisados por ANOVA one-way seguido do teste de comparação múltipla de Dunnett e expressos como média \pm erro médio padrão (EMP). O

programa utilizado para a análise dos dados foi GraphPad Prism Versão 6.0. As porcentagens de inibição do edema foram calculadas de acordo com a seguinte equação:

$$\%Inibição\ de\ edema = \frac{Valormédiodogrupoveículo - valormédiodogrupotratado}{Valormédiodogrupoveículo} * 100$$

5.5 CITOTOXICIDADE

Os testes *in vitro* descritos abaixo tem o objetivo de avaliar os efeitos de extratos vegetais em linhagens celulares derivados de pele humana saudável (fibroblasto).

5.5.1 Cultura de CCD1059SK

As células da linhagem CCD1059SK foram cultivadas em meio completo (DMEM contendo 5mM de bicarbonato de sódio e 10% de soro fetal bovino – SFB) a 37°C em estufa umidificada com 5% de CO₂. O meio de cultura foi renovado a cada 2 dias e as culturas foram subcultivadas na confluência de aproximadamente 80%. Para isso, o meio foi retirado e as células aderidas foram lavadas com tampão fosfato (*Phosphate Buffered Saline* – PBS). eEm seguida as células foram incubadas com 1 mL de tripsina, por no máximo 5 min. Após a ação da tripsina, esta foi inativada com meio de cultura suplementado com SFB e a suspensão de células foi dividida conforme a concentração de células para cada experimento.

5.5.2 Ensaio de viabilidade celular – Sulforodamina B

A viabilidade foi avaliada através do ensaio colorimétrico de sulforodamina B (SRB), esse ensaio se baseia na capacidade de ligação da SRB a componentes proteicos das células fixadas por ácido tricloroacético (TCA) em placas de cultura. A ligação da SRB é estequiométrica e por isso a quantidade de corante extraída das células coradas é diretamente proporcional à quantidade de células viáveis (Vichai e Kirtikara, 2006) . Para a análise da viabilidade celular usando a SRB, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços na densidade de 5x10³ células por poço. Após 24h de plaqueamento foi adicionado o tratamento com os extratos nas concentrações de 2,5; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0;100,0; 200,0 e 400,0 µg/mL e mantidos por 24 e 48h. Após o tempo final de tratamento, as células foram fixadas com TCA 15% por 1h a 4°C. Posteriormente as células foram lavadas com água MiliQ e deixadas secar em temperatura ambiente. Após a secagem da placa, foi realizada a coloração, usando 100 µL de SRB 0,4% por 1h em temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Em seguida, a placa foi lavada com ácido acético 1% para remover todo resíduo de SRB e então deixada secar à temperatura

ambiente. Depois disso, adicionou-se Tris Base 10mM (pH 10.5) para solubilização da SRB por 30 min ao abrigo de luz. Em seguida, a densidade óptica foi mensurada em espectrofotômetro (Asys UVM 340) a 540 nm com subtração de reação de fundo a 690 nm. A viabilidade celular foi expressa em porcentagens em relação ao controle (células não tratadas). A média \pm desvio padrão foi calculada a partir de experimentos em triplicata e curvas dose-respostas foram construídas dos extratos utilizando o programa GraphPad Prism® versão 6.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

$\% \text{ células} = (\text{absorbância do teste} \times 100) / \text{absorbância do controle}$

5.6 ANÁLISE DOS EXTRATOS POR UHPLC – ESI - HRMS

Os extratos foram analisados em cromatografia líquida ultra-eficiente acoplada a um espectrômetro de massa de alta resolução com sistema ESI-QTOF. (UHPLC-ESI-HRMS; Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). As amostras e o branco foram analisados nos modos positivo e negativo. Utilizou-se um analisador do tipo tempo de voo. A análise foi realizada usando cromatografia em coluna ultra-analítica de 2,2 μm de diâmetro de partícula (C18- 100 mm \times 2,1 mm; Acclain TM RSLC 120), uma taxa de fluxo de 400 $\mu\text{L} / \text{min}$ de um gradiente de acetonitrila e água (MeCN / água). Ambas as fases foram acidificadas com 0,1% de ácido fórmico e 0,025% de hidróxido de amônio, gradiente de 5-99% de MeCN em 15 min, 99% de acetonitrila até 17,5 min, 99-5% de acetonitrila até 17,6 min e 5% de acetonitrila até 20 min. A temperatura da coluna permaneceu controlada a 30 °C (Salem, 2020).

Os parâmetros do MS foram o padrão de equipamento compacto QTOF. Modo negativo/positivo: fonte capilar 2509 nA; carga máxima automática MSMS 50; carregamento min automático MSMS 5; energia de colisão -10,0 eV / 8eV; taxa de fluxo de fornecimento de gás de colisão 35,0%; detector TOF Tune Fator de intensidade de íon único interno 3,5; temperatura de referência do dispositivo 35,409 °C, temperatura2 35,046 °C; gradiente (s) de temperatura do dispositivo para calibrador (es) aprimorado (s) 84,0; -23,0 ppm/°C; tempo de aquisição do digitalizador 328 ms/245 ms; resolução do digitalizador de 10 bits; temperatura do digitalizador 44,0°C / 43 °C; fonte de gás seco 10.0 L / min; fonte de aquecedor seco 200 °C; Fonte da placa final 696 nA / 1019 nA; polaridade externa negativo/positivo; largura dos pulsos de extração 5,0 μs ; vácuo 2,30e + 000 mBar; processamento médio estimado 100; processamento de ruído estimado 200, alto vácuo 6,19e-007 mBar; intensidade para controle do fator de soma para MSMS 5000, 200000 cts; modo de polaridade de íons negativo; massa de isolamento MSMS 80,0; fonte nanoBooster 1,70 Bar; fonte do nebulizador 1,7 Bar; número

do pré-cursor automático MSMS 5; digitalizador de taxa de amostragem 0,20 ns; Salvar espectros de linha apenas de aquisição; Scan 50 - 1850 m/z ; calibragem MassList de referência usada no formato Na (neg); digitalizador de deslocamento vertical 206,07 mV; digitalizador de alcance vertical 316 mV; digitalizador de comprimento de forma de onda 278592 pontos; lista de precursores programado Time Slice automático MSMS 1 seg; fonte capilar 2800 V / 4500V; saída capilar TRANSFER -150,0 V / 148,0V; tensão de carga 2000 V; célula de colisão -20,0 V / 20V; célula de colisão em -290,0 V / 290V; célula de colisão RF 2500,0 Vpp; energia de colisão (Apenas MS) -10,0 eV / 8eV; energia de colisão para MS / MS bbCID MSMS -20 / (10,0 / 70) eV; Fonte de gás seco 10,0 L / min; fonte de aquecedor seco 200 ° C; desvio padrão de calibração TOF1 em Calibração PPM 0.9 / 1.9 (Salem, 2020).

5.6.1 Tratamento de Dados

A Desrepliação dos extratos foi realizada utilizando os softwares Compass Data Analysis da Bruker e MetFrag (Wolf *et al.*, 2010; Ruttkies *et al.*, 2016). Também utilizou-se a plataforma online GNPS (Yang *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2016). Para reforçar a confiabilidade das anotações, foi utilizado um banco de dados interno contendo compostos químicos previamente isolados e descritos no gênero *Jungia* e na família Asteraceae (Bohlmann *et al.*, 1983; Bohlmann, *et al.*, 1984; D'Agostino *et al.*, 1995; Riscala *et al.*, 2000).

O software DataAnalysis da empresa Bruker foi usado para processamento de dados para obter arquivos de dados prontos para uso em uma pesquisa de banco de dados. Tem-se os seguintes traços do cromatograma: Cromatograma de Pico de Base (BPC) que fornece uma visão geral da separação cromatográfica (larguras do pico, perfil de eluição). Cromatograma de íon total (TIC) para todos os MS. O TIC de todos MS fornece uma visão geral da estabilidade do spray e do desempenho do MS.

No MetFrag foram utilizados os seguintes parâmetros: tolerância de erro até 10 ppm, massa neutra exata, utilização da base de dados KEGG, o número de picos medidos e uma pontuação [0-1]. A pontuação representa o nível de similaridade [0-1] do espectro em estudo com os da base de dados do MetFrag. Os parâmetros utilizados no programa da Bruker incluíram uma tolerância de erro de massa de até 2 mDa, mSigma de 0 a 20 como confiável, 20 a 30 como razoável e acima de 50 descartável. Para a proposta das estruturas neste trabalho utilizando o software da Bruker foi considerado um mSigma de até 20. A Desrepliação dos compostos realizada pelo MetFrag teve como objetivo a comparação com as estruturas anotadas pelo GNPS e com o banco de dados interno visando identificar estruturas semelhantes.

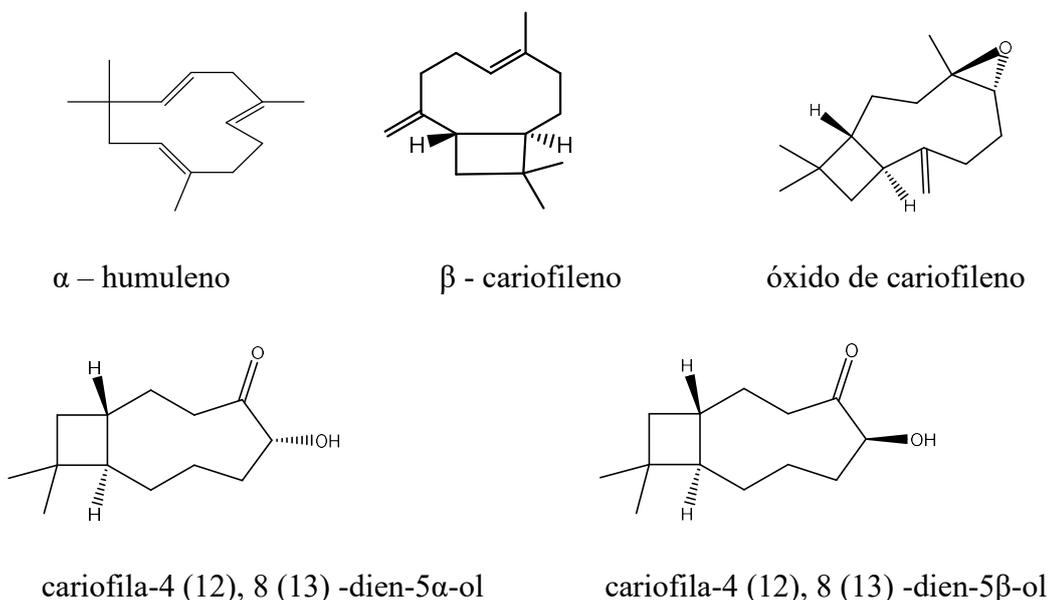
Para o GNPS, os dados da Bruker foram convertidos para o formato mzXML, um formato baseado em texto usado para representar dados de espectrometria de massa descrevendo o número de varredura, o precursor m/z , a razão m/z e a intensidade de cada íon observado em MS, utilizando o msconvert. Uma rede molecular foi criada utilizando o trabalho online (<https://ccms-ucsd.github.io/GNPSDocumentation/>) no site do GNPS. A tolerância de massa do íon precursor foi fixada em 2,0 Da enquanto a tolerância do íon fragmento MS foi definida como 0,5 Da. Uma rede foi então criada onde as arestas foram filtradas para ter uma pontuação de cosseno acima de 0,7 e mais de 6 picos correspondentes. Ressalta-se que o cosseno determina a similaridade de dois espectros MS com pontuações variando de 0 (totalmente diferente) a 1 (completamente idêntico) (Yang *et al.*, 2013). Os espectros na rede foram pesquisados nas bibliotecas espectrais do GNPS. Todas as correspondências mantidas entre os espectros da rede e os espectros da biblioteca tiveram uma pontuação acima de 0,7 e pelo menos 6 picos correspondentes (Wang *et al.*, 2016). Considerando que no GNPS a qualidade da Biblioteca é representada por ouro, prata e bronze, sendo os espectros de referência de ouro aqueles derivados de compostos sintéticos ou purificados estruturalmente e caracterizados. Os espectros de referência de prata são aqueles apoiados por uma publicação associada, e os espectros de referência de bronze compreendem todas as anotações potenciais restantes (Wang *et al.*, 2016).

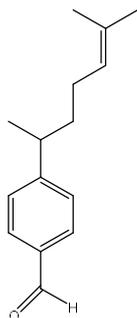
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 ANÁLISE DOS COMPONENTES DO ÓLEO ESSENCIAL DE ANÁLISE DOS COMPONENTES DO ÓLEO ESSENCIAL DE *J. floribunda*

As substâncias identificadas no óleo essencial de *J. floribunda* puderam ser determinadas (TABELA 1) considerando o Índice de Kovats (IK) da literatura (Adams, 2017), o banco de dados MASSBANK e dados descritos nos óleos essenciais do gênero *Jungia*. As substâncias em comum (β -cariofileno, α -humuleno, óxido de cariofileno, cariofila-4(12), 8(13)-dien-5 α -ol) para cada método de identificação estão em negrito. As possíveis estruturas químicas propostas em *J. floribunda* estão descritas na Figura 6. Algumas delas são sesquiterpenos que foram também descritas nos óleos essenciais de *J. polita*, *J. paniculata* e *J. rugosa*. Os principais componentes identificados na desreplicação dos óleos essenciais de *J. paniculata* (Ruiz *et al.*, 2015) foram óxido de cariofileno (36,49%), β -cariofileno (35,91%), α -humuleno (5,82%), D-limomeno (7,18%), ar-curcumeno (3,85%). Em *J. polita* (Duschatzky *et al.*, 2005) foram óxido de cariofileno (9,18%) e β -cariofileno (8,13%). Uma análise do óleo essencial de *J. rugosa* (Calvopinã *et al.*, 2021) apresentou como principais componentes ar-curcumeno (3,4%) e γ -curcumeno (47,1%). Neste trabalho foi proposta a estrutura ar-curcumeno-15-al (3,12%) para *J. floribunda* com base no IK da literatura (Adams, 2017). Nota-se que o ar-curcumeno foi identificado em *J. rugosa* e *J. paniculata*, sugerindo a possibilidade de essa estrutura estar presente no óleo essencial de *J. floribunda*.

Figura 6 - Estruturas identificadas no óleo essencial da *J. floribunda* Less.



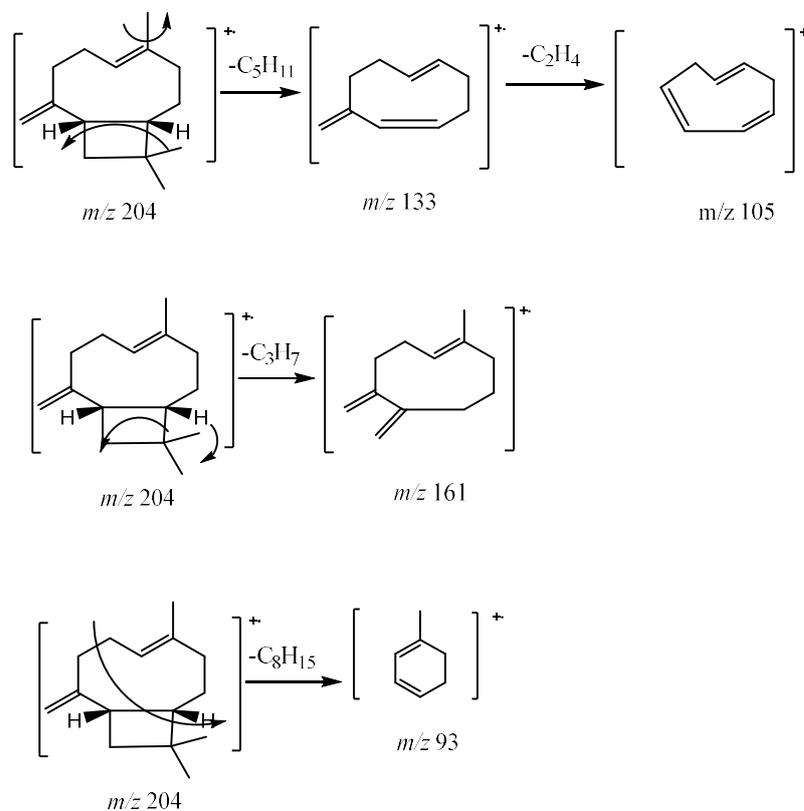


ar-curcumenol – 15 – al

Fonte: Do autor

No espectro de massa (ANEXO A) foi proposta uma fragmentação a partir do íon molecular de 204 daltons para a molécula β -cariofileno (FIGURA 7). Considera-se a perda de $-C_3H_7$ formando o íon m/z 161; ainda a partir do íon molecular 204 ocorre a perda de C_5H_{11} , C_8H_{15} formando os íons m/z 133, 9, respectivamente.

Figura 7 - Proposta de fragmentação para o β -cariofileno.



Fonte: Azevedo (2014).

Tabela 1 - Composição do óleo essencial das folhas de *J. floribunda*, dados de índice de Kovatz teórico e dados do MassBank

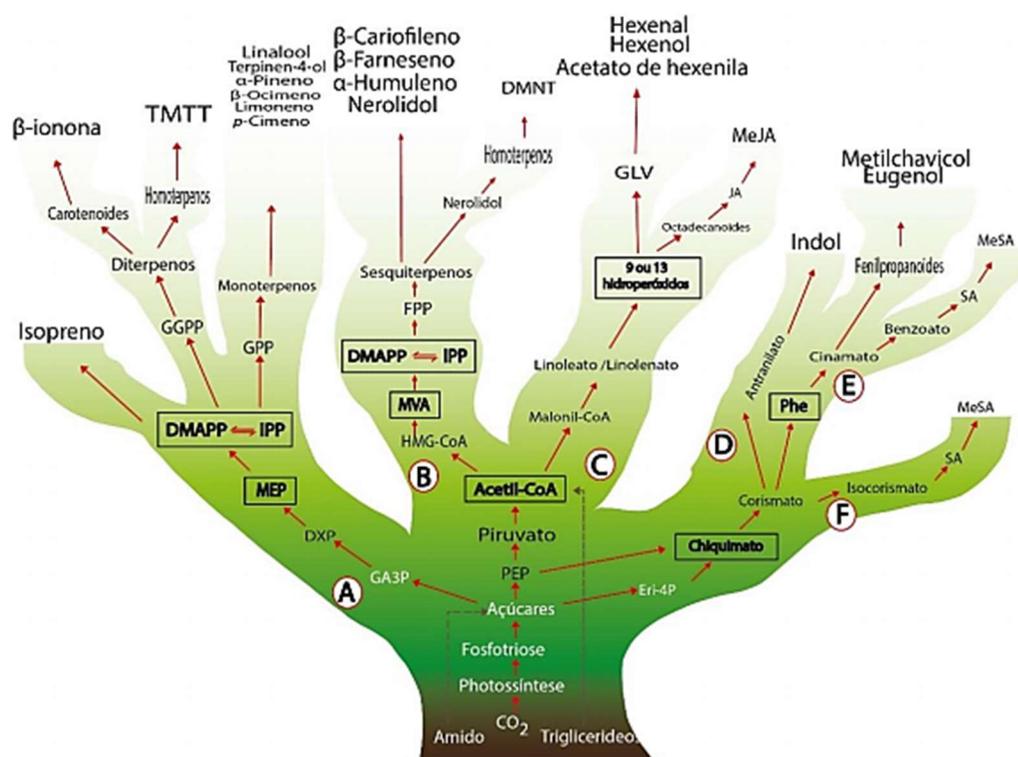
	Tempo de retenção	Substância identificada	Área relativa	IK teórico*	Pontuação MassBank**	Registro MassBank
1	26,936	β - cariofileno	55,05	1419	0,9163	JP007124
2	28,283	α - humuleno	2,07	1454	0,8803	JP002840
3	30,175	diidroagarofurano	0,19	1503
4	33,125	germacreno β	0,23	1561
5	33,425	óxido de cariofileno	10,37	1583	0,8184	JP007124
6	34,417	epóxido de α -humuleno	0,2	1608
7	34,717	II cedrol	0,29	1600
8	34,817	10-epi-gamma-eudesmol	0,25	1623
9	35,083	ar-curcumeno-15-al	3,12	1713
10	35,292	cariofila-4 (12), 8 (13)-dien-5α-ol	2,16	1640	0,8226	JP010684
11	35,433	cariofila-4(12),8(13)-dien-5β-ol	4,89	1640	0,7979	JP010684
12	35,942	β - eudesmol	0,2	1690
13	36,217	14-hidroxi-9-epi-cariofileno	0,19	1669
14	36,717	epóxido de aloaromadendreno	0,84	1641
15	37,075	4 - metil - bifenil	0,72	1489
16	37,383	1,3,5-heptatriinil-benzeno	11,4	1721
17	38,467	1,3,5-heptatriinil-benzeno	2,63	1721
18	39,350	1,3,5-heptatriinil-benzeno	0,45	1721
19	40,433	epóxi aromadendreno	0,21	1641
	..	Total	95,46

Fonte: Do autor, *Adams (2017), **<https://massbank.eu/MassBank/>. As substâncias em comum para cada método de identificação estão em negrito.

Os sesquiterpenos em comum no gênero *J. paniculata e polita* e identificados no extrato de *J. floribunda* fazem parte da classe dos terpenos encontrados em óleos voláteis e tem a sua biossíntese principalmente através da via de mevalonato isopentil - pirofosfato (FIGURAS 8, 9) (Mafei, 2010; Souza Vinícius, 2014; Adekenov, 2017). O carbocátion farnesila é o precursor de muitos sesquiterpenoides e é formado pela ionização do pirofosfato de farnesila, com abstração parcial de fosfato pelos metais presentes no sítio enzimático. Esse cátion pode sofrer

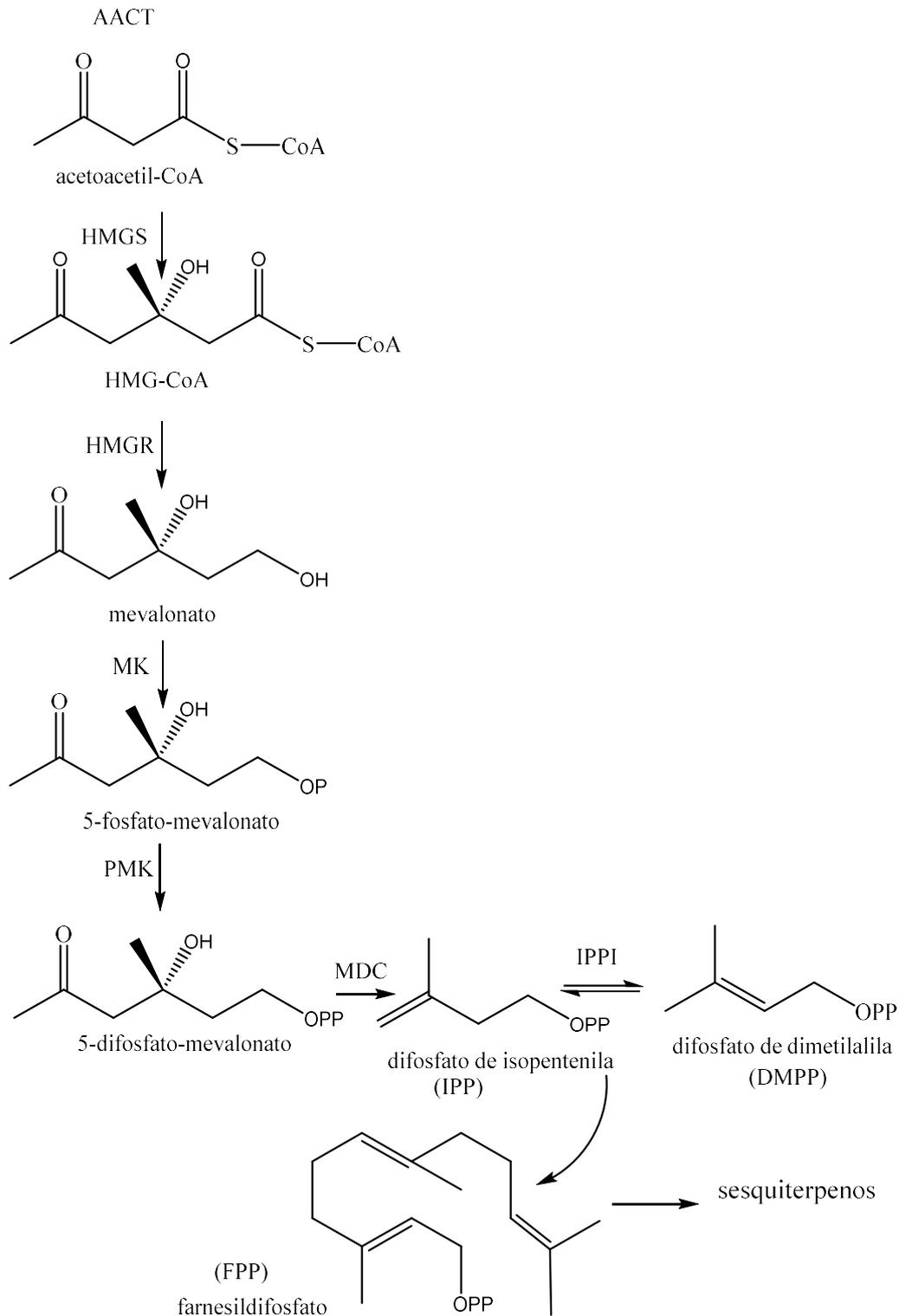
uma série de reações de ciclização, que darão origem a quase todos os sesquiterpenoides como o α -humuleno e β -cariofileno. O α -humuleno e o β -cariofileno geralmente ocorrem concomitantemente em óleos voláteis e ambos apresentam forte atividade anti-inflamatória (Fernandes *et al.*, 2007; Sain *et al.*, 2014; Silveira e Sá, 2015; Machado *et al.*, 2018). Seus óxidos geralmente são produtos de degradação dos óleos voláteis nos quais são encontrados (Souza Tiago, 2014).

Figura 8 - Principais rotas de biossíntese de compostos voláteis.



Fonte: Mafei (2010), Souza Tiago (2014). A: monoterpenoides e diterpenoides; B: sesquiterpenoides; C: – policetídeos; D: indol; E: fenilpropanoides; F: salicilato de metila.

Figura 9 - Biosíntese de terpenos: via Mevalonato.



HMGC_oA: 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA; AACT: Acetil-CoA: acetil-CoA C-acetiltransferase; HMGR: 3- hidróxi-3-metilglutaril-CoA redutase; HMGS: 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA sintase; IPPI: pirofosfato de isopentenilo isomerase; MDC: mevalonato-5-fosfato descarboxilase; MK: mevalonato quinase; PMK: fosfomevalonato quinase, OP: fosfato, OPP: difosfato.

Fonte: Adekenov (2017). Modificado.

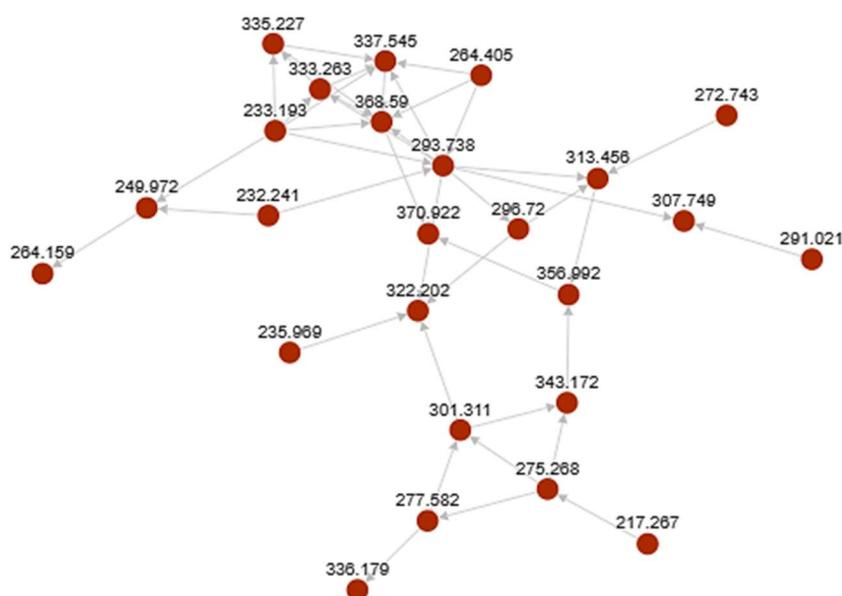
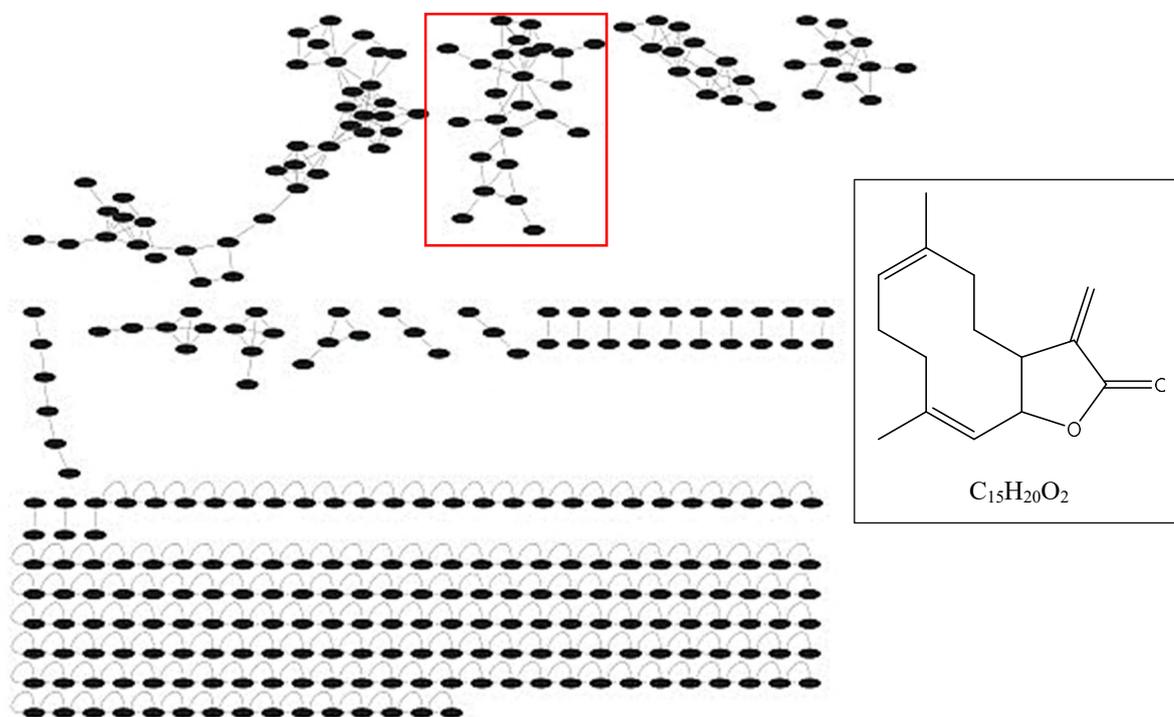
6.2 DESREPLICAÇÃO DO INFUSO

Os compostos identificados na plataforma GNPS (TABELA 2) e no MetFrag (TABELA 3) no modo positivo pertencem à classe de sesquiterpenos do tipo eudesmanos e lactonas sesquiterpênicas do tipo eudesmanolidos e germacranolidos. A classe de lactonas sesquiterpênicas do tipo germacranolidos e do tipo eudesmanolidos foram identificadas na tribo Mutisieae (Bohlmann *et al.*, 1984; Maldonado *et al.*, 1988; Heluani *et al.*, 1997, Riscala *et al.*, 2000). Os compostos agrupados *e.g.* m/z 233,193; 291,02; 293,74 e 296,72 do cluster da rede molecular do GNPS (FIGURA 10), modo positivo, pertencem a uma mesma classe, os sesquiterpenos. Os sesquiterpenos são formados biogeneticamente em uma forma de pirofosfato de farnesila principalmente através da via de mevalonato isopentil - pirofosfato (Adekenov, 2017) (FIGURA 9). A ciclização de farnesil pirofosfato resulta em compostos com ciclos de dez e onze carbonos. Germacrano é formado a partir do farnesil pirofosfato por meio da interação do centro reativo em C¹ com um fragmento de olefina. Se houver uma ionização da ligação carbono-oxigênio preliminar, o carbocátion formado ataca o átomo do C¹⁰ por meio de ligação eletrofílica a hidrocarbonetos não saturados de acordo com a regra de Markovnikov, e formando um esqueleto ciclodecanóico de uma molécula.

A distinção das estruturas de sesquiterpenos pode ser explicada pelo rearranjo intramolecular e outras transformações biossintéticas de intermediários formados na planta por meio de modificações enzimáticas. Do cátion FPP tem-se os principais grupos de lactonas sesquiterpênicas (FIGURA 11) e corrobora com as estruturas costunolido e eudesmanolido que foram desreplcados no infuso (TABELAS 2 e 3). Costunolido, do tipo germacrano, é considerado o precursor mais comum de lactonas sesquiterpênicas (Adekenov, 2017) e esta estrutura foi anotada pela plataforma GNPS e pelo programa MetFrag. Uma lactona sesquiterpênica do tipo costunolido foi isolado na família da Asteraceae na espécie *Saussurea costus* (Kumer *et al.*, 2014) de fórmula molecular C₁₅H₂₀O₂, os fragmentos apresentados foram [M+H]⁺ m/z 233,1530 [C₁₅H₂₁O₂]⁺, 215,1457[C₁₅H₁₉O₁]⁺ e 187,1208 [C₁₄H₁₉]⁺ concordantes com os fragmentos encontrados nos espectros obtidos na amostra infuso, 233, 215, 187 (ANEXO B, TABELA 4). Possíveis fragmentos para a estrutura do tipo costunolido de fórmula C₁₅H₂₀O₂ (FIGURA 12) foi apresentado e os espectros também foram comparados na biblioteca do GNPS (FIGURA 13). Os espectros da estrutura anotada pelo GNPS estão alinhados com os dados da espectrometria de massa referente ao infuso. Os dados da estrutura anotada são classificados como ouro na biblioteca referente a uma substância isolada e

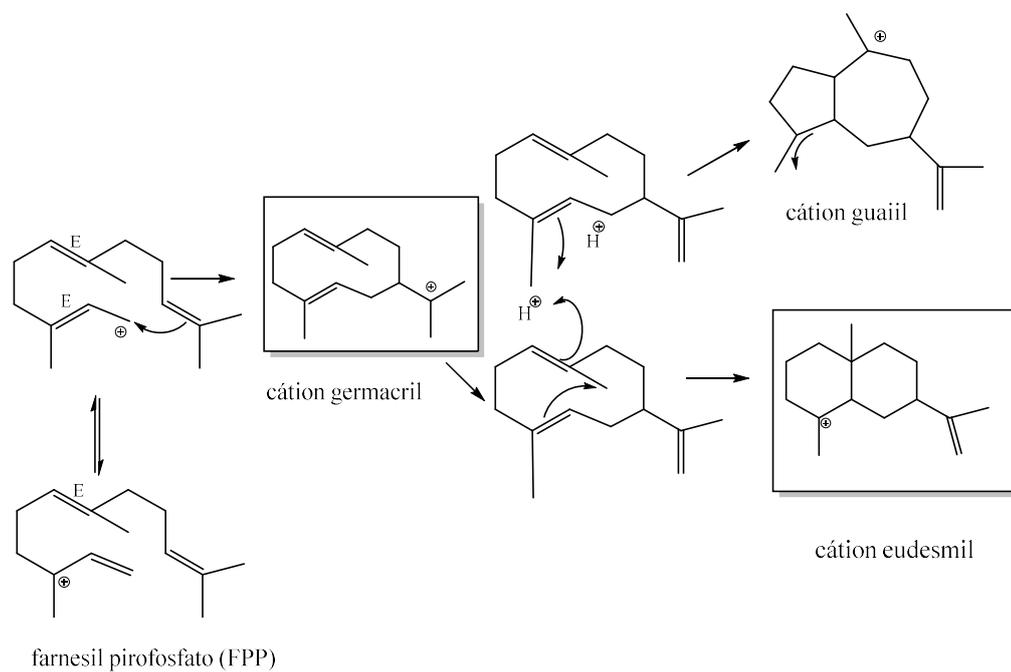
caracterizada. Portanto, costunolido, uma lactona sesquiterpênica, foi identificada na espécie *J. floribunda*.

Figura 10 – Cluster pertencente a rede molecular do GNPS. Modo positivo.



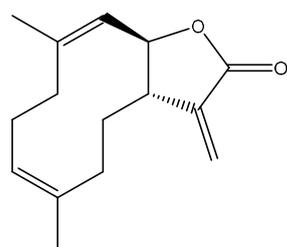
Fonte: Do autor. Rede molecular criada na plataforma GNPS, modo positivo. O quadro em destaque refere-se ao cluster em que foram anotadas substâncias da classe dos sesquiterpenos do tipo eudesmano (m/z 296,72) e lactonas sesquiterpênicas do tipo germacranolido (m/z 233,193) e eudesmanolido (m/z 291,02). A substância em destaque refere-se ao costunolido de m/z 233,15 de fórmula molecular $C_{15}H_{20}O_2$.

Figura 11- Biossíntese dos principais grupos de lactonas sesquiterpênicas

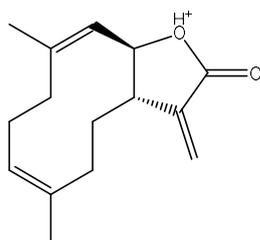


Fonte: Adekenov (2017). Os cátions em caixa correspondem as estruturas de lactonas anotadas na plataforma GNPS e MetFrag.

Figura 12 - Possíveis fragmentos para a estrutura costunolido. Modo positivo.

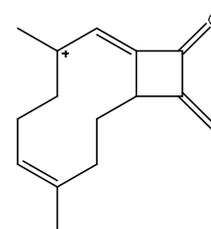


m/z 232,1463



233,1536 $[M + H]^+$

$[C_{15}H_{21}O_2]^+$

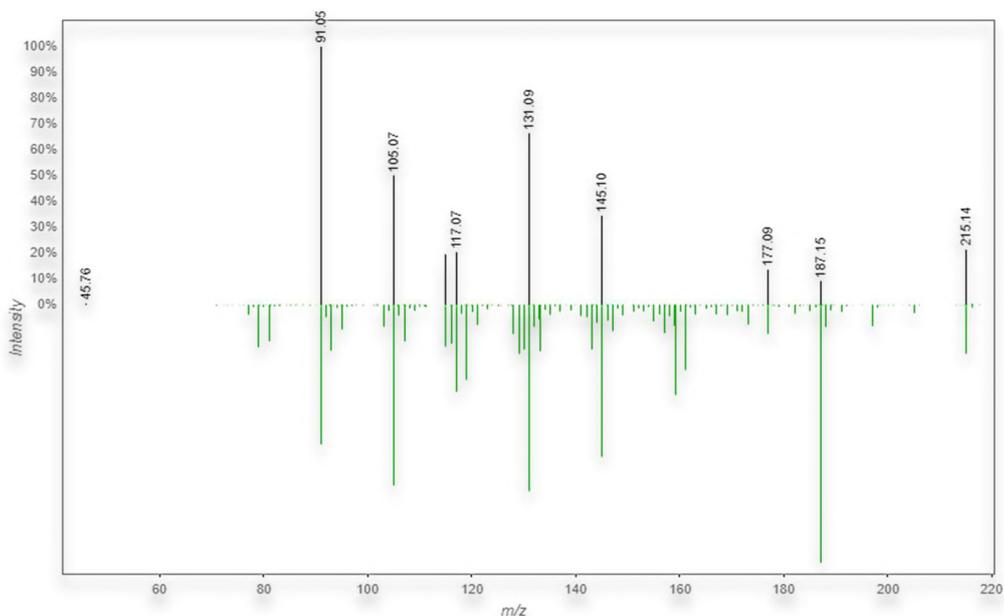


215,1445 $[233,1536 - H_2O]^+$

$[C_{15}H_{19}O_1]^+$

Fonte: Do autor

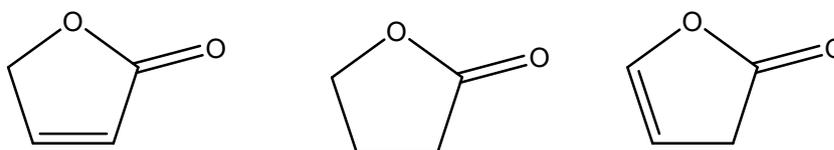
Figura 13 - Espectros referente a estrutura do costunolido.



Fonte: GNPS. Espectros em preto é o que foi obtido do infuso e em verde é o da biblioteca do GNPS.

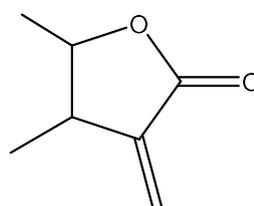
Ao considerarmos os dados de IV para lactonas de cinco anéis, reportados por Nakanishi (1962) e Pavia (2008), que apresentam bandas de absorção características em 1725 cm^{-1} , 1735 cm^{-1} e 1760 cm^{-1} (FIGURA 14), corrobora os achados das lactonas sesquiterpênicas na plataforma GNPS e MetFrag que apresentam em sua estrutura o agrupamento α -metileno-lactona (FIGURA 15) para as lactonas. O extrato de lavagem foliar de *J. floribunda* apresentou uma banda de absorção em torno de 1730 cm^{-1} (FIGURA 16), típica de estiramento de carbonila de γ -lactonas o que pode ser observado em Iranshahi *et al.*, (2007), que realizou análises no IV de extratos ricos em lactonas sesquiterpênicas de 10 espécies da família da Asteraceae e apresentaram fortes absorções entre 1730 e 1780 cm^{-1} (FIGURA 17). A análise de IV realizada por Iranshahi *et al.*, (2007) em extrato pobre em lactonas sesquiterpênicas indicou a presença de carbonila em $\nu=1709\text{ cm}^{-1}$. O resultado apresentado por Iranshahi *et al.*, (2007) corrobora com o resultado de IV ($\nu=1704\text{ cm}^{-1}$) para o extrato hidroetanólico de *J. floribunda* indicando a remoção dos tricomas glandulares.

Figura 14 - Estruturas de lactonas com cinco membros com bandas de absorção em 1725 cm^{-1} , 1735 cm^{-1} e 1760 cm^{-1} da esquerda para direita.



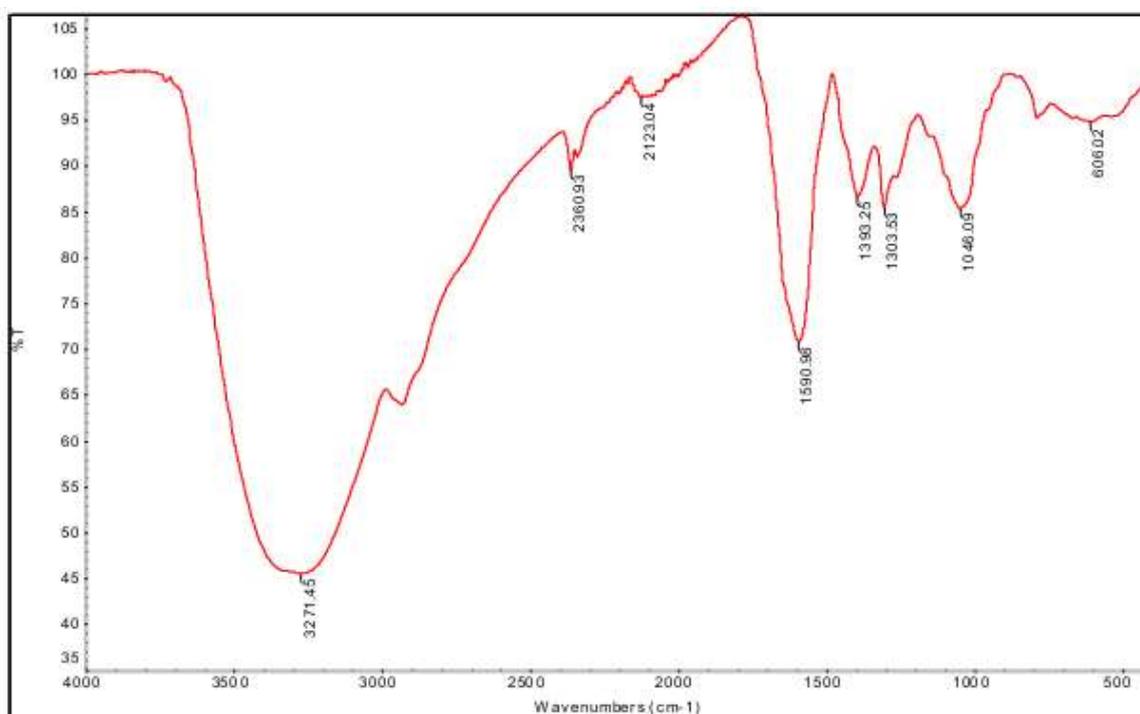
Fonte: Nakanishi (1962) e Pavia (2008)

Figura 15 - Agrupamento α -metileno-lactona

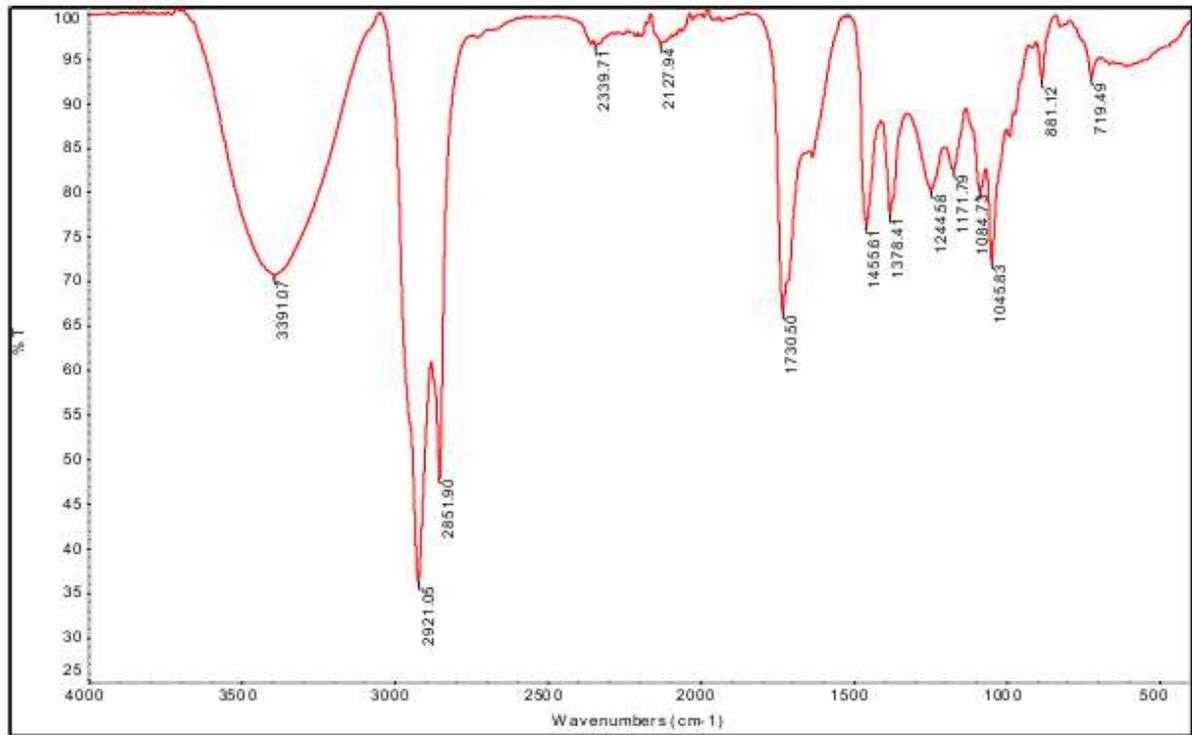


Fonte: Ferraz e Silva (1984)

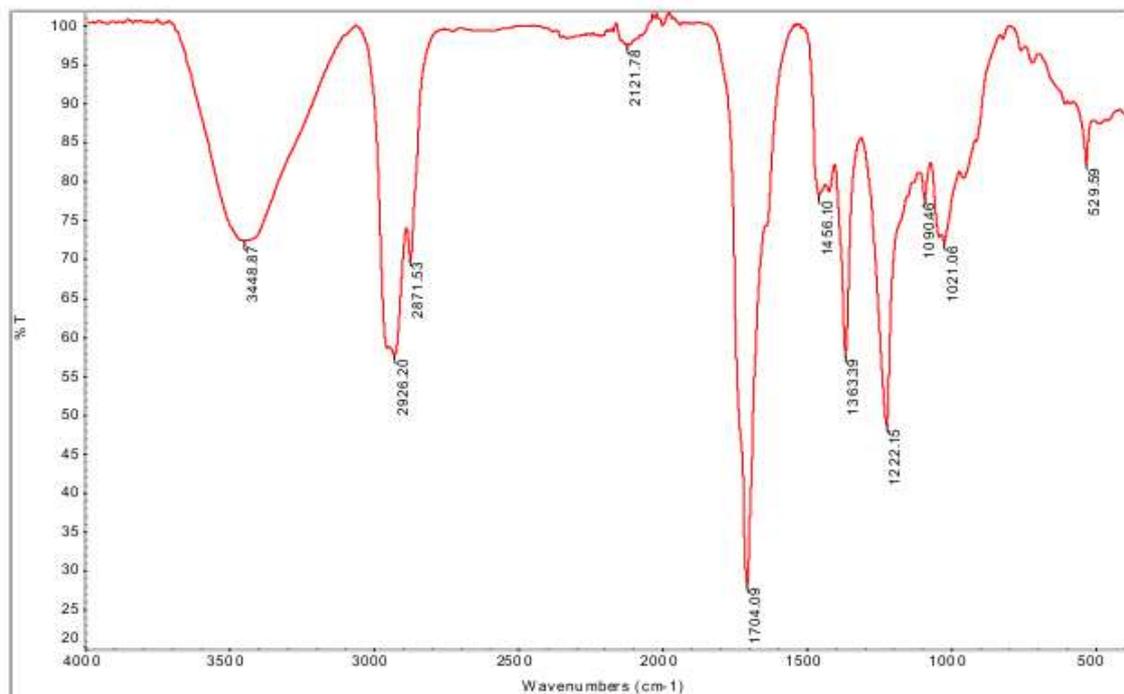
Figura 16 - Espectro de IV dos extratos de *J. floribunda* Less.



(a)



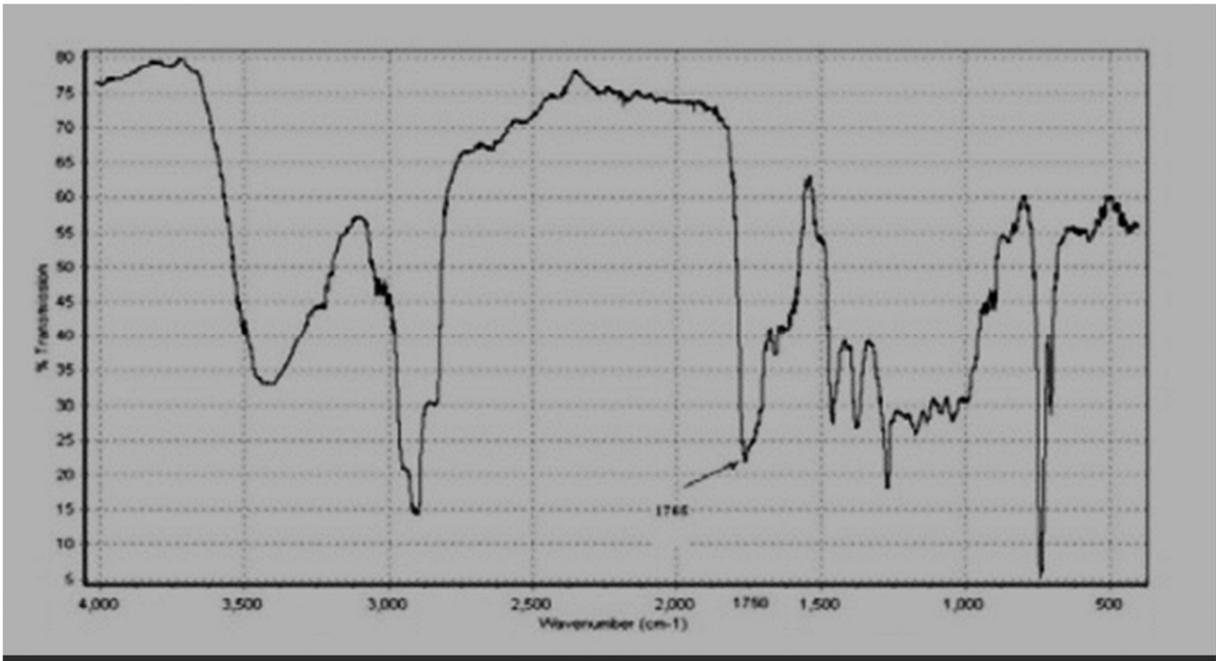
(b)



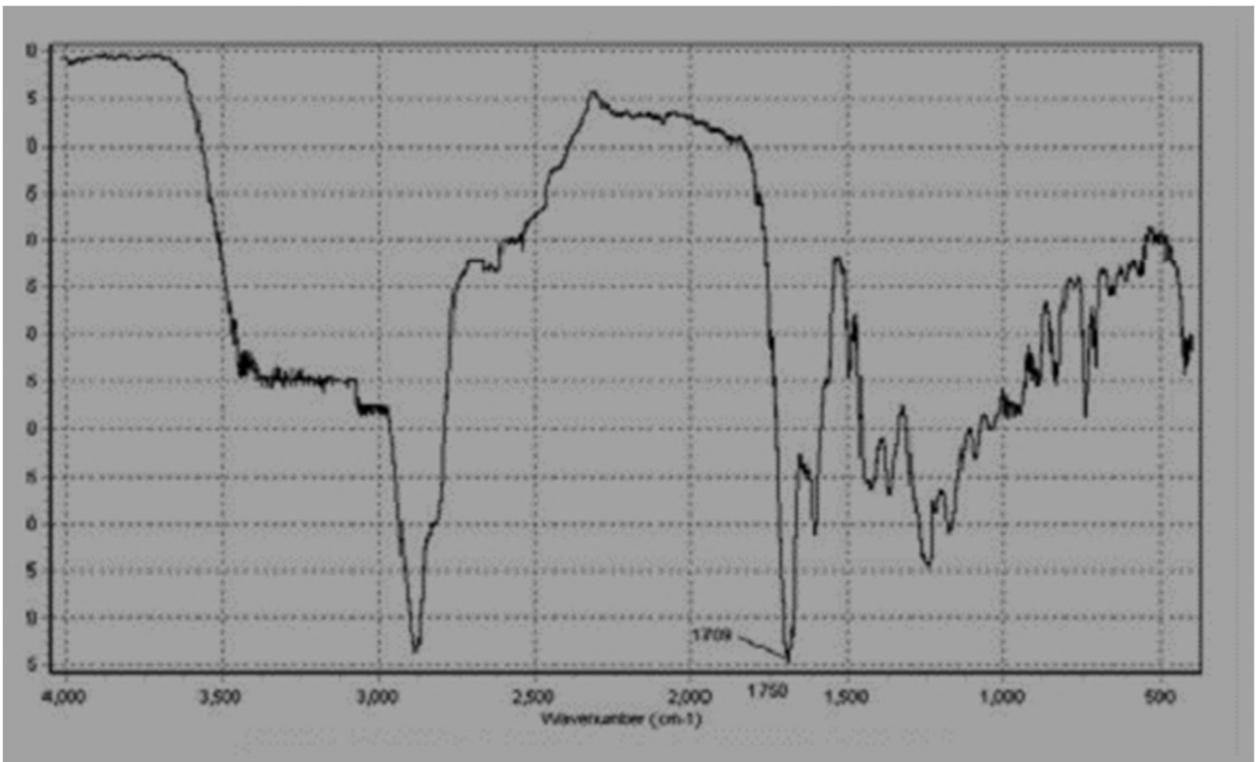
(c)

Fonte: Do autor. Espectro de IV do infuso ($\nu=1590\text{ cm}^{-1}$) (a), o extrato de lavagem foliar rico em lactonas ($\nu=1730\text{ cm}^{-1}$) (b) e extrato hidroetanólico ($\nu=1704\text{ cm}^{-1}$, livre de tricomas glandulares) (c).

Figura 17- Espectro de IV de 10 espécies da *Artemisia* (Asteraceae)



(a)

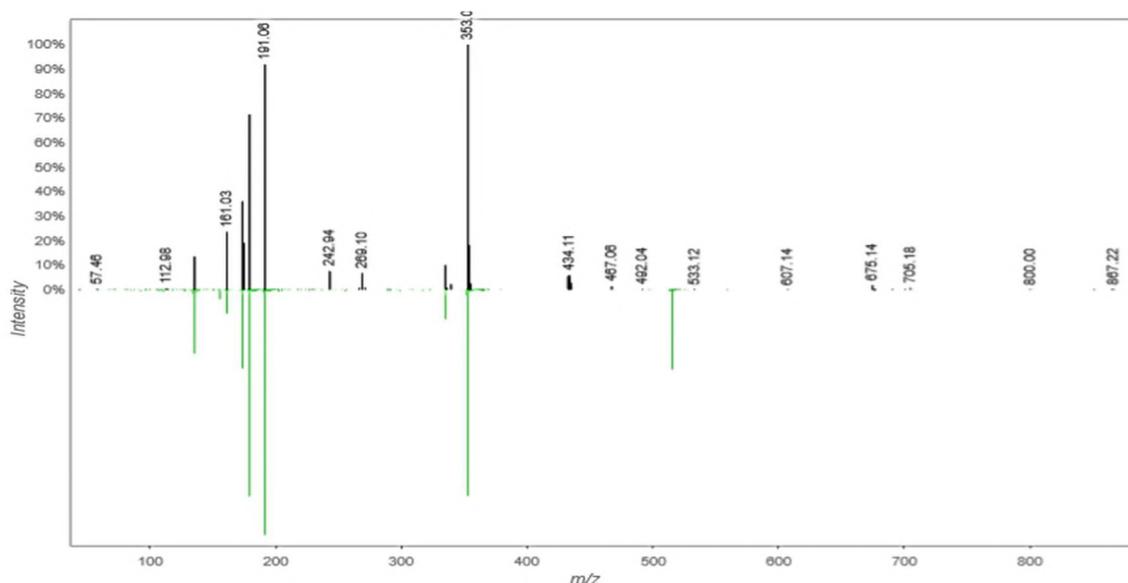


(b)

Fonte: Iranshahi *et al.*, (2007). Extrato rico em lactonas sesquiterpênicas ($\nu=1765 \text{ cm}^{-1}$) (a). Extrato pobre em lactonas sesquiterpênicas ($\nu=1709 \text{ cm}^{-1}$) (b).

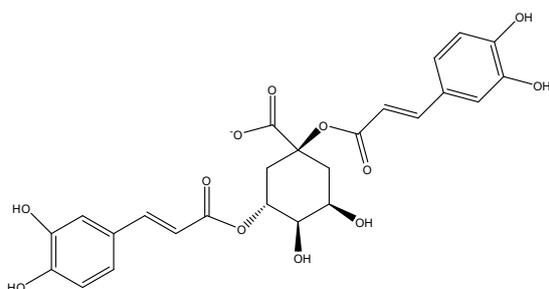
A estrutura anotada pelo GNPS e MetFrag para o espectro obtido no tR 4,53 min do polifenol 1,3 - ácido dicafeoilquínico (TABELAS 2 e 3) no modo negativo, foi anotada na biblioteca da Bruker no modo negativo (ANEXO B). Os espectros de massas das substâncias anotadas no infuso, modo negativo, foram espelhados com os espectros da estrutura proposta na plataforma GNPS (FIGURA 18), e se mostram alinhados. Uma proposta de fragmentação para os isômeros do ácido dicafeoilquínico no modo negativo foi descrita por Tolonen *et al.*, (2002) para a espécie *Eleutherococcus senticosus* da família Araliaceae. Os fragmentos da substância isolada e identificada como 1,5 - ácido dicafeoilquínico foram m/z 515[M-H]⁻, 353[M-163]⁻, 191[M-325]⁻, 179[M-337]⁻ o que corrobora com os dados deste trabalho (FIGURA 19) em que os fragmentos foram m/z 515,1201; 353,0871; 191,0569; 135,0444.

Figura 18 - Espectros referente a estrutura C₂₅H₂₄O₁₂ comparados com a biblioteca do GNPS.



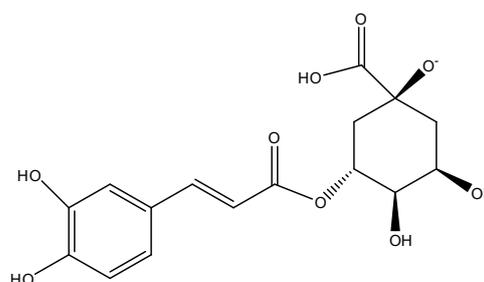
Fonte: GNPS. Espectros em preto do infuso e em verde da estrutura polifenol 1,3 - ácido dicafeoilquínico. Modo negativo.

Figura 19 - Possíveis fragmentos para a estrutura 1,3 - ácido dicafeoilquínico. Modo negativo.



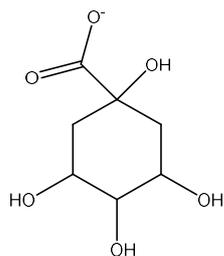
Aduto [M-H]⁻ 515,120

[C₂₅H₂₃O₁₂]⁻



353,088 [515,120 - C₉H₆O₃]⁻

[C₁₆H₁₇O₉]⁻



191,056 [353,088 – C₉H₆O₃]⁻

[C₇H₁₁O₆]⁻

Fonte: Demarque *et al.* (2016)

A estrutura do ácido clorogênico C₁₆H₁₈O₉ anotada pelo banco de dados da Bruker (ANEXO B) e MetFrag no tR 2,71-2,1 min apresentou fragmentos MS2, no modo negativo, semelhantes a estrutura isolada e identificada como ácido clorogênico na espécie *Lonicera henryi* Hemsl., da família Caprifoliaceae, MS2 353, 191, 179, 135 por ESI-MS (Jaiswal *et al.*, 2014) e a estrutura isolada e identificada como ácido clorogênico na espécie *Cousinia davisiana*, da família Asteraceae, com os fragmentos *m/z* 353, 191 [ácido quínico desprotonado], 179 [ácido caféico – H-] e 135 (Pasayeva *et al.*, 2021). A proposta de fragmentação (FIGURA 20) baseada no artigo de Demarque *et al.*, (2016) e no artigo de Pasayeva *et al.* (2021) para o ácido clorogênico é coerente com os fragmentos apresentados neste trabalho. Assim, o ácido clorogênico isolado e identificado em espécies na família da Asteraceae e anotado pela plataforma GNPS e MetFrag foi identificada na espécie *J. floribunda*.

Figura 20 – Proposta de fragmentação para o ácido clorogênico. Modo negativo. (Continua)

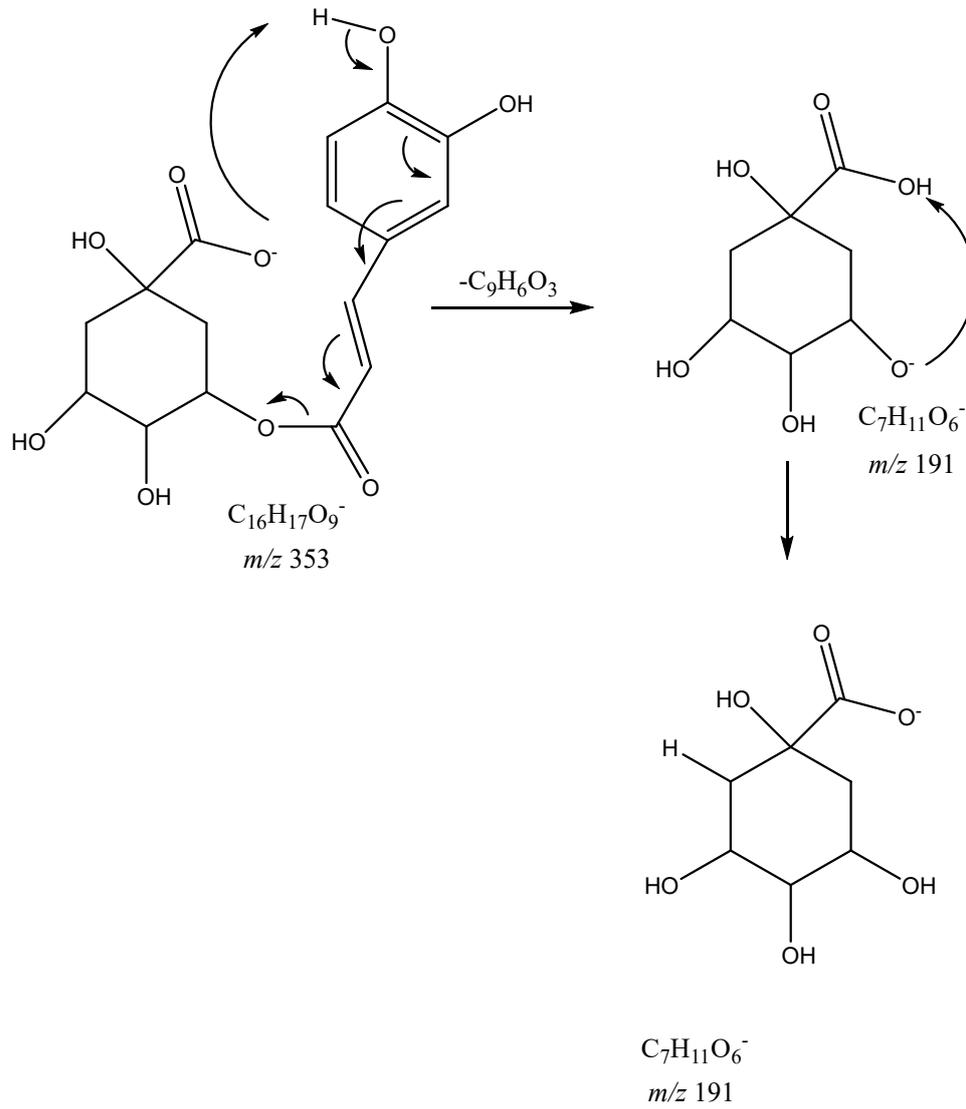
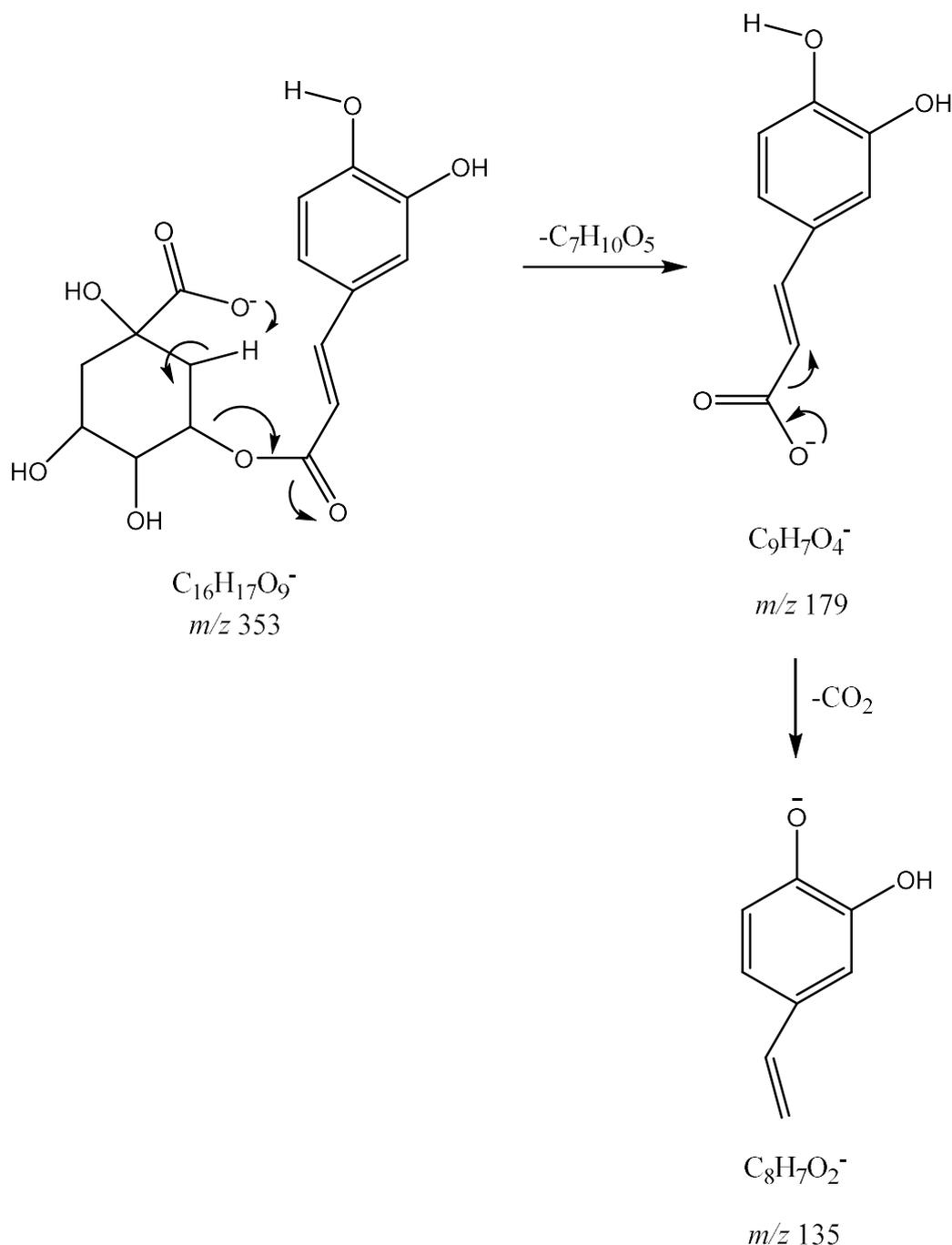


Figura 20 – Proposta de fragmentação para o ácido clorogênico. Modo negativo. (Conclusão).

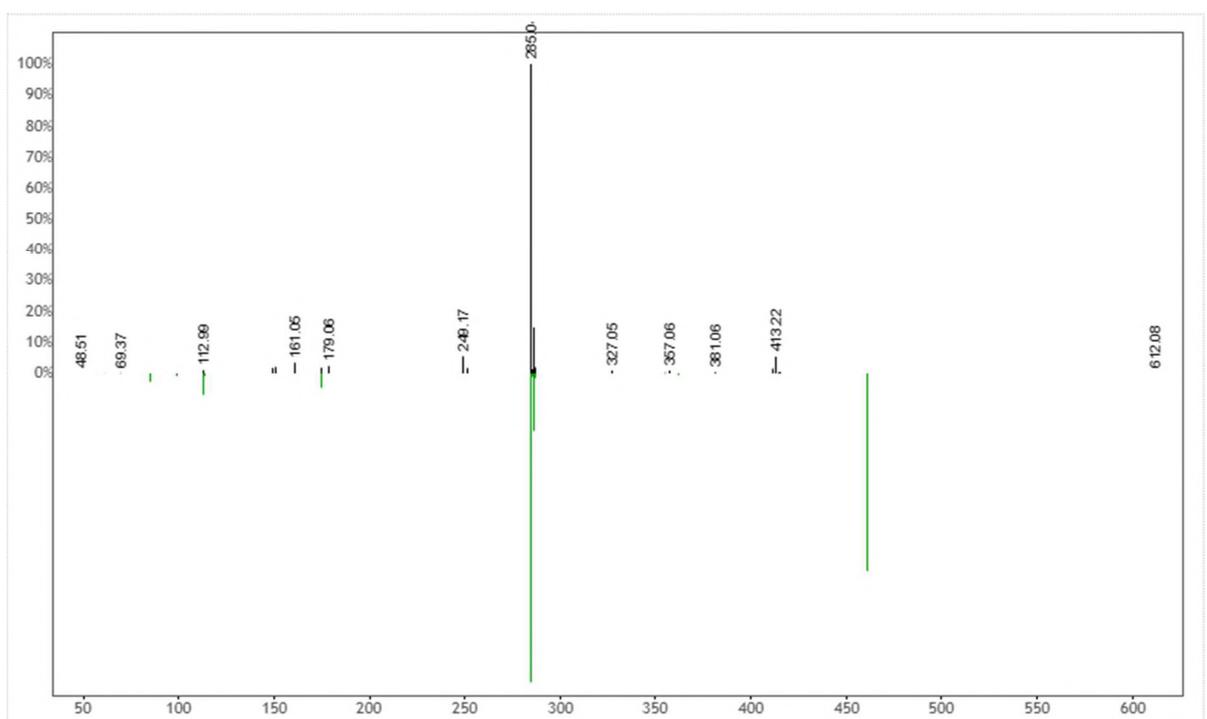


Fonte: Demarque *et al.* (2016) e Pasayeva *et al.* (2021). Adaptado.

A classe de flavonoides presentes no gênero *Jungia* (D'agostino *et al.*, 1995; Acosta-leon *et al.*, 2019) e na tribo Mutiseae (Catalán *et al.*, 1996) foi identificada no modo negativo no MetFrag e GNPS. A estrutura kaempferol 3-glucuronídeo anotada pelo banco de dados da Bruker (ANEXO B) e MetFrag no tR=2,85 min se espelham aos espectros da estrutura proposta pela plataforma GNPS (FIGURA 21). O composto kaempferol 3-glucuronídeo anotado pelo GNPS e MetFrag apresentou o fragmento em m/z 285,0379 (TABELA 4). Li *et al.*, (2016)

relataram que compostos isolados que apresentaram pico em m/z 285 podem ser de um fragmento de aglicona e compostos derivados do kaempferol. Estes compostos foram obtidos com CE=30 eV realizado em UHPLC-ESI-HRMS. Estes resultados corroboram os dados obtidos por Gu *et al.*, (2011) em que foram obtidos fragmentos MS2 por ESI-QTOF com CE=30 eV da espécie *Artemisia rupestris* da família Asteraceae com os valores de m/z 285 e 327 com pico base em m/z 285 e associados ao kaempferol. Granica *et al.*, (2013) isolaram o composto kaempferol 3- glucuronídeo da espécie *Polygonum aviculare* L. da família Polygonaceae e calcularam o fragmento $[C_{21}H_{17}O_{12}]^-$ m/z 461,0725, o fragmento apresentado neste trabalho foi $[C_{21}H_{17}O_{12}]^-$ m/z 461,0750 no tempo de retenção 2,85 min. Além disso, D'Agostino *et al.*, (1995) isolaram compostos derivados do kaempferol da espécie *J.paniculata* do gênero *Jungia*. Portanto, compostos derivados do kaempferol foram identificados em *J. floribunda*.

Figura 21 - Espectros referente a estrutura $C_{21}H_{18}O_{12}$ comparados com a biblioteca do GNPS.



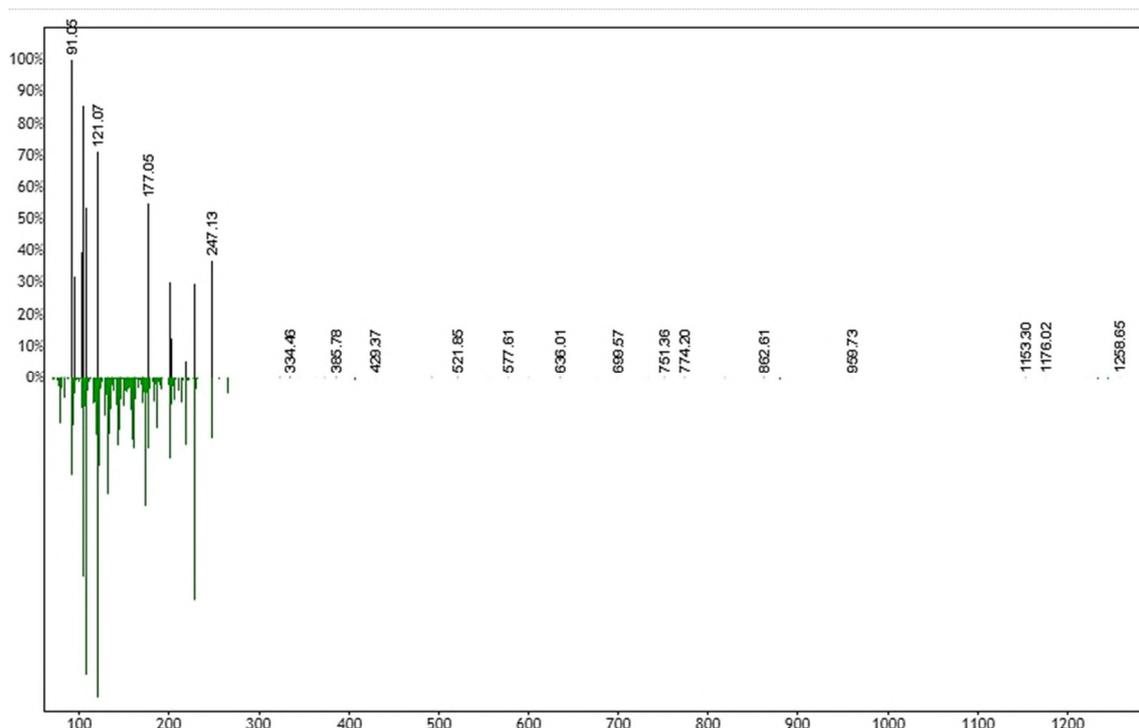
Fonte: GNPS. Espectros em preto do infuso e em verde da estrutura kaempferol 3-glucuronídeo. Modo negativo.

6.3 DESREPLICAÇÃO DO EXTRATO DE LAVAGEM FOLIAR

Um estudo realizado por Lee *et al.*, (2020) identificou estruturas que foram isoladas do extrato das folhas da espécie *Eupatorium fortunei* Turcz. (Asteraceae). Foram identificadas 10 lactonas sesquiterpênicas sendo 7 lactonas do tipo costunolido e 3 do tipo eudesmanolido. Entre essa estruturas identificaram a $C_{15}H_{20}O_4$, 14 - acetoxi - 8β - hidroxí - costunolido, de m/z

$[\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{O}_4]^+$ m/z 265,173. Essa mesma estrutura foi anotada na plataforma GNPS, modo positivo, do extrato de lavagem foliar com m/z 264, 67 (FIGURA 22, TABELA 5).

Figura 22 - Espectros referente a estrutura $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_4$ comparados com a biblioteca do GNPS.

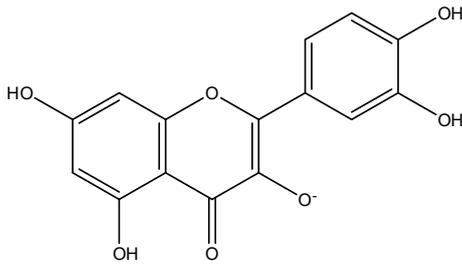


Fonte: GNPS. Espectros em preto do extrato de lavagem foliar e em verde da estrutura 14 – acetoxy - 8β – hydroxy – costunolido. Modo positivo.

As estruturas anotadas na plataforma GNPS e no MetFrag no modo positivo são lactonas sesquiterpênicas de estrutura germacranolido do tipo costunolido e eudesmanolido conforme nas estruturas nas espécies da família da Asteraceae e no gênero *Jungia*. As cumarinas e flavonoides anotados na plataforma GNPS foram identificados em espécies da família Asteraceae (Catalán *et al.*, 1996; Gu *et al.*, 2012) e no gênero *Jungia* (Bohlmann e Zdero, 1979; D'agostino *et al.*, 1995; Acosta-Leon *et al.*, 2019; Verdugo *et al.*, 2023). Nota-se que a estrutura costunolido foi anotada nos dois tipos de extratos (TABELAS 2, 3, 5, 6) o que corrobora com a proposta de que os tricomas glandulares tenham sido removidos durante a lavagem das folhas com acetona e que o extrato hidroetanólico seja mais empobrecido em lactonas sesquiterpênicas (TABELAS 8 e 9). A classe cumarina anotada na plataforma foi identificada no gênero *Jungia* (Zdero *et al.*, 1986). A estrutura quercetina 3-ramnosil – glucosil foi anotada pela plataforma GNPS e pelo MetFrag no tempo de retenção $t_R=4,82$ min com $[\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{O}_{16}]^-$ m/z 609,1461 e MS2 m/z 301 (TABELAS 5, 6, 7 e ANEXO C). O isômero desta estrutura de fórmula $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$ identificado por Jaiswal *et al.* (2014) como quercetina 3-O- (6-O-ramnosil glicosídeo) apresenta $[\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{O}_{16}]^-$ m/z 609,1450 e com um pico MS2 m/z 300. Este

pico base de m/z 300 [quercetina - H^+] (FIGURA 23) é atribuído à perda da parte referente ao glicano. No trabalho de Pasayeva *et al.* (2021) foi isolada a estrutura quercetina 3-ramnosil – glucosil m/z 609 da espécie *C. davisiana* em que a fragmentação do íon $[M - H]^-$ m/z 609 resultou em dois íons maiores em m/z 300 e 301, com a perda da unidade ramnose-glicose.

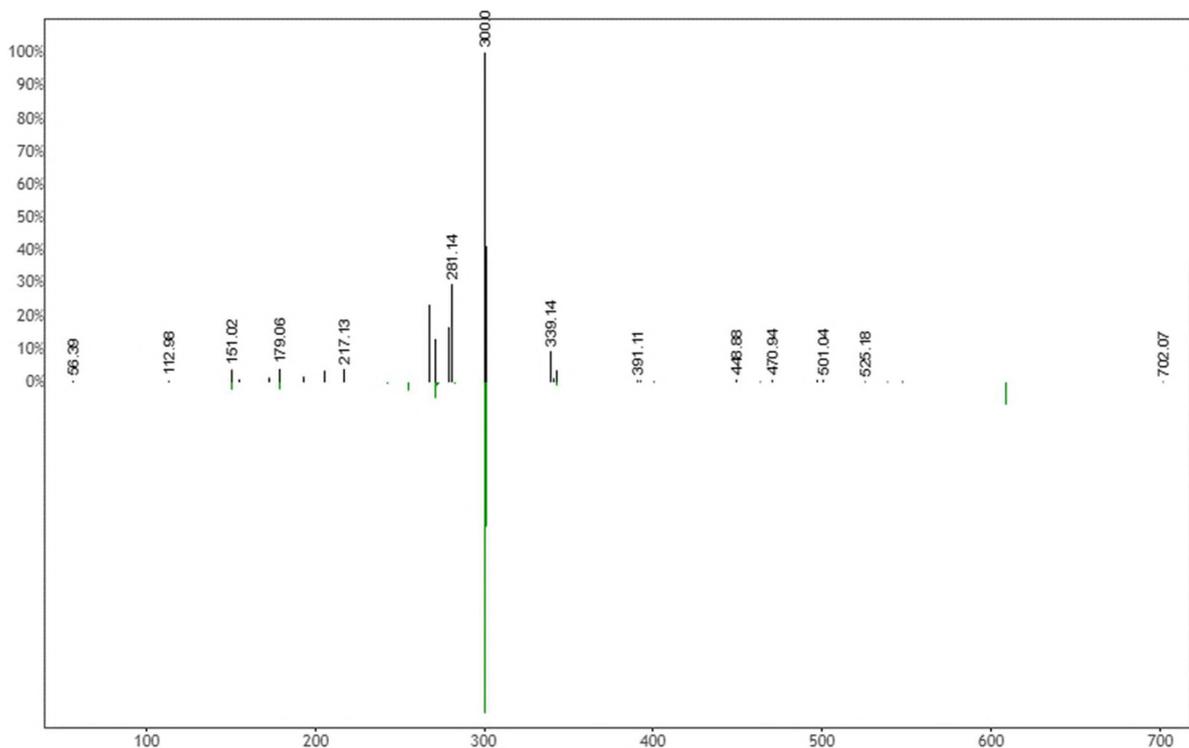
Figura 23 – Estrutura da Quercetina



$C_{15}H_9O_7^-$ m/z 300

Fonte: Jaiswal *et al.* (2014)

Figura 24 - Espectros referente a estrutura $C_{27}H_{30}O_{16}$ comparados com a biblioteca do GNPS.

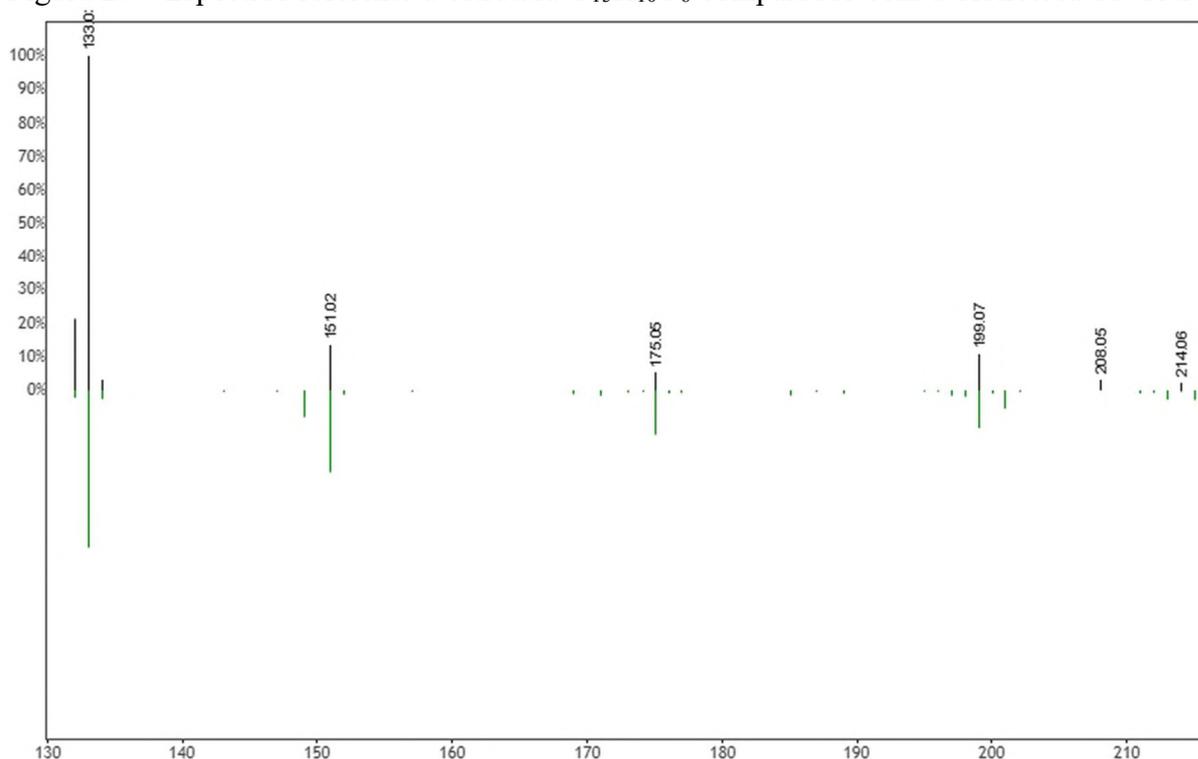


Fonte:GNPS. Espectros em preto do extrato de lavagem foliar e em verde da estrutura quercetina 3-ramnosil – glucosil. Modo negativo.

6.4 DESREPLICAÇÃO DO EXTRATO HIDROETANÓLICO

A classe de flavonoides e a subclasse flavonas presentes no gênero *Jungia* (D'agostino *et al.*, 1995; Acosta-leon *et al.*, 2019) e na tribo Mutiseae (Catalán *et al.*, 1996) foram identificados no modo negativo no MetFrag e GNPS. A estrutura luteolina proposta na plataforma GNPS modo negativo (TABELA 7) foi detectada por HPLC em *J. rugosa* (Acosta-Leon *et al.*, 2019). Os espectros de *J. floribunda* utilizados na plataforma GNPS se alinham aos espectros da estrutura proposta (FIGURA 25) (ANEXO D). Fragmentos MS2 por ESI-QTOF da espécie *Artemisia rupestris* da família da Asteraceae (Gu *et al.*, 2012) apresentaram os valores de m/z 285, 133, 175, 151. Ao considerarmos os dados apresentados MS2 (m/z 285, 133) neste trabalho a estrutura luteolina foi identificada na espécie *J. floribunda*.

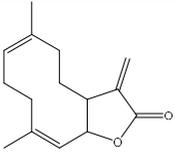
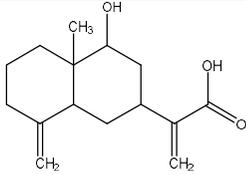
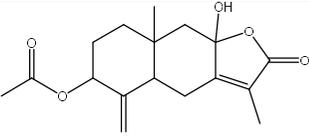
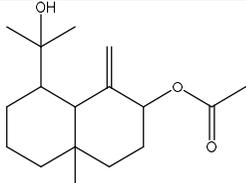
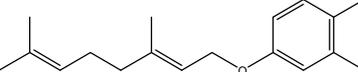
Figura 25 - Espectros referente a estrutura $C_{15}H_{10}O_6$ comparados com a biblioteca do GNPS.

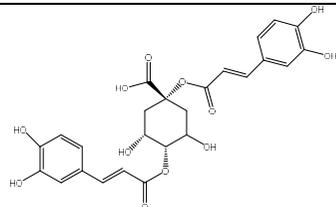
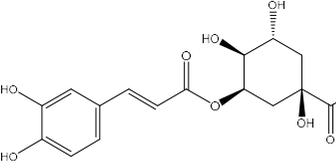
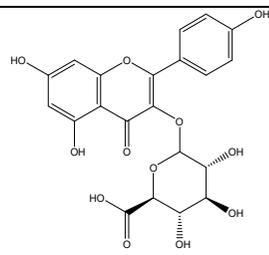
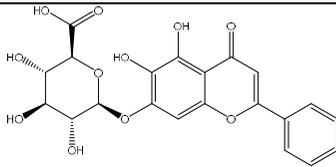


Fonte: GNPS. Espectros em preto do extrato hidroetanólico e em verde da estrutura luteolina. Modo negativo.

Tabela 2 - Estruturas anotadas no GNPS – Infuso

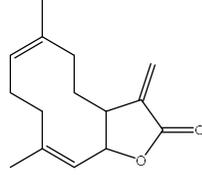
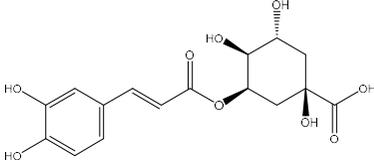
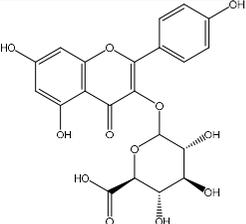
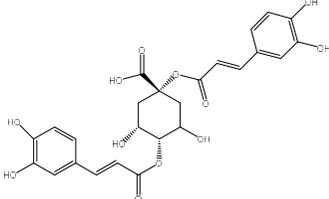
(Continua)

FM	Classe	Nome	Qualidade da Biblioteca	Cosseno	Espectro <i>m/z</i>	Biblioteca <i>m/z</i>	Estrutura
^a C ₁₅ H ₂₀ O ₂	Lactona sesquiterpênica	Germacranolido	Ouro	0,85	233,193	233,15	
^a C ₁₅ H ₂₂ O ₃	Sesquiterpeno	Eudesmano	Ouro	0,90	233,91	233,15	
^a C ₁₇ H ₂₂ O ₅	Lactona Sesquiterpênica	Eudesmanolido	Ouro	0,70	291,02	289,14	
^a C ₁₇ H ₂₈ O ₃	Sesquiterpeno	Eudesmano	Ouro	0,75	296,72	298,24	
^b C ₁₉ H ₂₂ O ₃	Cumarina	...	Bronze	0,71	297,15	297,15	

FM	Classe	Nome	Qualidade da Biblioteca	Cosseno	Espectro <i>m/z</i>	Biblioteca <i>m/z</i>	Estrutura
^b C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	Ácido fenólico	...	Bronze	0,88	515,12	515,12	
^b C ₁₆ H ₁₈ O ₉	Ácido fenólico	...	Bronze	0,91	353,09	353,09	
^b C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	Flavonóide	...	Ouro	0,94	461,07	461,07	
^b C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	Flavonóide	...	Bronze	0,83	447,32	447,09	

Fonte: Do Autor. ^aModo positivo. ^bModo negativo.

Tabela 3- Estruturas anotadas no MetFrag – Infuso

FM	Nome Comum	Picos Medidos	Classe	Pontos	MS2	Estrutura Molecular
^a C ₁₅ H ₂₀ O ₂	(+) - Costunolido	4	Lactona sesquiterpênica	0,598	219,138 [C ₁₄ H ₁₇ O ₂ +2H] ⁺ 218,1665 [C ₁₅ H ₂₀ O ₁ +2H] ⁺ 217,1587 [C ₁₅ H ₂₀ O ₁ +H] ⁺ 216,1509 [C ₁₅ H ₂₀ O ₁] ⁺	
^b C ₁₆ H ₁₈ O ₉	Ácido Clorogênico	4	Ácido fenólico	0,940	353,0882 [C ₁₆ H ₁₇ O ₉] ⁻ 191,0568 [C ₇ H ₁₁ O ₆] ⁻ 179,035 [C ₉ H ₇ O ₄] ⁻ 135,0436 [C ₈ H ₇ O ₂] ⁻	
^b C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	Kaempferol 3-Glucuronídeo	3	Flavonóide	1,0	461,0750 [C ₂₁ H ₁₇ O ₁₂] ⁻ 285,0379 [C ₁₅ H ₉ O ₆] ⁻ 157,0142 [C ₆ H ₇ O ₅ -2H] ⁻	
^b C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	1,3 - ácido dicafeoilquínico	1	Ácido fenólico	0,304	353,08882 [C ₁₆ H ₁₇ O ₉] ⁻	

Fonte: Do Autor. A pontuação representa o nível de similaridade [0-1] do espectro em estudo com aqueles da base de dados do MetFrag. ^a Modo positivo. ^b Modo negativo.

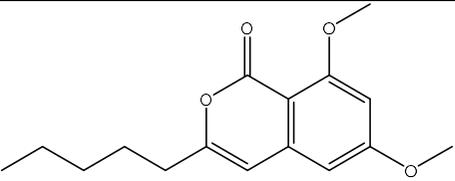
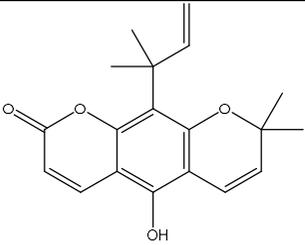
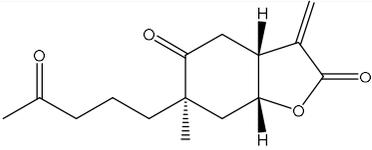
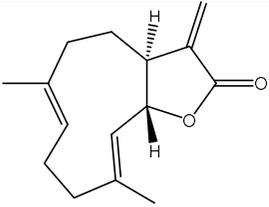
Tabela 4 – Fórmula molecular de estruturas anotadas no programa da Bruker Compass Data Analysis – Infuso

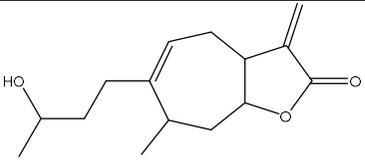
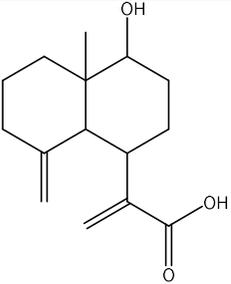
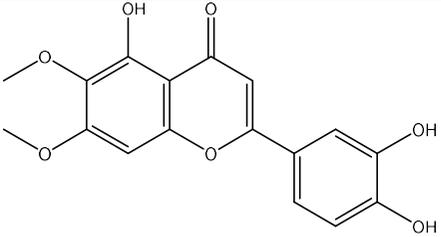
FM	Íon Molécula	m/z	err [mDa]	¹ mSigma	tR(min)
C₁₅H₂₀O₂	[C ₁₅ H ₂₁ O ₂] ⁺	233,1510	-0,5	16,7	1,70
	[C ₁₅ H ₁₉ O ₁] ⁺	215,1423	-1,5	n.a	
C₂₅H₂₄O₁₂	[C ₂₅ H ₂₃ O ₁₂] ⁻	515,1201	0,6	8,1	4,53
	[C ₁₆ H ₁₇ O ₉] ⁻	353,0871	1,4	18,6	
	[C ₇ H ₁₁ O ₆] ⁻	191,0569	0,8	19,1	
	[C ₈ H ₇ O ₂] ⁻	135,0444	0,8	31,4	
C₁₆H₁₈O₉	[C ₁₆ H ₁₇ O ₉] ⁻	353,0882	0,4	20,6	2,71-2,81
	[C ₇ H ₁₁ O ₆] ⁻	191,0568	0,7	15,3	
	[C ₈ H ₇ O ₂] ⁻	135,0436	1,6	18,6	
C₂₁H₁₈O₁₂	[C ₂₁ H ₁₇ O ₁₂] ⁻	461,0750	-0,1	5,0	2,85
	[C ₁₅ H ₉ O ₆] ⁻	285,0379	2,0	4,8	

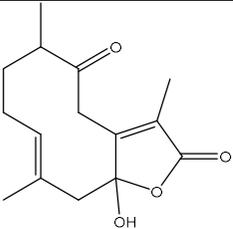
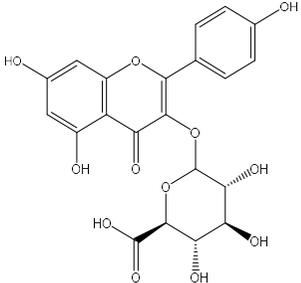
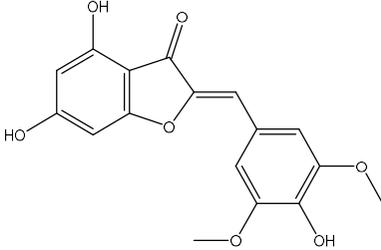
Fonte: Do Autor. ¹mSigma compara o padrão isotópico medido (TIP) com o padrão isotópico teórico; mSigma até 20 é considerado confiável. tR – tempo de retenção.

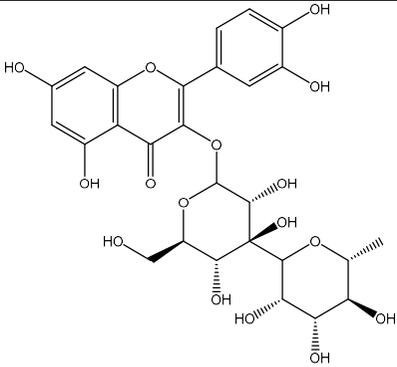
Tabela 5 - Estruturas anotadas no GNPS – Extrato de Lavagem Foliar

(Continua)

FM	Classe	Nome	Qualidade da Biblioteca	Cosseno	Espectro <i>m/z</i>	Biblioteca <i>m/z</i>	Estrutura
^a C ₁₆ H ₂₀ O ₄	Cumarina	...	Bronze	0,94	575,33	575,26	
^a C ₁₉ H ₂₀ O ₄	Cumarina	...	Bronze	0,95	647,38	647,26	
^a C ₁₅ H ₂₀ O ₄	Lactona Sesquiterpênica	Eudesmanolido	Bronze	0,92	551,99	551,26	
^a C ₁₅ H ₂₀ O ₂	Lactona Sesquiterpênica	Germacranolido	Ouro	0,90	233,43	233,15	

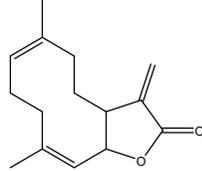
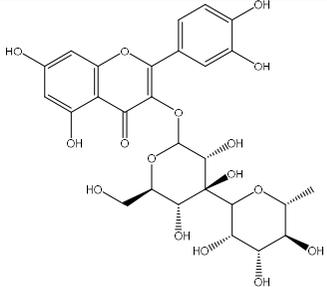
FM	Classe	Nome	Qualidade da Biblioteca	Cosseno	Espectro <i>m/z</i>	Biblioteca <i>m/z</i>	Estrutura
^a C ₁₅ H ₂₂ O ₃	Lactona Sesquiterpênica	Germacranolido	Ouro	0,80	250,32	251,16	
^a C ₁₅ H ₂₂ O ₃	Sesquiterpeno	Eudesmano	Ouro	0,88	234,96	233,15	
^a C ₁₇ H ₁₄ O ₇	Flavonóide	...	Ouro	0,78	329,11	331,08	

FM	Classe	Nome	Qualidade da Biblioteca	Cosseno	Espectro m/z	Biblioteca m/z	Estrutura
^a C ₁₅ H ₂₀ O ₄	Lactona sesquiterpênica	Germacranolido	Ouro	0,77	264,97	265,14	
^b C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	Flavonóide	...	Bronze	0,71	460,52	461,07	
^b C ₁₇ H ₁₄ O ₇	Flavonóide	...	Bronze	0,87	329,06	329,07	

FM	Classe	Nome	Qualidade da Biblioteca	Cosseno	Espectro <i>m/z</i>	Biblioteca <i>m/z</i>	Estrutura
^b C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	Flavonóide	...	Bronze	0,78	609,15	609,13	

Fonte: Do Autor. ^aModo positivo. ^bModo negativo.

Tabela 6 - Estruturas anotadas no MetFrag – Extrato de Lavagem Foliar

FM	Nome Comum	Picos Medidos	Classe	Pontos	MS2	Estrutura Molecular
^a C ₁₅ H ₂₀ O ₂	(+) - Costunolido	4	Lactona sesquiterpênica	0,598	219,138 [C ₁₄ H ₁₇ O ₂ +2H] ⁺ 218,1665 [C ₁₅ H ₂₀ O ₁ +2H] ⁺ 217,1587 [C ₁₅ H ₂₀ O ₁ +H] ⁺ 216,1509 [C ₁₅ H ₂₀ O ₁] ⁺	
^b C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	Quercetina - 3-ramnosil – glucosil	1	Flavonóide	1,0	[C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆] ⁻	

Fonte: Do Autor. A pontuação representa o nível de similaridade [0-1] do espectro em estudo com aqueles da base de dados do MetFrag. ^aModo positivo. ^bModo negativo.

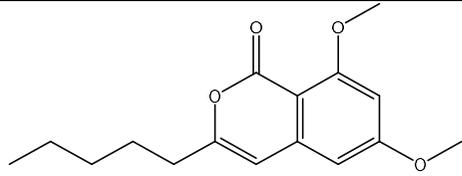
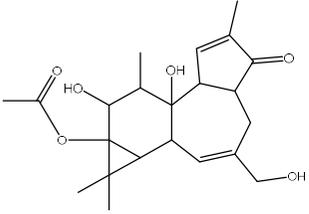
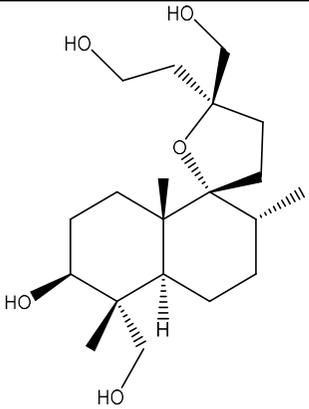
Tabela 7 – Fórmula molecular de estruturas anotadas no programa da Bruker Compass Data Analysis – Extrato de Lavagem Foliar

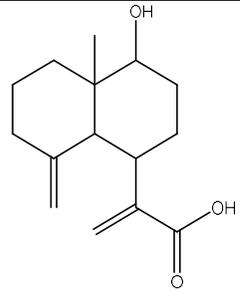
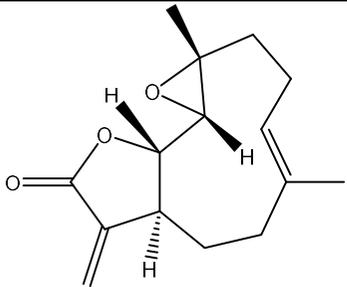
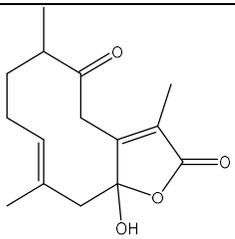
FM	Íon Molécula	m/z	err [mDa]	¹ mSigma	tR(min)
C ₁₅ H ₂₀ O ₂	[C ₁₅ H ₂₁ O ₂] ⁺	233,1496	-0,5	16,7	13,43
	[C ₁₅ H ₁₉ O ₁] ⁺	215,1397	-1,5	n.a	
C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	[C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆] ⁻	609,1461	0,4	14,2	4,82

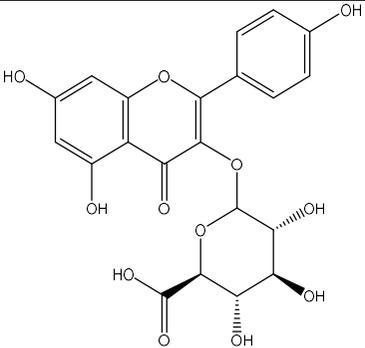
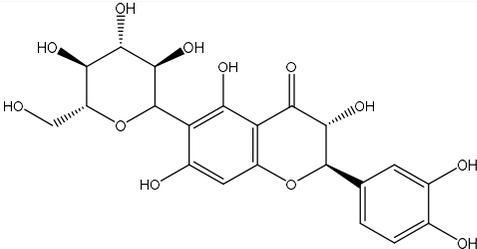
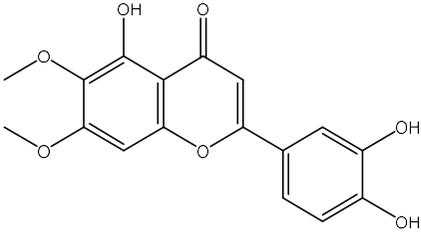
Fonte: Do Autor. ¹mSigma compara o padrão isotópico medido (TIP) com o padrão isotópico teórico; mSigma até 20 é considerado confiável. tR – tempo de retenção.

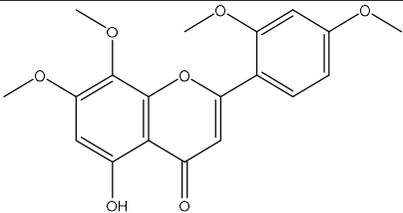
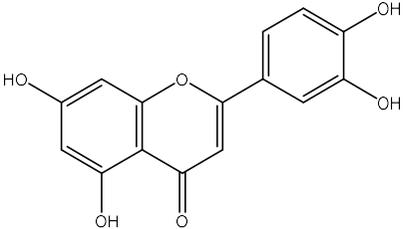
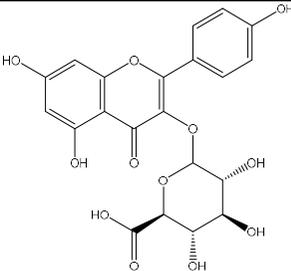
Tabela 8 – Estruturas anotadas no GNPS – Extrato Hidroetanólico.

(Continua)

FM	Classe	Nome	Qualidade da Biblioteca	Cosseno	Espectro <i>m/z</i>	Biblioteca <i>m/z</i>	Estrutura
^a C ₁₆ H ₂₀ O ₄	Cumarina	...	Bronze	0,93	575,34	575,26	
^a C ₂₂ H ₃₀ O ₆	Diterpeno	...	Ouro	0,92	432,24	432,24	
^a C ₂₀ H ₃₆ O ₅	Diterpeno	...	Bronze	0,77	355,80	357,26	

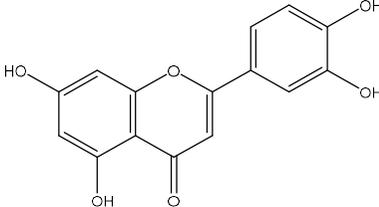
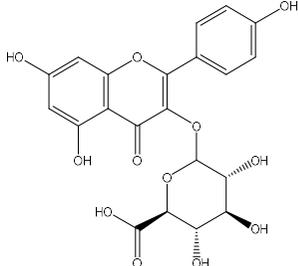
FM	Classe	Nome	Qualidade da Biblioteca	Cosseno	Espectro m/z	Biblioteca m/z	Estrutura
${}^a\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_3$	Sesquiterpeno	Eudesmano	Ouro	0,93	233,91	233,15	
${}^a\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_3$	Lactona Sesquiterpênica	...	Ouro	0,79	249,47	247,15	
${}^a\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_4$	Lactona Sesquiterpênica	Germacranolido	Ouro	0,77	264,97	265,14	

FM	Classe	Nome	Qualidade da Biblioteca	Cosseno	Espectro <i>m/z</i>	Biblioteca <i>m/z</i>	Estrutura
^a C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	Flavonóide	...	Bronze	0,90	463,09	463,09	
^a C ₂₁ H ₂₂ O ₁₂	Flavonóide	...	Ouro	0,76	447,16	449,11	
^a C ₁₇ H ₁₄ O ₇	Flavonóide	...	Ouro	0,79	329,10	329,08	

FM	Classe	Nome	Qualidade da Biblioteca	Cosseno	Espectro <i>m/z</i>	Biblioteca <i>m/z</i>	Estrutura
^a C ₁₉ H ₁₈ O ₇	Flavonóide	...	Bronze	0,78	359,08	359,11	
^b C ₁₅ H ₁₀ O ₆	Flavonóide	...	Bronze	0,91	284,04	284,04	
^b C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	Flavonóide	...	Bronze	0,84	461,07	461,07	

Fonte: Do Autor. ^aModo positivo. ^bModo negativo.

Tabela 9 – Estruturas anotadas no MetFrag – Extrato Hidroetanólico

FM	Nome Comum	Picos Medidos	Classe	Pontos	MS2	Estrutura Molecular
^b C ₁₅ H ₁₀ O ₆	Luteolina	1	Flavonóide	0,598	285,0379 [C ₁₅ H ₉ O ₆] ⁻	
^b C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	Kaempferol 3-glucuronídeo	2	Flavonóide	0,950	461,0750 [C ₂₁ H ₁₇ O ₁₂] ⁻ 285,0379 [C ₁₅ H ₉ O ₆] ⁻	

Fonte: Do Autor. A pontuação representa o nível de similaridade [0-1] do espectro em estudo com aqueles da base de dados do MetFrag. ^bModo Negativo.

Tabela 10 - Fórmula molecular de estruturas anotadas no programa da Bruker Compass Data Analysis – Extrato Hidroetanólico

FM	Íon Molécula	<i>m/z</i>	err [mDa]	¹ mSigma	tR(min)
C ₁₅ H ₁₀ O ₆	[C ₁₅ H ₉ O ₆] ⁻	285,0383	0,8	4,0	6,62
C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	[C ₂₁ H ₁₇ O ₁₂] ⁻	461,0742	1,6	17,8	4,56
	[C ₁₅ H ₉ O ₆] ⁻	285,0386	1,9	1,2	

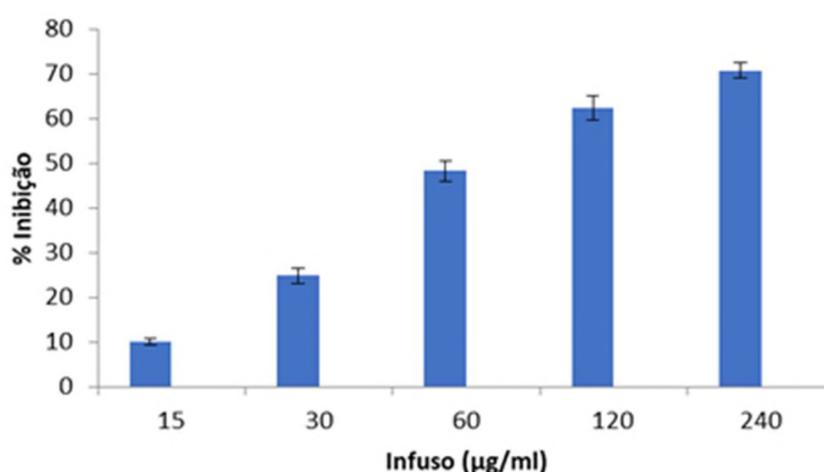
Fonte: Do Autor. ¹mSigma compara o padrão isotópico medido (TIP) com o padrão isotópico teórico; mSigma até 20 é considerado confiável. tR – tempo de retenção.

6.5 ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

6.5.1 Enzima Elastase

A concentração do infuso variando de 15 a 240 $\mu\text{g} / \text{mL}$ (FIGURA 26) produziu uma inibição significativa na elastase. Uma concentração de 240 $\mu\text{g} / \text{mL}$ produziu inibição da elastase de 71%. A elastase foi inibida pelo infuso com valores de IC50 de $81,2 \pm 8,4 \mu\text{g}/\text{mL}$.

Figura 26 - Variação da percentagem de inibição em função da concentração do Infuso



Fonte: Do autor

A capacidade de *J. floribunda* Less. de inibir a enzima elastase pode ser devida à presença de algumas classes químicas, como lactonas sesquiterpênicas, flavonoides, cumarinas e ácidos fenólicos no infuso, conforme a desreplicação e pelos compostos isolados e identificados na literatura para o gênero *Jungia* e a família Asteraceae. Estudos envolvendo substâncias isoladas destas classes químicas (lactonas sesquiterpênicas e compostos fenólicos) na família Asteraceae apresentaram inibição da enzima elastase (Siedle *et al.*, 2002; Azwanida *et al.*, 2020; Jakimiuk, *et al.*, 2021).

Nos estudos realizados por Lee *et al.* (1999) em extratos de plantas foram identificados polifenóis com atividade inibitória para elastase pancreática suína. Dos 150 extratos investigados, seis mostraram inibição de 65% ou mais dessas enzimas. Esses extratos mostraram atividade em valores de IC50 acima de 208 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Nos estudos realizados por Thring *et al.* (2009) a espécie *Camellia sinensis* Kuntze da família Theaceae exibiu alta percentagem de inibição da enzima elastase e collagenase,

sendo os principais constituintes químicos identificados nesta espécie os seguintes: flavan-3-óis, quercetina, kaempferol, ácidos cumáricos e ácido caféico. Cuccioloni *et al.* (2009) compararam as capacidades inibitórias de um conjunto de polifenóis em relação à atividade de serina proteases e observaram que o ácido cafeico inibiu moderadamente a enzima elastase, com seus derivados de éster mostrando uma atividade inibitória aumentada contra elastase de neutrófilos. Constituintes químicos isolados das folhas de *Ilex paraguariensis*, da família Aquifoliaceae inibiram a HNE. Os resultados demonstraram que os derivados do ácido dicafeoilquínico (ácido 3,4 – dicafeoilquínico e ácido 3,5 – dicafeoilquínico) e flavonoides exibiram potente atividade inibitória de HNE com valores de IC₅₀ variando de 1,4 a 7,3 µM (Xu *et al.*, 2009). Como o ácido 1,3 – dicafeoilquínico e seus derivados foram anotados (TABELAS 2 e 3) em *J. floribunda* possivelmente, ele pode contribuir para a atividade inibitória da enzima elastase.

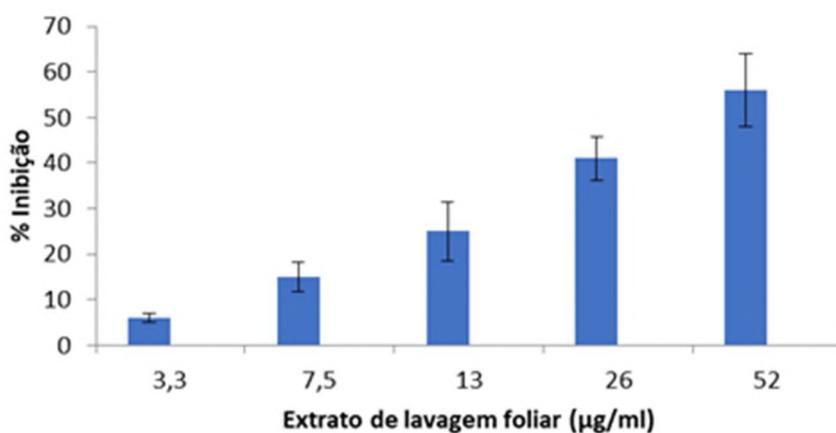
O ácido clorogênico (ácido fenólico) e kaempferol 3-glucuronídeo (flavonóide) anotados pela plataforma GNPS e MetFrag em *J. floribunda* podem ter contribuído com a atividade inibitória da enzima assim como mostraram estudos realizados por Melzig *et al.* (2001) com valores de IC₅₀= 400 µM para ácido clorogênico e Jakimiuk *et al.* (2021) em substâncias isoladas de produtos naturais.

Em Siedle *et al.* (2002) 17 lactonas sesquiterpênicas (SLs) foram investigadas quanto à sua capacidade de inibir HNE através de ensaio *in vitro*. Eles observaram que algumas SLs inibiram mais do que outras e isso poderia ser uma relação de estrutura-atividade. As lactonas do tipo germacranolidos foram as mais reativas que outros tipos de lactonas sesquiterpênicas e isso poderia estar relacionado à existência de α-metileno – γ-lactona e à afinidade eletrônica. Stefani *et al.* (2006) utilizando duas espécies de dimerostemma (*Asteraceae*) em ensaio *in vitro*, relataram que as lactonas do tipo germacranolidos e eudesmanolidos inibiam diretamente a elastase. Com base nestes achados, as lactonas sesquiterpênicas anotadas (TABELAS 2 e 3) na infusão de *J. floribunda* provavelmente podem contribuir para a inibição da elastase.

Um estudo realizado neste trabalho com o extrato de lavagem foliar, que é rico em lactonas sesquiterpênicas (FIGURA 27) demonstrou uma atividade inibitória maior em comparação ao infuso (IC₅₀: 81 µg/mL) com menor valor de IC₅₀ (38,3 ± 1,2 µg/mL), provavelmente devido a estrutura das lactonas sesquiterpênicas presentes. Em concentrações maiores, 120 µg/mL e 240 µg/mL, não foi possível realizar o ensaio devido a precipitação que se formava com o DMSO e a solução tampão fosfato de sódio (FIGURA 28). As estruturas

anotadas na plataforma GNPS e no MetFrag (TABELA 5) apresentaram lactonas sesquiterpênicas do tipo Germacranolidos e Eudesmanolidos. Este grupo de lactonas apresentou atividade inibitória nos trabalhos realizados por Siedle *et al.* (2002) e Siedle *et al.* (2007). De acordo com Siedle *et al.* (2007) as lactonas sesquiterpênicas exibiram uma atividade inibitória moderada com o composto 7- hidroxí- costunolido (IC 50: 20 μM) e 3- acetoxi – costunolido (IC 50:70 μM) e estes valores são próximos dos valores apresentados neste trabalho para o extrato de lavagem foliar a baixas concentrações (IC 50: $38,3 \pm 1,2$ $\mu\text{g/mL}$). Contudo não pode ser descartada a possibilidade da contribuição de outros compostos de classes químicas diferentes como os flavonoides anotadas na plataforma GNPS e MetFrag (TABELAS 5 e 6). Esta classe química apresentou inibição nos trabalhos apresentados por Thring *et al.* (2009), Bras *et al.* (2010), Azwanida *et al.* (2020) e Jakimiuk *et al.* (2021).

Figura 27 - Ensaio da elastase suína utilizando o extrato de lavagem foliar rico em lactonas sesquiterpênicas



Fonte: Do autor

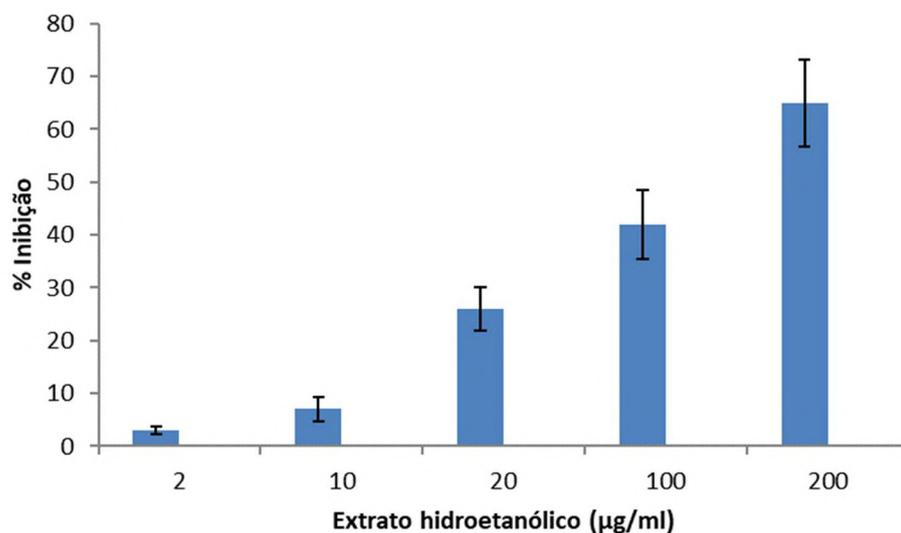
Figura 28 - Precipitação do DMSO com a solução tampão fosfato de sódio em concentrações de 120 μmL e 240 $\mu\text{g/mL}$



Fonte: Do autor

Ao analisarmos o gráfico da porcentagem de inibição *versus* a concentração do extrato hidroetanólico (FIGURA 30) observa-se que o valor de $IC_{50} = 113,1 \pm 22,1 \mu\text{g/mL}$ foi maior que os demais extratos. Este ensaio apresentou uma atividade inibitória menor em comparação ao infuso ($IC_{50}: 81 \mu\text{g/mL}$) e ao extrato de lavagem foliar ($IC_{50}: 38,3 \pm 1,2 \mu\text{g/mL}$) provavelmente devido as classes dos compostos químicos presentes e/ou a estrutura do composto de determinada classe. Ao compararmos as tabelas 2, 3, 5, 6, 7 e 8 para os três extratos, a anotação química realizada pela plataforma GNPS e o MetFrag do extrato hidroetanólico (TABELAS 7 e 8) apresentaram poucas lactonas sesquiterpênicas. Isso pode ser devido à remoção dos tricomas glandulares através da lavagem das folhas com acetona. A análise de IV realizada neste trabalho (FIGURA 16) para o extrato hidroetanólico de *J. floribunda*, em que o seu preparo envolveu primeiramente a lavagem das folhas com acetona para remover os tricomas glandulares, apresentou um resultado de IV ($\nu=1704 \text{ cm}^{-1}$). Este resultado se assemelha aos achados de Iranshahi *et al.* (2007) que analisou um extrato pobre em lactonas sesquiterpênicas da espécie da família Asteraceae e indicaram a presença de carbonila em $\nu=1709 \text{ cm}^{-1}$ (FIGURA 17). O resultado apresentado por Iranshahi *et al.* (2007) corrobora com o resultado de IV ($\nu=1704 \text{ cm}^{-1}$) para o extrato hidroetanólico de *J. floribunda* sugerindo uma remoção dos tricomas glandulares e provavelmente uma menor inibição da enzima, considerando o potencial anti-inflamatório das lactonas sesquiterpênicas (Kim e Choi, 2019; Matos *et al.*, 2021). De acordo com os estudos de Matos *et al.* (2021) as lactonas sesquiterpênicas isoladas de plantas e pertencentes as subclasses germacranolidos, guaianolidos, pseudoguaianolidos e eudesmanolidos mostraram eficácia em inibir a elastase neutrófila humana devido a interação não covalente de sua estrutura com o sítio catalítico da proteína, exigindo as características estruturais das SLs como um grupo carbonila cercado por grupos hidroxila. Jakimiuk *et al.* (2021) relatam que grupos químicos ligados a estrutura do flavonóide tem uma forte contribuição na maior ou menor inibição da enzima. Portanto a relação estrutura-atividade do flavonóide é um fator a ser considerado na atividade inibitória sobre a enzima elastase e isso pode ter contribuído nos resultados apresentados nos ensaios deste trabalho.

Figura 29 - Ensaio da elastase suína utilizando o extrato hidroetanólico



Fonte: Do autor.

6.5.2 Edema de Orelha

A Asteraceae é uma família conhecida por suas propriedades anti-inflamatórias e seu uso como planta medicinal. Uma revisão bibliográfica sobre a atividade anti-inflamatória das espécies mais pesquisadas pode ser encontrado em Lopes *et al.* (2020). Dentre a literatura consultada foram selecionados os trabalhos de Casado *et al.* (2010), Oliveira *et al.* (2013) e Rauh *et al.* (2011) considerando os parâmetros: parte da planta, marcadores, tipo de extrato e condição experimental (TABELA 11).

Tabela 11 - Ensaio de edema de orelha em espécies da Asteraceae

Nome da Espécie	Parte da Planta	Marcadores	Tipo de extrato	Condição experimental/ Aplicação	Resultados
¹ <i>Jungia floribunda</i> Less.	Folhas	-	Extrato aquoso (infuso), hidroetanólico e extrato de lavagem foliar (acetona)	Óleo de cróton. Edema de orelha (0,500 mg/orelha).	Extrato hidroetanólico apresentou atividade anti-inflamatória na dosagem (0,500 mg/orelha)
² <i>Jungia paniculata</i> (D.C) A. Gray	Folhas	Compostos fenólicos total e flavonoides total expressados em termos de ácido gálico e rutina respectivamente.	Extrato hidrometanólico (MEOH50)	12-O-tetradecanoilforbo 1-13-acetato (TPA). Edema de orelha (2,500 mg/orelha).	Apresentou atividade anti-inflamatória.
³ <i>Smallanthus Sonchifolius</i> (Poepp) H. Rob	Folhas	Derivados do ácido clorogênico, flavonoides e lactonas sesquiterpênicas	Extrato aquoso, extrato polar (MeOH), e extrato de folhas lavadas (acetona).	Óleo de cróton. Edema de orelha(0,125; 0,250; 0,500 mg/orelha).	Ambos os extratos apresentaram atividade anti-inflamatória.
⁴ <i>Vernonia scorpioides</i> (Lam.) Pers.	Folhas e flores	---	Extrato etanólico	Edema de orelha (0,0030 a 1,000 mg/orelha) induzida com 12-O-tetradecanoil-1-13 – acetato (TPA)	Apresentou diminuição do edema. Inibição máxima de 80±5,5% (1,000 mg/orelha)

Fonte: (1) Do autor, (2) Casado *et al.* (2010), (3) Oliveira *et al.* (2013), (4) Rauh *et al.* (2011)

Estudos de três extratos realizados por Oliveira *et al.* (2013) na espécie *S. sonchifolius* tiveram classes químicas como derivados de ácidos clorogênicos (ácido cumárico e caféico) identificadas em maior porcentagem no extrato polar hidrometanólico (MeOH-H₂O, 7:3, v/v) e em menor quantidade no extrato aquoso. As lactonas sesquiterpênicas foram identificadas no extrato aquoso e no extrato de lavagem foliar (acetona) em maior quantidade e não foram identificadas no extrato polar. Estes três extratos apresentaram atividade anti-inflamatória mesmo com composições químicas distintas pois diminuíram o edema, que foi

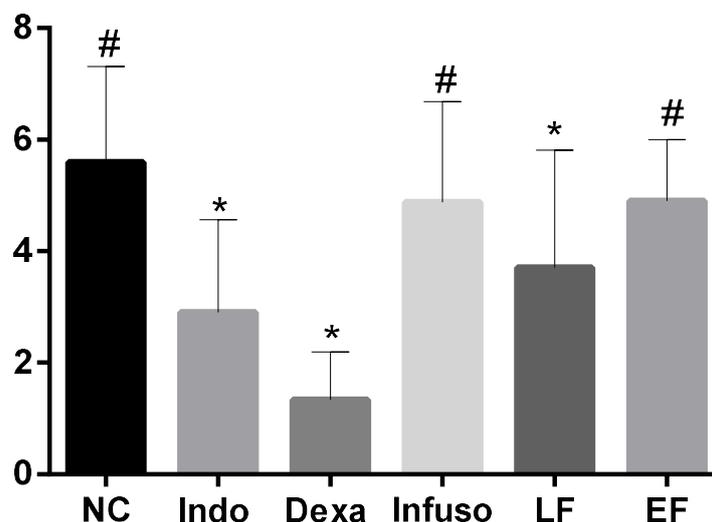
induzido pela aplicação do óleo de cróton. O extrato aquoso apresentou uma resposta estatisticamente significativa com uma taxa de inibição (25,9%) em uma maior dosagem (0,500 mg/orelha).

O extrato de lavagem foliar e o polar apresentaram uma taxa de inibição em todas concentrações (0,125; 0,250 e 0,500 mg/orelha) sendo que no caso do extrato aquoso os constituintes químicos identificados foram em maior parte as lactonas sesquiterpênicas. Assim, possivelmente as lactonas sesquiterpênicas tiveram a sua contribuição no processo anti-inflamatório (Oliveira *et al.*, 2013). No estudo desenvolvido por Rauh *et al.* (2011) a inibição do edema de orelha foi provocado por diferentes compostos químicos presentes na espécie *Vernonia scorpioides* (Asteraceae). Estes compostos foram identificados nesta espécie e são os flavonoides (apigenina e luteolina), triterpenos, lactonas sesquiterpênicas e ácido caféico. Sendo que as lactonas sesquiterpênicas foram descritas no trabalho de Recio *et al.* (2000) pela sua atividade de inibição do edema provocado por TPA. Matos *et al.* (2021) relataram que o potencial anti-inflamatório das lactonas sesquiterpênicas resulta em sua capacidade de direcionar e inibir várias moléculas pró-inflamatórias em diversas vias inflamatórias e prevenir ou reduzir o danos inflamatórios nos tecidos.

No estudo de *Jungia paniculata* (D.C) A. Gray o extrato hidrometanólico apresentou atividade anti-inflamatória e isto foi atribuído a presença de compostos fenólicos identificados neste extrato. Da análise por HPLC-UV dos extratos aquoso, metanólico e hidrometanólico constatou-se que os três extratos apresentavam conteúdo fenólico (Casado *et al.*, 2010). Ao analisarmos o ensaio de edema de orelha de *J. floribunda* para os três extratos (FIGURA 30) observou-se que somente o extrato foliar livre de tricomas glandulares (hidroetanólico) apresentou atividade anti-inflamatória, diminuindo o edema, possivelmente devido aos compostos fenólicos característicos na família da Asteraceae (Lopes *et al.*, 2020). O edema induzido por *O*-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) também pode ser usado para produzir inflamação aguda em camundongos e é um dos constituintes do óleo de cróton (*Croton tiglium* L.) (Gorzalczany *et al.*, 2009). Ele produz inflamação ativando a proteína quinase C (PKC), por meio de uma interação com o diacilglicerol. A PKC é uma proteína quinase dependente de Ca^{2+} e fosfolípido, levando à secreção celular, expressão e proliferação (Gorzalczany *et al.*, 2009). Gorzalczany *et al.* (2009) relataram que extratos ricos em flavonoides de *Heterotheca subaxillaris var latifolia* da família da Asteraceae inibiu até 90% da inflamação total.

Ao observarmos os extratos ricos em lactonas sesquiterpênicas (extrato de lavagem e aquoso) de outras espécies da família (Oliveira *et al.*, 2013), estes demonstraram atividade anti-inflamatória. Os extratos de lavagem foliar e infuso de *J. floribunda* não apresentaram atividade anti-inflamatória e isso pode ser devido a concentração utilizada (0,500 mg/orelha), uma vez que a espécie *Vernonia scorpioides* apresentou atividade máxima em 1,000 mg/orelha no ensaio biológico (Rauh *et al.*, 2011). Ou que diferentes substâncias presentes em cada extrato podem agir por diferentes mecanismos, o que pode ter relação com o uso da planta para o tratamento de doenças anti-inflamatórias. Um resumo dos resultados do teste de edema de orelha e da elastase é apresentado na TABELA 12.

Figura 30 - Ensaio edema de orelha em camundongos.



Fonte: Do autor. NC – Controle Negativo. Controle positivo- Indometacina e Dexametasona. Extrato aquoso (infuso), LF – extrato foliar livre de tricomas glandulares (hidroetanólico), EF – extrato de lavagem foliar rico em lactonas sesquiterpênicas. As amostras foram testadas com uma concentração de 0,500 mg/orelha. Os resultados foram analisados por ANOVA one-way seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunett e expressos como média±EMP. Os símbolos diferentes sugerem diferenças estatísticas com $p \leq 0,05$.

Tabela 12 - Resultados dos testes biológicos utilizando os três extratos das folhas de *J. floribunda*

Ensaio Biológico	Extratos	Resultados	Anotação Química*	Substância Anotada
Elastase	Infuso	Apresentou inibição IC50: 81,2±8,4 µg/mL	Lactonas sesquiterpênicas, flavonoides, ácidos fenólicos	costunolido, ácido clorogênico, 1,3 ácido dicafeoilquínico, kaempferol -3- glucuronídeo
	Lavagem foliar	Apresentou inibição a baixas concentrações IC50: 38,3±1,2 µg/mL	Lactonas sesquiterpênicas Flavonoides	costunolido, quercetina-3- ramnosil- glucosil
	Hidroetanólico	Inibição a maiores concentrações IC50: 113,1±22,1 µg/mL	Flavonoides	luteolina, kaempferol-3- glucuronídeo
Edema de Orelha	Infuso	Não apresentou atividade anti- inflamatória	Lactonas sesquiterpênicas, flavonoides, ácidos fenólicos	costunolido, ácido clorogênico, 1,3 ácido dicafeoilquínico, kaempferol -3- glucuronídeo
	Lavagem foliar	Não apresentou atividade anti- inflamatória	Lactonas sesquiterpênicas Flavonoides	Costunolido, quercetina-3- ramnosil- glucosil
	Hidroetanólico	Apresentou atividade anti-inflamatória na dosagem utilizada de 0,500 mg/orelha	Flavonoides	luteolina, kaempferol-3- glucuronídeo

Fonte: Do autor. * Classes que contém as substâncias identificadas nos extratos das folhas de *J. floribunda* considerando as anotações do MetFrag e GNPS em comum e que foram confirmadas pelos dados da literatura.

6.6 CITOTOXICIDADE

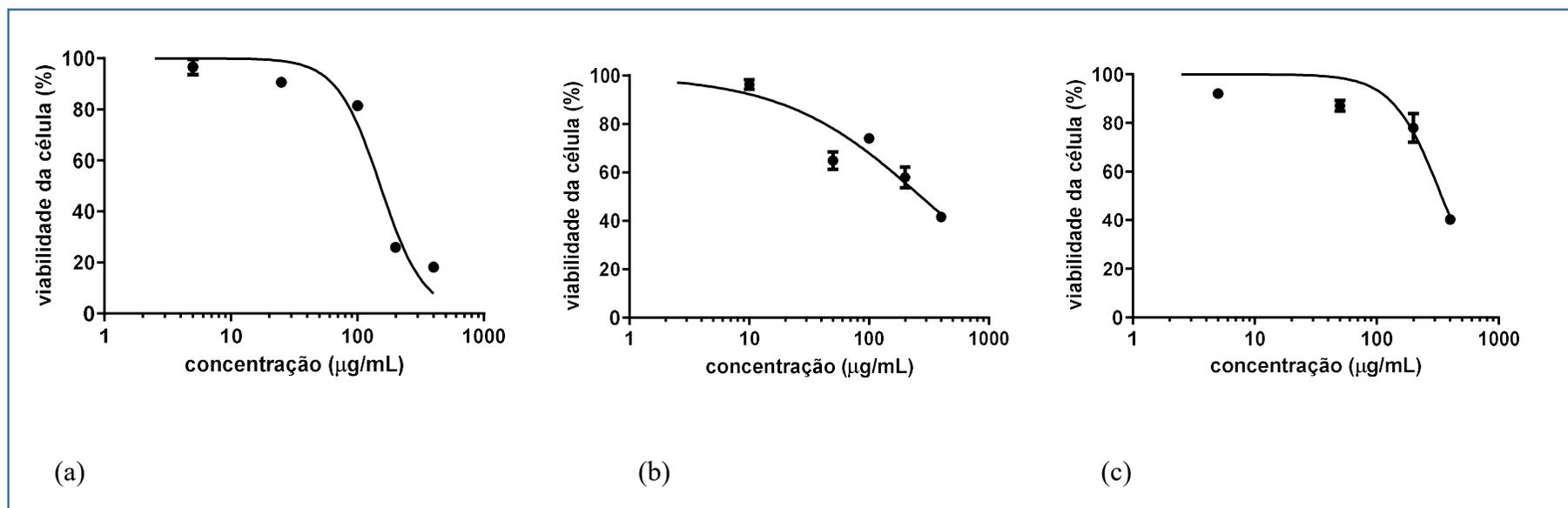
Os valores de IC₅₀ foram calculados para os testes SRB em células da linhagem CD1059SK, o extrato de lavagem foliar ($151,8 \pm 10,70 \mu\text{g/ml}$), infuso ($271,9 \pm 42,9 \mu\text{g/ml}$) e o extrato hidroetanólico ($339,9 \pm 23,6 \mu\text{g/ml}$). As curvas de doses-respostas (FIGURAS 31) foram plotadas de acordo com a quantidade do extrato utilizada em cada teste.

Ao observarmos os três gráficos estes apresentaram valores de IC₅₀ maiores que 100 e menores que 1000 sendo classificados como citotoxicidade moderada de acordo com os trabalhos apresentados por Prayong *et al.* (2008), em que os valores de IC₅₀ em células HepG2 $<100 \mu\text{g/ml}$ são potencialmente citotóxicas, $100 \mu\text{g/ml} < \text{IC}_{50}$ e HepG2 $< 1000 \mu\text{g/ml}$ são moderadamente citotóxicas e $\text{IC}_{50} > 1000 \mu\text{g/ml}$ sem toxicidade. Prayong *et al.* (2008) avaliaram extratos etanólicos a 50% de 14 espécies de plantas utilizadas na medicina popular de Tai contra células da linhagem de hepatoma humano maligno (HepG2). Um trabalho apresentado por Anywar *et al.* (2022) em citotoxicidade de plantas medicinais utilizadas para tratar pessoas com Aids em Uganda, utilizaram a classificação $\text{IC}_{50} \leq 20 \mu\text{g/ml}$ como altamente ativo, $\text{IC}_{50} = 21\text{--}200 \mu\text{g/ml}$ como moderadamente ativo, $\text{IC}_{50} = 201\text{--}500 \mu\text{g/ml}$ como moderadamente fraco e inativo se $\text{IC}_{50} = > 501 \mu\text{g/ml}$. A viabilidade celular foi medida utilizando a célula glioblastoma humano da linhagem U87.CD4.CXCR4 obtida através do Instituto Nacional de Padrões e Controle Biológico para a Aids, Reino Unido. Assim, podemos considerar os três extratos de *J. floribunda* como citotoxicidade moderadamente fraca a moderadamente ativa.

Este resultado de efeito citotóxico moderado foi apresentado em *Conyza canadenses* (L). da família da Asteraceae (Ayaz *et al.*, 2016) em que os extratos considerados moderadamente ativos apresentaram os valores de IC₅₀ de $84,85 \mu\text{g/ml}$ e $94,73 \mu\text{g/ml}$ em células cancerosas. Para a espécie *J. sellowi* os valores para os extratos utilizados foram IC₅₀ de $100 \mu\text{g/ml}$ a $290 \mu\text{g/ml}$ (Azevedo *et al.*, 2016) e valores $\text{IC}_{50}=580 \mu\text{g/ml}$ (Vicente *et al.*, 2020) que consideraram a citotoxicidade como moderadamente fraca a moderadamente ativa.

O extrato hidroetanólico de *J. floribunda* apresentou menos toxicidade em relação aos outros extratos. Esta menor toxicidade pode ser devido à composição química do extrato. Ayaz *et al.*, 2016 e Pasayeva *et al.*, 2021 relataram que a composição química dos extratos influi no efeito citotóxico das células. E que as lactonas sesquiterpênicas, esteroides, terpenos tem um efeito sinérgico na atividade citotóxica. Assim, é provável que as lactonas sesquiterpênicas e outros compostos químicos podem agir de forma sinérgica na atividade citotóxica. E isto pode ser levado em conta na sua utilização para fins terapêuticos.

Figura 31 – Curva dose/resposta dos extratos em células da linhagem CCD1059SK por 48 horas



Fonte: Do autor. (a) Extrato de lavagem foliar ($\text{IC}_{50}: 151,8 \pm 10,70 \mu\text{g/ml}$), (b) Infuso ($\text{IC}_{50}: 271,9 \pm 42,9 \mu\text{g/ml}$), (c) Extrato hidroetanólico ($\text{IC}_{50}: 339,9 \pm 23,6 \mu\text{g/ml}$).

7 CONCLUSÃO

O estudo do perfil químico dos extratos de *Jungia floribunda* Less foi realizado utilizando a plataforma GNPS Molecular Networking, a qual permite fazer a anotação de moléculas da espécie investigada com as bibliotecas espectrais presentes na plataforma. Essa ferramenta em conjunto com o programa MetFrag e dados da literatura permitiu a identificação de estruturas de substâncias no modo positivo e negativo de ionização, sendo possível observar uma dominância de compostos fenólicos e lactonas sesquiterpênicas. Esses compostos fenólicos em sua maioria foram classificados como flavonoides e ácido caféico, os quais são conhecidos por apresentar atividade antioxidante e anti-inflamatória. Os germacranolidos um grupo da classe das lactonas sesquiterpênicas foi identificado nas anotações e é caracterizado por apresentar atividade anti-inflamatória. Os germacranolidos e os compostos fenólicos tem sido relatado como substâncias que contribuem com a inibição da enzima elastase. Esses resultados sugerem que a espécie em estudo apresenta compostos fenólicos e lactonas sesquiterpênicas em sua composição, e que estes contribuem para a atividade anti-inflamatória da espécie o que sugere que essa espécie estudada, que apresenta uma citotoxicidade moderada, possa ser usada como planta medicinal pela população.

8 REFERÊNCIAS

- ABABBOUD R. T; VIMALANATHAN, S. Pathogenesis of COPD. Part I: The role of protease antiprotease imbalance in emphysema. **International Journal of Tuberculosis and Lung Diseases**, Vancouver, v. 12, n.4, p. 361–367, 2008.
- ACOSTA-LEÓN, K.L. *et al.* Hypoglycemic Activity of *Jungia rugosa* Less. on Induced Diabetic Mice (*Mus Musculus*). **PharmacologyOnline**, Berlin, v.1, p. 236-245, 2019.
- ACOSTA-RECALDE, P. *et al.* Uso de plantas medicinales y fitoterápicos em pacientes com diabetes Mellitus tipo 2. **Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud**, San Lorenzo, v. 16, n. 2, p. 6-11, 2018.
- ADAMS, R. P. Identification of Essencial Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, **Allured Publishing Corporation, Carol Stream, USA**, ed. 4.1, p. 809, 2017.
- ADEKENOV, S. M. Sesquiterpene lactones with unusual structure. Their biogenesis and biological activity. **Fitoterapia**, Italy, v. 121, p. 16-30, 2017.
- ALMEIDA, A. M. *et al.* Diversidade e ocorrência de Asteraceae em cerrados de São Paulo. **Biota Neotropica**, São Paulo, v. 5, p. 1-17, 2005.
- AMORIM, M. H. R., *et al.* Sesquiterpene lactones: Adverse health effects and toxicity mechanisms. **Critical Reviews in Toxicology**, London, p. 43, n.7, p.559–579, 2013. doi:10.3109/10408444.2013.813905
- ANYWAR, G. U., *et al.* Cytotoxicity of medicinal plant species used by traditional healers in treating people suffering from HIV/AIDS in Uganda. **Frontiers of Toxicology**, London, v. 4, 2022.
- AZWANIDA, Z.N.N.; JONATHAN, O.E.; MELANIE-JAYNES, H. Antioxidant, Anti-collagenase, Anti-elastase and Anti-tyrosinase Activities of an Aqueous *Cosmos caudatus* Kunth (Asteraceae) Leaf Extract. **Tropical Journal of Natural Product Research**, Nigeria, v.4, n.12, p. 1124-1130, 2020. doi.org/10.26538/tjnpr/v4i12.15
- AZEVEDO, L. *et al.* Three new trixane glycosides obtained from the leaves of *Jungia sellowii* Less. using centrifugal partition chromatography. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, Germany, v.12, p. 674-683, 2016.
- AZEVEDO, G.A. Caracterização química e atividades biológicas dos óleos essenciais das folhas de *Eugenia* spp (Myrtaceae) ocorrentes na amazônia de terra firme. 2014.121 p. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2014.
- AYAZ, F. *et al.* Cytotoxic effect of *Conyza Canadensis* (L.) cronquist on human lung cancer cell lines. **Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences**, Turkey, v. 13, n.3, p. 342-346, 2016.

BALCKE, G.U. *et al.* Multi-omics of tomato glandular trichomes reveals distinct features of central carbon metabolism supporting high productivity of specialized metabolites. **Plant Cell**, Oxford, v. 29, p. 960-983, 2017.

BARBOSA, G. *et al.* Medicinal plants: A general review and a phytochemical and ethnopharmacological screening of the native Argentine Flora. **Kurtziana**, Cordoba, v. 34, n. 1-2, p. 7-365, 2009.

BODE, W.; MEYER, E.; POWERS, J. C. Human leukocyte and porcine pancreatic elastase: x-ray crystal structures, mechanism, substrate specificity, and mechanism-based inhibitors. **Biochemistry**, USA, v. 28, n.5, p.1951–1963, 1989. doi:10.1021/bi00431a001

BOHLMANN, F; ZDERO, C. Naturally occurring terpene derivatives. Part 88. Constituents of tribe Mutisieae. **Phytochemistry**, USA, v. 16, n. 2, p. 239-242, 1977.

BOHLMANN, F; ZDERO, C; LEVAN, N. Naturally occurring terpene derivatives. Part 168, New geranylcoumarin derivatives and further constituents of the tribe Mutisieae. **Phytochemistry**, USA, v. 18, n. 1, p. 99-102, 1979.

BOHLMANN, F. *et al.* Naturally occurring terpene derivatives. Part 474. A tetracyclic sesquiterpene, further isocedrene, and guaiene derivatives from *Jungia stuebelii*. **Phytochemistry**, USA, v. 22, n. 5, p. 1201-1206, 1983.

BOHLMANN, F. *et al.* Polyacetylene compounds from *Jungia seteriana*. **Planta Medica**, India, v. 50, n. 2, p. 190-191, 1984.

BOHLMANN, F. *et al.* Germacranolides from *Gochnatia vernonioides*. **Phytochemistry**, USA, v. 23, p.1989–1993, 1984.

BRAS, N. F. *et al.* Inhibition of pancreatic elastase by polyphenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, USA, v. 58, p. 10668 – 10676, 2010.

BRETAS, R. M. Avaliação da capacidade instalada para a produção e certificação de células animais. 2011. 170 p. Dissertação de Mestrado. Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Rio de Janeiro, RJ. 2011.

BUENO, J. C. O uso de plantas medicinais na cultura popular no município de Bueno Brandão – MG. 2005. 83 p. Trabalho de conclusão de curso - ASMEC, Ouro Fino, MG, 2005.

CALVOPÍÑA, K. *et al.* A New Sesquiterpene Essential Oil from the Native Andean Species *Jungia rugosa* Less (Asteraceae): Chemical Analysis, Enantiomeric Evaluation, and Cholinergic Activity. **Plants**, Basel, v.10, p.2102, 2021. <https://doi.org/10.3390/plants10102102>

CAMILIER, A. A. *et al.* Alpha-1 antitrypsin deficiency: diagnosis and treatment. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, Brasília, v. 34, n. 7, p. 514-527, 2008.

CAMPOS, K.C. *et al.* Biological screening of select Puerto Rican plants for cytotoxic and antitumor activities. **Puerto Rico Health Sciences Journal**, Puerto Rico, v. 34, p. 25, 2015.

CANUTO, G. A. B. *et al.* Metabolômica: definições, estado-da-arte e aplicações representativas. **Química Nova**, São Paulo, v. 41, n.1, p. 75-91, 2018.

CASADO, R. *et al.* Anti-inflammatory and antioxidant activities of *Jungia paniculata*. **Pharmaceutical Biology**, London, v. 48, n. 8, p. 897-905, 2010.

CATALÁN, C.A.N; BORKOSKY, S.A; JOSEPH-NATHAN, P. The secondary metabolite chemistry of the subtribe Gochnatiinae (Tribe Mutisieae, Family Compositae). **Biochemical Systematics in a Ecology**, USA, v. 24, n. 7/8, 1996.

CERVILHA, D. A. B. Avaliação experimental da responsividade das vias aéreas em camundongos após indução do enfisema pulmonar por elastase. 2014.76p. Dissertação de mestrado – Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2014.

CHAGAS-PAULA, D. A. Atividade anti-inflamatória e caracterização fitoquímica do chá e de diferentes extratos de *Tithonia diversifolia* (Asteraceae). 2010. 116p. Dissertação de mestrado – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2010.

CHIARADIA, M. C. O Estado da Arte da Cromatografia Associada à Espectrometria de Massas Acoplada à Espectrometria de Massas na Análise de Compostos Tóxicos em Alimentos. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, p. 623-636, 2008.

CROCETTI, L. *et al.* A patenting perspective on human neutrophil elastase (HNE) inhibitors and their therapeutic applications. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, London, v. 29, p.555–578, 2019. doi: 10.1080/13543776.2019.1630379

CUCCIOLONI, M. *et al.* Natural Occurring Polyphenols as Template for Drug Design. Focus on Serine Proteases. **Chemical Biology & Drug Design**, USA, n. 74, p. 1–15, 2009.

D'AGOSTINO, M. *et al.* Flavonol Glycosides from *Jungia paniculata*. **Fitoterapia**, Italia, v. 66, n.3, p. 283, 1995.

DAI, P.; HARADA, Y.; TAKAMATSU, T. Highly efficient direct conversion of human fibroblasts to neuronal cells by chemical compounds. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, USA, v. 56, n. 3, p. 166–170, 2015.

DEGEN DE ARRÚA, R; GONZÁLEZ, Y. Plantas utilizadas en la medicina popular paraguayana como antiinflamatorias, **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, vol. 13, núm. 3, mayo, pp. 213-231, Universidad de Santiago de Chile Santiago, Chile, 2014.

DEMARQUE, D. P. *et al.* Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. **Natural Product Reports**, USA, v. 33, n.3, p. 367-524, 2016.

DUSCHATZKY, C. B *et al.* Evaluation of chemical and antiviral properties of essential oils from South American plants. **Antiviral Chemistry and Chemotherapy**, USA, n. 16, p. 247-251, 2005.

DUJAK, C. R. *et al.* Estudios preliminares micrográficos e histoquímicos en hojas de *Jungia floribunda* Less.. (Asteraceae), de uso medicinal. **Steviana**, Paraguay, v. 2, 2010.

EISENBRANDE, G., *et al.* Methods of *in vitro* toxicology. **Food and Chemical Toxicology**, USA, v. 40, p.193-236, 2002.

ENCISO, E; ARROYO, J. Efecto antiinflamatorio Y antioxidante de los flavonoides de las hojas de *Jungia rugosa* Less. (matico de puna) en um modelo experimental en ratas. **Anales de la Facultad de Medicina**, Lima, v. 72, n. 04, p. 231-237, 2011.

FERNANDES, E.S. *et al.* Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **European Journal of Pharmacology**, London, v. 569, n. 3, p. 228-236, 2007.

FERRAZ, M. C; SILVA, V. J. Síntese de produtos naturais sesquiterpênicos. **Química Nova**, São Paulo, p. 237 – 250, 1984.

FERREIRA, V. F; PINTO, A. C. A fitoterapia no mundo atual. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 9, p. 1829, 2010.

FIEHN, O. Metabolomics-the link between genotypes and phenotypes. **Plant Molecular Biology**, USA, v. 48, p. 155–171, 2002.

FILHO, V. C.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, São Paulo, v. 21, n.1, 1998.

FREY, F. *et al.* Sesquiterpene lactones – insights into biosynthesis, regulation and signalling roles. **Critical Reviews in Plant Sciences**, London, 2024.
doi.org/10.1080/07352689.2024.2307240

GADEK, J. E.; PACTH, E. R. The protease-antiprotease balance within the human lung: implications for the pathogenesis of emphysema. **Lung**, USA, v. 168, n. 1, p. 552-564, 1990.

GERACE, A. *et al.* X-ray structural study of Human neutrophil elastase inhibition with a series of azaindoles, azaindazoles and isoxazolones, **Journal of Molecular Structure**, USA, v. 1274, part 1, 2023.

GORZALCZANY, S. *et al.* 2009 – Anti-inflammatory activity of *Heterotheca subaxillaris* var. *latifolia*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v.19, p. 876-879, 2009.

GRANICA *et al.* Antioxidant and anti-inflammatory flavonol glucuronides from *Polygonum aviculare* L. **Fitoterapia**, Italy, v. 91, p. 180–8, 2013.

- GU, D., YANG, Y., ABDULLA, R., and A, H. A. Characterization and identification of chemical compositions in the extract of *Artemisia rupestris* L. by liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, Canada, v. 26, n.1, p.83–100, 2012.
- GUERRA, M.P; NODARI, R.O. Biodiversidade e matérias primas farmacêuticas. In: SIMÕES, C.M.O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6^aed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS/ Editora da UFSC, p.13-26, 2010.
- HELUANI, C. S. *et al.* Triterpenes and sesquiterpene lactones from *Cyclolepis genistoides*. **Phytochemistry**, USA, v. 45, n. 4, p. 801- 805, 1997.
- HIRSCHMANN, S. D; BORDAS, E. Paraguayan Medicinal Compositae. **Journal of Ethnopharmacology**, USA, v. 28, p. 163-171, 1990.
- HORAI, H. *et al.* MASSBANK: a public repository for sharing mass spectral data for life sciences. **Journal of Mass Spectrometry**, USA, v.45, 703 – 714, 2010.
- HOFBAUER, S. *et al.* Stabilization of porcine pancreatic elastase crystals by glutaraldehyde cross-linking. **Acta Crystallographica**, Africa, F71, p.1346–1351, 2015.
- HURRELL, J. A.; PUENTES, J. P. Medicinal and aromatic species of Asteraceae commercialized in the conurbation Buenos Aires-La Plata (Argentina). **Ethnobiology Conservation**, Paraíba, v. 2, n.7, 2013.
- HVATTUM, E.; EKEBERG, D. Study of the collision-induced radical cleavage of flavonoid glycosides using negative electrospray ionization tandem quadrupole mass spectrometry. **Journal Mass Spectrometry**, USA, v. 38, n. 1, p 43-9, 2003.
- IBANEZ, S; GALLET C; DESPRES L. Plant Insecticidal Toxins in Ecological Networks. **Toxins**, Basel, v. 4, p. 228-243, 2012.
- IRANSHASHI, M; EMAMI, S. A; MAHMOUD-SOLTANI, M. Detection of sesquiterpene lactones in Ten *Artemisia* species population of Khorasan provinces. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, Iran, v. 10, n. 3, p. 183-188, 2007.
- JAISWAL, R. *et al.* Identification and characterization of chlorogenic acids, chlorogenic acid glycosides and flavonoids from *Lonicera henryi* L. (Caprifoliaceae) leaves by LC MSn. **Phytochemistry**, USA, v. 108, p. 252-263, 2014.
- JAKIMIUK, K. *et al.* Flavonoids as inhibitors of human neutrophil elastase. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, London, v. 36, n.1, p.1016 – 1028, 2021.
- JANOFF, A. Elastase in tissue injury. **Annual Review of Medicine**, USA, n. 36, p. 207-16, 1985.
- JANOFF, A. *et al.* Cigarette smoke inhalation decreases α_1 .antitrypsin activity in rat lung. **Science**, USA, v. 206, p.1313–1314, 1979.

JOHANSSON, S. U. Neutrophil multitarget functional bioassay to detect anti-inflammatory natural products. **Journal Natural Products**, USA, v. 65, p. 32-41, 2002.

JUDD, W. S. *et al.* **Plant Systematics: a phylogenetic approach**. 3^a ed. Massachussets: Sinauer Associates, INC Publishers, 2008.

KANEHISA, M. *et al.* The KEGG resource for deciphering the genome. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 32(suppl 1), p. D277–D280, 2004.

KAWABATA, K., HAGIO, T., MATSUOKA, S. The role of neutrophil elastase in acute lung injury. **European Journal of Pharmacology**, London, v. 451, n.1, p.1–10, 2002.

KEYEL, P. A. *et al.* How is inflammation initiated? Individual influences of IL-1, IL-18 and HMGB1. **Cytokine**, USA, v. 69, n. 1, p. 136–145, 2014.

KIM, Y; UYAMA, H; KOBAYASHI, S. Inhibition effects of (+) – catechin – aldehyde polycondensates on proteinases causing proteolytic degradation of extracellular matrix. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, USA, v. 320, p. 256-261, 2004.

KRAWISZ, J. E.; SHARON, P.; STENSON, W. F. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. **Gastroenterology**, USA, v. 87, n. 6, p. 1344–1350, 1984.

KUMAR, A. *et al.* UPLC/MS/MS method for quantification and cytotoxic activity of sesquiterpene lactones isolated from *Saussurea lappa*. **Journal of Ethnopharmacology**, USA, v. 155, p. 1393-1397, 2014.

LAJTER, I. Biologically active secondary metabolites from Asteraceae and Polygonaceae species. 2015. 66 p. Thesis, Szeged, Hungary, 2015.

LAKSHMI, S. A review on chromatography with High Performance Liquid chromatography (HPLC) and its functions. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, USA, v. 4, n. 1, p. 1–15, 2015.

LANÇAS, F.M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, São Paulo, v.1, p. 35-61, 2009.

LARGMAN, C; BRODRICK, J. W; GEOKAS, M. C. Purification and characterization of two human pancreatic elastases. **Biochemistry**, USA, v. 15, n.11, p.2491–2500, 1976.

LEATHERBARROW, R.J. **GraFit Version 5.0**. Erithacus Software Ltd, Staines, U.K, 1992.

LEE, K.K. *et al.* Inhibitory Effects of 150 plant extracts on elastase activity, and their anti-inflammatory effects. **International Journal of Cosmetic Science**, France, v. 21, p.71-82, 1999.

LEE, J. *et al.* Targeted isolation of cytotoxic sesquiterpene lactones from *Eupatorium fortune* by the NMR annotation tool, Smart 2.0. **ACS Omega**, USA, vol. 5, p. 23989-23995, 2020.

LI, Z. *et al.* Rapid Identification of Flavonoid Constituents Directly from PTP1B Inhibitive Extract of *Raspberry (Rubus idaeus L.)* Leaves by HPLC–ESI–QTOF–MS–MS. **Journal of Chromatographic Science**, USA, v. 54, n.5, p. 805–810, 2016.

LOPES, D.C. *et al.* **Anti-Inflammatory Activity of the Compositae Family and Its Therapeutic Potential**. Planta Med. New York: Georg Thieme Verlag KG Stuttgart, 2020.

LOPES, N. P. Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. **Natural Product Reports**, USA, v. 33, n. 3, 432-455, 2016.

MACHADO, K. C. *et al.* A systematic review on the neuroprotective perspectives of beta-carophyllene. **Phytotherapy Research**, USA, v. 32, n. 12, p. 2376-2388, 2018.

MALDONADO, E; FLORES, A.M; ORTEGA, A. A germacrolide from *Gochnatia hypoleuca* and its transformation into a melampolide. **Phytochemistry**, USA, v. 27, n. 3, p. 861-863, 1988.

MATOS, M.S.; ANASTÁCIO, J.D.; SANTOS, N. C. Sesquiterpene Lactones: Promising Natural Compounds to Fight Inflammation. **Pharmaceutics**, Basel, v. 13, p. 991, 2021. doi.org/10.3390/pharmaceutics13070991

MAFFEI, M. E. Sites of synthesis, biochemistry and functional role of plant volatiles. **South African Journal of Botany**, South African, v. 76, n. 4, p. 612-631, 2010.

MASSBANK. Disponível em: <<https://massbank.eu/MassBank/>>. Acesso em 27 Mar 2021.

MEDZHITOV, R. *et al.* Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. **Overview Essay**, USA, v.40, n.6, p. 771–776, 2010.

MEIRER, K; STEINHILBER, D; PROSCHAK, E. Inhibitors of the arachidonic acid cascade: Interfering with multiple pathways. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, Finland, v. 114, n. 1, p. 83–91, 2014.

MELZIG, MF; LOSER, B; CIESIELSKI, S. Inhibition of neutrophil elastase activity by phenolic compounds from plants. **Pharmazie**, Germany, v. 56, n. 12, p. 967-70, 2001.

MOUGA, D. *et al.* Bees and Plants in a transition area between Atlantic Rain Forest and Araucaria Forest in Southern Brasil. **Revue D Ecologie-La Terre Et La Vie**, France, v. 67, 2012.

MORSE, J. O. Alpha1 -antitrypsin deficiency. **New England Journal of Medicine**, Massachusetts, v. 299, p. 1045-1048;1099-1105, 1978.

NAKANISHI, K. **Infrared absorption spectroscopy, practical**. Nankodo, Tokyo, Japan; HoldenDay, San Francisco, Calif., 1962.

NEWMAN, D.J; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, USA, v. 70, n. 3, p. 461-77, 2007.

OLIVEIRA, R. B. *et al.* Topical anti-inflammatory activity of *yacon* leaf extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia-Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Rio de Janeiro, v. 23, n.3, 2013.

OLIVEIRA, E.B; SALGADO, M.C. Pancreatic Elastases. **Handbook of Proteolytic Enzymes**, v. 3, p. 2639-2645, 2013. doi: 10.1016/B978-0-12-382219-2.00584-6

PAVIA, D. *et al.* **Introduction to spectroscopy**. 1^a ed. Boston: Cengage Learning, 2010.

PADILLA-GONZALEZ, G. F.; SANTOS, F. A.; COSTA, F. B. Sesquiterpene Lactones: More Than Protective Plant Compounds With High Toxicity, Critical Reviews. **Plant Sciences**, London, v. 35, n.1, p.18-37, 2016. doi: 10.1080/07352689.2016.1145956

PADRINES, M., RABAUD, M., BIETH, J.G., Oxidized α 1-proteinase inhibitor: a fast-acting inhibitor of human pancreatic elastase, **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, UK, v. 1118, Issue 2, p. 174-178, 1992.

PASAYEVAA, L. *et al.* Phytochemical composition and cytotoxic activity of four Cousinia Species against human hepatocellular carcinoma (HepG2) cell line. **Phytomedicine Plus**, Amsterdam, v. 1, 2021.

PEDROSA, R. S.; ANDRADE, G. PIRES, R. H. Plantas medicinais: uma abordagem sobre o uso seguro e racional. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 2, 2021.

PÉREZ, Y. *et al.* Inhibition of cyclooxygenase and 5-Lipoxygenase enzymes by d-002 (BEESWAX ALCOHOLS). **Current Topics in Nutraceutical Research**, USA, v. 12, n. 1–2, p. 13–18, 2014.

PRAYONG, P. *et al.* Cytotoxic activity screening of some indigenous Thai plants. **Fitoterapia**, Italy, v.79, p. 598-601, 2008.

RAINVILLE, P.D. *et al.* Advances in liquid chromatography coupled to mass spectrometry for metabolic phenotyping. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 61, p. 181-191, 2014.

REIS, F. J.C; DAMACENO, N. Fibrose cística. **Journal of Pediatrics**, Rio de Janeiro, v. 74, n. Supl 1, p. S76S94, 1998.

RAUH, L. K. *et al.* Effectiveness of *Vernonia scorpioides* ethanolic extract against skin inflammatory processes. **Journal of Ethnopharmacology**, USA, v. 132, n. 2, p. 390-397, 2011.

RECIO, M.C. *et al.* In vivo activity of pseudoguaianolide sesquiterpene lactones in acute and chronic inflammation. **Life Sciences**, Hong Kong, v.66, p. 2509–2518, 2000.

RISCALA, E.C. *et al.* A glycosidic eudesmanolide from *Hyaloseris salicifolia*. **Phytochemistry**, USA, v. 53, p. 873 -876, 2000.

RUIZ, C; DIAZ, C; ROJAS, R. Composición química de aceites esenciales de 10 plantas aromáticas peruanas. **Revista de la Sociedad Química del Perú**, Lima, v. 81, n. 2, p. 81-94, 2015.

RUTTIES, C. *et al.* MetFrag relaunched: incorporating strategies beyond in silico fragmentation. **Journal of Cheminformatics**, USA, v. 3, p.1-16, 2016.

SAIN S. *et al.* Beta caryophyllene and caryophyllene oxide, isolated from *Aegle marmelos*, as the potent anti-inflammatory agents against lymphoma and neuroblastoma cells. **Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry**, Sharjah, v.13, n. 1, p. 45-55, 2014.

SALEM, P. P. O. *et al.* Anti-urolithiatic and anti-inflammatory activities through a different mechanism of actions of *Cissus gongylodes* corroborated its ethnopharmacological historic. **Journal of Ethnopharmacology**, USA, v. 253, 2020.

SANTANA, R. O. *et al.* Aspectos botânicos, fitoquímicos e citotóxicos de espécies vegetais pertencentes às famílias Moraceae, Asteraceae, Theaceae, Malvaceae, Junglandaceae, Celastraceae e Illiciaceae: uma revisão da literatura. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 17, 2021. São Paulo, DOI: 10.33448/rsd-v10i17.24331.

SANTOS, M.P. *et al.* *Cannabis sativa* e *Salvia divinorum* – uso irresponsável de plantas medicinais com atividade psicoativas. **Revista de Trabalhos Acadêmicos**, Belo Horizonte, n. 2, p. 1-7, 2011.

SHANNON, P. *et al.* Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. **Genome Research**., New York, v. 13, p. 2498–2504, 2003.

SIEDLE, B. *et al.* Sesquiterpene lactones as inhibitors of human neutrophil elastase. **Bioorganic e Medicinal Chemistry**, USA, v.10, p. 2855–2861, 2002.

SIEDLE, B. *et al.* The effect of sesquiterpene lactones on the release of human neutrophil elastase. **Biochemical pharmacology**, USA, v. 65, n. 5, p. 897-903, 2003.

SILVEIRA E SÁ, *et al.* Sesquiterpenes from essential oils and anti-inflammatory activity. **Natural Product Communication**, USA, v. 10, n. 10, p. 1767-1774, 2015.

SILVERSTEIN, R. M., WEBSTER, F. X., KIEMLE, D. J. **Identification of organic compounds**. Seventh Edition, John Wiley e Sons, Inc, 2005, 502p.

SIMOES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017.

SORIAL, N; RAMOS, P. Uso de Plantas Medicinales En La Atención Primaria de Salud En Paraguay: Algunas Consideraciones Para Su Uso Seguro y Eficaz, Paraguay. **Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud**, Paraguay, v. 2, n. 13, p.8-17, 2015.

SOUZA, T. J. T. Estudo dos constituintes químicos dos óleos volatéis de espécies de *Eupatorium* nativas do Rio Grande do Sul e construção de banco de dados de lactonas sesquiterpênicas. 2014. 302 p. Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

SOUZA, V. P. Morfoanatomia de órgãos vegetativos aéreos e sistemas subterrâneos de *Ichthyothere mollis* Baker e *Jungia floribunda* Less. (Asteraceae) Ocorrentes no Cerrado rupestre do Estado de Goiás. 2014. 107 p. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Vegetal - Universidade Federal de Goiás, GO, 2014.

SPICER, R. *et al.* Navigating freely-available software tools for metabolomics analysis. **Metabolomics**, v. 13, n. 106, p. 1-16, 2017.

STEFANI *et al.* Sesquiterpene lactones from *Dimerostemma* (Asteraceae) and *in vitro* potencial anti-inflammatory activities. **Zeitschrift für Naturforschung**, 61c: 647 – 652, 2006.

STEIN, S. E; SCOTT, D. R. Optimization and testing of mass spectral library search algorithms for compound identification. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 5, p. 859, 1994.

STOCKLEY, R. A. *et al.* The effect of augmentation therapy on bronchial inflammation in α 1-antitrypsin deficiency. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 165, n. 11, p. 1494-1498, 2002.

SUMNER, L. W. *et al.* Proposed Minimum Reporting Standards for Chemical Analysis: Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI). **Metabolomics**, USA, v. 3, n. 3, p. 211-221, 2007.

SUMNER, L. W. *et al.* Modern Plant Metabolomics: Advanced Natural Product Gene Discoveries, Improved Technologies, and Future Prospects. **Natural Product Reports**, v. 32, n. 2, p. 212-229, 2015.

THRING, T.S.A. *et al.* Anti-collagenase, anti-elastase and anti-oxidant activities of extracts from 21 plants. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, USA, n.9, v.27, p.1-11, 2009.

TOLONEN, A. *et al.* Identification of isomeric dicaffeoylquinic acids from *Eleutherococcus senticosus* using UHPLC-ESI/TOF/MS and ¹H-NMR Methods. **Phytochemical analysis**, USA, v. 13, p. 316-328, 2002.

TRAVIS J.; SALVESEN, G. S. Human plasma proteinase inhibitors. **Annual Review of Biochemistry**, USA, v. 52, p.655-709, 1983.

- TROWBRIDGE, H.; EMLING, R.C. **Mediadores químicos da resposta vascular. Inflamação uma revisão de processos.** Quessence Publishing Co. Inc. São Paulo, p. 27-42, 172p, 1996.
- TUBARO, A. *et al.* Screening of the topical anti-inflammatory activity of some Central **American plants**, USA, v. 81, 2002.
- TUBARO, A.; DRI, P.; DELBELLO, G.; *et al.* The croton oil ear test revisited. **Agents and Actions**, USA, sl, v. 17, n. 3–4, p. 347–349, 1986.
- VERDUGO, V.; *et al.* Main Polar Metabolites from Leaves of the Native Andean Species *Jungia rugosa* Less (Asteraceae). **ESPOCH Congresses: The Ecuadorian Journal of S.T.E.A.M.**, Dubai, v. 3, n. 1, p.421–433, 2023. doi 10.18502/epoch.v3i1.14460
- VESTENA, A. S. *et al.* Validation of a method for quantification of perezone in roots of *Jungia floribunda* Less (asteraceae), **7th BCNP, XXXIII RESEM**, Rio de Janeiro, 2019.
- VICENTE G. *et al.* Anti-inflammatory profile of *Jungia sellowii* Less. By downregulation of proinflammatory mediators and inhibition of NF- κ B and p38 pathways. **Mediators of Inflammation**, ID 9078956, 2020. doi: 10.1155/2020/9078956.
- VICHNEWSKIT, W. *et al.* Granilin and ivasperin from *Ambrosia polystachya*. ¹³C-NMR spectra of hydroxylated isosalantones. **Phytochemistry**, USA, v. 15, p. 1531-1532, 1976.
- VICHAJ, V.; KIRTIKARA, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. **Nature Protocols**, USA, v. 1, n. 3, p. 1112–1116, 2006.
- VIEIRA, P. C. Classificação pela forma física do sistema cromatográfico. **Química Nova**, São Paulo, v. 7, n. 7, p. 21–25, 1998.
- WANG, M. *et al.* Sharing and community curation of mass spectrometry data with GNPS. **Nature Biotechnology**, UK, v. 34, n. 8, p. 828-83, 2016.
- WERB, Z. *et al.* Elastases and elastin degradation. **Journal of Investigative Dermatology**, USA, v.79, Suppl 1:154s-159s, 1982
- WILCHES, I. *et al.* Evaluation of anti-inflammatory activity of the methnolic extract from *Jungia rugosa* leaves in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, USA, v. 173, p. 166-171, 2015.
- WINK, M. Plant breeding: Importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. **Theoretical Applied Genetics**, Germany, v.75, n.2, p. 225-233, 1988.
- WISHART, D. S. *et al.* HMDB 3.0 – The human metabolome database in 2013. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 41, n. D1, p.801-807, 2013.
- WOLF, S. *et al.* In silico fragmentation for computer assisted identification of metabolite mass spectra. **Bioinformatics**, Oxford, v. 11, p. 148-160, 2010.

WOLFENDER, J-L. HPLC in Natural Product Analysis: The Detection Issue. **Planta Medica**, India, v. 75, p. 719-734, 2009.

XU, G *et al.* Chemical constituents from the leaves of *Ilex paraguariensis* inhibit human neutrophil elastase. **Archives of Pharmacal Research**, Germany, v. 32, n. 9, p.1215-1220, 2009.

YANG, J. Y. *et al.* Molecular Networking as a dereplication strategy. **Journal of natural products**, USA, v. 76, p. 1686 – 1699, 2013.

YBARRA, M. I. *et al.* A cyperane and trixanes from *Jungia polita*. **Phytochemistry**, USA, v. 31, n. 10, p. 3627-3629, 1992.

ZDERO, C; BOHLMANN, F; BOHLMANN, KING, R. M; ROBINSON, H. α – Isocedrene derivatives, 5-methyl coumarins and other constituents from the subtribe nassauviinae of the compositae. **Phytochemistry**, USA, v. 25, n. 12, p. 2873 – 2882, 1986.

9 ANEXOS

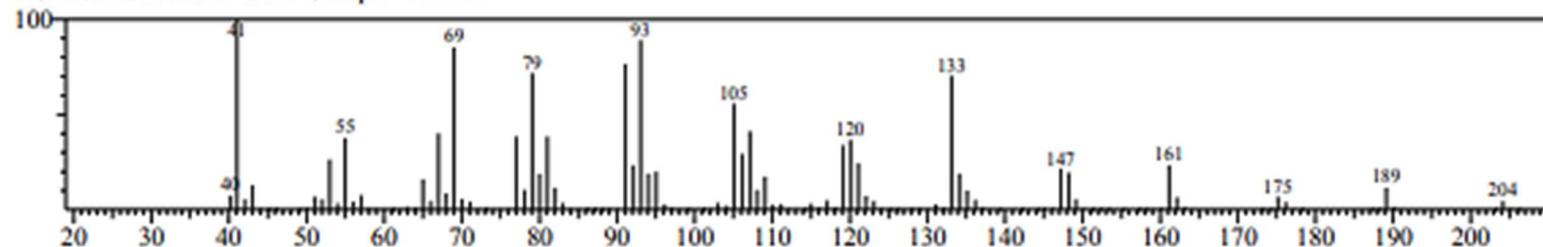
ANEXO A – β -cariofileno

<< Target >>

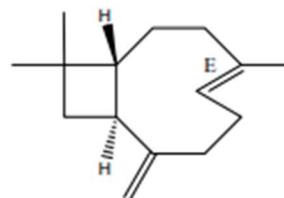
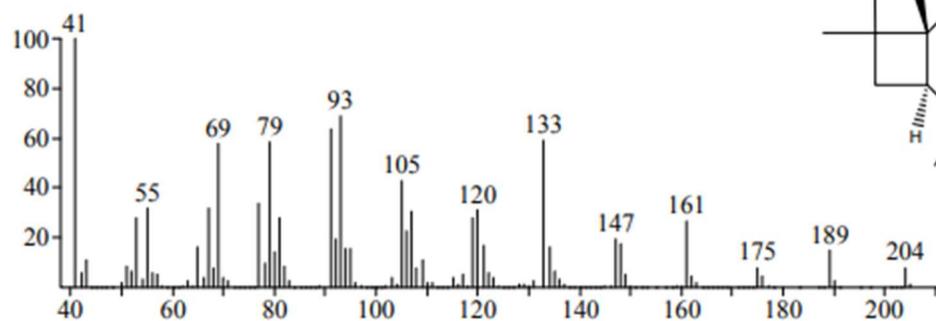
Line#:1 R.Time:26.942(Scan#:2874) MassPeaks:134

RawMode:Averaged 26.917-26.950(2871-2875) BasePeak:41.05(672633)

BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1

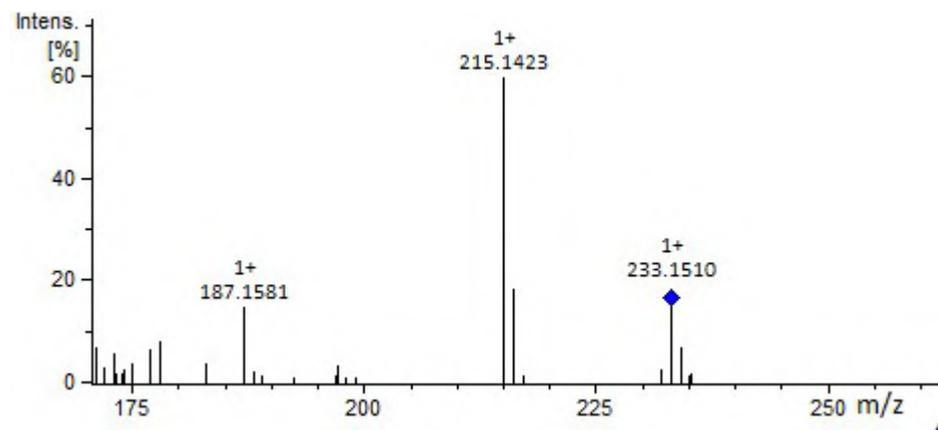
RT: 25.36 AI: 1417 KI: 1419 **Caryophyllene <(E)->**CAS#: 87-44-5 MF: C₁₅H₂₄ FW: 204 MSD LIB#: 830

CN: trimethyl-8-methylenebicyclo(7.2.0)undec-4-ene <4,11,11->

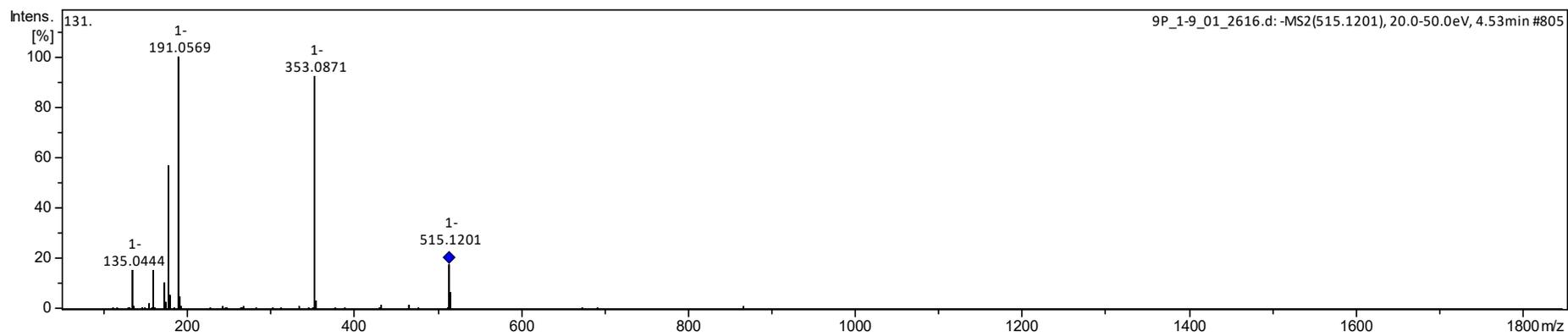
Synonyms: β -caryophylleneSource: *Hymenaea* oil ex Jean Langenheim

ANEXO B – Infuso

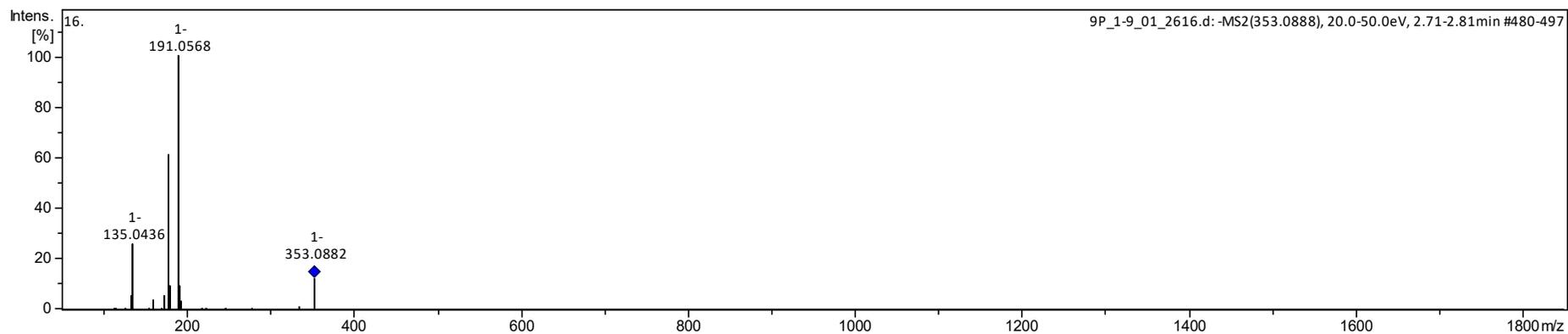
Fragmentos MS2 da estrutura de fórmula $C_{15}H_{20}O_2$, modo positivo.



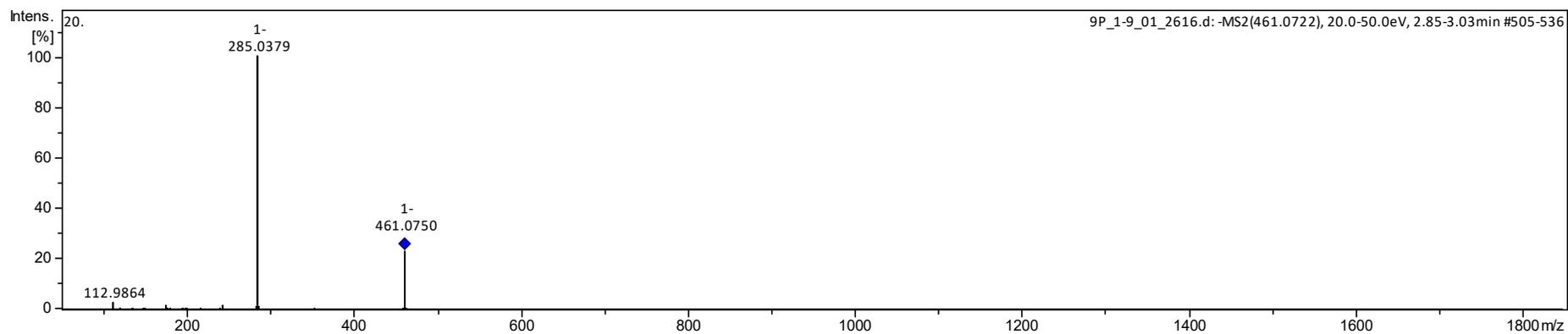
Fragmentos MS2 da estrutura de fórmula $C_{25}H_{24}O_{12}$, modo negativo.



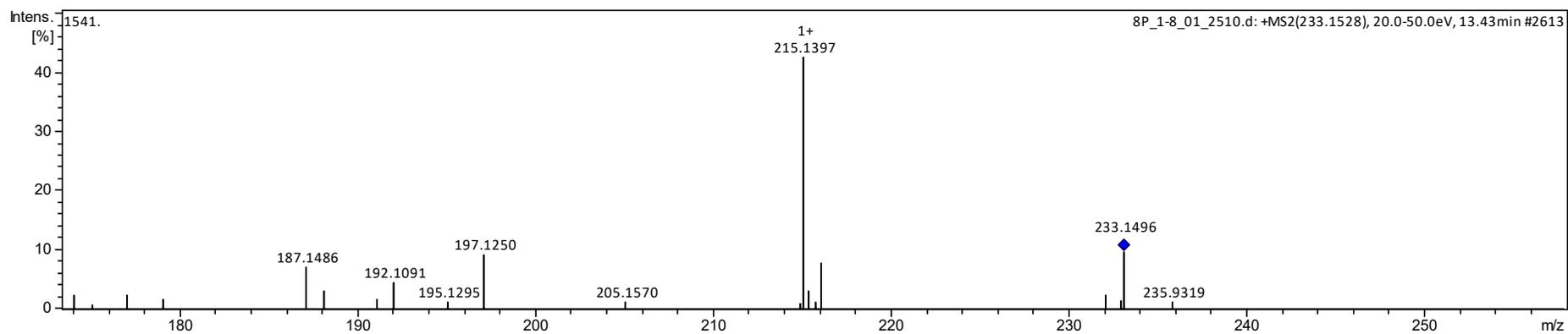
Fragmentos MS2 da estrutura de fórmula $C_{16}H_{18}O_9$, modo negativo.



Fragmentos MS2 da estrutura de fórmula $C_{21}H_{18}O_{12}$, modo negativo.



ANEXO C – Extrato de Lavagem Foliar

Fragmentos MS2 da estrutura de fórmula $C_{15}H_{20}O_2$, modo positivo.Fragmentos MS2 da estrutura de fórmula $C_{27}H_{30}O_{16}$, modo negativo.