



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

“Estudo químico e avaliação das atividades antitumoral e antileishmania das espécies *Lessingianthus intermedius*, *Vernonanthura crassa* e *V. nudiflora* (ASTERACEAE)”.

Tese apresentada por **Juliana Luna Bilheiro Peixoto** ao Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Estadual de Maringá como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Química.



MARINGÁ

2015



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

“Estudo químico e avaliação das atividades antitumoral e antileishmania das espécies *Lessingianthus intermedius*, *Vernonanthura crassa* e *V. nudiflora* (ASTERACEAE)”.

Doutoranda: Juliana Luna Bilheiro Peixoto

Orientadora: Prof^a. Dra. Maria Helena Sarragiotto

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR, Brasil)

P379e Peixoto, Juliana Luna Bilheiro
Estudo químico e avaliação das atividades antitumoral e antileishmania das espécies *Lessingianthus intermedius*, *Vernonanthura crassa* e *V. nudiflora* (ASTERACEAE) / Juliana Luna Bilheiro Peixoto. -- Maringá, PR, 2015.
185 f.: il. col. figs. tabs.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Helena Sarragiotto.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Exatas, Departamento de Química, Programa de Pós-Graduação em Química, 2015.

1. Asteraceae. 2. *Lessingianthus intermedius*. 3. *Vernonanthura crassa*. 4. *Vernonanthura nudiflora*. 5. Lactona sesquiterpênica. 6. Flavonoides. 7. Ensaio biológicos. I. Sarragiotto, Maria Helena, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Exatas. Departamento de Química. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDD 23.ed. 615.321

MRP-003544



Universidade Estadual de Maringá

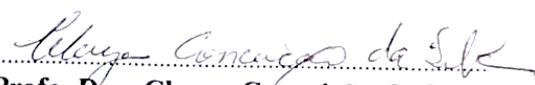
Centro de Ciências Exatas
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

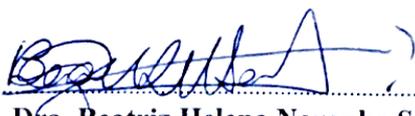
Este é o exemplar definitivo da Tese apresentada por **Juliana Luna Bilheiro Peixoto**, perante a Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Química em 16 de outubro de 2015.

COMISSÃO JULGADORA:


.....
Profa. Dra. Maria Helena Sarragiotto
PRESIDENTE - DQ/UEM


.....
Profa. Dra. Débora Cristina Baldoqui
MEMBRO - DQ/UEM


.....
Profa. Dra. Cleuza Conceição da Silva
MEMBRO - DQ/UEM


.....
Profa. Dra. Beatriz Helena Noronha Sales Maia
MEMBRO - UFPR


.....
Profa. Dra. Lucilia Kato
MEMBRO - UFG

Dedico este trabalho ao meu Deus e à Virgem Maria,
meu filho Lucas,
minha mãe Neusa
meu pai Everaldo,
meu marido Leandro,
meus irmãos Natália, Rafael e Bruno,
por todo amor, paciência, compreensão, incentivo,
depositados em mim...

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar sempre ao meu lado me capacitando e me dando forças para continuar...

À prof. Dra. Maria Helena Sarragiotto, pela oportunidade, orientação, paciência e amizade.

Ao Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá, pela disponibilidade de concretização deste trabalho.

A meu pai Everaldo e minha mãe Neusa que me auxiliaram a continuar com dedicação esta pesquisa, por toda compreensão, por terem lutado para eu chegar à universidade e por estarem sempre comigo.

Ao meu esposo Leandro por todo o amor e compreensão.

Aos colegas de laboratório; Darlon, Manu, Marcos, Paula, Camila, Valéria, Carla, Letícia, Maria Augusta, George, Andrey, Vinícius e Professora Débora pelos momentos de descontração e aprendizado durante estes anos de convivência no laboratório 31.

À Ivânia, grande companheira, pela ajuda e realização dos espectros de RMN.

Ao Moacir pela colaboração técnica e pela amizade.

À minha amiga Patrícia pela análise de PCA e amizade.

A todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

Rendêr-te-ei graças, SENHOR, de todo o meu coração.

(Salmo 138,1)

Resumo

O presente trabalho teve como objetivos o estudo fitoquímico das espécies *Lessingianthus intermedius*, *Vernonanthura crassa* e *Vernonanthura nudiflora*, e a avaliação das atividades antitumoral e antileishmania dos extratos bruto, das frações resultantes da partição em solventes e de metabólitos secundários isolados destas espécies.

Os extratos brutos de todas as espécies foram submetidos à partição em n-hexano, diclorometano e acetato de etila. As frações diclorometano de *L. intermedius* (**LI-DC**), *Vernonanthura crassa* (**VC-DC**) e *V. nudiflora* (**VN-DC**) foram submetidas a purificação por coluna cromatográfica em sílica *flash*. Da fração **LI-DC** foram isolados os flavonóides genkwanina (**LI-1**), 3-O-metilquercetina (**LI-2**) e 3,7-di-O-metilquercetina (**LI-3**); as lactonas sesquiterpênicas 8-O-acetil-13-O-metil vernojalcanolídeo (**LI-4**), 8 α -acetóxi-10 α -hidróxi-13-O-metil hirsutinolídeo (**LI-5**), espicatolídeo (**LI-6**) e a lignana siringaresinol (**LI-7**). O fracionamento da fração diclorometano (**VC-DC**) da espécie *V. crassa* resultou no isolamento de uma lactona sesquiterpênica 8 α -metilacrilóloxi-10-hidróxi-13-O-metil-hirsutinolídeo (**VC-1**), uma lactona monoterpênica lolíolida (**VC-2**). Da fração diclorometano da espécie *V. nudiflora* (**VN-DC**) foram identificadas as lactonas sesquiterpênicas (**VN-1**), piptocarfol C (**VN-1a**) e um análogo do espicatolídeo E, inédito na literatura (**VN-1b**).

A purificação da fração hidrometanólica de *L. intermedius* (**LI-HM**) e acetato de etila de *V. crassa* (**VC-AE**) por CC em Sephadex LH-20 resultou no isolamento de uma mistura dos ácidos 3-O-cafeoilquínico (**LI-8a**), ácido 4-O-cafeoilquínico (**LI-8b**), e ácido 5-O-cafeoilquínico (**LI-8c**), da espécie *L. intermedius* e, das flavonas 2-(S)/2-(R)-eriodictiol-7-O-glucoronídeo (**VC-3**) e vitexina (**VC-4**) de *V. crassa*.

As substâncias isoladas foram identificadas por análises espectroscópicas, espectrométricas e comparação com dados na literatura.

Foram realizadas também análises de LC-MS e quimiométrica (PCA) das frações diclorometano de *L. intermedius* (**LI-DC**) e *V. crassa* (**VC-DC**) e das substâncias **LI-4**, **LI-5** e **VC-1**.

Todas as substâncias isoladas de *Lessingianthus intermedius*, *V. crassa* e *V. nudiflora* são descritas nestas espécies pela primeira vez.

As lactonas sesquiterpênicas 8 α -acetóxi-10 α -hidróxi-13-O-metil hirsutinolídeo (**LI-5**), espicatolídeo (**LI-6**), 8 α -metilacrilóloxi-10-hidróxi-13-O-metil-hirsutinolídeo (**VC-1**) e piptocarfol C (**VN-1a**) isoladas neste trabalho de *Lessingianthus intermedius*, *V. crassa* e *V. nudiflora* já foram descritas para estes gêneros. Isto nos leva a sugerir que as lactonas sesquiterpênicas, da classe dos hirsutinolídeos, possam ser consideradas marcadores químicos destes gêneros.

Os resultados dos ensaios de atividade antitumoral apontaram que a fração mais ativa de *L. intermedius* e *Vernonanthura crassa* foi a diclorometano (**LI-DC**) e (**VC-DC**), respectivamente com GI₅₀ variando de 1,20 a 11,50 $\mu\text{g/mL}$ para **LI-DC** e GI₅₀ de 5,10 a 24,40 para **VC-DC**.

A avaliação da atividade leishmanicida dos extratos e frações de *L. intermedius* e *V. crassa* mostrou que as frações diclorometano (**VC-DC**) e (**LI-DC**) apresentaram maior atividade, com CI₅₀ de 8,97 $\mu\text{g/mL}$ e 9,15 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. As demais amostras apresentaram atividade leishmanicida moderada. Estes resultados indicam que as atividades observadas para as

frações diclorometano destas plantas devem-se, provavelmente, a presença das lactonas sesquiterpênicas.

Palavras-chave: *Lessingianthus intermedius*, *Vernonanthura crassa*, *Vernonanthura nudiflora*, Asteraceae, lactonas sesquiterpênicas, flavonóides e ensaios biológicos.

Abstract

The present work aimed the phytochemical study of the species *Lessingianthus intermedius*, *Vernonanthura crassa* and *Vernonanthura nudiflora*, and the evaluation of antitumor and antileishmania activities of crude extracts and fractions, resulting from its partition in solvents, as well as the secondary metabolites isolated from these species.

The crude extracts of all species were submitted to partition in *n*-hexane, dichloromethane and ethyl acetate. The dichloromethane fractions of *L. intermedius* (**LI-DC**), *Vernonanthura crassa* (**VC-DC**) and *V. nudiflora* (**VN-DC**) were purified by chromatographic column in silica *flash*. From the fraction **LI-DC** were isolated the flavonoids genkwanin (**LI-1**), 3-O-methylquercetin (**LI-2**) and 3,7-di-O-methylquercetin (**LI-3**); the sesquiterpene lactones 13-O-methylvernojalcanolide 8-O-acetate (**LI-4**), 8- α -acetoxy-10- α -hydroxy-13-O-methylhirsutinolide (**LI-5**), spicatolide E (**LI-6**) and the lignan siringaresinol (**LI-7**).

The fractionation of dichloromethane fraction (**VC-DC**) from *V. crassa* resulted in the isolation of a sesquiterpene lactone 8- α -methacryloyloxy-10- α -hydroxy-13-O-methylhirsutinolide (**VC-1**), the terpene lactone loliolide (**VC-2**). The dichloromethane fraction of *V. nudiflora* (**VN-DC**) afforded the sesquiterpene lactones (**VN-1**), piptocarphol C (**VN-1a**), and a new compound, identified as an spicatolide analogue (**VN-1b**).

The hydro-methanol fraction of *L. intermedius* (**LI-HM**), and the ethyl acetate fraction of *V. crassa* (**VC-AE**) were purified by CC on Sephadex LH-20, which gave a mixture of 3-O-caffeoylquinic (**LI-8a**), 4-O-caffeoylquinic (**LI-8b**), e 5-O-caffeoylquinic acid (**LI-8c**) acids, from *L. intermedius*, and the flavones 2-(S)/2-(R)-eriodictyol-7-O-glucoronide (**VC-3**) and vitexin (**VC-4**) from *V. crassa*.

All compounds isolated from *L. intermedius*, *V. crassa* and *V. nudiflora* are being described in these species for the first time.

The isolated compounds were identified by analysis of their spectroscopic data and by comparison with those described in the literature.

Were also held LC-MS and chemometric analysis (PCA) of dichloromethane fractions of *L. intermedius* (**LI-DC**) and *V. crassa* (**VC-DC**) and **LI-4** substances, **LI-5** and **VC-1**.

The sesquiterpene lactones 8- α -acetoxy-10- α -hydroxy-13-O-methylhirsutinolide (**LI-5**), spicatolide E (**LI-6**), 8- α -methacryloyloxy-10- α -hydroxy-13-O-methylhirsutinolide (**VC-1**) and piptocarphol C (**VN-1a**) have been described for the genus studied in this work. This suggest that the sesquiterpene lactones of the hirsutinolide class can be considered as chemical markers of the *Lessingianthus* and *Vernonanthura* genus.

The assays results showed significant antitumor activity to the dichloromethane fractions (**LI-DC**) and (**VC-DC**) of *L. intermedius* and *V. crassa*, with GI₅₀ values ranging from 1.20 to 11.50 μ g/mL, and 5.10 to 24.40 μ g/mL, for **LI-DC** and **VC-DC**, respectively. These fractions were also the most active against *Leishmania amazonensis*, with IC₅₀ of 8.97 μ g/mL, and 9.15 μ g/mL for (**VC-DC**) and (**LI-DC**), respectively. The other fractions showed moderate leishmanicida activity. These results indicate that the presence of sesquiterpene lactones is, probably, the responsible by the activity of the dichloromethane fraction

Keywords: *Lessingianthus intermedius*, *Vernonanthura crassa*, *Vernonanthura nudiflora*, Asteraceae, sesquiterpene lactones, flavonoids and biological assays.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Descrição/revisão das espécies/gêneros estudados no presente trabalho	2
2	OBJETIVOS	9
3	PARTE EXPERIMENTAL	10
3.1	Materiais e equipamentos utilizados	10
3.2	Estudo Químico	11
3.2.1	Coleta e secagem das plantas	11
3.2.2	Preparação e fracionamento dos extratos brutos das espécies	11
3.2.3	Estudo das frações resultantes da partição do EB de <i>Lessingianthus intermedius</i>	12
3.2.3.1	Estudo da fração hexano (LI-HE).....	14
3.2.3.2	Fração diclorometano (LI-DC).....	14
3.2.3.3	Estudo das frações obtidas da coluna da fração LI-DC.....	15
3.2.3.4	Fração LI-DC-4/ Isolamento da substância LI-1.....	15
3.2.3.5	Fração LI-DC -6/ Isolamento das substâncias LI-2, LI-3, LI-4, LI-5 e LI-6... ..	16
3.2.3.6	Fração LI-DC -7/ Isolamento das substâncias LI-3 e LI-7.....	17
3.2.3.7	Estudo da fração acetato (LI-AE).....	18
3.2.3.8	Estudo da fração hidrometanólica (LI-HM).....	19
3.2.4	Estudo das frações resultantes da partição do EB de <i>Vernonanthura crassa</i> (Vell.) H.Rob.....	21
3.2.4.1	Estudo da fração diclorometano (VC-DC)/ Isolamento das substancias VC-1 e VC-2.....	22
3.2.4.2	Estudo da fração acetato de etila (VC-AE)/ Isolamento das substancias VC-3 e VC-4.....	23
3.2.5	Estudo das frações resultantes da partição do EB de <i>Vernonanthura nudiflora</i>	24
3.2.5.1	Estudo da fração diclorometano (VN-DC) de <i>Vernonanthura nudiflora</i>	24
3.3	Análise de Componentes principais (PCA).....	26
3.4	Análise de LC-MS/MS.....	26
3.5	Ensaio Biológicos.....	27
3.5.1	Avaliação da atividade antitumoral.....	27
3.5.2	Diluição das amostras.....	27
3.5.3	Ensaio da Sulforrodamina B (SRB).....	27
3.5.4	Análise dos resultados.....	28
3.5.5	Avaliação da atividade antileishmania.....	29
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
4.1	Elucidação estrutural das substancias isoladas.....	30
4.1.1	Flavonóides.....	30
4.1.1.1	Substância LI-1.....	30
4.1.1.2	Substância LI-2.....	36
4.1.1.3	Substância LI-3.....	42
4.1.1.4	Mistura de compostos VC-3.....	49
4.1.1.5	Substância VC-4.....	60
4.1.2	Lactonas Sesquiterpênicas.....	68

4.1.2.1	Substância LI-4.....	68
4.1.2.2	Substância LI-5.....	82
4.1.2.3	Mistura das substâncias LI-5 e LI-6.....	96
4.1.2.4	Substância VC-1.....	104
4.1.2.5	Mistura VN-1.....	115
4.1.3	Outros metabólitos isolados de <i>Lessingianthus intermedius</i> , <i>Vernonanthura crassa</i>	128
4.1.3.1	Substância LI-7.....	128
4.1.3.2	Substância VC-2.....	134
4.1.3.3	Mistura LI-8.....	137
4.2	Método quimiométrico-PCA.....	149
4.3	Análises por LC-ESI-MS/MS.....	154
4.3.1	Análise da fração diclorometano de <i>L. intermedius</i>	154
4.3.2	Análise da fração diclorometano de <i>V. crassa</i>	164
4.4	Importância quimiotaxonômica.....	170
4.5	Avaliação da Atividade Biológica.....	172
4.5.1	Atividade Antitumoral.....	172
4.5.2	Atividade Antileishmania.....	175
5	CONCLUSÕES.....	177
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	179

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1:	Estrutura dos principais compostos isolados do gênero <i>Lessingianthus</i>	4
Figura 2:	Estrutura dos principais compostos isolados dos gêneros <i>Vernonanthura</i>	5
Figura 3:	Exemplos de esqueletos básicos de lactonas sesquiterpênicas e de alguns derivados dos germacronolídeos presentes no gênero <i>Vernonia</i>	8
Figura 4:	Espectro de RMN de ^1H ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, 300 MHz) de LI-1.....	31
Figura 5:	Espectro de RMN de ^{13}C (CD_3OD , 75,5 MHz) da substância LI-1.....	32
Figura 6:	Espectro de HSQC (75,5MHz; CD_3OD) da substância LI-1.....	33
Figura 7:	Espectro de diferença de NOE de LI-1 com irradiação em δ_{H} 3,86....	35
Figura 8:	Espectro de RMN de ^1H ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, 300 MHz) de LI-2.....	37
Figura 9:	Espectro de RMN de ^{13}C ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, 75,5 MHz) de LI-2.....	38
Figura 10:	Espectro de HSQC ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, 75,5MHz) de LI-2.....	39
Figura 11:	Espectro de diferença de NOE de LI-2 com irradiação em δ_{H} 3,77....	41
Figura 12:	Espectro de RMN de ^1H ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, 300,06 MHz) de LI-3.....	43
Figura 13:	Espectro de ^{13}C ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, 75,5MHz) de LI-3.....	44
Figura 14:	Espectro de HSQC ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, 75,5MHz) de LI-3.....	45
Figura 15:	Espectro de diferença de NOE de LI-3 com irradiação em δ_{H} 3,86....	48
Figura 16:	Espectro de diferença de NOE de LI-3 com irradiação em δ_{H} 3,76....	48
Figura 17:	Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 300 MHz) de VC-3.....	50
Figura 18:	Espectro de COSY (CD_3OD , 300 MHz) de VC-3.....	51
Figura 19:	Espectro de ^{13}C (CD_3OD , 75 MHz) de VC-3.....	52
Figura 20:	Espectro de DEPT (CD_3OD , 75 MHz) de VC-3.....	53
Figura 21:	Espectro de HSQC (CD_3OD , 75 MHz) de VC-3.....	54
Figura 22:	Mapa de contornos HMBC (CD_3OD) de VC-3.....	55
Figura 23:	Estrutura do 2-(S)/2-(R)-eriodictiol-7-O-glucoronídeo.....	56
Figura 24:	Espectro de RMN de ^1H (DMSO, 300 MHz) de VC-4.....	61
Figura 25:	Espectro de HSQC (DMSO 75 MHz) de VC-4.....	62
Figura 26:	Espectro de ^{13}C (DMSO 75 MHz) de VC-4.....	63
Figura 27:	Espectro de DEPT (DMSO 75 MHz) de VC-4.....	64
Figura 28:	Espectro de HMBC (DMSO 75 MHz) de VC-4.....	67
Figura 29:	Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de LI-4.....	69
Figura 30:	Espectro de ^{13}C (CDCl_3 , 75,5MHz) de LI-4.....	71
Figura 31:	Espectro de DEPT (CDCl_3 , 75,5MHz) de LI-4.....	72
Figura 32:	Espectro de HSQC (CDCl_3 , 75,5MHz) de LI-4.....	73
Figura 33:	Expansão do espectro de HSQC (CDCl_3 , 75,5MHz) de LI-4.....	74
Figura 33a:	Mapa de contornos HMBC (CDCl_3) de LI-4.....	78
Figura 33b:	Expansão do espectro de HMBC (CDCl_3) de LI-4.....	79
Figura 33c:	Expansão do espectro de HMBC (CDCl_3) de LI-4.....	80
Figura 34:	Mapa de contornos COSY (CDCl_3) de LI-4.....	81
Figura 35:	Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300,06 MHz) de LI-5.....	83
Figura 36:	Espectro de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) de LI-5.....	85
Figura 37:	Expansão do espectro de ^{13}C de LI-5 em CDCl_3	86
Figura 38:	Espectro de DEPT (CDCl_3 , 75,5MHz) de LI-5.....	87
Figura 39:	Espectro de HSQC (CDCl_3 , 75,5MHz) de LI-5.....	88
Figura 40:	Espectro de HMBC (CDCl_3 , 75,5MHz) de LI-5.....	91

Figura 41:	Expansão do espectro de HMBC (CDCl ₃ , 75,5MHz de LI-5).....	92
Figura 42:	Expansão do espectro de HMBC (CDCl ₃ , 75,5MHz) de LI-5.....	93
Figura 43:	Expansão do espectro de HMBC (CDCl ₃ , 75,5MHz) de LI-5.....	94
Figura 44:	Espectro de RMN de ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) de LI-6.....	97
Figura 45:	Espectro de RMN de ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) de LI-6.....	98
Figura 46:	Espectro de DEPT (CDCl ₃ , 75 MHz) de LI-6.....	99
Figura 47:	Espectro de HSQC (CDCl ₃ , 75 MHz) de LI-6.....	100
Figura 48:	Mapa de contornos HMBC (CDCl ₃ , 75 MHz) de LI-6.....	103
Figura 49:	Espectro de RMN de ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) de VC-1.....	105
Figura 50:	Espectro de RMN de ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) de VC-1.....	107
Figura 51:	Espectro de DEPT (CDCl ₃ , 75 MHz) de VC-1.....	108
Figura 52:	Espectro de HSQC (CDCl ₃ , 75 MHz) de VC-1.....	110
Figura 53:	Espectro de HMBC (CDCl ₃ , 75 MHz) de VC-1.....	111
Figura 54:	Espectro de HMBC (CDCl ₃ , 75 MHz) de VC-1.....	112
Figura 55:	Espectro de HMBC (CDCl ₃ , 75 MHz) de VC-1.....	112
Figura 56:	Espectro de ¹ H (CDCl ₃ , 75 MHz) de VN-1.....	116
Figura 57:	Espectro de ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) de VN-1.....	117
Figura 58:	Espectro de HSQC (CDCl ₃ , 75 MHz) de VN-1.....	118
Figura 59:	Expansão do espectro de HSQC (CDCl ₃ , 75 MHz) de VN-1.....	119
Figura 60:	Espectro de HMBC (CDCl ₃ , 75 MHz) de VN-1.....	124
Figura 61:	Espectro de HMBC (CDCl ₃ , 75 MHz) de VN-1.....	125
Figura 62:	Espectro de HMBC (CDCl ₃ , 75 MHz) de VN-1.....	126
Figura 63:	Espectro de RMN de ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) de LI-7.....	129
Figura 64:	Espectro de COSY (CDCl ₃ , 300 MHz) de LI-7.....	131
Figura 65:	Espectro de RMN de ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) de LI-7.....	132
Figura 66:	Espectro de HSQC (CDCl ₃ , 75 MHz) de LI-7.....	133
Figura 67:	Espectro de ¹ H (CDCl ₃ , 300 Mz) de VC-2.....	135
Figura 68:	Espectro de ¹ H (DMSO, 300 Mz) de LI-8.....	139
Figura 69:	Espectro de ¹³ C (DMSO, 75,5 Mz) de LI-8.....	140
Figura 70:	Espectro de DEPT (DMSO, 75,5 Mz) de LI-8.....	141
Figura 71:	Espectro de HSQC (DMSO, 75,5 Mz) de LI-8.....	142
Figura 72:	Expansão do espectro de HSQC (DMSO, 75,5 Mz) de LI-8.....	143
Figura 73:	Expansão do espectro de HSQC (DMSO, 75,5 Mz) de LI-8.....	144
Figura 74:	Espectro de HMBC (DMSO, 75,5 Mz) de LI-8.....	145
Figura 75:	Transformação de glaucolídeo em cadinanolídeo e hirsutinolídeo....	149
Figura 76:	Espectros de RMN ¹ H.....	150
Figura 77:	Processo para a realização da PCA.....	151
Figura 78:	Gráfico dos <i>scores</i>	152
Figura 79:	Gráfico dos <i>loadings</i> de (A) PC1 e (B) PC2.....	153
Figura 80:	Cromatograma de íons totais da fração diclorometano de <i>L. intermedius</i> adquiridos no modo positivo.....	154
Figura 81:	Espectro de fragmentação ESI-(+)-MS/MS da substância LI-5 (23 eV).....	155
Figura 82:	Proposta de fragmentação ESI-(+)-MS/MS da substância LI-5 (23 eV).....	155
Figura 83:	Espectro de fragmentação ESI-(+)-MS/MS da substância LI-5 na fração LI-DC.....	156
Figura 84:	Espectro de fragmentação ESI-(+)-MS/MS de LI-4 (15 eV).....	157
Figura 85:	Proposta de fragmentação da substância LI-4.....	158
Figura 86:	Espectro de MS/MS da substância LI-4 detectada na fração LI-DC...	159
Figura 87:	Espectro de MS/MS da substância LI-4a detectada na fração LI-DC.	160

Figura 88:	Espectro de MS/MS da substância LI-1 detectada na fração LI-DC...	160
Figura 89:	Espectro de MS/MS da substância LI-2 detectada na fração LI-DC...	161
Figura 90:	Espectro de MS/MS da substância LI-3 detectada na fração LI-DC...	162
Figura 91:	Espectro de MS/MS da apigenina detectada na fração LI-DC.....	163
Figura 92:	Espectro de MS/MS da substancia kaempferol detectada na fração LI-DC.....	163
Figura 93:	Cromatograma de íons totais da fração diclorometano de <i>V. crassa</i> adquiridos no modo positivo.....	164
Figura 94:	Espectro de fragmentação ESI-(+)-MS/MS da substância VC-1 (25 eV).....	165
Figura 95:	Proposta de fragmentação de VC-1.....	165
Figura 96:	Espectro de MS/MS de VC-1 detectado na fração LI-DC.....	166
Figura 97:	8 α -4-hidroximetacriloil-10-hidroxi13-metoxihirsutinolideo.....	166
Figura 98:	Espectro de MS/MS da substância 8 α -4-hidroximetacriloil-10-hidróxi13-metoxihirsutinólídeo detectada na fração LI-DC.....	167
Figura 99:	Espectro de MS/MS da substância 8 α -4-hidroximetacriloil-10-hidróxi13-metoxihirsutinólídeo detectada na fração LI-DC.....	168
Figura 100:	Espectro de MS/MS da substância 3,7 di-O-metilquercetina presente na fração VC-DC.....	168
Figura 101:	Espectro de MS/MS da substância apigenina presente na fração VC-DC.....	169

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1:	Metabólitos secundários que ocorrem nos gêneros <i>Lessingianthus</i> e <i>Vernonanthura</i>	3
Tabela 2:	Dados obtidos dos extratos brutos e partições das espécies estudadas.....	12
Tabela 3:	Dados da CC da fração diclorometano (DC).....	15
Tabela 4:	Dados da CC da fração VI-DC-6.....	16
Tabela 5:	Dados da cromatografia em sílica <i>flash</i> da fração VI-DC-7.....	18
Tabela 6:	Dados da filtração em CC da fração acetato.....	19
Tabela 7:	Dados da filtração em CC da fração hidrometanólica.....	20
Tabela 8:	Dados da cromatografia em coluna da fração VC-DC.....	22
Tabela 9:	Dados da filtração da fração acetato de etila.....	24
Tabela 10:	Dados da cromatografia em coluna da fração diclorometano de <i>Vernonanthura nudiflora</i>	25
Tabela 11:	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância LI-1 e para 7-O-metilapigenina (genkwanina).....	34
Tabela 12:	Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C da substância LI-2 e 3-O-metilquercetina (LEE <i>et al.</i> , 2003).....	40
Tabela 13:	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância LI-3 e para 3,7-di-O-metilquercetina.....	47
Tabela 14:	Dados de RMN de ^1H da mistura VC-3a VC-3b e de 2-(S)- e do 2-(R)-eriodictiol-7-O- glucoronídeo(CUI <i>et al.</i> , 1990 e SUN-YUP <i>et al.</i> , 2012).....	57
Tabela 15:	Dados de RMN de ^{13}C da mistura VC-3a VC-3b e de 2-(S)- e do 2-(R)-eriodictiol-7-O- glucoronídeo (CUI <i>et al.</i> , 1990 e SUN-YUP <i>et al.</i> , 2012).....	58
Tabela 16:	Dados de RMN de ^{13}C e de HMBC da substância VC-3.....	58
Tabela 17:	Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C da substância VC-4(DMSO) e vitexina.....	65
Tabela 18:	Dados de RMN de ^{13}C e de HMBC da substância VC-4.....	66
Tabela 19:	Dados de RMN de ^1H da substância LI-4 e para o 8-O-acetil-13-O-metil vernojalcanolideo(Jakupovic) e 8-O-acetil-13-O-etil vernojalcanolideo (Ragasa).....	75
Tabela 20:	Dados de RMN de ^{13}C da substância LI-4 e para o 8-O-acetil-13-O-metil vernojalcanolideo(Jakupovic) e Ragasa.....	76
Tabela 21:	Dados de RMN de ^{13}C e de HMBC da substância LI-4.....	77
Tabela 22:	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância LI-5 e para 8 α -acetóxi-10 α -hidróxi-13-O-metil Hirsutinolídeo.....	89
Tabela 23:	Dados de RMN de ^{13}C e de HMBC da substância LI-5.....	95
Tabela 24:	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da mistura LI-5 e LI-6 (CDCl ₃) e para o espicatolídeo.....	101
Tabela 25:	Dados de RMN de ^{13}C e de HMBC da substância VI-6.....	102
Tabela 25a:	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância VC-1 (CDCl ₃) e para 8 α -metilacrilóxi-10-hidroxi-13-O-metil-hirsutinolídeo.....	113
Tabela 26:	Dados de RMN de ^{13}C e de HMBC da substância VC-1.....	114
Tabela 27:	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância VN-1a (CDCl ₃) e para phytocarpol C.....	121
Tabela 28:	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância VN-1b (CDCl ₃) e para	

	Espicatólideo E.....	122
Tabela 29:	Dados de RMN de ¹³ C e de HMBC das substâncias VN-1a e VN-1b.	127
Tabela 30:	Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C da substância LI-7 e para o siringaresinol.....	130
Tabela 31:	Dados de RMN de ¹ H da substância VC-2 e loliolida.....	136
Tabela 32:	Dados de RMN de ¹ H de ¹³ C de LI-8a (DMSO) e do Ácido 3-O- cafeoilquínico(CD ₃ OD).....	146
Tabela 33:	Dados de RMN de ¹ H de ¹³ C de LI-8b (DMSO) e do Ácido 4-O- cafeoilquínico (CD ₃ OD).....	147
Tabela 34:	Dados de RMN de ¹ H de ¹³ C de LI-8c (DMSO) e do Ácido 5-O- cafeoilquínico (DMSO).....	148
Tabela 35:	Avaliação da atividade antitumoral Valores de GI ₅₀ µg/mL para extratos, frações e das substâncias LI-4 e LI-5 de <i>V. intermedia</i> e <i>V. crassa</i>	174
Tabela 36:	Atividade leishmanicida dos extratos e frações de <i>L. intermedius</i> e <i>V. crassa</i>	176

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1:	Procedimento empregado no isolamento dos constituintes de <i>L. intermedius</i>	13
Esquema 2:	Procedimento empregado no isolamento dos constituintes de <i>Vernonia crassa</i>	21

1-INTRODUÇÃO

Ao longo dos tempos, a humanidade tem se valido da natureza para as suas necessidades básicas como, a produção de gêneros alimentícios, abrigos, roupas, meios de transporte, fertilizantes, sabores e fragrâncias, e, não menos importante, medicamentos. Desta forma, as plantas têm sido a base de terapias empregadas na medicina tradicional, algumas já existentes há milhares de anos, e continuam fornecendo à humanidade novos remédios (FAKIM *et al.*, 2006).

Na farmacologia moderna, cerca de 50% dos medicamentos são derivados de produtos naturais, sendo que a medicina tradicional e remédios naturais continuam desempenhando um papel relevante em práticas farmacêuticas, pesquisa e desenvolvimento em todo o mundo (DHAMI *et al.*, 2013).

Dentre as diversas famílias de plantas que servem como fontes potenciais de fármacos destaca-se a família Asteraceae, uma das maiores e economicamente mais importantes, apresentando mais de 23.000 espécies distribuídas em 1620 gêneros. Essa família está dividida em 12 subfamílias e 35 tribos, representando cerca de 10% da flora mundial (MAGGIO, 2013). A família Asteraceae tem sido muito estudada, não somente quanto à sua morfologia, anatomia, ontogenia e ecologia, mas também quanto a sua composição química, citogenética e estrutura macromolecular (NAKAJIMA *et al.*, 2001).

Em relação à morfologia, plantas da família Astereaceae apresentam aspecto extremamente variado, incluindo principalmente ervas ou arbustos e raramente árvores. Aproximadamente 98% dos gêneros são constituídos por plantas de pequeno porte, que podem ser encontradas em todos os tipos de habitats, mas, principalmente, nas regiões tropicais montanhosas na América do Sul (PIZZOLATTI *et al.*, 2005). Várias espécies dessa família ocorrem na região dos Campos Gerais do Paraná (CERVI *et al.*, 2007; ANDRADE *et al.*, 2011.), que constitui uma área de investigação de nosso grupo de pesquisa.

Espécies de Asteraceae biossintetizam ampla diversidade de constituintes químicos, como alcaloides, cumarinas, saponinas, flavonoides, esteroides, lignoides, triterpenos e lactonas sesquiterpênicas (CARRENHO *et al.*, 2009). No entanto, as lactonas sesquiterpênicas constituem a classe mais estudada de metabólitos secundários, devido às suas propriedades biológicas e importância como marcadores taxonômicos (GASTEIGER *et al.*, 2005).

As lactonas sesquiterpênicas (LS) são largamente distribuídas em plantas e mais de 7.000 diferentes estruturas já foram descritas (MACIAS et al., 2006), ocorrendo principalmente na família Asteraceae. A importância farmacológica desta classe é conhecida desde longa data, principalmente devido à ação antimalárica e como agentes anticancer. Mais recentemente, várias pesquisas vêm enfocando a atividade anti-inflamatória, leishmanicida e tripanocida desta classe de compostos (MERFORT et al., 2011; CHATURVEDI et al., 2011).

Dentre as plantas da família Asteraceae que ocorrem na região, registra-se a presença de uma variedade de espécies do gênero *Vernonia*, cujos estudos descritos na literatura mostram a presença de lactonas sesquiterpênicas como principais constituintes químicos.

A importância, tanto do ponto de vista químico quanto farmacológico, dos metabólitos presentes no gênero *Vernonia*, da busca de novas substâncias bioativas, além da ocorrência de espécies do gênero ainda não estudadas na região dos Campos Gerais do Paraná, justificam o nosso interesse pelo gênero *Vernonia*.

1.1- Descrição/revisão das espécies/gêneros estudados no presente trabalho

As três plantas estudadas neste trabalho pertencem a tribo Vernonieae Cass. (Asteraceae), a qual contém cerca de 90 gêneros e 1.700 espécies. Do ponto de vista taxonômico, a tribo Vernonieae é considerada um dos grupos mais complexos da família Asteraceae, sendo que a principal discussão está geralmente centrada em torno da divisão do grande gênero *Vernonia Schreb* (DEMATTEIS et al., 2012).

Em 1999, Robinson publicou um trabalho propondo uma nova classificação para as Vernonieae americanas, sendo esse estudo baseado em vários trabalhos realizados por ele e outros autores durante os anos de 1973 a 1999. A principal modificação ocorreu no gênero *Vernonia* que foi segregado em outros, como por exemplo, *Lessingianthus* H. Rob. (100 spp.), *Vernonanthura* H. Rob. (65 spp.) e *Cyrtocymura* H. Rob. (6 spp.) (SOUZA et al., 2007).

Desta forma as plantas foram reclassificadas como: *Vernonanthura crassa* (Vell.) H. Rob. (sinonímia: *Vernonia crassa*), uma espécie que se encontra na forma de um subarbusto cujo florescimento ocorre nos meses de fevereiro a julho e produz frutos nos meses de julho, setembro e novembro (Silva, 2014); *Lessingianthus intermedius* (DC.) Dematt. (sinonímia: *Vernonia intermedia*), cujo hábitat é campo seco

de restinga e campo com afloramento rochoso, a qual floresce e frutifica no verão e é encontrada na América do Sul (BERETTA *et al.*, 2009), e *Vernonanthura nudiflora* (sinonímia: *Vernonia nudiflora*), conhecida pelo nome vulgar de alecrim do campo e considerada uma planta daninha, ocorrendo geralmente em solos secos e pedregosos, em campos ou beira de matas, sendo nativa do Uruguai, Argentina e sul do Brasil (FARIAS, 2008).

A partir de uma revisão da literatura foram encontradas poucas referências descrevendo estudos sobre os gêneros *Lessingianthus* e *Vernonanthura*. Na **Tabela 1** foram agrupados os metabólitos secundários isolados desses gêneros, cujas estruturas encontram-se compiladas nas **Figuras 01 e 02**.

Tabela 1: Metabólitos secundários que ocorrem nos gêneros *Lessingianthus* e *Vernonanthura*

Espécies	Compostos isolados	Referências
<i>Lessingianthus rubricaulis</i>	1-3.	BARDON <i>et al.</i> , 1993
<i>Lessingianthus intermedius</i>	4-8.	BOHLMANN <i>et.al.</i> , 1981
<i>Lessingianthus saltensis</i>	9-11.	BOHLMANN <i>et.al.</i> ,1979
<i>Vernonanthura squamulosa</i>	12-18.	KOTOWICZ <i>et al.</i> ,1998.
<i>Vernonanthura amplexicaulis</i>	19-21.	BORKOSKY <i>et al.</i> , 1995
<i>Vernonanthura tweedieana</i>	22.	PORTILLO <i>et al.</i> , 2005
<i>Vernonanthura nebularum</i>	23-24.	POLLA <i>et al.</i> , 2003
<i>Vernonanthura nudiflora</i>	25-27	BARDON <i>et al.</i> , 1992

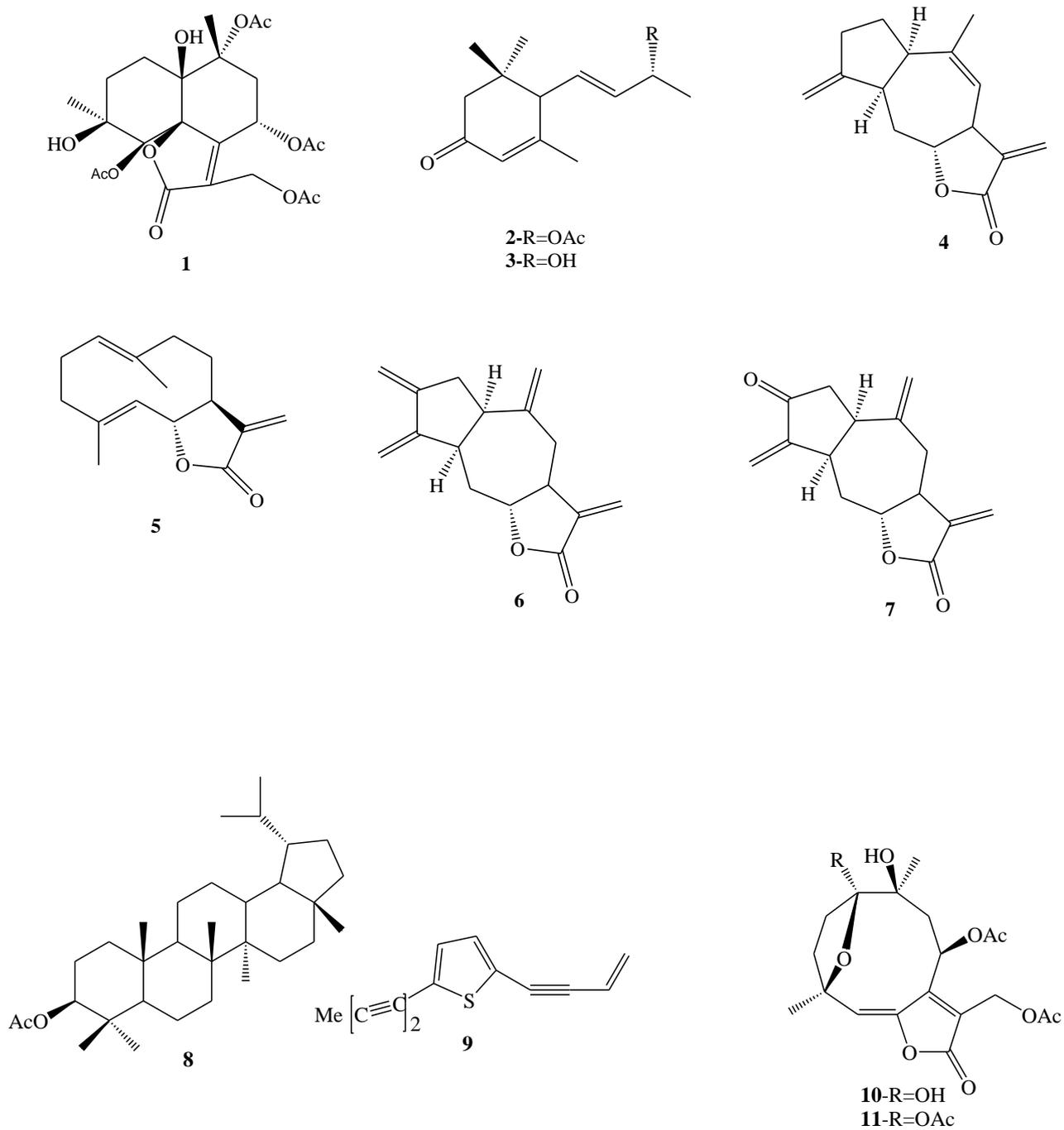
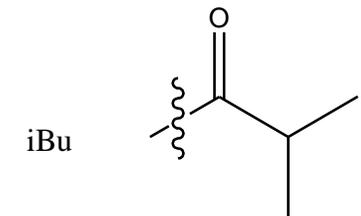
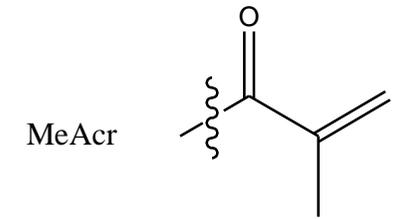
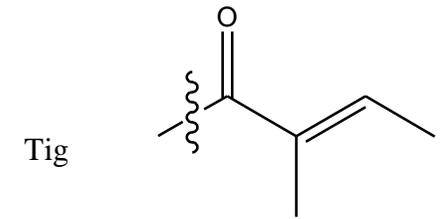
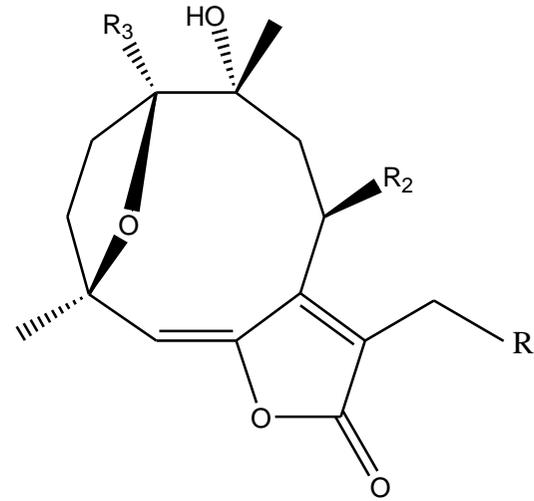
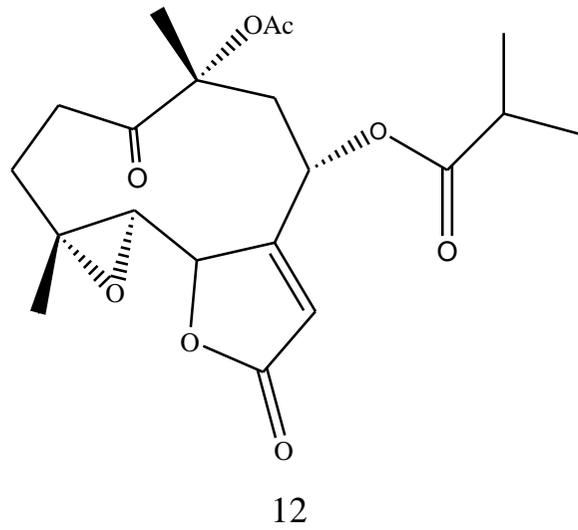
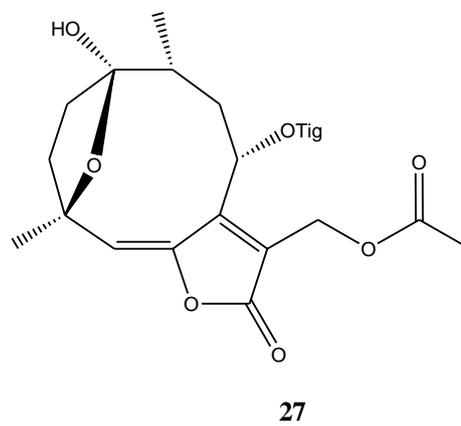
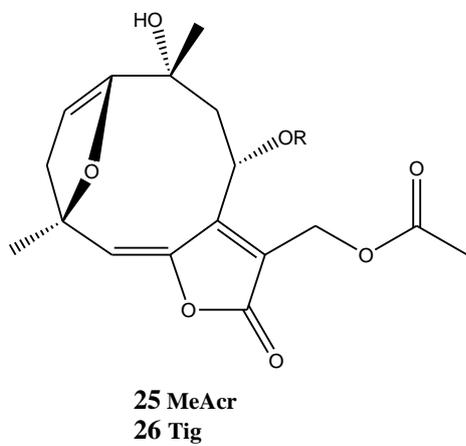
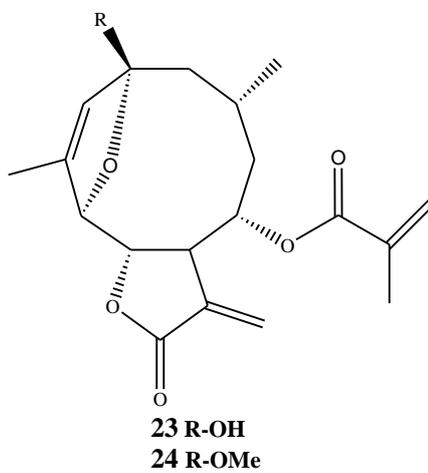
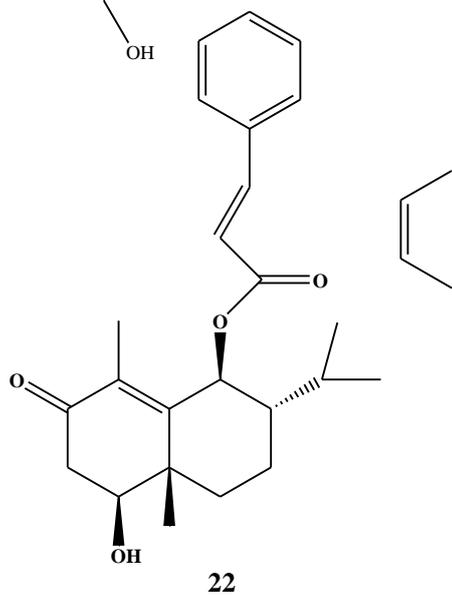
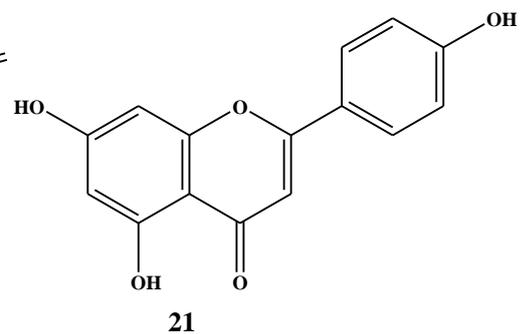
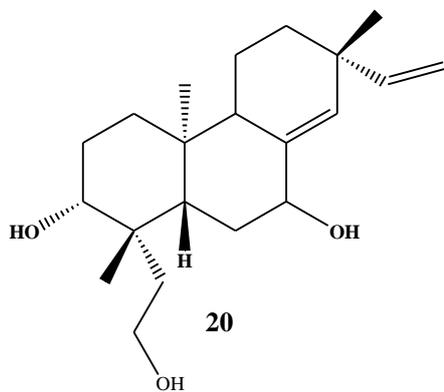
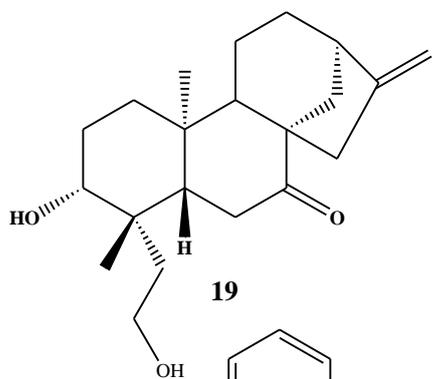
Figura 01: Estrutura dos principais compostos isolados do gênero *Lessingianthus*

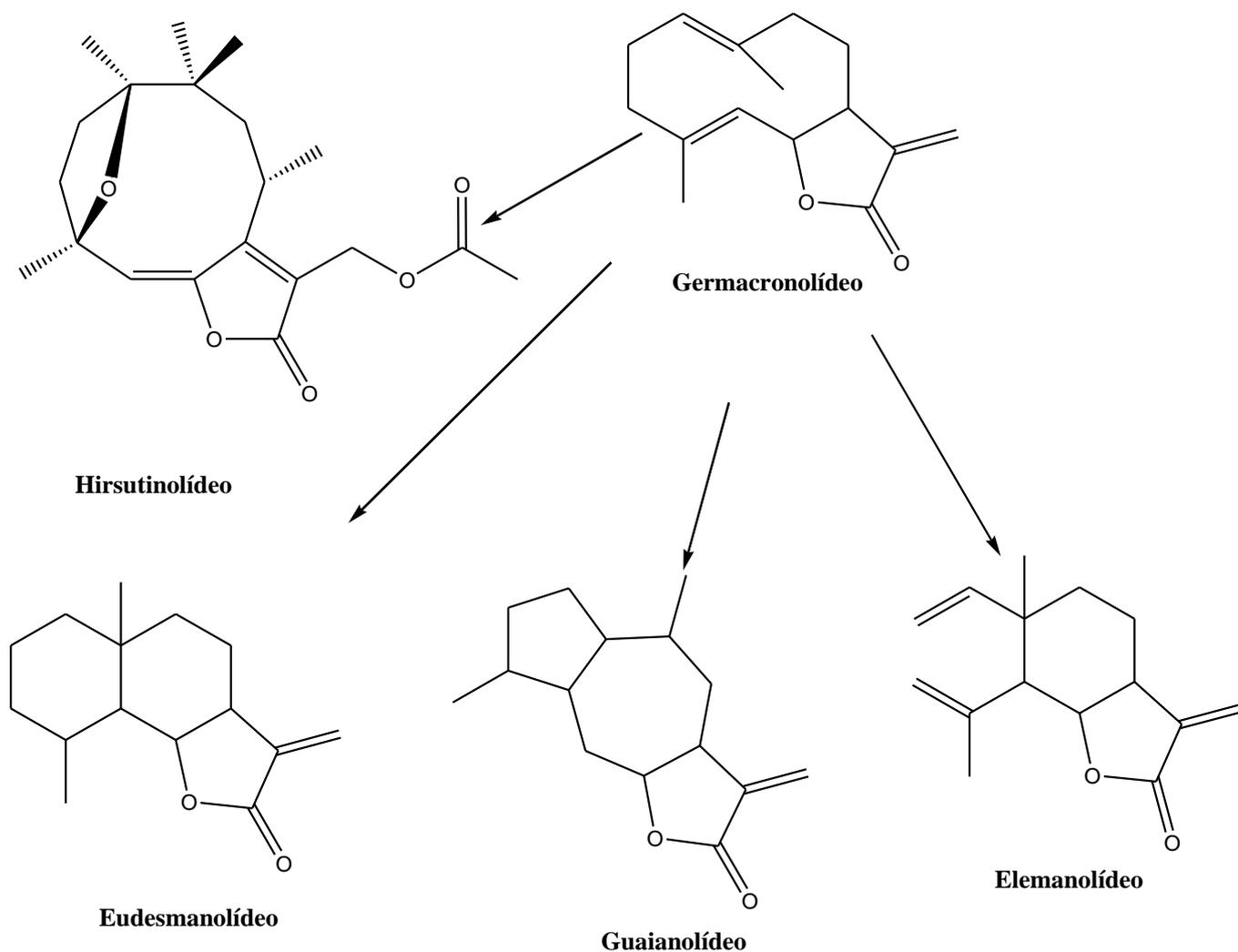
Figura 02: Estrutura dos principais compostos isolados dos gêneros *Vernonanthura*.

	R ₁	R ₂	R ₃
13	OAc	OTig	OH
14	OEt	OMeAcr	OH
15	OAc	OMeAcr	OMe
16	OEt	OH	OH
17	OAc	iBu	OH
18	OAc	OMeAcr	OH



Por outro lado, uma revisão sobre o gênero *Vernonia* mostrou um grande número e variedade de classes de compostos isolados como: alcaloides, flavonoides, cumarinas e terpenoides (monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos e carotenoides). Os sesquiterpenos formam o grupo mais interessante de compostos com destaque para as lactonas sesquiterpênicas. O grupo lactona é o responsável pela maior parte da atividade biológica dos membros desta classe de compostos, especialmente quando se trata de citotoxicidade (TOYANG *et al.*, 2013). As principais classes de lactonas isoladas das espécies deste gênero são os glaucolídeos, hirsutinolídeos, germacranolídeos, eudesmanolídeos, guaianolídeos e elemanolídeos (**Figura 03**) (ZHANG *et al.*, 2014; BUSKUHL *et al.*, 2010). Os hirsutinolídeos foram descritos como tendo propriedades citotóxicas, antibacterianas e anti-inflamatórias, bem como efeitos antiplasmódicos. Compostos contendo o esqueleto glaucolídeo possuem propriedades relaxantes do músculo liso e atuam como inibidores do crescimento de fito-hormônio, apresentando ainda efeitos citotóxicos e moluscidas (BUSKUHL *et al.*, 2010).

Figura 03: Exemplos de esqueletos básicos de lactonas sesquiterpênicas e de alguns derivados dos germacronolídeos presentes no gênero *Vernonia*.



As espécies apresentadas neste trabalho; *Vernonia nudiflora* e *Vernonia intermedia* já foram estudadas quimicamente enquanto que o estudo químico da espécie *Vernonia crassa* é inédito.

BOHLMANN *et al.*(1981) relataram a presença de lactonas sesquiterpênicas e também de triterpenos na espécie *Vernonia intermedia*. **(Estruturas 4-8, Figura 1)**

Das raízes da espécie *Vernonia nudiflora* foram isoladas duas lactonas sesquiterpênicas pertencentes à classe dos hirsutinolídeos **(25-27, Figura 2)**

2-OBJETIVOS:

- Isolar e caracterizar os metabólitos secundários das espécies *Lessingianthus intermedius* (DC.) Dematt., *Vernonanthura crassa* (Vell.) H.Rob. e *Vernonanthura nudiflora* pertencentes à família Asteraceae.
- Analisar as frações de *L. intermedius* e *V. crassa* por cromatografia líquida eletrospray (LC-ESI-MS/MS) e por métodos quimiométricos (PCA).
- Realizar ensaios biológicos para avaliar a atividade antitumoral e antileishmania dos extratos, frações e compostos isolados em maior quantidade de *Lessingianthus intermedius* (DC. Dematt. e *Vernonanthura crassa* (Vell.) H.Rob.
- Contribuir para estudos quimiotaxômicos dos gêneros *Lessingianthus* e *Vernonanthura*.

3- PARTE EXPERIMENTAL.

3.1- Materiais e equipamentos utilizados.

Nos fracionamentos cromatográficos em coluna (CC) foram utilizadas como fases estacionárias sílica gel 60 (0,063-0,200mm) da Merck, sílica *flash* (0,035-0,070mm) da Acros Organics e Sephadex LH-20 da Sigma-Aldrich.

As cromatografias em camada delgada analítica (CCD) foram realizadas em placas de vidro de 5,0 x 20,0 cm com espessura da camada de sílica-gel (sílica-gel 60G e 60GF254 – 1:1) de aproximadamente 0,25 mm. As revelações foram obtidas por irradiação com lâmpada de ultravioleta em 254 e 366nm, utilização de solução de H₂SO₄/MeOH (1:1) e/ou do revelador para terpenos (anisaldeído, MeOH, H₂SO₄, 1:1:1).

Os espectros de RMN de ¹H e de ¹³C foram obtidos em um espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear-VARIAN, modelo Mercury Plus, operando a 300 MHz para ¹H e 75,5 MHz para ¹³C tendo como referência interna o tetrametilsilano (TMS, δ=0,0 ppm). Os deslocamentos químicos (δ) foram dados em ppm e os solventes utilizados foram CD₃OD e CDCl₃. A interpretação dos dados foi realizada com auxílio da técnica DEPT 135 [CH₃/CH=sinal positivo (+), CH₂=sinal negativo (-)] e DEPT 90 [CH=sinal positivo (+)], em que C representa carbono não ligado a hidrogênio (C₀) e confirmado por dados espectroscópicos de correlações bidimensionais; COSY, HSQC, HMBC e NOESY.

Para a análise de componentes principais (PCA) foi empregado o software Matlab R2007b através das ferramentas do PLS-Toolbox 5.2.

O equipamento utilizado nas análises de cromatografia em fase líquida LC-MS/MS foi um sistema de HPLC Waters 2489 acoplado a um espectrômetro de massas de micro API Micromass Quattro (Waters, Milford, MA, EUA) um analisador de massa de quadrupolo triplo, com uma fonte de ionização por eletrospray (ESI). As análises de ESI-MS e ESI-MS/MS foram controladas utilizando o software MassLynx 4.1 (Waters, Milford, MA, EUA).

3.2-Estudo Químico.

3.2.1- Coleta e secagem das plantas

As espécies *Vernonanthura crassa*, *Lessingianthus intermedius* e *Vernonanthura nudiflora* foram coletadas na região das Furnas Gêmeas em Ponta Grossa no Paraná. A identificação das espécies foi realizada pela professora Dr^a Marta Regina Barrotto do Carmo do Departamento de Biologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa. Uma exsicata de *Vernonanthura crassa* (Vell.) H.Rob, *Lessingianthus intermedius* (DC.) Dematt. e de *Vernonanthura nudiflora* (Less.) H.Rob. encontra-se depositada na Universidade Estadual de Ponta Grossa, sob os registros nº HUPG 19827, 18926 e 18914, respectivamente.

As partes aéreas das plantas foram secas em estufa de ar circulante, a 35 °C, e em seguida moída em moinho de facas.

3.2.2- Preparação e fracionamento dos extratos brutos das espécies

Vernonanthura crassa, *Lessingianthus intermedius* e *Vernonanthura nudiflora*

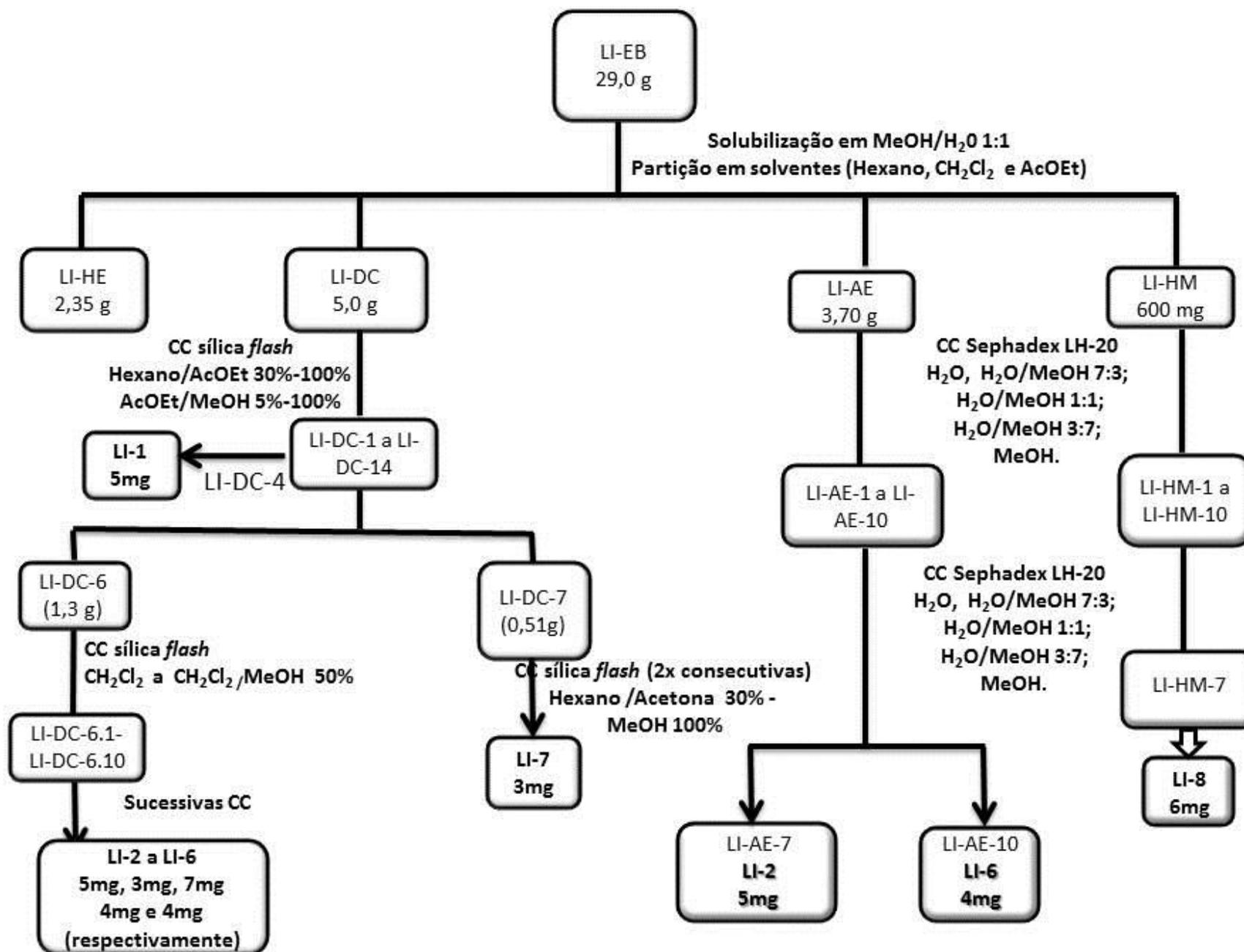
O material vegetal seco e moído foi extraído com metanol, a temperatura ambiente, por maceração exaustiva, resultando, após evaporação do solvente nos extratos brutos metanólicos. Os extratos brutos foram dissolvidos em metanol/água 1:1 e então particionados com hexano, diclorometano e acetato de etila. Após a remoção dos solventes utilizando um evaporador rotativo, foram obtidas as frações: hexano, diclorometano, acetato de etila e hidrometanólica, conforme apresentado na **Tabela 2**.

Tabela 2: Dados obtidos dos extratos brutos e partições das espécies estudadas

Espécie vegetal (parte utilizada)	Massa de material seco (g)/ EB obtido (g)	Frações obtidas da partição do EB (g)			
		Fração hexano /g	Fração Diclorometano/ g	Fração acetato de etila/ g	Fração hidro- metanólica/ g
<i>Lessingianthus intermedius</i> (partes aéreas)	286,0 EB (29,0)	LI-HE/ 2,35	LI-DC/ 5,0	LI-AE/ 3,70	LI-HM/ 18,0
<i>Vernonanthura crassa</i> (partes aéreas)	386,50 EB (36,0)	VC-HE/ 6,30	VC-DC/ 0,90	VC-AE/ 5,3	VC-HM/ 19,0
<i>Vernonanthura nudiflora</i> (partes aéreas)	50 EB(1,26)	VN-HE/ 0,121	VN-DC/ 0,204	VN-AE/ 0,591	VN-HM 0,360

3.2.3. Estudo das frações resultantes da partição do EB de *Lessingianthus intermedius*

No **Esquema 1** é apresentado o procedimento geral empregado para isolamento dos constituintes de *L. intermedius*.

Esquema 1: Procedimento empregado no isolamento dos constituintes de *L. intermedius*.

3.2.3.1. Estudo da fração hexano (LI-HE)

A fração hexano foi submetida a sucessivas cromatografias em coluna utilizando sílica como fase estacionária, porém não foi possível isolamento de substância pura.

3.2.3.2. Estudo da fração diclorometano (LI-DC)

Parte da fração LI-DC (3,5 gramas) foi submetida a um fracionamento em CC (sílica flash; Ø= 3,0 cm x h= 20,0 cm) usando hexano/acetato/ metanol como eluentes, em gradiente crescente de polaridade, que resultou em 49 frações de aproximadamente 10 mL cada, reunidas em 16 novas frações de acordo com o perfil cromatográfico observado em CCD (**Tabela 03**).

Tabela 03: Dados da CC da fração diclorometano (LI-DC).

Código	Frações reunidas	Eluentes	Massa (mg)	Substâncias isoladas
LI-DC-1	1-2	Hexano/Acetato de etila 30%	10,9	LI-1
LI-DC-2	3-5	Hexano/Acetato de etila 30%	19,8	
LI-DC-3	6-7	Hexano/ Acetato de etila 40%	30,2	
LI-DC-4	8-12	Hexano/Acetato Acetato de etila 50%	66,2	
LI-DC-5	13-15	Acetato de etila	173,8	
LI-DC-6	16-18	Acetato de etila	1300	
LI-DC-7	19-21	Acetato de etila	514,1	
LI-DC-8	22-23	Acetato de etila /Metanol 5%	100,0	
LI-DC-9	24-28	Acetato de etila /Metanol 10%	221,8	
LI-DC-10	34-35	Acetato/Metanol 30%	214,2	
LI-DC-11	36-37	Acetato de etila /Metanol 50%	119,2	
LI-DC-12	38-40	Acetato de etila /Metanol 50%	160,9	
LI-DC-13	41	Acetato de etila /Metanol 50%	80,0	
LI-DC-14	42-49	Metanol	133	

3.2.3.2.1. Estudo das frações obtidas da coluna da fração LI-DC

3.2.3.2.1.1. Fração LI-DC-4/ Isolamento da substância LI-1

A fração LI-DC-4 apresentou cristais que foram recristalizados em metanol fornecendo a substância codificada como **LI-1** (5 mg).

3.2.3.2.1.2. Fração LI-DC-6/ Isolamento das substâncias LI-2, LI-3, LI-4, LI-5 e LI-6.

A fração LI-DC-6 (1,3 g) foi submetida a uma cromatografia em coluna ($\varnothing = 3,0$ cm x h= 20,0 cm) de sílica *flash* usando diclorometano com gradiente de metanol como eluente. Foram coletadas 42 frações de 20 mL cada, reunidas em 10 novas frações de acordo com perfil em CCD, conforme **tabela 04**.

Tabela 04: Dados da CC da fração LI-DC-6.

Código	Frações reunidas	Eluentes	Massa(mg)	Purificação	Substâncias isoladas		
LI-DC-6.1	1-5	CH ₂ Cl ₂	20,2	Sucessivos fracionamentos em CC	LI-02, LI-06, LI-04, LI-05.		
LI-DC-6.2	6-8	CH ₂ Cl ₂	20,4				
LI-DC-6.3	9-14	CH ₂ Cl ₂	14,0				
LI-DC-6.4	15	CH ₂ Cl ₂ /MeOH 3%	12,2				
LI-DC-6.5	16-20	CH ₂ Cl ₂ /MeOH 3%	19,0				
LI-DC-6.6	21-23	CH ₂ Cl ₂ /MeOH 5%	890,0				
LI-DC-6.7	24	CH ₂ Cl ₂ /MeOH 5%	30,0				
LI-DC-6.8	25-27	CH ₂ Cl ₂ /MeOH 5%	53,4				
LI-DC-6.9	28-34	CH ₂ Cl ₂ /MeOH 20%	48,4			Recristalização em MeOH	LI-03
LI-DC-6.10	35-42	CH ₂ Cl ₂ /MeOH 50%	62,3				

A fração LI-DC -6.6 (890mg) foi purificada em coluna de sílica *flash* ($\varnothing = 3,0$ cm x h= 30,0 cm) usando éter de petróleo/acetona 20% como eluente de empacotamento. A coluna foi eluída com éter de petróleo/acetona 20, 30 e 50% e acetona pura. Foram coletadas 27 frações, reunidas em 8 frações de acordo com o perfil cromatográfico apresentado em CCD, e codificadas como LI-DC-

6.6.1 a LI-DC- 6.6.8. A fração LI-DC-6.6.1 forneceu 5 mg da substância codificada como **LI-2** e a fração LI-DC-6.6.3, 7mg de **LI-4**

A fração LI-DC-6.6.2 foi submetida a um fracionamento em coluna ($\varnothing=2,0$ cm x h= 20,0 cm) usando sílica *flash* como fase estacionária e hexano/acetona 40% e metanol, como eluentes. Foram coletadas 22 frações de 5mL cada, reunidas em 6 novas frações de acordo com CCD e codificadas como LI-DC-6.6.2.1 a LI-DC-6.6.2.6. A fração LI-DC-6.6.2.5 forneceu 6mg da substância codificada como **LI-6**.

Uma cromatografia em coluna CC foi realizada com a fração LI-DC - 6.6.2.3 ($\varnothing= 1,0$ cm x h=25 cm) em sílica *flash* (30g) usando hexano/acetona 40% como eluente. Foram coletadas 12 frações de 5 mL cada, reunidas em 4 frações LI-DC-6.6.2.3.1 a LI-DC-6.6.2.3.4. A fração LI-DC-6.6.2.3.2 forneceu uma substância de aspecto oleosa codificada como **LI-5** (4mg).

A fração LI-DC-6.6.2.4 (120 mg) foi submetida a um fracionamento em coluna ($\varnothing= 1,0$ cm x h=25 cm) isocrática, utilizando hexano/Acetona 25% como eluente e sílica *flash* (19 gramas) como fase estacionária. Foram coletadas 37 frações de 5mL cada, reunidas em 6 novas frações e codificadas como LIC-6.6.2.4.1 a LIC-6.6.2.4.6. A fração LI-DC-6.6.2.4.2, forneceu 4mg da substância codificada como **LI-6**.

A fração LI-DC-6.9 apresentou cristais amarelos que foram recristalizados em metanol fornecendo a substância codificada como **LI-3**.

3.2.3.2.1.3. Fração LI-DC -7/ Isolamento das substâncias LI-3 e LI-7.

A fração LI-DC-7 (514,1 mg) foi cromatografada em CC (*sílica flash*, $\varnothing=2,0$ cm x h= 30 cm) utilizando hexano/acetona/metanol em gradiente crescente de polaridade como eluentes. Foram coletados 38 frações de 20mL cada, reunidas em 10 frações de acordo com CCD, conforme **Tabela 05**.

A fração LI-DC-7.1 forneceu a substância LI-3 já isolada anteriormente da fração LI-DC- LI-DC-6.9. Já a fração LI-DC-7.6 foi submetida à cromatografia em coluna ($\varnothing= 1,5$ cm) utilizando 30 gramas de sílica *flash* e eluída em diclorometano/metanol em ordem crescente de polaridade. Foram recolhidas 35 frações de 5 mL cada, reunidas em 7 frações codificadas como

LI-DC-7.6.1 a LI-DC-7.6.7.A substância codificada como LI-7 foi isolada da fração LI-DC-7.6.1.

Tabela 05: Dados da cromatografia em sílica *flash* da fração LI-DC-7

Código	Frações reunidas	Eluentes	Massa (mg)	Substância isolada
LI-DC -7.1	1	Hexano/acetona 30%	10,2	LI-7
LI-DC -7.2	2-8	Hexano/acetona 40%	20,4	
LI-DC -7.3	9-10	Hexano/acetona 40%	14,0	
LI-DC -7.4	11-16	Hexano/acetona 40%	50,0	
LI-DC -7.5	17-19	Hexano/acetona 60%	20,0	
LI-DC -7.6	20-24	Acetona	223,0	
LI-DC -7.7	25-27	Acetona /MeOH 10%	9,4	
LI-DC -7.8	28-30	Acetona /MeOH 30%	38,1	
LI-DC -7.9	31-33	Acetona /MeOH 50%	42,3	
LI-DC -7.10	34-38	Metanol	68,0	

3.2.3.3. Estudo da fração acetato de etila (LI-AE)

A fração acetato (450mg) foi submetida a uma filtração em CC ($\varnothing = 1,5$ cm x h=23cm) em sephadex LH-20, utilizando água e metanol em ordem decrescente de polaridade resultando em 58 frações que foram reunidas em 10 novas frações de acordo com o perfil cromatográfico conforme **Tabela 6**. Das frações LI-AE-7 e LI-AE-10 foram novamente isoladas as substâncias LI-2 e LI-6, respectivamente.

Tabela 06: Dados da filtração em CC da fração acetato de etila

Código	Frações reunidas	Eluentes	Massa (mg)	Substâncias isoladas
LI-AE-1	1-9	H ₂ O	5,0	
LI-AE-2	10-15	H ₂ O	140,0	
LI-AE-3	16-19	H ₂ O/Metanol 30%	20,0	
LI-AE-4	20-22	H ₂ O/Metanol 30%	90,0	
LI-AE-5	23-25	H ₂ O/Metanol 50%	19	
LI-AE-6	26-32	H ₂ O/Metanol 70%	78,0	
LI-AE-7	33-37	Metanol	18	LI-2
LI-AE-8	38-43	Metanol	15,0	
LI-AE-9	44-46	Metanol	18,4	
LI-AE-10	47-58	Metanol	17,0	LI-3

3.2.3.4. Estudo da fração hidrometanólica (LI-HM)

A fração hidrometanólica (600 mg) foi submetida a uma CC ($\varnothing= 1,5$ cm x h=23cm) em sephadex LH-20, utilizando água e metanol em ordem decrescente de polaridade resultando em 37 frações que foram reunidas em 10 novas frações de acordo com a análise em CCD, conforme **Tabela 7**

A fração LI-HM-7 foi submetida a uma filtração em CC($\varnothing= 1,5$ cm x h=23cm) em sephadex LH-20 , utilizando água e metanol em ordem decrescente de polaridade resultando em 37 frações que foram reunidas em 9 novas frações(LI-HM-7.1- LI-HM-7.9). A fração LI-HM-7.7 forneceu a substância codificada como **LI-8**.

As demais frações da fração hidrometanólica foram trabalhadas utilizando a mesma fase estacionária, porém não foi possível isolamento de substância pura.

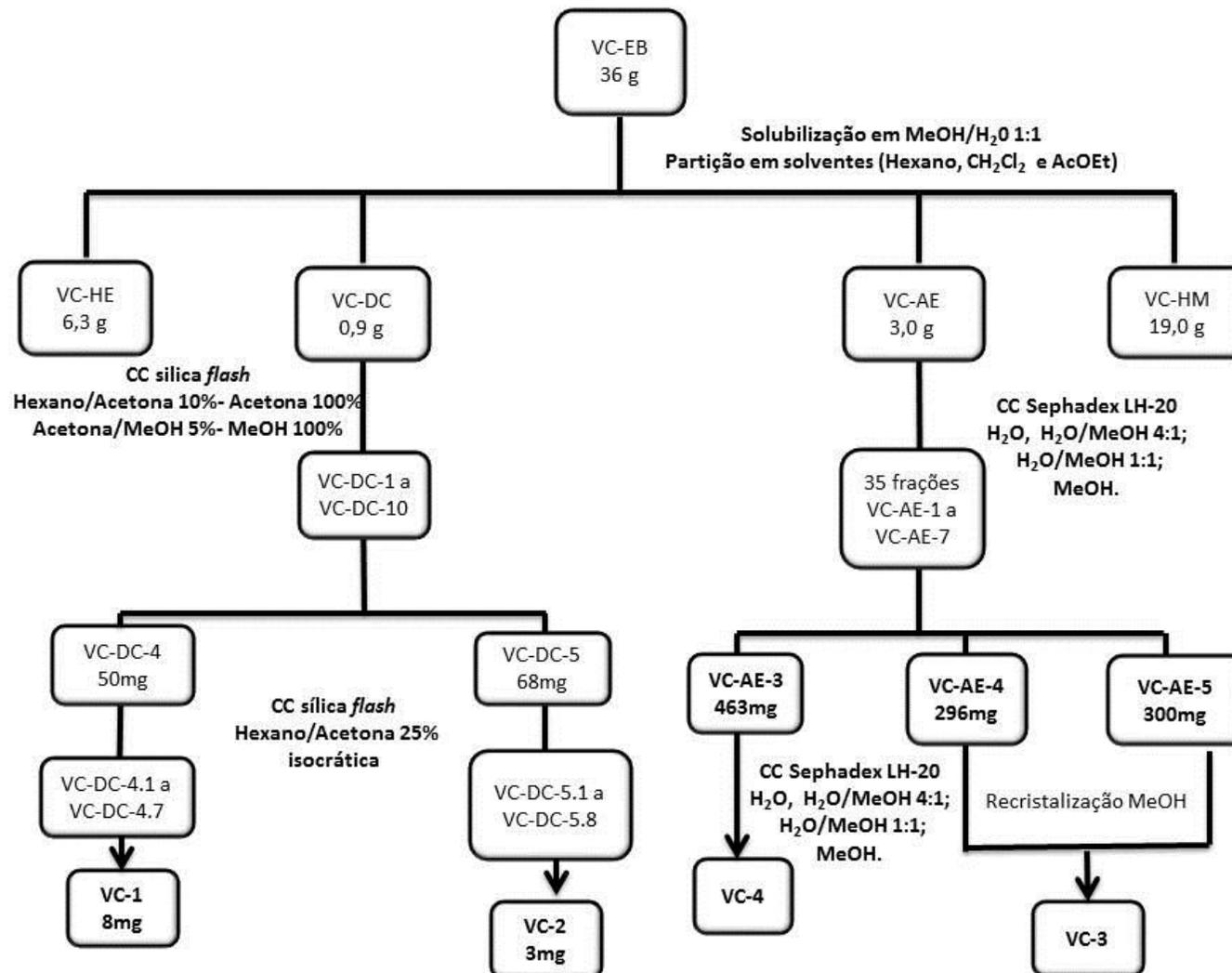
Tabela 07: Dados da filtração em CC da fração hidrometanólica (LI-HM)

Código	Frações reunidas	Eluentes	Massa (mg)
LI-HM-1	1-4	H ₂ O	5,0
LI-HM-2	5-6	H ₂ O	30,0
LI-HM-3	7-12	H ₂ O/Metanol 25%	20,0
LI-HM-4	13-17	H ₂ O/Metanol 50%	18,0
LI-HM-5	18-22	H ₂ O/Metanol 50%	200,0
LI-HM-6	23-25	Metanol	78,0
LI-HM-7	26-30	Metanol	150,0
LI-HM-8	28-30	Metanol	25,0
LI-HM-9	31-32	Metanol	13,4
LI-HM-10	33-34	Metanol	12,0

3.2.4. Estudo das frações resultantes da partição do EB de *Vernonanthura crassa* (Vell.) H.Rob

No **Esquema 2** é apresentado o procedimento empregado no isolamento dos constituintes de *Vernonanthura crassa* (Vell.) H.Rob

Esquema 2: Procedimento empregado no isolamento dos constituintes de *Vernonanthura crassa* (Vell.) H.Rob



Análises preliminares da fração hexano (VC-HE) em CCD e RMN de ^1H revelaram a presença de uma mistura complexa de substâncias sendo majoritários os esteóides bem conhecidos sitosterol e estigmasterol, por esta razão a fração não foi estudada. A fração aquosa também não foi estudada devido a grande quantidade de açúcar observada por RMN de ^1H

3.2.4.1 Estudo da fração diclorometano (VC-DC)/ Isolamento das substancias VC-1 e VC-2

A fração diclorometano (0,9 g) foi adsorvida em sílica *flash* e submetida a um fracionamento em coluna ($\varnothing = 2,0 \text{ cm} \times h = 20,0 \text{ cm}$) usando sílica flash como fase estacionária e hexano/acetona/metanol como eluentes, em gradiente de polaridade crescente que resultou em 52 frações de aproximadamente 10 mL cada, reunidas em 10 novas frações de acordo com o perfil cromatográfico observado (**Tabela 08**).

Tabela 08: Dados da cromatografia em coluna da fração VC-DC

Código	Frações reunidas	Eluentes	Massa (mg)
VC-DC-1	1-6	Hexano/Acetona 10%	5
VC-DC -2	7-12	Hexano/Acetona 15%	7
VC-DC -3	13-22	Hexano/Acetona 15%	20
VC-DC -4	23-25	Hexano/Acetona 20%	50
VC-DC-5	26-34	Hexano/Acetona 30%	68
VC-DC-6	35-39	Hexano/Acetona 50%	50
VC-DC-7	40-41	Acetona	145
VC-DC-8	42-47	Acetona/Metanol 5%	206
VC-DC-9	48-49	Acetona/Metanol 10%	81
VC-DC-10	50-52	Metanol	210

A fração VC-DC-4 foi submetida a um fracionamento em coluna ($\varnothing= 2,0$ cm x h= 18,0 cm) isocrática, usando sílica *flash* como fase estacionária e eluente Hexano/ acetona 25%. Foram coletadas 40 frações de 10 mL cada reunidas conforme perfil cromatográfico em 7 novas frações codificadas como VC-DC-4.1- VC-DC-4.7. Da fração VC-DC-4.5 foi obtida a substância codificada como **VC-1** (8mg). As demais frações não foram estudadas devido à pequena quantidade de massa apresentada e à complexidade da mistura

A fração VC-DC-5 foi submetida a um fracionamento em coluna ($\varnothing= 2,0$ cm x h= 18,0 cm) de sílica flash isocrática usando Hexano/ Acetona 20% como eluente, resultando em 60 frações de 5 mL cada. Estas frações foram reunidas, através de análise em cromatografia em camada delgada, em 8 novas frações codificadas como VC-DC-5.1 a VC-DC-5.8. Da fração VC-DC-5.2 resultou no isolamento de **VC-2 (3 mg)** . As demais frações por conterem pequena quantidade de massa não foram estudadas. As frações VC-DC-7, VC-DC-8, VC-DC-9 e VC-DC-10 foram submetidas a fracionamentos em Sephadex usando H₂O/MeOH como eluentes, porém nenhuma substancia foi isolada.

3.2.4.2 Estudo da fração acetato de etila (VC-AE)/ Isolamento das substancias VC-3 e VC-4

A fração acetato de etila (3,0 g) foi solubilizada em água e metanol e submetida à coluna CC de Sephadex LH-20 ($\varnothing= 2,0$ cm x h= 22,0 cm), eluída em H₂O, H₂O/MeOH 20%, H₂O/MeOH 50% e MeOH, resultando em 35 frações de aproximadamente 10mL cada, que forneceu 7 novas frações reunidas de acordo com o perfil cromatográfico obtido (**Tabela 09**).

Tabela 09: Dados da filtração da fração acetato de etila (VC-AE).

Código	Frações reunidas	Eluentes	Massa(mg)	Substância isolada
VC-AE -1	1-10	H ₂ O	700	VC-3
VC-AE -2	11-17	H ₂ O/MeOH 20%	400	
VC-AE -3	18-19	H ₂ O/MeOH 50%	463	
VC-AE -4	20-22	H ₂ O/MeOH 50%	296	
VC-AE -5	23-26	MeOH puro	300	
VC-AE -6	27-30	MeOH puro	120	
VC-AE -7	31-35	MeOH puro	150	

As frações VC-AE-4 e VC-AE-5 apresentaram cristais que foram recristalizadas em metanol a frio e forneceram 200mg da substância codificada como VC-3.

A fração VC-AE -3 foi submetida a uma coluna CC de Sephadex LH-20 ($\varnothing = 2,0$ cm x h= 22,0 cm) usando H₂O e Metanol em ordem decrescente de polaridade que resultou em 7 frações(VC-AE-3.1 a VC-AE-3.7). A fração VC-AE-3.3 resultou no isolamento da substância codificada como VC-4.

3.2.5. Estudo das frações resultantes da partição do EB de *Vernonanthura nudiflora*

Devido a pequena quantidade de material e complexidade das frações hexano, acetato de etila e hidrometanólica foi estudada somente a fração diclorometano.

3.2.5.1- Estudo da fração diclorometano (VN-DC) de *Vernonanthura nudiflora*

A fração diclorometano (204 mg) foi adsorvida em sílica e submetida a um fracionamento em coluna ($\varnothing = 2,0$ cm x h= 20,0 cm) de sílica *flash* eluída com a mistura de eluente; éter de petróleo/ acetona em gradiente crescente de polaridade e finalizada com metanol, resultando em 89 frações de 5mL cada. Estas frações foram reunidas, através de análise em cromatografia em camada delgada, conforme **tabela 10**.

As frações VN-DC-1.2 e VN-DC-1.5 forneceram as substâncias codificadas como **VN-1** e **VN-2**, respectivamente.

Tabela 10: Dados da cromatografia em coluna da fração diclorometano de *Vernonanthura nudiflora*

Código	Frações reunidas	Eluentes	Massa (mg)	Substância isolada
VN-DC-1	1-23	Éter de petróleo/Acetona 12%	33	VN-1
VN-DC-2	24-25	Éter de petróleo/Acetona 15%	8	
VN-DC-3	26-46	Éter de petróleo/Acetona 20%	24	
VN-DC-4	47-79	Éter de petróleo/Acetona 30%	35	
VN-DC-5	80-83	Éter de petróleo/Acetona 50%	7	VN-2
VN-DC-6	84-86	Acetona	47	
VN-DC-7	87-89	MeOH puro	38	

3.3- Análise de Componentes principais (PCA)

As amostras utilizadas na realização da análise foram as frações diclorometano de *Lessingianthus intermedius* (LI-DC) e de *Vernonanthura crassa* (VC-DC) e as substâncias LI-4 e LI-5. Os experimentos de RMN de ^1H foram realizados em duplicata com número de aquisição igual a 72. Foram pesadas 10mg de cada fração e 3mg de cada substância. Os espectros obtidos foram organizados no formato de uma matriz **X** onde foi realizada uma Análise de Componentes Principais (PCA – do inglês, Principal Component Analysis) empregando o software Matlab R2007b através das ferramentas do PLS-Toolbox 5.2. Os espectros foram normalizados para retirar a influência das diferenças de concentração utilizadas no preparo das amostras.

3.4- Análise de LC-MS/MS

As análises foram realizadas no Laboratório de Biomoléculas e Espectrometria de Massas – DQI/UEM. As amostras analisadas foram as frações diclorometano das espécies *Lessingianthus intermedius* (LI-DC) e *Vernonanthura crassa* (VC-DC) e as substâncias LI-4, LI-5 e VC-1.

As separações cromatográficas foram realizadas utilizando uma coluna Symmetry C18 (3,5 μm ; 75 x 4,6 mm), mantido a temperatura ambiente. A fase móvel consistiu em ácido fórmico a 0,1% em água (solvente A) e 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila (solvente B). O sistema de gradiente foi o seguinte; 0 min 5% de solvente B; 10 min 5% de solvente B, mantida durante 1 min; 10 min 95% de solvente B, mantendo-se nesta última condição durante 1 min. A taxa de fluxo foi de 0,5 ml / min e o volume de injeção da amostra foi de 10 μl .

As condições de operação do espectrômetro de massa foram; tensão capilar 2,5 kV (modo de ionização positivo). A voltagem do cone de 25V. A temperatura de fonte de gás e a temperatura de dessolvatação foram fixadas em 150 e 450 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente. O fluxo de gás e fluxo de gás cone dessolvatação foram 50 e 900 l/h, respectivamente. Os espectros foram registrados em modo positivo.

3.5 - Ensaios Biológicos

3.5.1- Avaliação da atividade antitumoral.

A avaliação da atividade antitumoral foi realizada no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) sob-responsabilidade dos professores Dr. João Ernesto de Carvalho e Dra. Mary Ann Foglio.

As células foram mantidas em meio de cultura RPMI-1640 suplementadas com 5% de soro fetal bovino inativo (SFB) e penicilina: estreptomicina (meio RPMI/SFB/pen:strep).

Foram plaqueados 100 μ L das células tumorais, nas suas respectivas densidades de inoculação, nos compartimento das placas de 96 compartimentos. Estas placas foram incubadas por 24 horas, a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ e 100% de umidade. Para cada linhagem foi utilizado um número estipulado de placas, além da placa T₀ (placa controle), dependendo da quantidade de células obtidas na contagem.

3.5.1.1 - Diluição das amostras.

As amostras foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 0,1g/mL resultando em soluções estoques. Estas soluções foram diluídas 40 vezes em RPMI/SFB/pen:strep. Foram adicionadas 100 μ L da solução dos compostos nos compartimentos das placas de 96 compartimentos, exceto na T₀, nas doses de 0,25; 2,5; 25; 250 μ g/mL. Neste mesmo momento foi realizada a fixação da placa T₀, determinando-se assim a quantidade de células presentes no momento em que os compostos foram colocados. As demais placas foram incubadas por 48 horas. Após este período, foram realizadas as leituras pelo ensaio do SRB.

3.5.1.2 - Ensaio da Sulforrodamina B (SRB).

As placas de 96 compartimentos foram fixadas com 50 μ L de ácido tricloroacético a 50% (TCA) em cada compartimento. Para completar a fixação celular, as placas foram incubadas por 1 hora a 4 °C. Após esse tempo, foram submetidas a

quatro lavagens consecutivas com água destilada para a remoção dos resíduos de TCA, meio SFB e metabólitos secundários. Estas placas foram mantidas à temperatura ambiente até a secagem completa. Em seguida, as placas foram coradas pela adição de 50 µL/compartimento de SRB a 0,4% (peso/volume), dissolvido em ácido acético a 1%. Estas foram incubadas a 4 °C, durante 30 minutos. Após esse período, as placas foram lavadas por 4 vezes consecutivas com uma solução de ácido acético 1%. O resíduo da solução de lavagem foi removido e as placas foram novamente secas à temperatura ambiente. O corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com uma solução de Trizma Base, na concentração de 10 µL e pH 10,5, por 5 minutos em ultra-som. A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em 560 nm em um leitor de microplacas.

3.5.1.3- Análise dos resultados.

As médias das absorbâncias foram determinadas através das seguintes fórmulas:

Se $T > C$ a substância estimulou o crescimento.

Se $C > T \geq T_0$, a substância foi citostática, $\text{Cresc.(\%)} = 100 * [(T - T_0) / (C - T_0)]$.

Se $T < T_0$ a substância foi citocida, $\text{Cresc.(\%)} = 100 * [(T - T_0) / (T_0)]$;

Onde: T é a média da absorbância da célula tratada;

C é o controle de célula;

T_0 é o controle das células no dia da adição das substâncias.

3.5.2- Avaliação da atividade antileishmania

Os ensaios biológicos para avaliação da atividade frente à *Leishmania amazonensis* foram realizados no Departamento de Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá, sob a responsabilidade dos Professores Doutores Celso Vataru Nakamura e Tânia Ueda Nakamura.

Para os ensaios biológicos frente à *Leishmania amazonensis* foram utilizadas cepas de formas promastigotas (*WHOM/BR/75/JOSEFA strain*) mantidas em meio Warren, em pH=7.0, suplementado com 10% de soro bovino fetal e 5 mL de gentamicina a 28 °C. Para os experimentos, cepas de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* foram incubadas em meio Warren suplementado com 10% de soro bovino fetal na presença de diferentes concentrações das amostras testadas (5, 10, 50, e 100 mg/mL) ou no meio sem a presença das amostras. O crescimento das células foi feito em uma placa de 24 poços com cada poço contendo 1 mL do meio.

A padronização dos inóculos em 1×10^6 células/mL foi feita através da contagem em câmara hematocitométrica de Neubauer (*Improved Double Neubauer*). A sobrevivência dos parasitas foi estimada contando-se as formas viáveis em uma câmara hematocitométrica de Neubauer. Em todos os testes, as amostras foram dissolvidos em DMSO, de forma que a concentração final de DMSO não excedeu a 1%. Todos os experimentos foram realizados em duplicata e os resultados expressos em porcentagem de inibição do crescimento.

4– RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- Elucidação estrutural das substancias isoladas

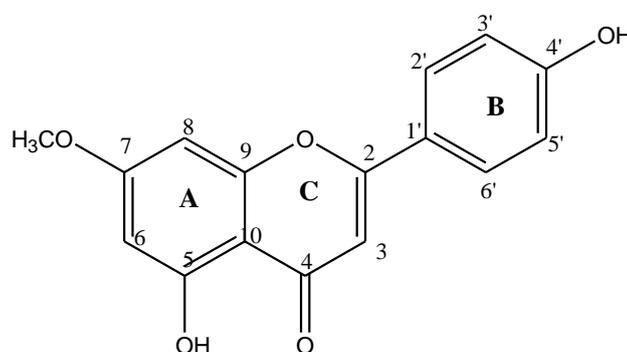
A discussão dos compostos isolados das espécies *Lessingianthus intermedius*, *Vernonanthura crassa* e *V.nudiflora* foi dividida por classe de substâncias tendo como sequência; flavonoides, lactonas sequiterpênicas e outros metabólitos (lignana, lactona monoterpênic e ácido clorogênico).

4.1.1–Flavonoides

4.1.1.1 – Substância LI-1

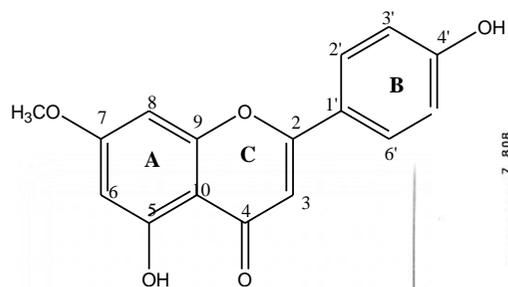
A substância **LI-1** foi isolada da fração diclorometano LI-DC-4 da espécie *Lessingianthus intermedius* na forma de cristais de coloração amarela. O espectro de RMN ^1H desta substância (**Figura 04**) apresentou sinais para hidrogênios de sistema aromático em δ_{H} 7,79 (d; $J=9,0\text{Hz}$, H-2'/H-6'), 6,91 (d; $J=9,0\text{Hz}$, H-3'/H-5'), 6,55 (sl; H-3), 6,54 (d; $J=2,1\text{Hz}$, H-8), 6,32 (d; $J=2,1\text{Hz}$, H-6) e de hidrogênios de uma metoxila em δ_{H} 3,86 (s; 7-OCH₃). Os padrões de substituição dos anéis A e B foram evidenciados pelos valores de J entre os hidrogênios H-6 e H-8 e entre os H-2', H-3', característicos de acoplamentos *meta* e *orto*, respectivamente. Estes dados, em conjunto com a presença de um singlete em δ_{H} 6,55, referente ao hidrogênio H-3, são característicos de flavonas.

A análise do espectro de RMN ^{13}C (**Figura 05**) em conjunto com o espectro de HSQC (**Figura 06**) mostrou a presença de 11 sinais, sendo 5 sinais de CH em δ_{C} 129,0, 116,6, 103,7, 98,9 e 93,2; 6 sinais de carbonos não ligados a hidrogênios em δ_{C} 166,5, 165,9, 161,9 129,0, 122,6, 105,8 e um carbono de grupo metoxila em δ_{C} 56,2.



LI-1

Figura 04: Espectro de RMN de ^1H ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, 300 MHz) de LI-1



LI-1	
Posição	δ_{H} (mult., J, Hz)
2	-
3	6,55(s)
4	-
5	-
6	6,32(d,2,1)
7	-
8	6,54(d, 2,1)
9	-
10	-
1'	-
2'	7,79(d, 9)
3'	6,91(d, 9)
4'	-
5'	6,91(d,9)
6'	7,79(d,9)
MeO	3,86(s)

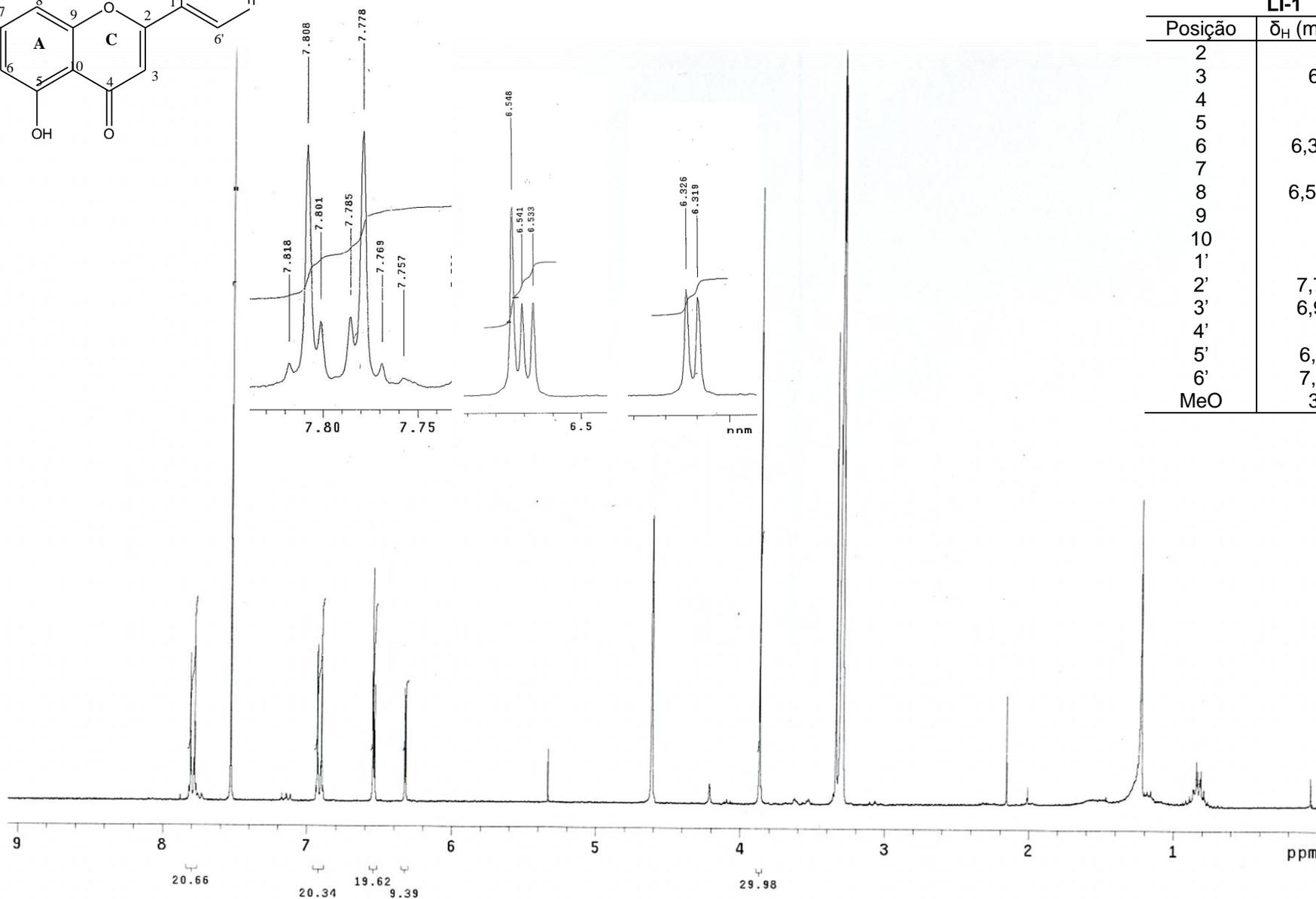
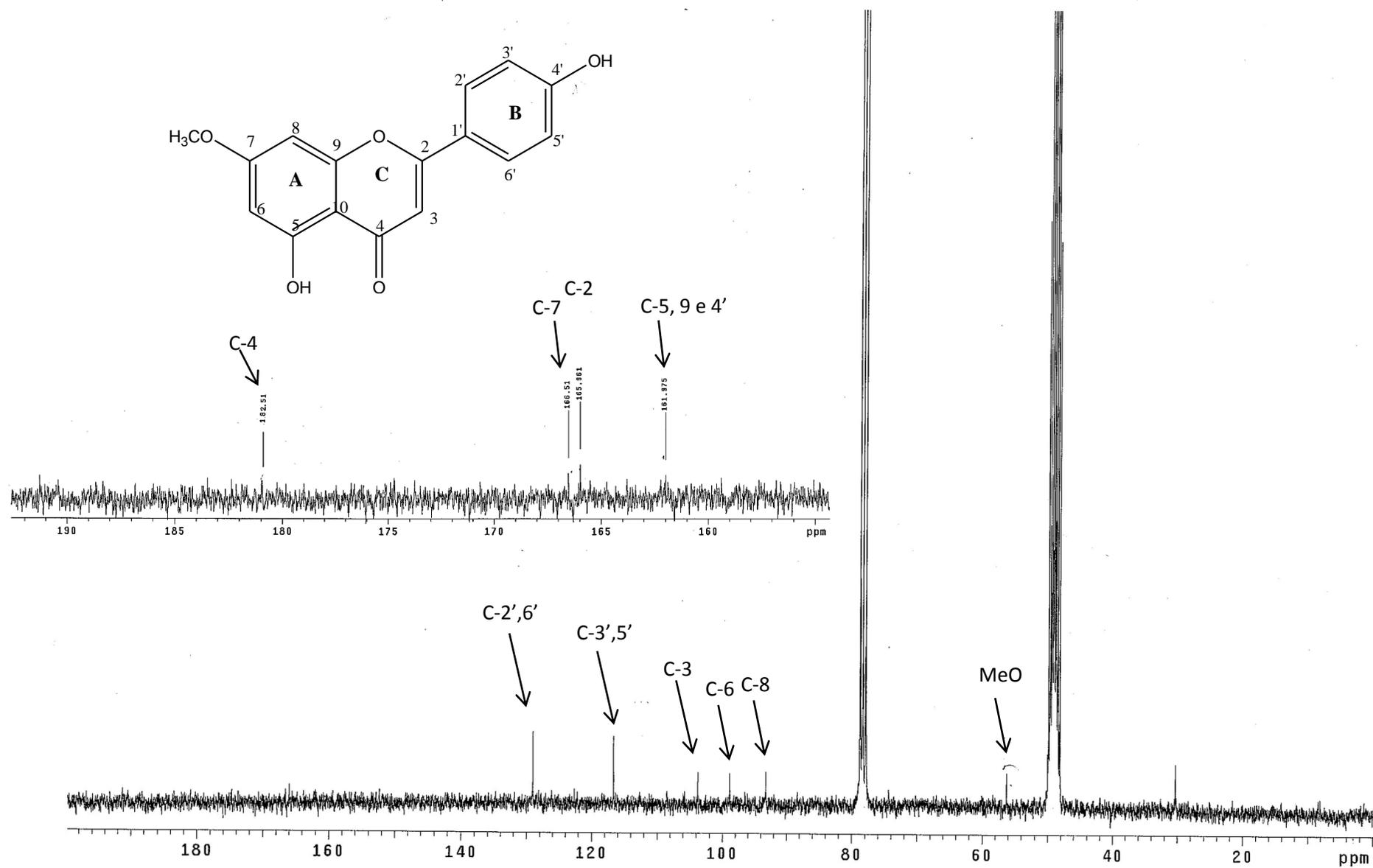


Figura 05: Espectro de RMN de ^{13}C (CD_3OD , 75,5 MHz) da substância LI-1



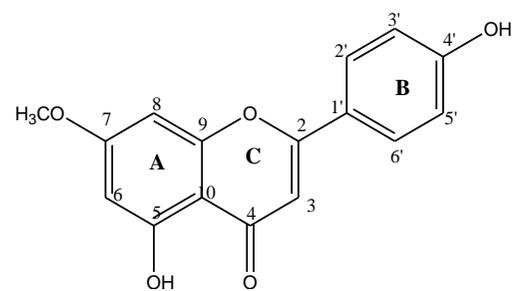
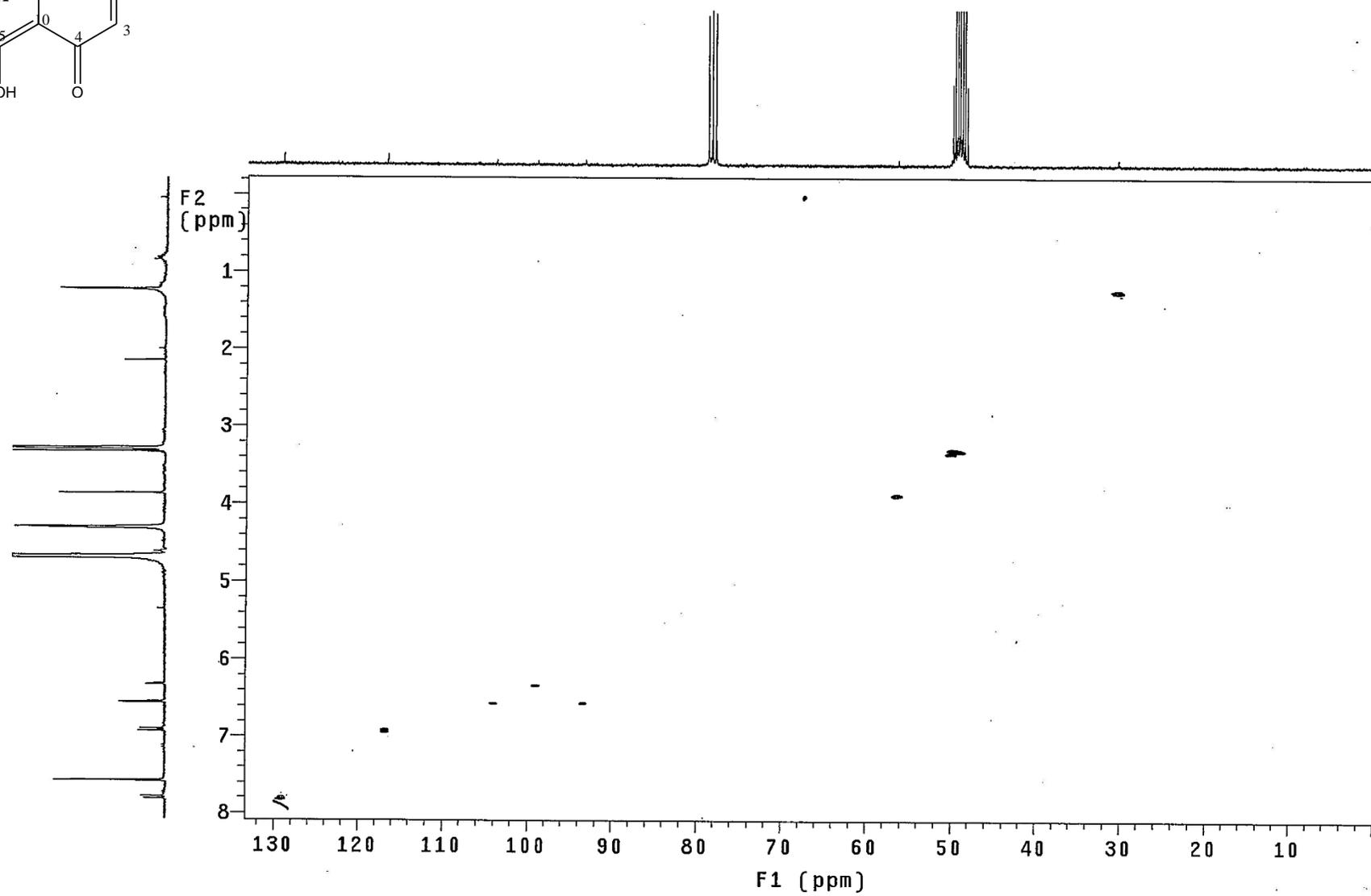


Figura 06: Espectro de HSQC (75,5MHz; CD₃OD) da substância LI-1



A comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C com os dados da literatura (BOSABALIDIS *et al.*, 1998) permitiu caracterizar a flavona isolada **LI-1** como sendo 7-O-metilapigenina (genkwanina) (**Tabela 11**).

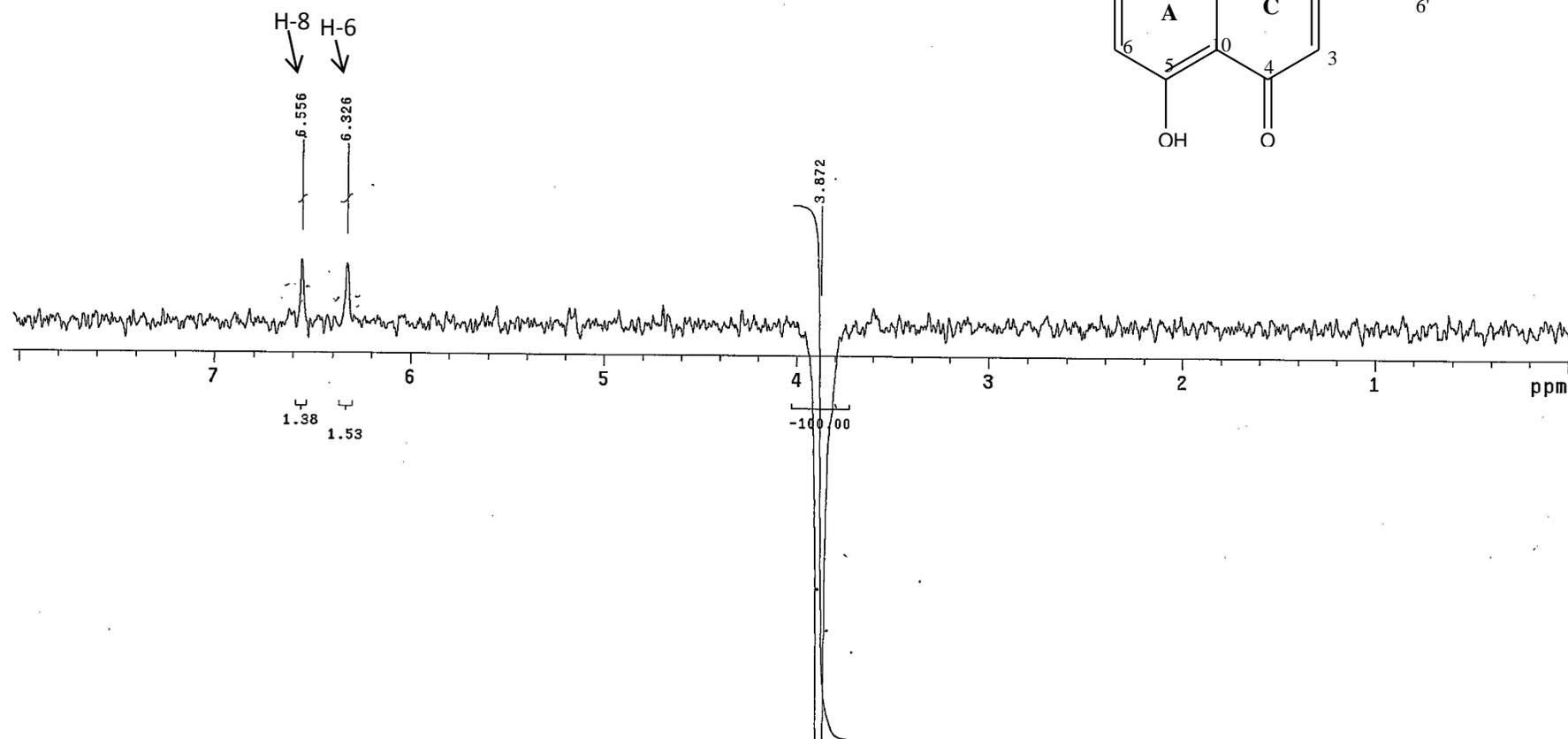
O posicionamento do grupo metoxila foi confirmado pelo uso da técnica de diferença de NOE. A irradiação do sinal em δ_{H} 3,86 (s) (**Figura 7**) resultou em um aumento na intensidade dos sinais dos hidrogênios em δ_{H} 6,54 (H-8) e 6,32 (H-6), indicando que esta metoxila encontra-se ligada ao C-7.

Tabela 11: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância LI-1 e para 7-O-metilapigenina (BOSABALIDIS *et al.*, 1998)

Posição	LI-1 ^a		genkwanina	
	δ_{H} (mult., J, Hz)	δ_{C}	δ_{H} (mult., J, Hz) ^a	δ_{C} ^b
2	-	165,9	-	164,8
3	6,53(s)	103,8	6,55 (s)	104,1
4	-	182,5	-	182,8
5	-	161,9	-	158,1
6	6,32(d,2,1)	98,9	6,27 (d, 2,0)	98,6
7	-	166,5	-	165,8
8	6,54(d, 2,1)	93,2	6,54 (d, 2,0)	92,9
9	-	161,9	-	162,8
10	-	105,8	-	105,9
1'	-	122,6	-	122,1
2'	7,79(d, 9,0)	129,0	7,77 (d, 8,0)	129,0
3'	6,91(d, 9,0)	116,6	6,81 (2H, d, 8,0)	116,9
4'	-	161,9	-	162,7
5'	6,91(d,9,0)	116,6	6,81 (2H, d, 8)	116,9
6'	7,79(d,9,0)	129,0	7,77 (d, 8)	129,0
MeO	3,86(s)	56,2	3,83 (s)	56,0

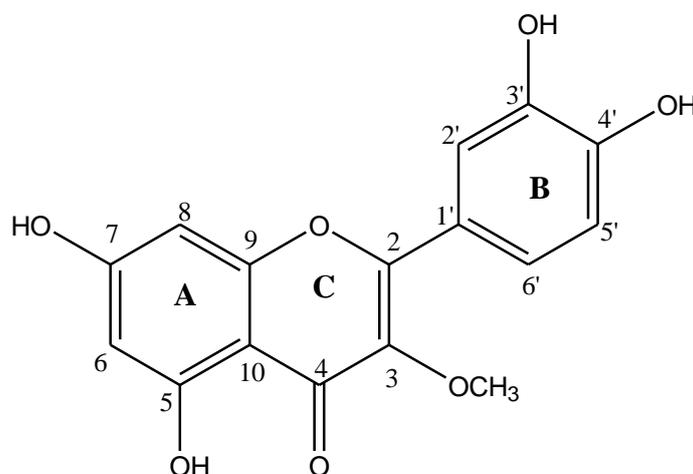
^a (CD₃OD; 300,06 MHz para ^1H) ^b CDCl₃; 50 MHz para ^{13}C

Figura 07: Espectro de diferença de NOE de LI-1 com irradiação em δ_H 3,86.



4.1.1.2 – Substância LI-2

A substância **LI-2** foi isolada da fração diclorometano LI-DC-6.6.2 da espécie *Lessingianthus intermedius* na forma de cristais amarelos. O espectro de RMN ^1H de **LI-2** (**Figura 08**) apresentou sinais similares aos de **LI-1** para hidrogênios do sistema aromático do anel A em δ_{H} 6,19 (H-6) e 6,39 (H-8) com constante de acoplamento de 2,0 Hz indicando acoplamento *meta* entre os mesmos (**Tabela 12**, **Figura 08**). O padrão 1,3,4 de substituição do anel B de **LI-2** foi confirmado pelo valor da constante de acoplamento de 2,1 Hz sugerindo uma relação *meta* entre os hidrogênios em δ_{H} 7,61 (H-2') e 7,53 (H-6') e de 8,7 Hz relativo ao acoplamento orto entre os hidrogênios em δ_{H} 6,89 (H-5') e 7,53 (H-6'). Além desses, observa-se sinal em δ_{H} 3,77, correspondentes a hidrogênios de um grupo metoxila.



LI-2

Figura 08: Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 300 MHz) de LI-2

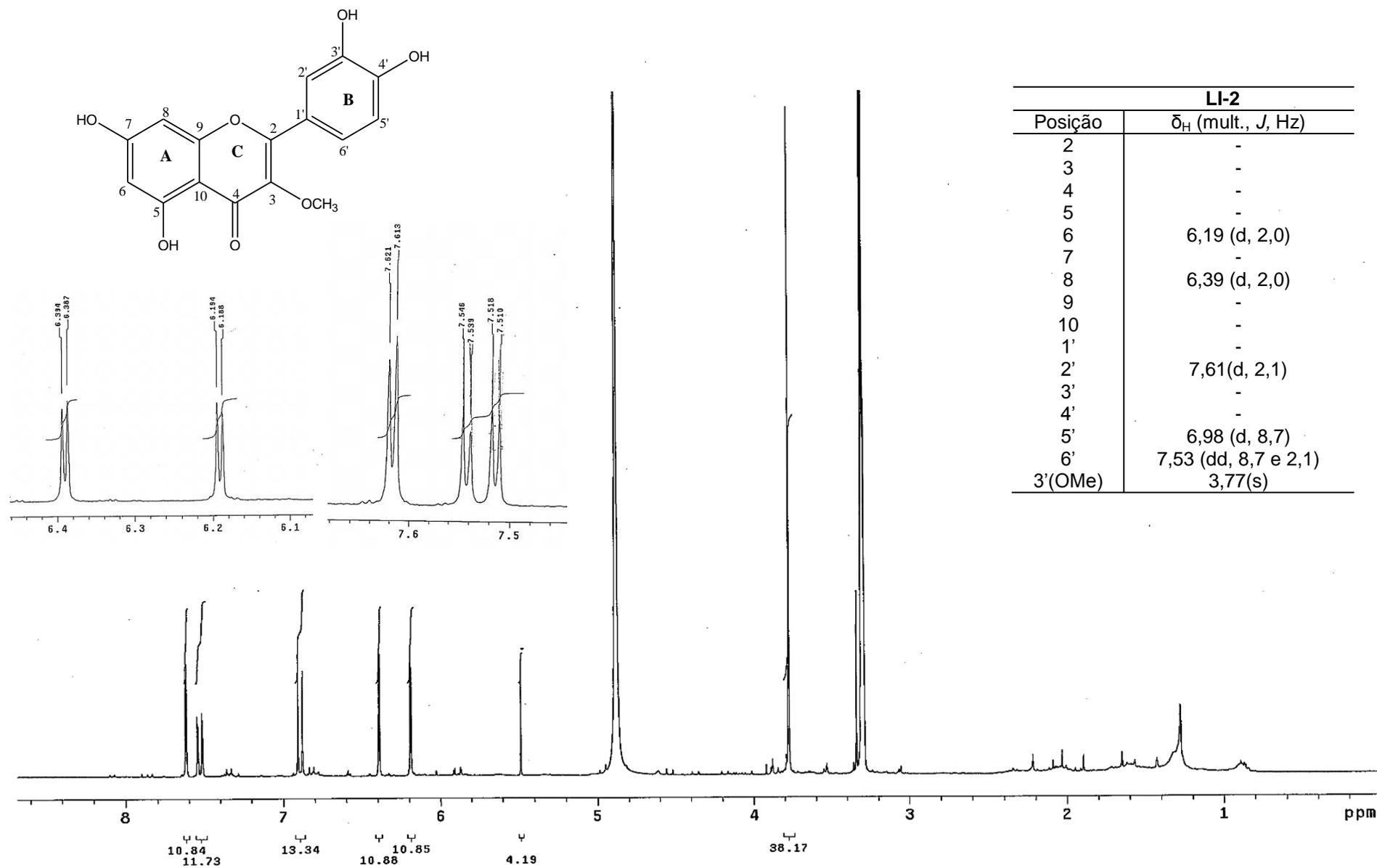


Figura 09: Espectro de RMN de ^{13}C (CD_3OD , 75,5MHz) de LI-2

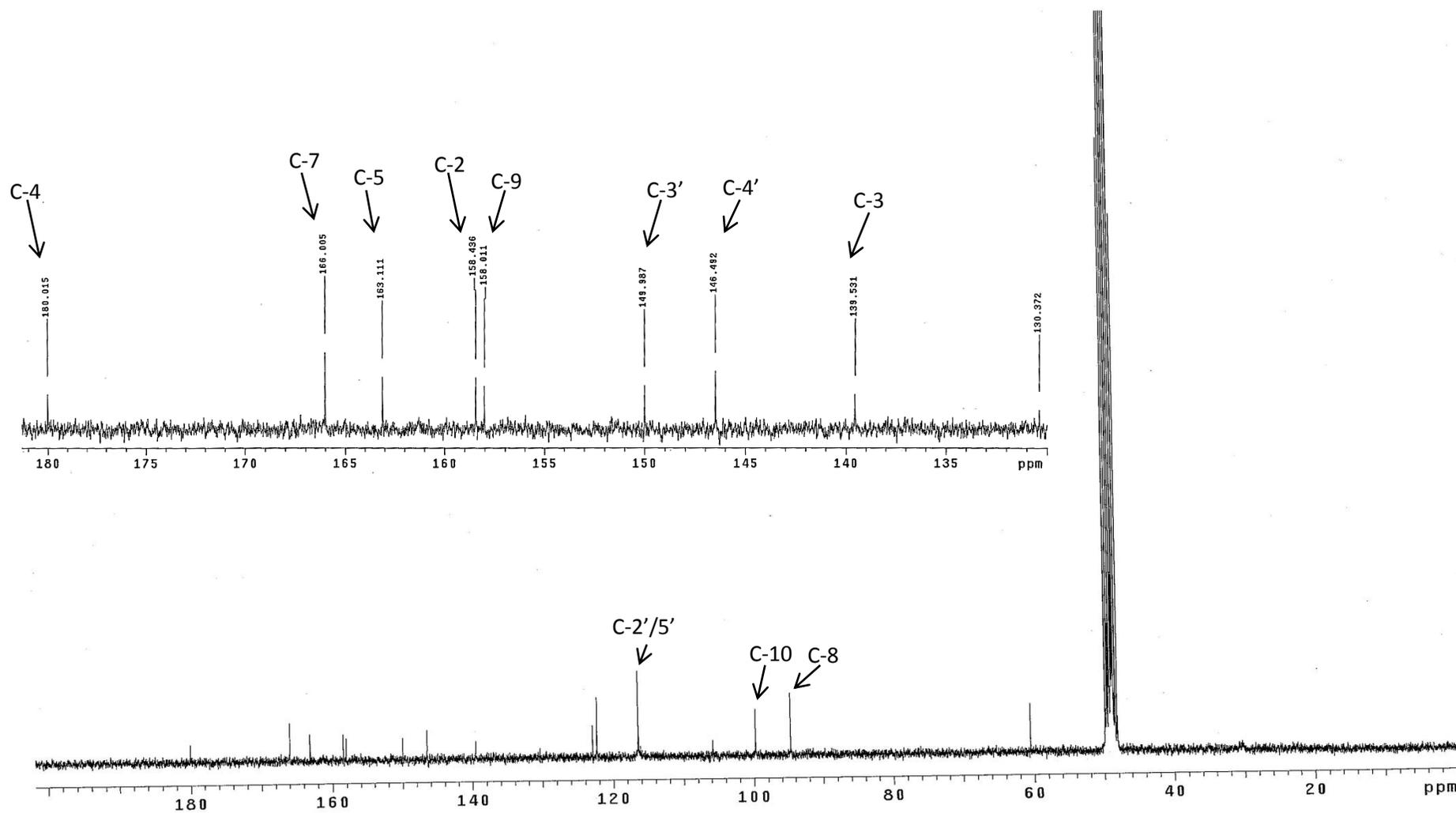
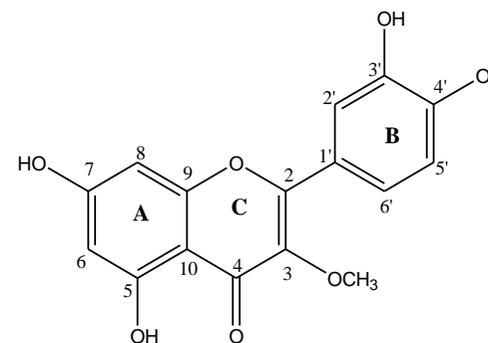


Figura 10: Espectro de HSQC (CD₃OD, 75,5MHz) de LI-2

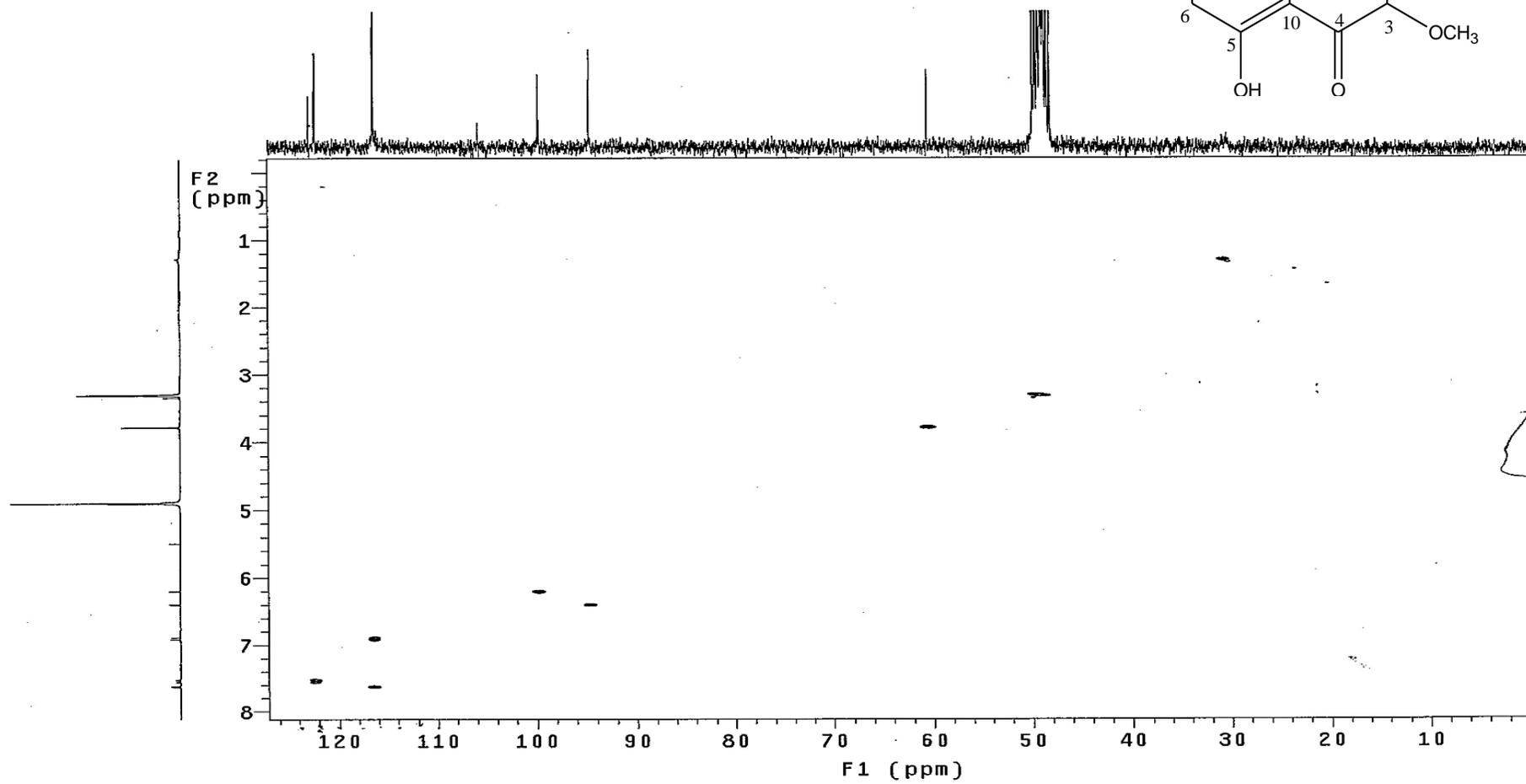
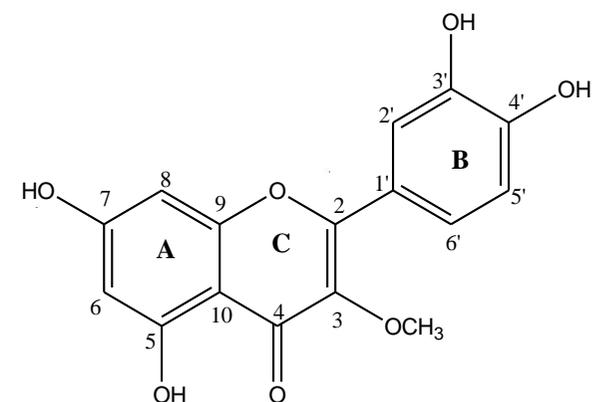


Tabela 12: Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C da substância LI-2 e 3-O-metilquercetina (LEE *et al.*, 2003)

Posição	LI-2 ^a		3-O-metilquercetina ^b	
	δ_{H} (mult., J, Hz)	δ_{C}	δ_{H} (mult., J, Hz)	δ_{C}
2	-	158,4	-	158,4
3	-	139,5	-	139,9
4	-	180,0	-	180,4
5	-	163,1	-	163,5
6	6,19 (d, 2,0)	99,7	6,09 (d,1,8)	100,1
7	-	166,0	-	166,3
8	6,39 (d, 2,0)	94,7	6,29 (d, 1,8)	96,1
9	-	158,0	-	158,8
10	-	105,8	-	106,2
1'	-	122,9	-	123,3
2'	7,61(d, 2,1)	116,4	7,52 (d, 2,0)	116,8
3'	-	146,5	-	146,8
4'	-	149,9	-	150,3
5'	6,98 (d, 8,7)	116,4	6,87 (d, 8,5)	116,9
6'	7,53 (dd, 8,7 e 2,1)	122,3	7,51 (dd, 8,5 e 2,0)	122,7
3'(OMe)	3,77(s)	60,5	3,68 (s)	60,9

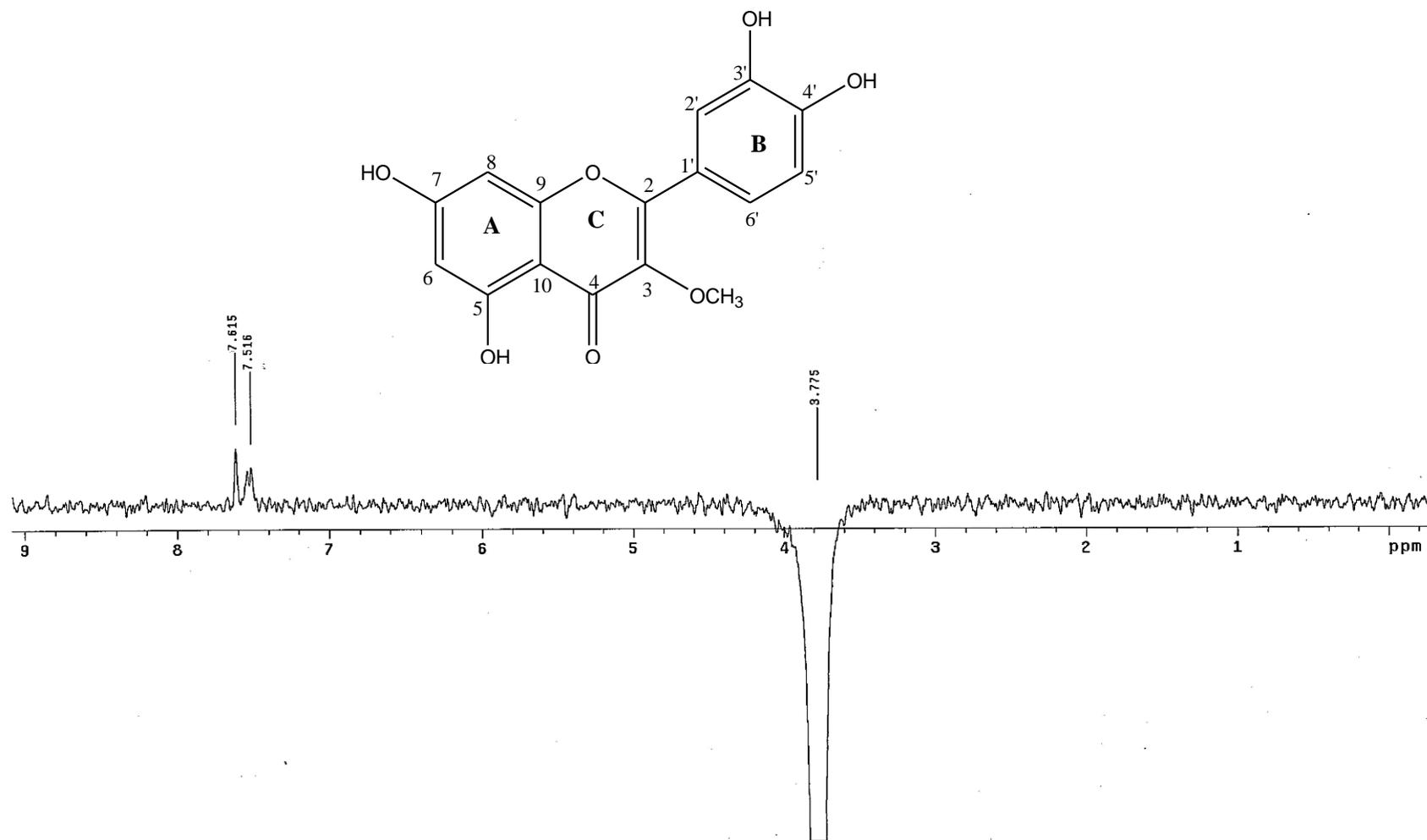
^a(CDCl₃/CD₃OD, 300 MHz) ^b(CD₃OD, 100 MHz)

A análise do espectro de RMN ^{13}C (**Figura 09**) em conjunto com o espectro de HSQC (**Figura 10**) mostrou a presença de 14 sinais, sendo 4 CH em δ_{C} 122,3, 116,4, 99,8 e 94,7; 10 carbonos não ligados a hidrogênios em δ_{C} 180,0, 166,0, 163,1, 158,4, 158,0, 149,9, 146,4, 139,5, 122,9, 116,4 e um carbono do grupo metoxila em δ_{C} 60,5 (**Tabela 12**).

Para a determinação da posição do grupo metoxila, utilizou-se a técnica de diferença de NOE, assim como em **LI-1**. Ao irradiar-se o sinal em δ_{H} 3,77 (s, OCH₃) (**Figura 11**), observou-se um aumento na intensidade dos sinais em δ_{H} 7,61 (H-2') e 7,53 (H-6'), indicando que esta metoxila encontra-se posicionada no carbono C-3.

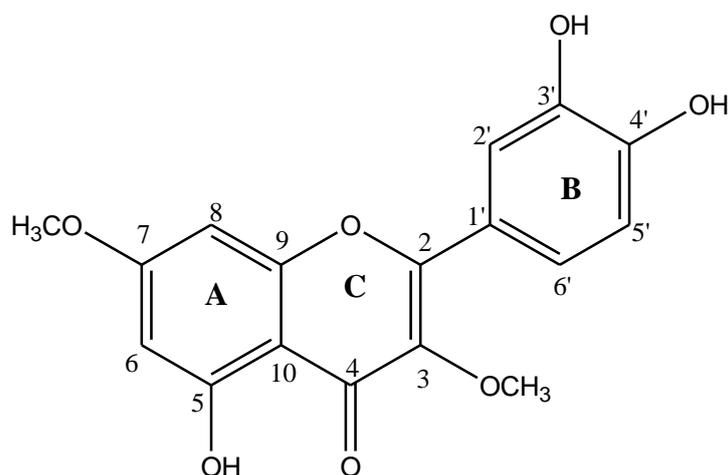
A substância **LI-2** foi identificada como sendo 3-O-metilquercetina através da comparação de seus dados de RMN- ^1H e ^{13}C (**Tabela 12**) com os da literatura (LEE *et al.*, 2003).

Figura 11: Espectro de diferença de NOE de LI-2 com irradiação em δ_H 3,77.



4.1.1.3 – Substância LI-3

A substância **LI-3** foi isolada da fração diclorometano VI-DC-6.9 da espécie *Lessingianthus intermedius*, na forma de cristais amarelos. O espectro de RMN ^1H (**Figura 12**) de **LI-3** apresentou sinais característicos de sistema aromático situados na região de δ_{H} 6,30 a 7,63, com o mesmo padrão de substituição indicando o mesmo esqueleto básico de **LI-2**. A principal diferença entre as duas substâncias isoladas foi a presença em **LI-3** de sinais referentes a hidrogênios de dois grupos metoxila em δ_{H} 3,86 (s) e em δ_{H} 3,76 (s). A análise do espectro de RMN ^{13}C (**figura 13**) em conjunto com o espectro de HSQC (**figura 14**) revelou que os sinais em δ_{H} 3,76 e em δ_{H} 3,86 estão correlacionados aos carbonos em δ_{C} 60,4 e δ_{C} 56,2, respectivamente.



LI-3

Figura 12: Espectro de RMN de ^1H ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, 300,06 MHz) de LI-3

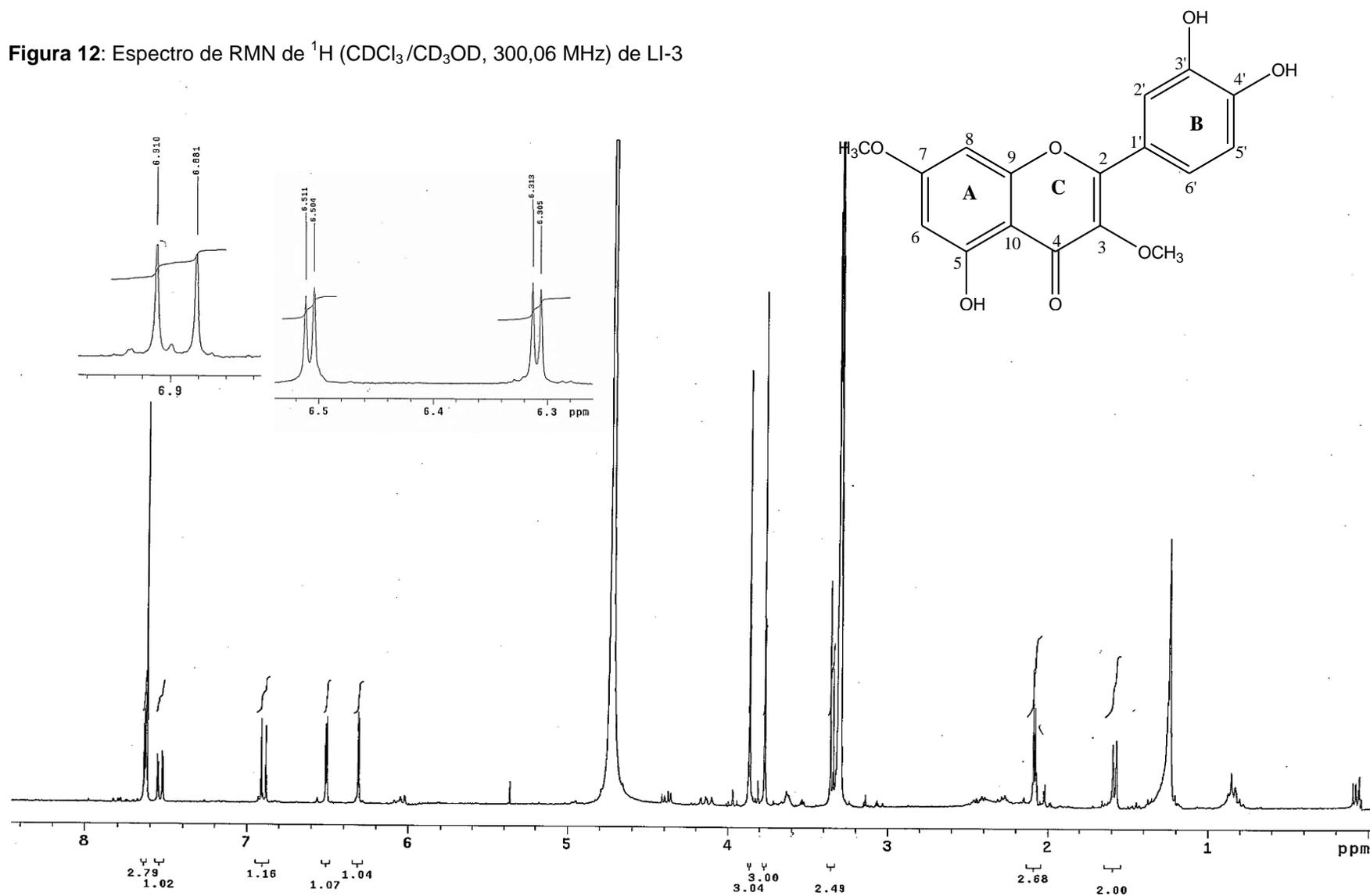


Figura 13: Espectro de RMN de ^{13}C ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, 75,5MHz) de LI-3

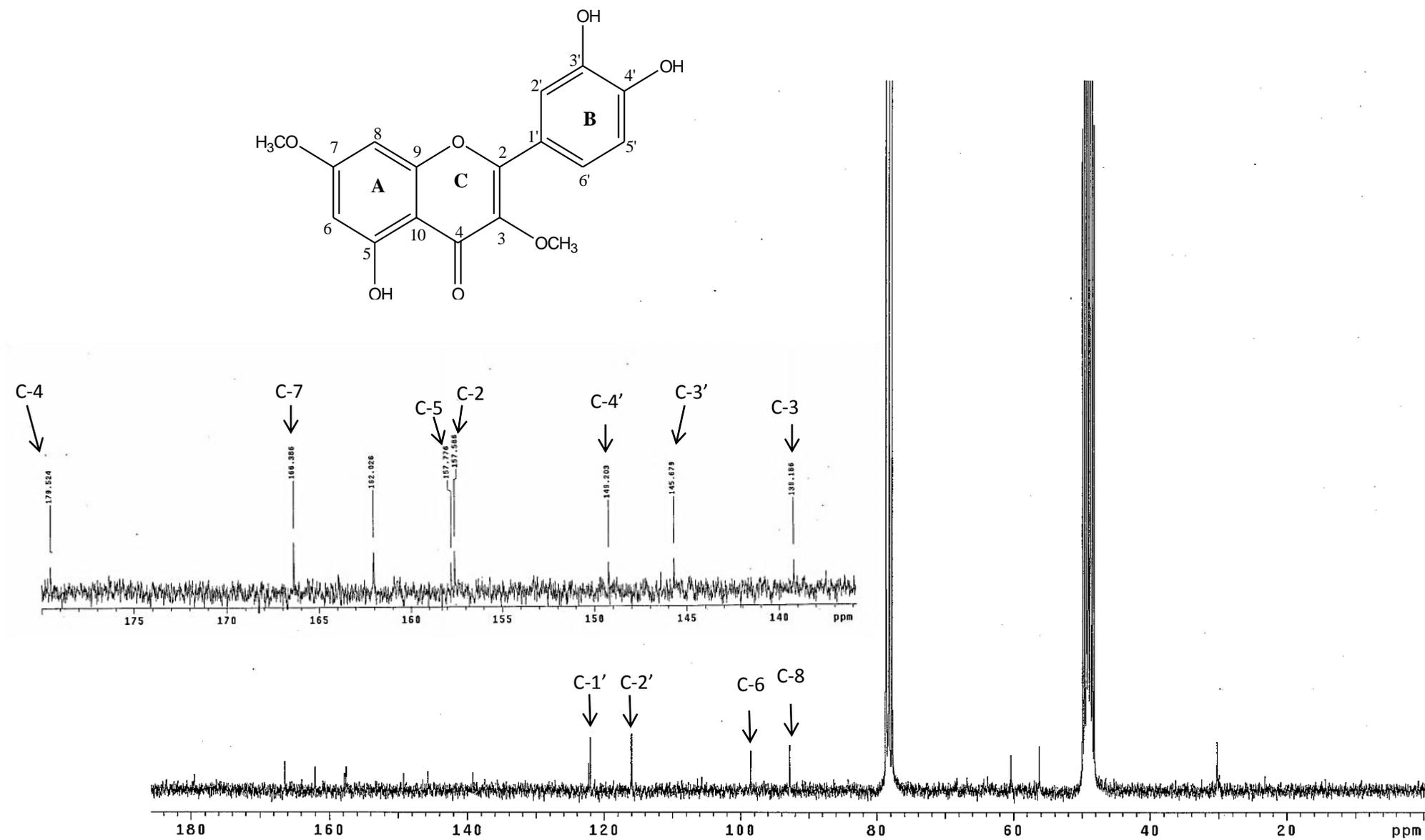
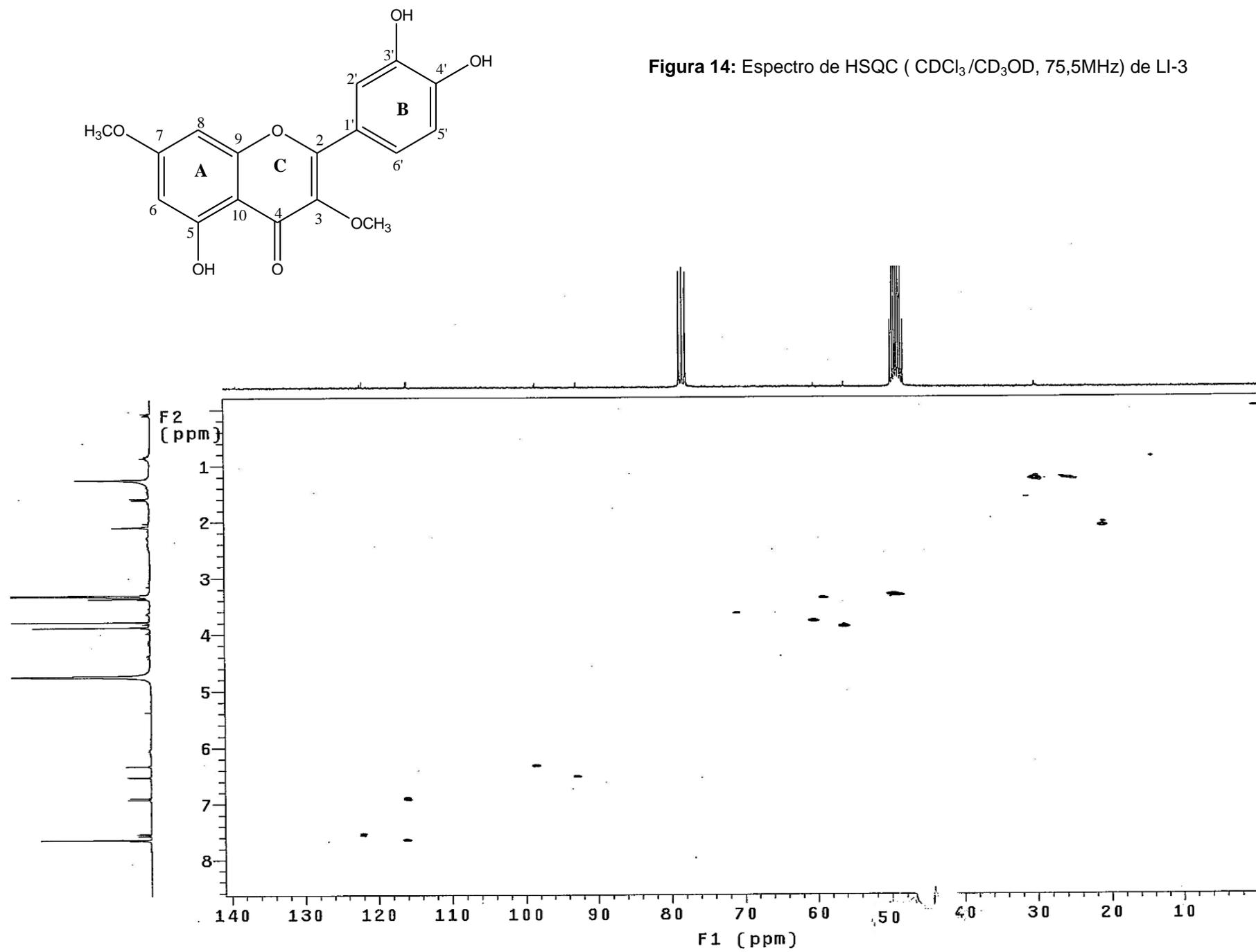


Figura 14: Espectro de HSQC (CDCl₃/CD₃OD, 75,5MHz) de LI-3

O posicionamento dos grupos metoxilas foi estabelecido através da técnica de diferença de NOE. Ao irradiar-se o sinal correspondente aos hidrogênios do grupo metila em δ_H 3,86 (s) (**Figura 15**), observou-se um aumento na intensidade dos sinais correspondentes aos hidrogênios em δ_H 6,30 (H-6) e 6,50 (H-8), indicando que esta metoxila encontra-se posicionada no carbono 7 do anel A. Quando os hidrogênios do grupo metila em δ_H 3,76 foram irradiados não foi possível observar aumento significativo de sinal (**Figura 16**)

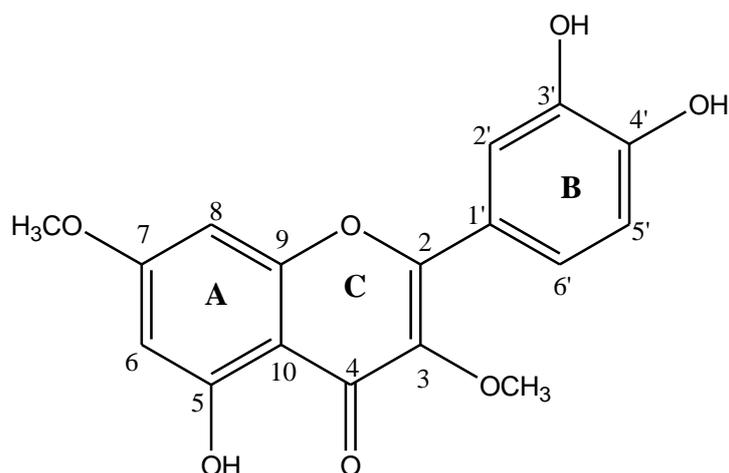
O posicionamento da metoxila em C-3 foi baseada nos valores de deslocamentos químicos para a carbonila em δ_C 179,5 (C-4) e para o carbono C-3 em δ_C (139,2), que são característicos de esqueleto de flavonoides com metoxila nesta posição (AGRAWAL,1989)

Os demais sinais de RMN de ^{13}C foram comparados com os dados da literatura (YANG, et.al., 2013), permitindo a identificação de LI-3 como sendo a 3,7-di-O-metilquercetina. Os dados de RMN de 1H foram comparados com os apresentados por GRAYER et al.(2010) (**Tabela 13**).

Tabela 13: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância LI-3 e para 3,7-di-O-metilquercetina.

Posição	LI-3 ^a		3,7-di-O-metilquercetina ^b	
	δ_{H} (mult., J, Hz)	δ_{C}	δ_{H} (mult., J, Hz)	δ_{C}
2	-	157,6	-	154,8
3	-	139,2	-	140,0
4	-	179,5	-	174,8
5	-	157,8	-	158,8
6	6,30 (d,2,4)	98,5	6,36(d, 2,0)	95,7
7	-	166,4	-	162,4
8	6,50 (d, 2,1)	92,7	6,70 (d, 2,0)	94,6
9	-	157,8	-	161,1
10	-	-	-	107,3
1'	-	122,2	-	121,7
2'	7,63 (d, 2,4)	116,0	7,58 (d, 2,2)	115,0
3'	-	145,7	-	145,0
4'	-	149,2	-	148,1
5'	6,89 (d, 8,7)	115,9	6,88 (d, 8,5)	114,9
6'	7,53 (dd, 8,4 e 2,10)	121,9	7,48 (dd, 8,5 e 2,2)	120,6
3(MeO)	3,76 (s)	60,4	3,80 (s)	58,8
7(MeO)	3,86 (s)	56,2	3,86(s)	55,1

^a($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, 300,06 MHz) ^b(CD_3OD , 500 MHz)



LI-3

Figura 15: Espectro de diferença de NOE de LI-3 com irradiação em δ_H 3,86.

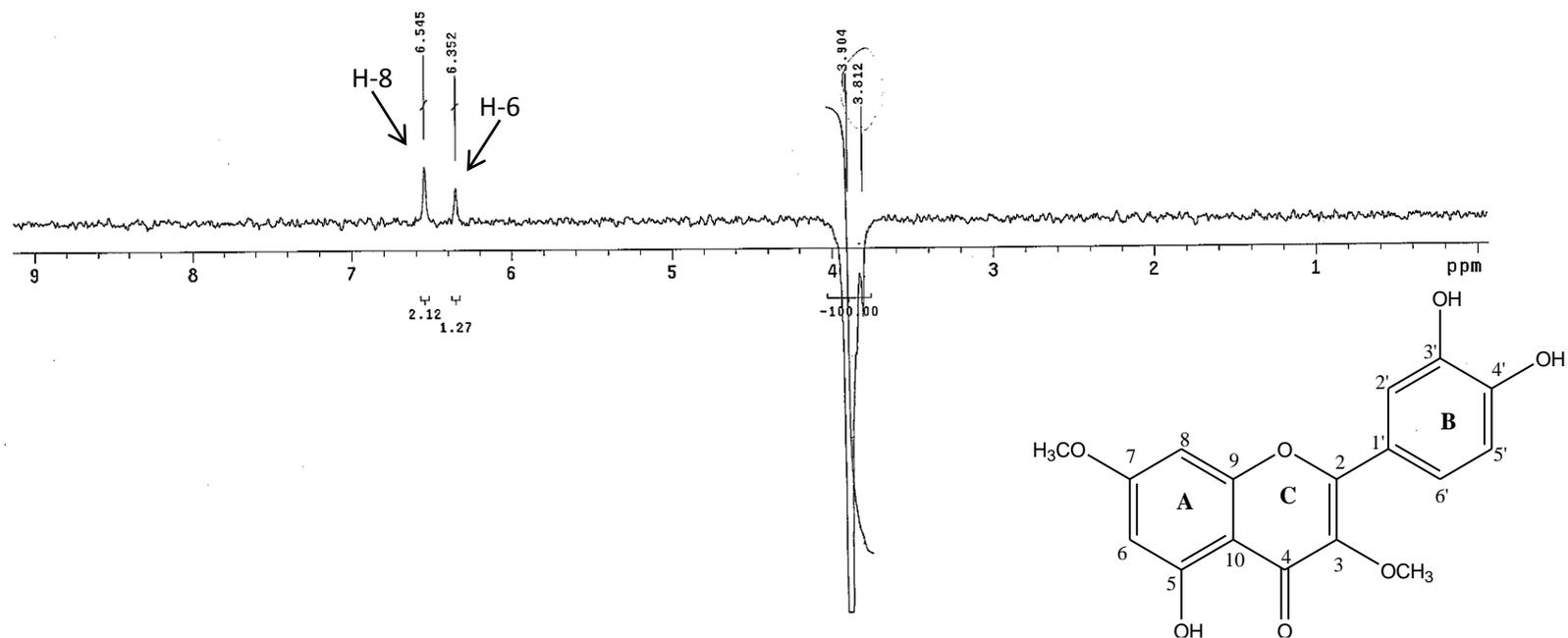
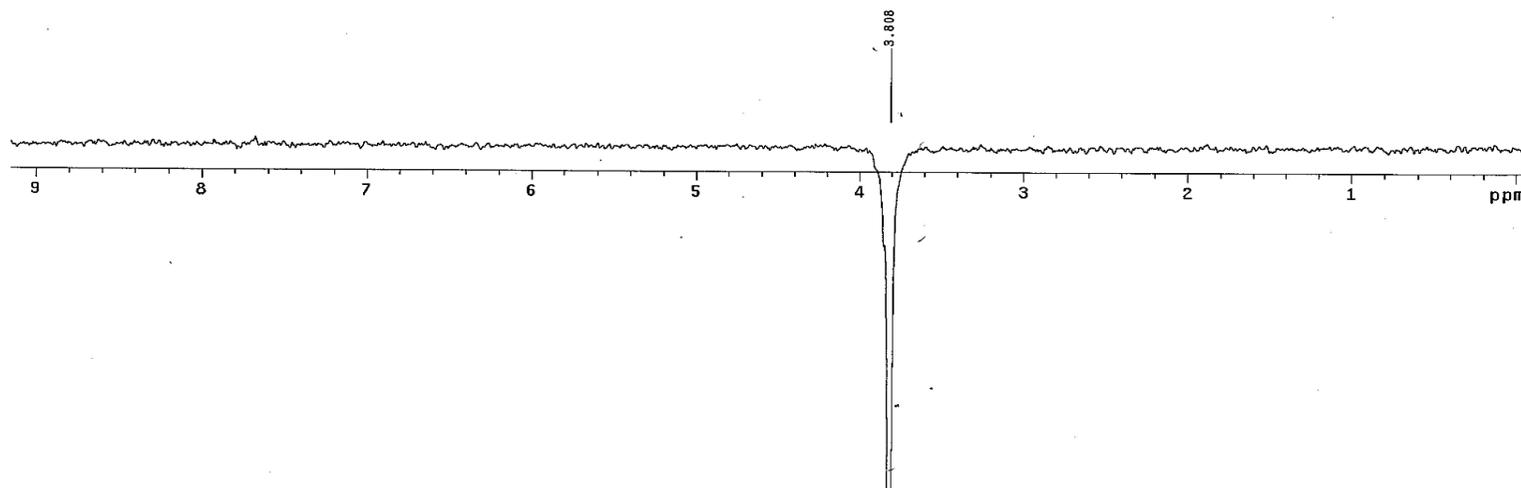


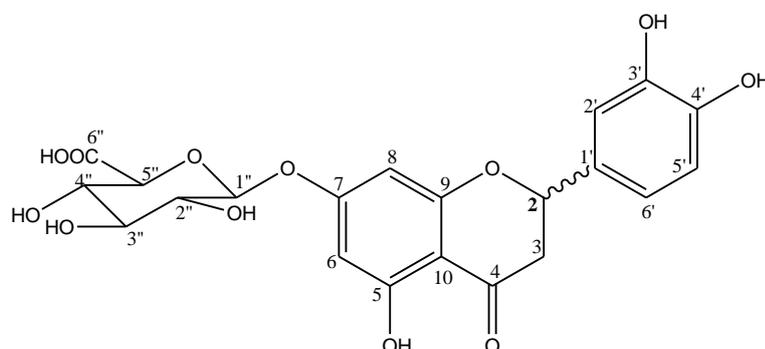
Figura 16: Espectro de diferença de NOE de LI-3 com irradiação em δ_H 3,76.



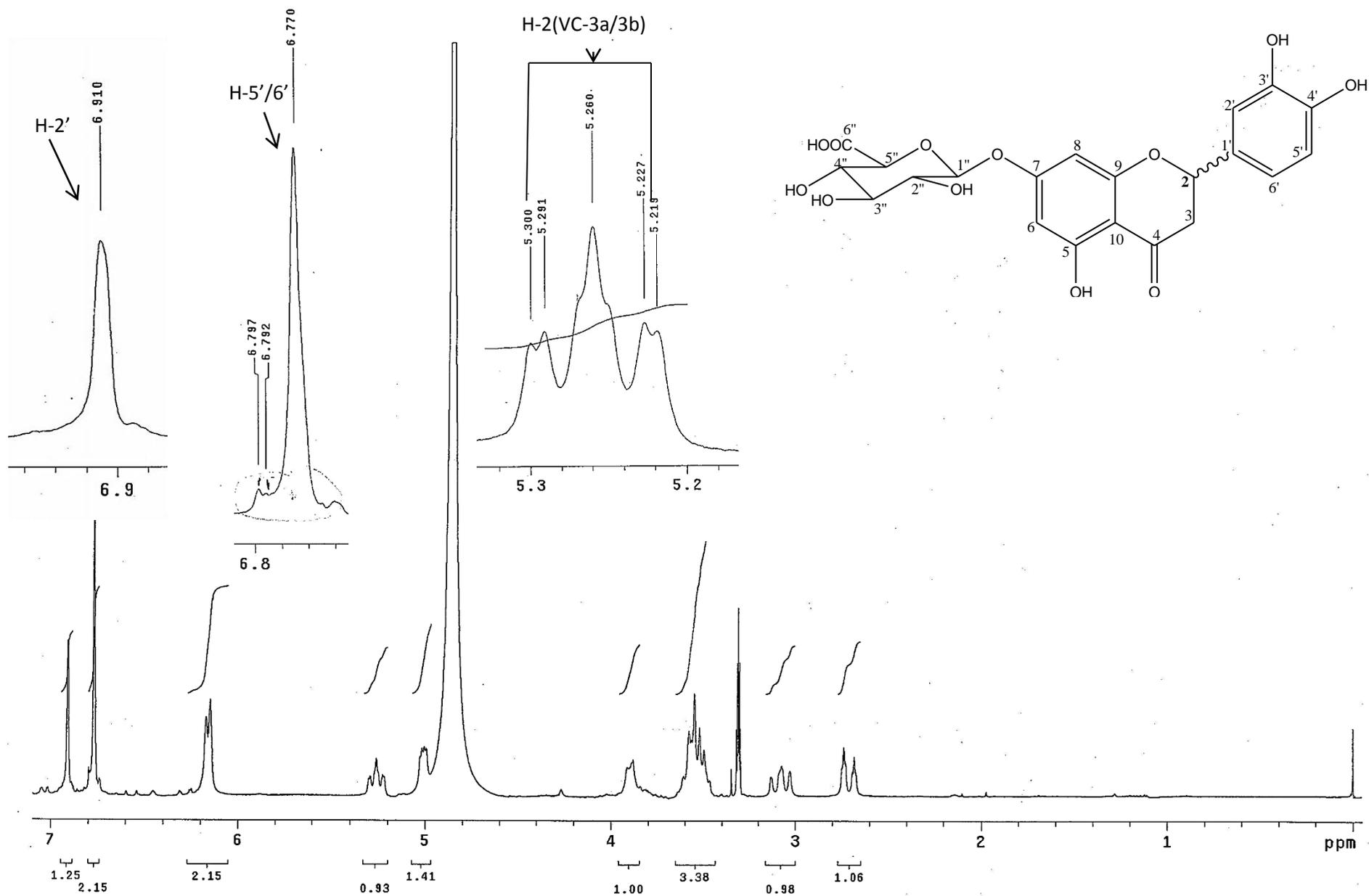
4.1.1.4 –Mistura de compostos VC-3

A mistura de compostos codificada como **VC-3** foi isolada da fração acetato (**VC-AE-4 e VC-AE-5**) da espécie *Vernonanthura crassa* na forma de sólido amorfo de cor marrom claro.

O espectro de RMN ^1H (**Figura 17**) de **VC-3** apresentou sinais na região de hidrogênios de sistema aromático, na forma de simpletos largos em δ_{H} 6,91(1H), 6,77 (2H), 6,15(1H) e 6,1 (1H). Além destes, observou-se sinais para hidrogênios oximetínicos na região de δ_{H} 5,20-5,30, desdobrados em duplos dupletos em δ_{H} 5,24 (12,3 e 2,4 Hz, H-2) e em 5,28 (12,3 e 2,7 Hz, H-2). Estes se encontram acoplados aos sinais em δ_{H} 2,72 (dd, 17,1 e 2,7 Hz, H-3eq) e δ_{H} 3,08 (dd, 16,8 e 13,2 Hz, H-3ax), conforme o observado no espectro de COSY (**Figura 18**). Os dados obtidos sugerem o esqueleto básico de uma flavanona para **VC-3**. A presença de sinais de H-2 duplicado, em δ_{H} 5,24 e δ_{H} 5,28 sugere uma mistura de duas substâncias contendo o mesmo esqueleto básico. O espectro de RMN de ^1H mostrou também dois sinais para hidrogênios anoméricos em δ_{H} 5,00 (d, 6,6 Hz) e 5,04 (d, 6,6 Hz).



VC-3

Figura 17: Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 300 MHz) de VC-3

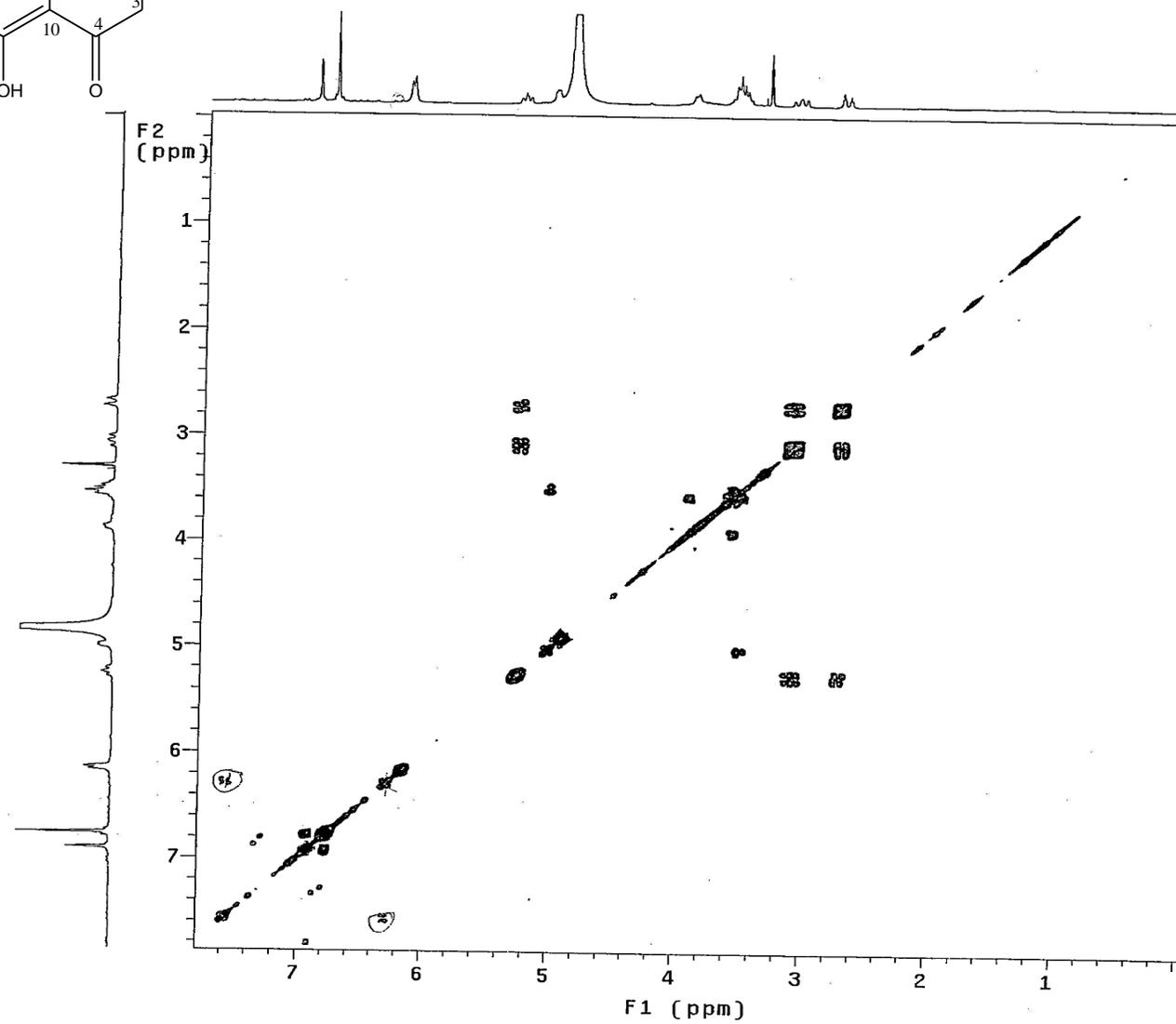
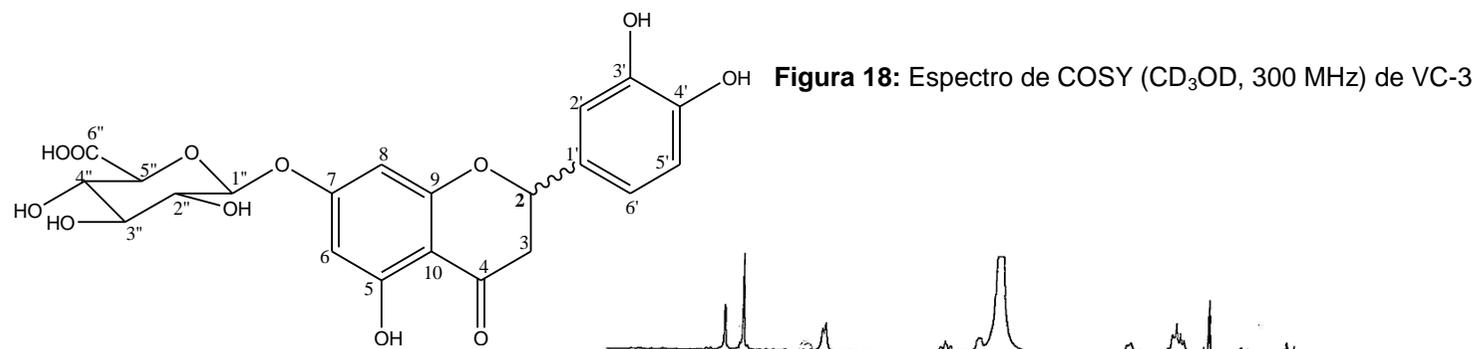
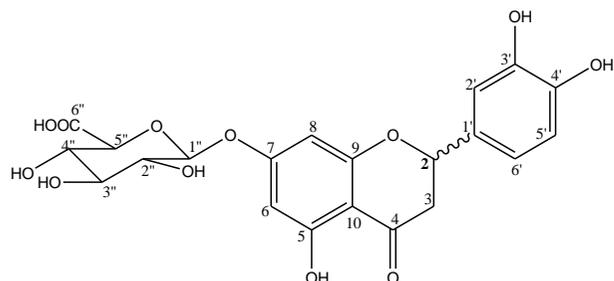


Figura 19: Espectro de RMN de ^{13}C (CD_3OD , 75 MHz) de VC-3



C	VC-3a	VC-3b
	δ_{C}	δ_{C}
2	80,64	80,56
3	44,0	44,1
4	198,5	198,5
5	164,7	164,7
6	98,0	98,0
7	166,7	166,7
8	96,9	96,9
9	164,6	164,6
10	104,9	104,9
1'	131,4	131,4
2'	114,8	114,8
3'	146,4	146,4
4'	146,9	146,9
5'	116,3	116,3
6'	119,3	119,3
1''	100,9	100,9
2''	74,3	74,3
3''	77,4	77,4
4''	73,3	73,3
5''	76,5	76,5
6''	176,0	176,0

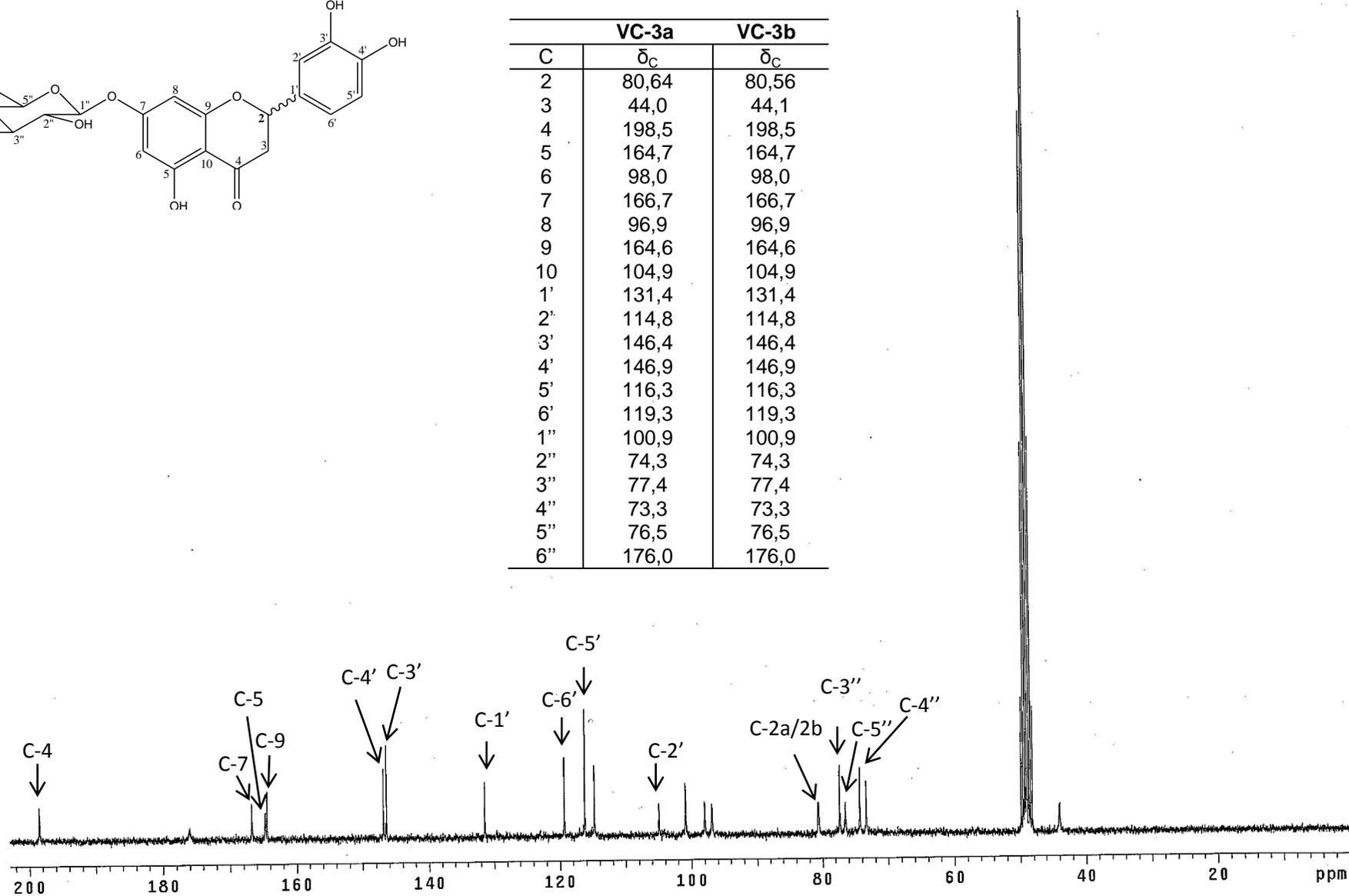


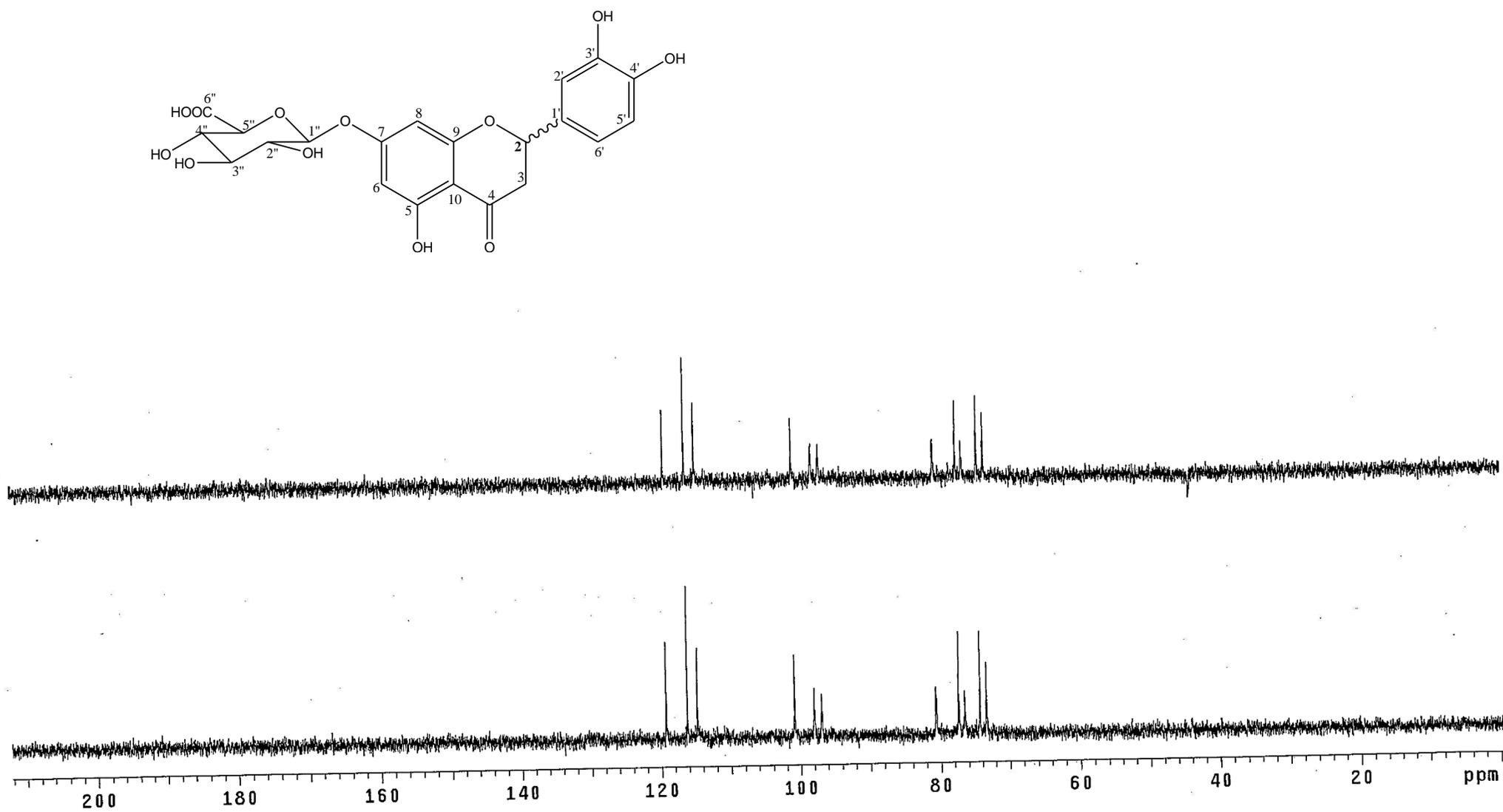
Figura 20: Espectro de DEPT (CD₃OD, 75 MHz) de VC-3

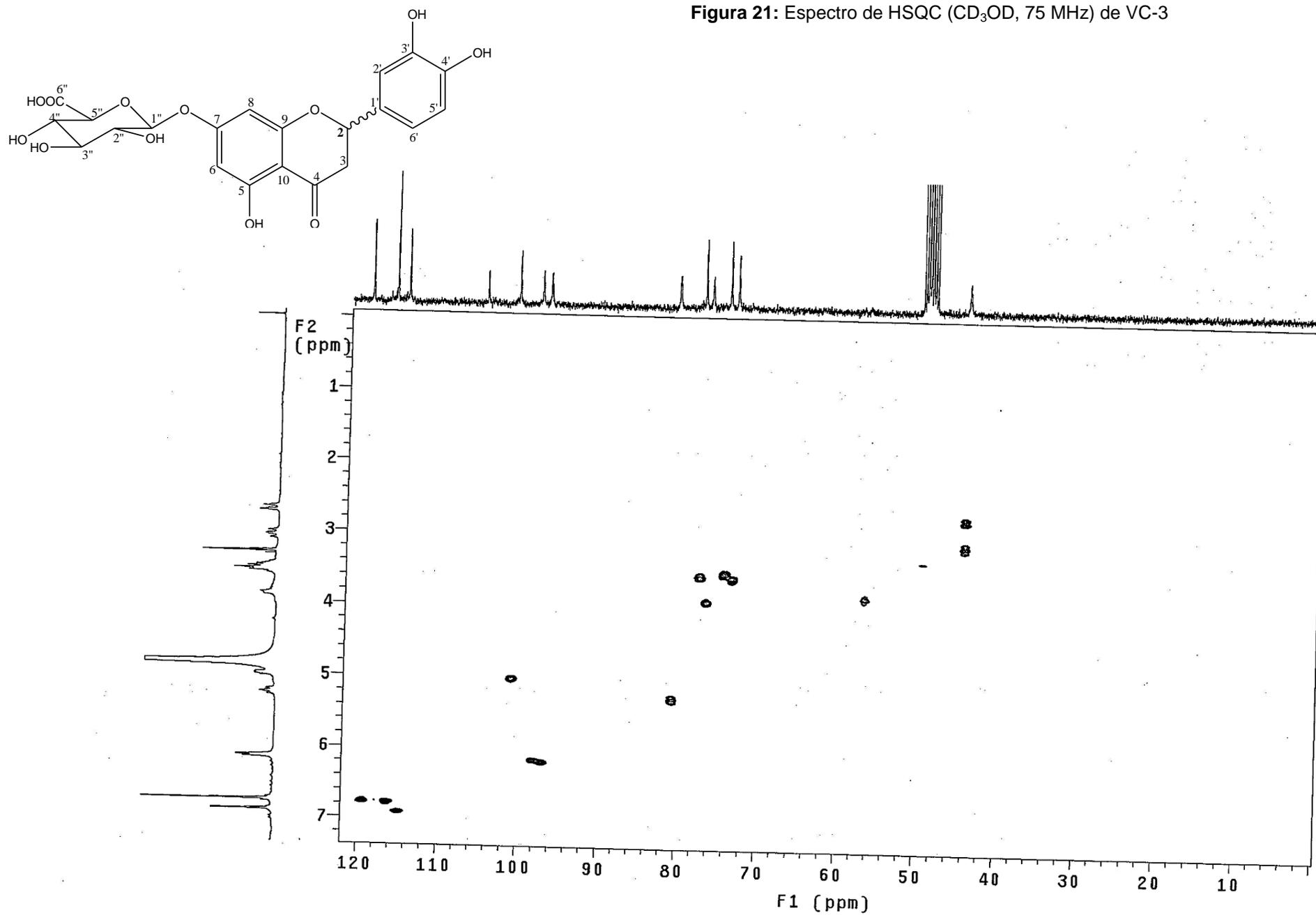
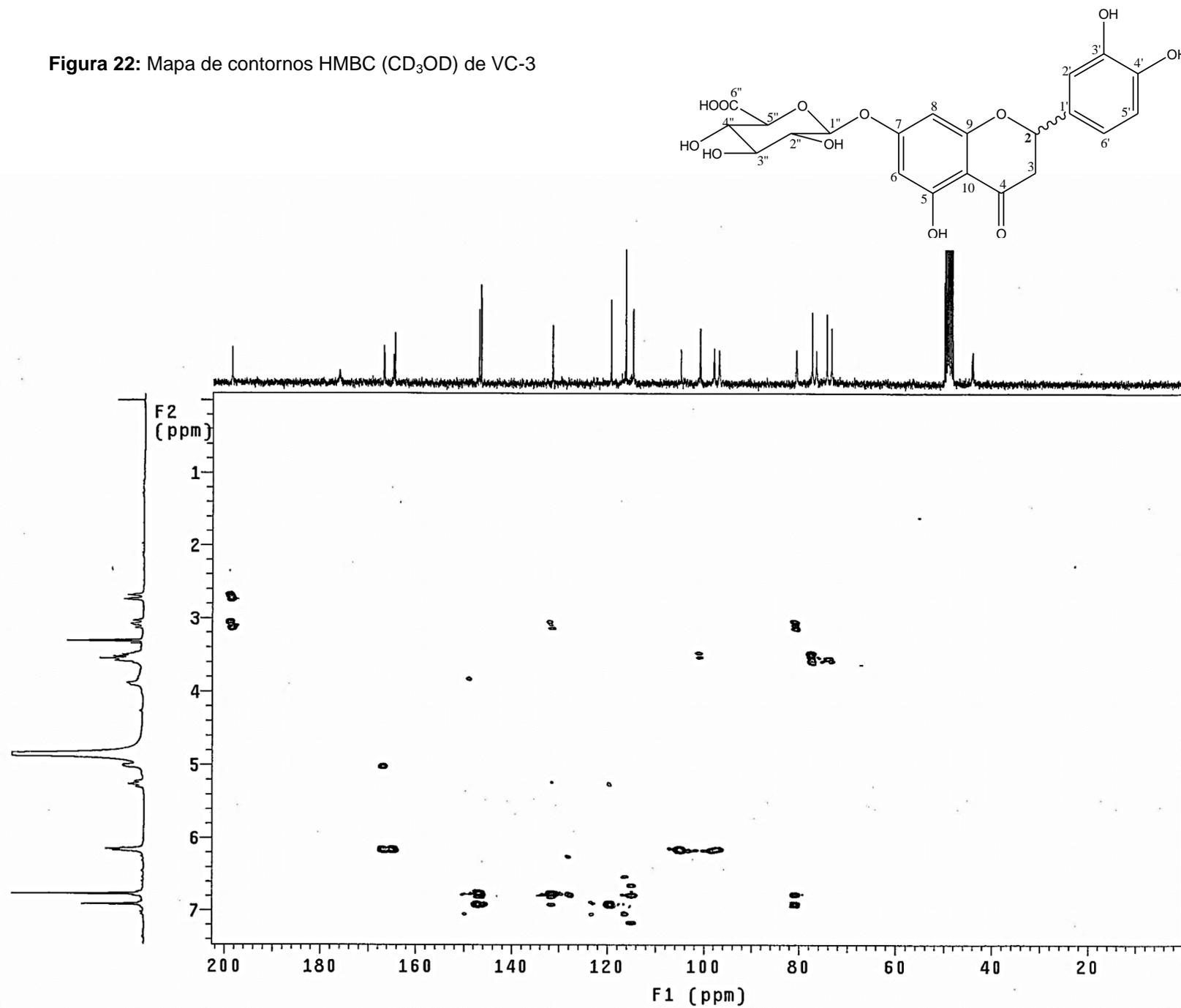
Figura 21: Espectro de HSQC (CD_3OD , 75 MHz) de VC-3

Figura 22: Mapa de contornos HMBC (CD_3OD) de VC-3

A análise do espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 19**), em conjunto com o experimento de DEPT (**Figura 20**) e HSQC (**Figura 21**), evidenciou o esqueleto básico de uma flavanona, pelos sinais relativos aos anéis **A** e **C**, sendo os carbonos do anel **A** observados em δ_{C} 98,0 (C-6), 96,9 (C-8), 164,7(C-5), 166,7(C-7), 164,6(C-9), 104,9 (C-10) e os carbonos do anel **C** em δ_{C} 198,5 (C-4), 80,64 e 80,54 (C-2) 44,1 e 44,0 (C-3). O padrão de substituição do anel **A** foi definido pelos deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos, associados ao valor característico da constante de acoplamento *meta* para os hidrogênios H-6 e H-8. Os sinais adicionais em δ_{C} 114,8 (CH), 116,3 (CH), 119,3 (CH), 131,4 (C), 146,6 (C) e 146,9 (C) correspondem aos carbonos do sistema aromático do anel **B**.

Similarmente ao observado no espectro de RMN ^1H , alguns sinais apareceram duplicados no espectro de RMN ^{13}C , como por exemplo, em δ_{C} 80,64 e 80,54 (C-2) e δ_{C} 44,1 e 44,0 (C-3), confirmando que **VC-3** é uma mistura de duas substâncias, provavelmente contendo o mesmo esqueleto básico.

Adicionalmente, foram observados sinais compatíveis com a presença de uma unidade glicosídica, caracterizada como sendo o glucoronídeo pelos sinais em δ_{C} 176,0, característico de ácido carboxílico (C-6''), em δ_{C} 100,9 (C-1'') de carbono anomérico e na região de δ_{C} 73,3 a 76,5, para CH oximetínicos. O posicionamento da unidade glucoronídica no C-7 foi estabelecida pelo mapa de contornos HMBC (**Figura 22, Tabela 16**) através da correlação do carbono δ_{C} 166,7 (C-7) com o hidrogênio anomérico em δ_{H} 5,00/5,04.

A partir destes dados foi realizada uma revisão da literatura para O-glucuronídeo flavanonas, sendo que os mesmos foram compatíveis com os descritos por CUI. *et al.*, (1990) para a mistura de 2-(S)/2-(R)-eriodictiol-7-O-glucoronídeo (**Figura 23, Tabelas 14 e 15**).

Figura 23. Estrutura do 2-(S)/2-(R)-eriodictiol-7-O-glucoronídeo

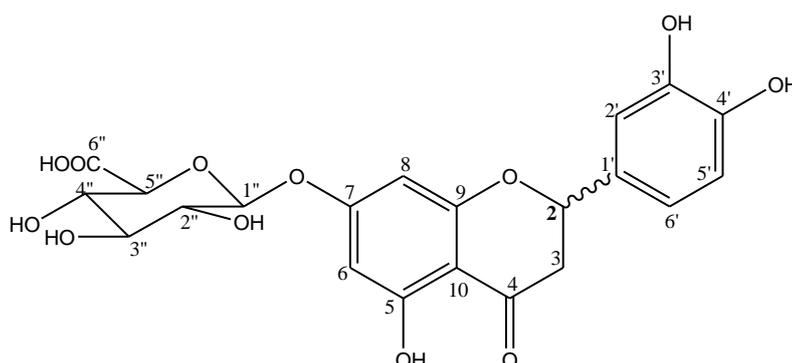
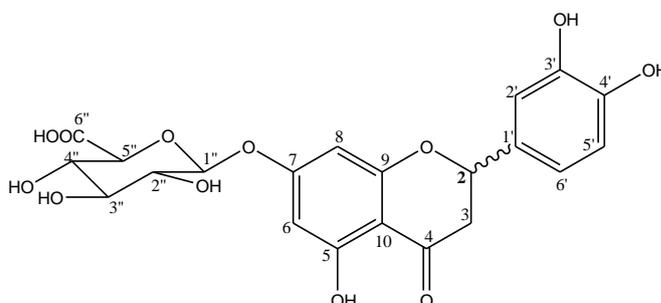


Tabela 14: Dados de RMN de ^1H da mistura VC-3a VC-3b e de 2-(S) e do 2-(R)-eriodictiol-7-O-glucoronideo

(CUI *et al.*, 1990^a e SUN-YUP^b *et al.*, 2012)

	VC-3a	VC-3b	2S ^a	2R ^a	2S ^b	2R ^b
H	δ_{H} (mult., J em Hz)					
2	5,24(dd, 12,3; 2,4)	5,28(dd,12,3; 2,7)	5,27(dd, 12,8;3,1)	5,28(dd, 12,8;3,1)	5,25 (dd, 13,1; 2,5)	5,25 (dd, 13,1; 2,5)
3 _{axial}	3,08(dd,16,8; 13,2)	3,08(dd,16,8; 13,2)	3,09(dd, 17,0;12,8)	3,09(dd, 17,0;12,8).	3,03 (dd, 16,5, 13,1,)	3,03 (dd, 16,5, 13,1)
3 _{eq}	2,72(dd, 17,1;2,7)	2,72(dd, 17,1;2,7)	2,71(dd, 17,0;3,1)	2,71(dd, 3,1)	2,66 (dd, 16,5, 2,5)	2,66 (dd, 16,5, 2,5)
6	6,15(sl)	6,15(sl)	6,16(d, 2,3)	6,16(d, 2,3)	6,08 (s)	6,08 (s)
8	6,17(sl)	6,17(sl)	6,17(d,2,1)	6,17(d, 2,1)	6,10 (s)	6,10 (s)
2'	6,91(sl)	6,91(sl)	6,92(sl)	6,92(sl)	6,83 (s)	6,83 (s)
5'	6,77(s)	6,77(s)	6,78(sl)	6,78(sl)	6,68 (d,8,3)	6,68 (d,8,3)
6'	6,77(s)	6,77(s)	6,78(sl)	6,78(sl)	6,71 (d, 8,3)	6,71 (d, 8,3)
1''	5,00(d;6,6)	5,04(d;6,6)	5,06(d,7,5)	5,07(d,7,5)	4,97 (d, 6,2)	4,97 (d, 6,2)
2''	3,51(m)	3,51(m)	3,51(dd,8,0 ;7,5)	3,51(dd,8,0 ;7,5)	3,38 (m)	3,38 (m)
3''	3,55(m)	3,55(m)	3,53(t, 8,0)	3,53(t, 8,0)	3,38(m)	3,38(m)
4''	3,57(m)	3,57(m)	3,62(dd,9,5 ;8,0)	3,62(dd,9,5 ;8,0)	3,50 (t,8,3)	3,50 (t,8,3)
5''	3,89(d, 9,3)	3,89(d, 9,3)	4,05(d, 9,5)	4,03(d, 9,5)	3,93 (d, 7,6)	3,93 (d, 7,6)



Embora os dados de RMN de **VC-3** (Tabela 25) sejam compatíveis com os relatados por CUI *et al.*, (1990), as multiplicidades observadas para os hidrogênios do anel **B** (simpletos para os H-2', H-5' e H-6') não correspondem às esperadas (duplete com acoplamento *meta* para H-2'; duplete com acoplamento *orto* para H-5' e *dd* com acoplamento *orto-meta* para H-6') para o 2-(S)/2-(R)-eriodictiol-7-O-glucoronideo. Ressalta-se que no trabalho citado foram observadas as mesmas multiplicidades mesmo com o uso de diferentes solventes, tais como DMSO- d_6 , CD₃OD e acetona- d_6 .

Tabela 15: Dados de RMN de ^{13}C da mistura VC-3a VC-3b e de 2-(S)- e do 2-(R)-eriodictiol-7-O-glucoronídeo (CUI *et al.*, 1990 e SUN-YUP *et al.*, 2012)

Posição	VC-3a	VC-3b	CUI <i>et al.</i>		SUN-YUP <i>et al.</i>	
	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}
2	80,64	80,56	81,4	81,3	79,4	79,4
3	44,0	44,1	44,8	44,9	42,8	42,8
4	198,5	198,5	199,3	199,3	197,2	197,2
5	164,7	164,7	165,6	165,6	163,3	163,3
6	98,0	98,0	98,61	98,6	96,7	96,7
7	166,7	166,7	167,1	167,2	163,6	163,6
8	96,9	96,9	97,6	97,7	95,6	95,6
9	164,6	164,6	165,2	165,2	165,6	165,6
10	104,9	104,9	105,1	105,1	103,6	103,6
1'	131,4	131,4	132,1	132,1	131,7	131,7
2'	114,8	114,8	115,5	115,5	113,4	113,4
3'	146,4	146,4	147,1	147,1	145,2	145,2
4'	146,9	146,9	147,6	157,6	145,6	145,6
5'	116,3	116,3	115,6	115,6	114,9	114,9
6'	119,3	119,3	120,1	120,1	117,9	117,9
1''	100,9	100,9	101,64	101,61	99,8	99,8
2''	74,3	74,3	75,0	75,0	73,1	73,1
3''	77,4	77,4	77,8	77,8	75,3	75,3
4''	73,3	73,3	73,6	73,6	72,1	72,1
5''	76,5	76,5	77,2	77,2	76,2	76,2
6''	176,0	176,0	172,8	172,79	170,7	170,7

$^{\text{a}}\text{CD}_3\text{OD}$

Tabela 16: Dados de RMN de ^{13}C e de HMBC da substância VC-3

VC-3		
Posição	^{13}C	HMBC
2a	80,64	-
2b	80,56	-
3a	44,1	-
3b	44,0	-
4	198,5	H-3 _{ax} , H-3 _{eq} , H-6 e H-8
5	164,7	H-8
6	98,0	H-8
7	166,7	H-6, H-8, H-1''
8	96,9	H-6
9	164,6	-
10	104,9	H-6 e H-8
1'	131,4	H-5', H-2', H-3 _{ax} , H-2a e 2b
2'	114,8	H-5'
3'	146,4	H-5'
4'	146,9	H-2'
5'	116,3	-
6'	119,3	H-2' e H-2a e 2b
1''	100,9	H-2''
2''	74,3	H-3''
3''	77,4	H-2'' e H-4''
4''	73,3	-
5''	76,5	-
6''	176,0	H-5''

Em outro trabalho, RING *et al.*, (2007) relatam as mesmas multiplicidades que as descritas por CUI *et al.*, 1990 (simpletos para os H-2', H-5' e H-6') para o 2-(S)/2-(R)-eriodictiol-7-O-glucoronídeo. Por sua vez, SUN-YUP *et al.*, (2012) observaram diferentes multiplicidades para os hidrogênios do anel B desta mesma substância (**Tabela 24**), sendo isto também observado para outras substâncias análogas contendo o esqueleto básico do eriodictiol (PAREJO *et al.*, 2004; KRAFCZYK *et al.*, 2008).

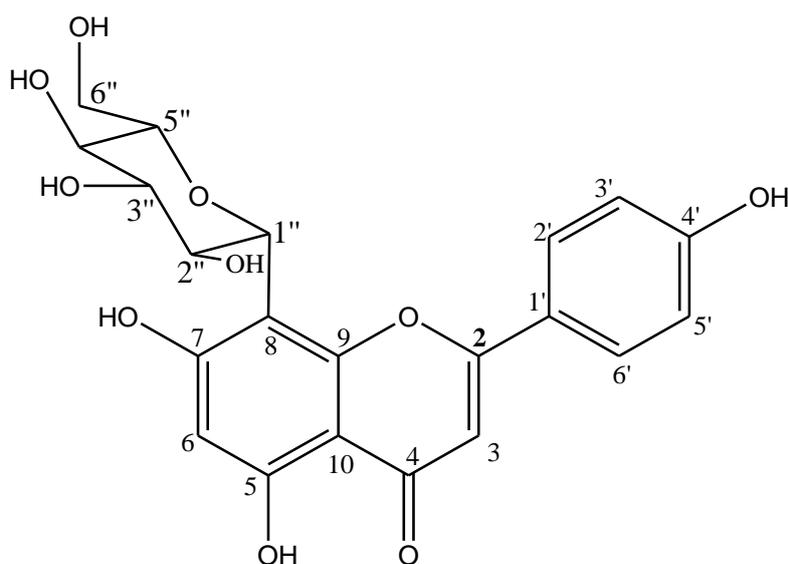
Segundo o descrito na literatura (TOMAS-BARBERAN *et al.*, 2008), flavanonas que ocorrem como produtos naturais tem usualmente configuração 2S, podendo, no entanto, ocorrer isomerização deste estereocentro durante o processo de extração e fracionamento, o que explica a presença da mistura de diastereoisômeros para eriodictiol-7-O-glucoronídeo e outros análogos, como também para o **VC-3**.

4.1.1.5-Substância VC-4

A substância codificada como **VC-4** foi isolada da fração acetato de etila da espécie *Vernonanthura crassa* na forma de cristais amarelos.

A análise do espectro de RMN de ^1H (**Figura 24**) mostrou os sinais em δ_{H} 8,02 (d; H-2' e H-6') e em δ_{H} 6,89 (d; H-3' e H-5'), com integração para 2 hidrogênios cada, característicos de hidrogênios de sistema aromático com padrão de acoplamento *orto* ($J= 8,7$ Hz), além de dois simpletos em δ 6,27 e 6,77, referentes aos hidrogênios H-6 e H-3 (**Tabela 17**). Os sinais dos hidrogênios da unidade glicosídica foram observados na região de δ_{H} 3,00 a 3,60. O simpleto em δ_{H} 13,2, mais desblindado, corresponde a um hidrogênio de hidroxila ligada ao carbono C-5, devido a ligação de hidrogênio desta com o grupo cetona no C-4 (δ_{C} 182,6).

O sinal em δ_{H} 4,68 (dubleto com $J=9,9$ Hz) possui integração para 1H e correlaciona com o carbono em δ_{C} 73,3 ppm, no espectro de HSQC (**Figura 25**). Deslocamentos químicos nesta região são característicos de hidrogênios de C-glicosídeos, sendo o valor da constante de acoplamento de 9,9Hz correspondente a um hidrogênio em posição axial. Os dados de RMN de ^{13}C (**Figura 26**), DEPT (**Figura 27**) e HSQC (**Figura 28**) de **VC-4** indicaram que essa substância trata-se de uma flavona C-glicosilada.



Vitexina

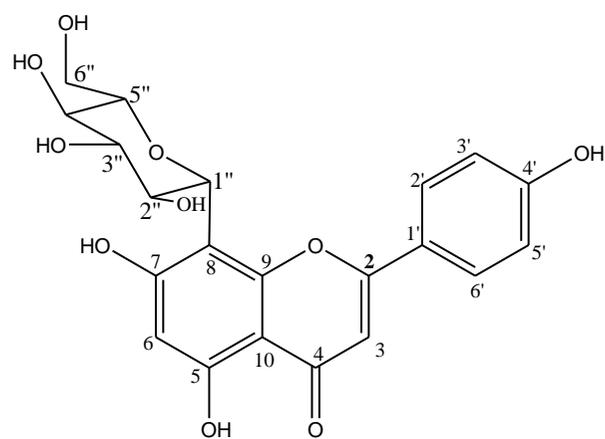
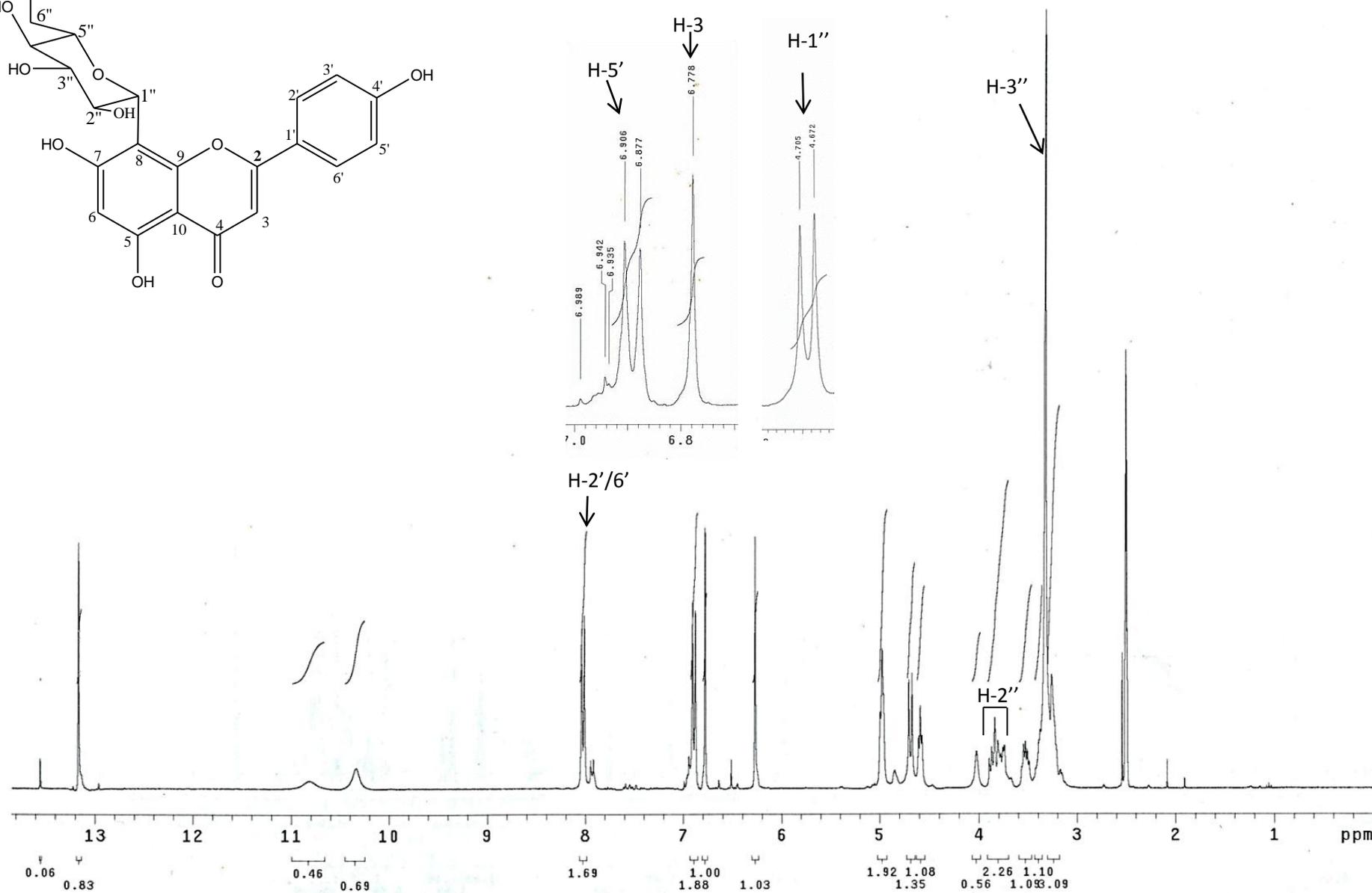


Figura 24: Espectro de RMN de ^1H (DMSO, 300 MHz) de VC-4



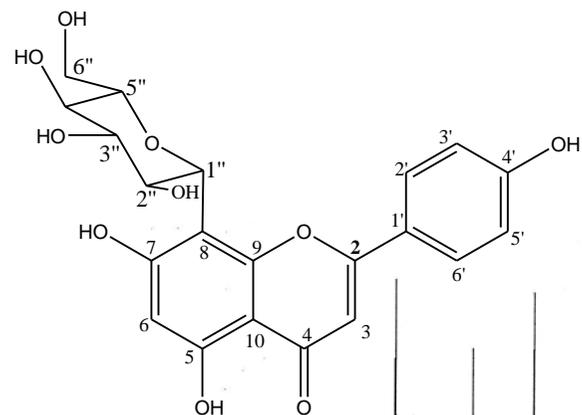


Figura 25: Espectro de HSQC (DMSO 75 MHz) de VC-4

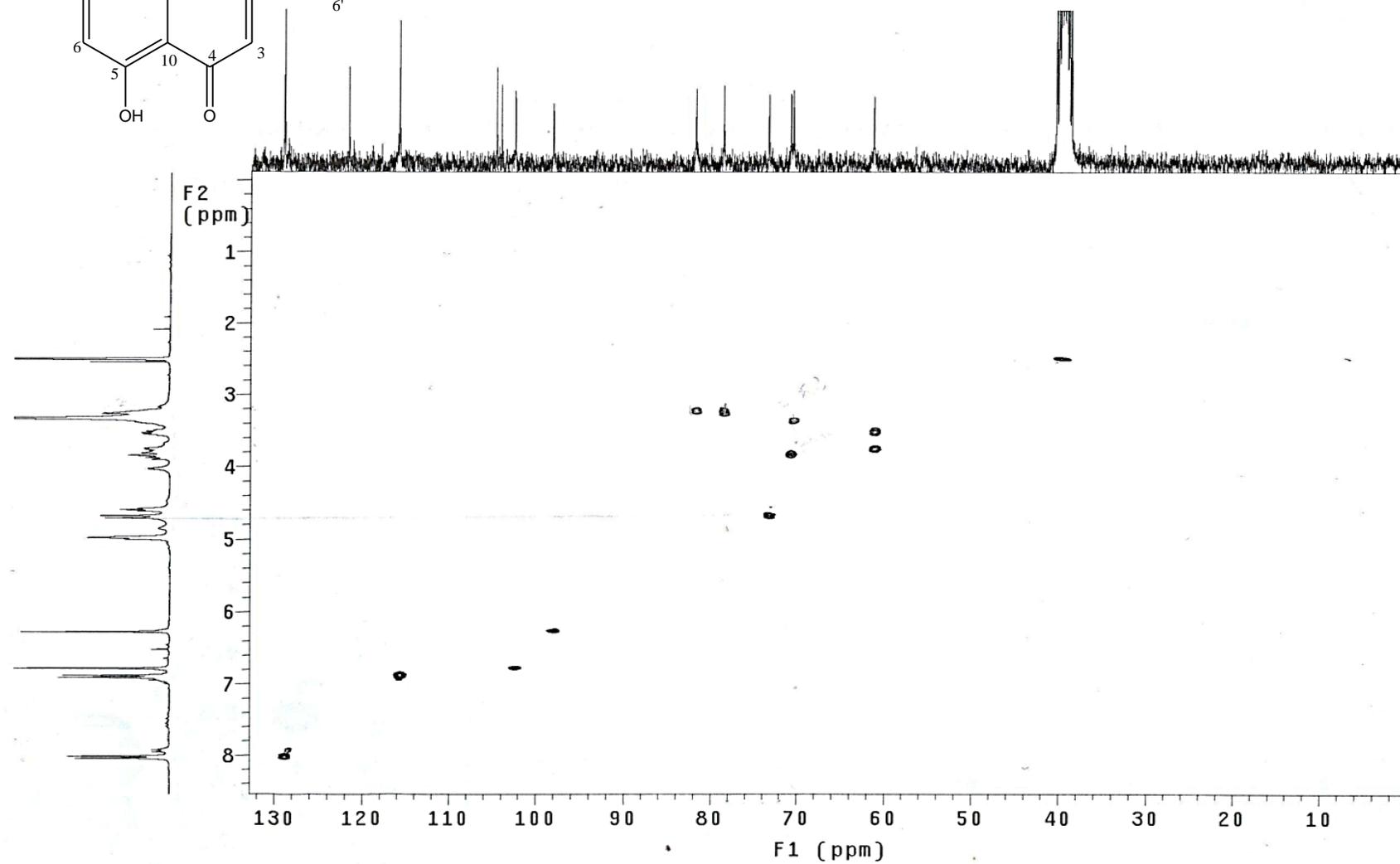


Figura 26: Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO 75 MHz) de VC-4

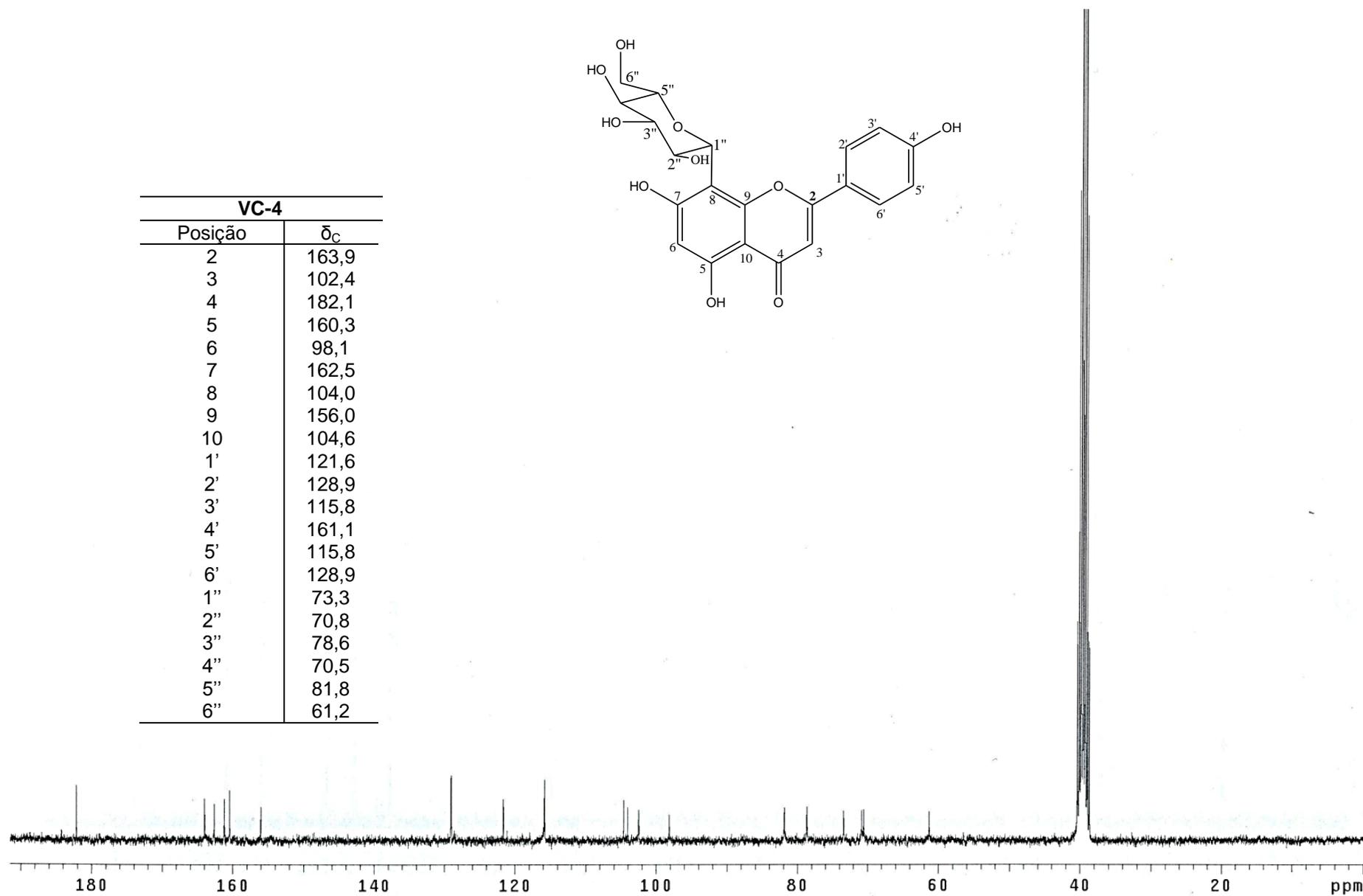
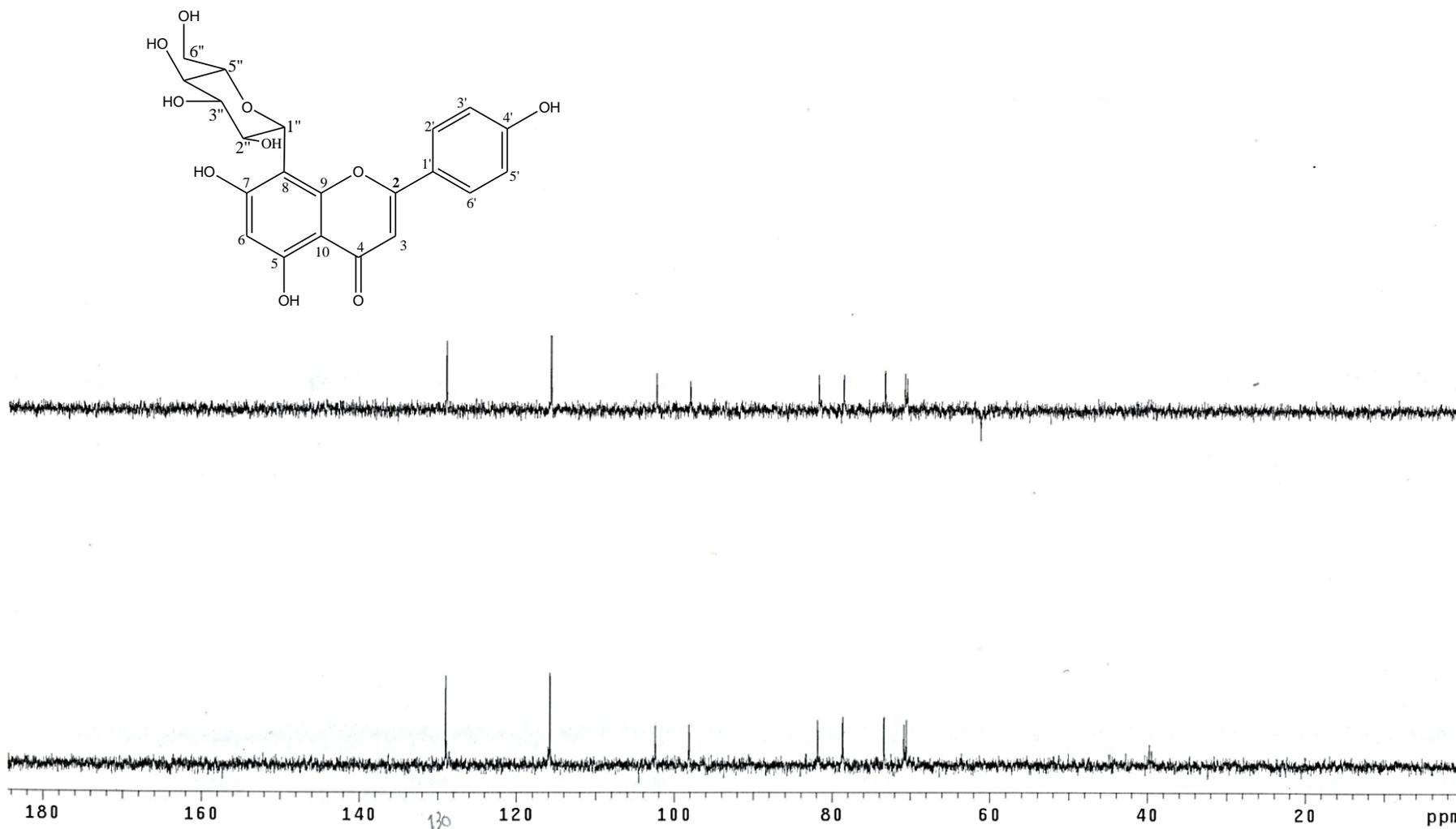


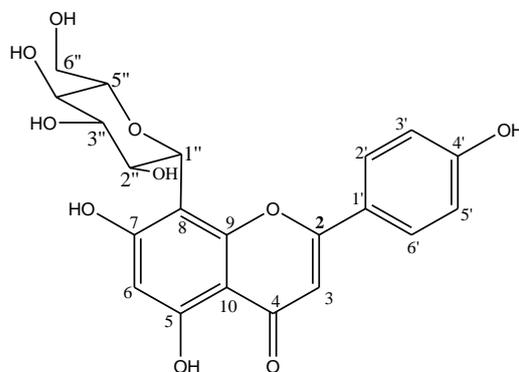
Figura 27: Espectro de DEPT (DMSO 75 MHz) de VC-4

Os sinais dos carbonos não hidrogenados C-4', C-5 e C-7, ligados a grupos hidroxila, foram observados em δ_c 161,1, 160,3 e 162,5, respectivamente. A presença dos sinais de carbonos oximetínicos na região de 70,8 a 81,8 e de um carbono oximetilênico em δ_c 61,2 confirma a presença de uma unidade glicosídica ligada à flavona (Tabela 17)

Tabela 17: Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C da substância VC-4(DMSO) e vitexina. (TANAKA *et al.*, 2005)

Posição	VC-4 ^b		Vitexina	
	δ_{H} (mult., J em Hz)	^{13}C	δ_{H} (mult., J em Hz) ^a	^{13}C ^b
2		163,9		164,4
3	6,77(s)	102,4	6,77 (s)	102,8
4		182,1		182,6
5		160,3		160,9
6	6,27(s)	98,1	6,27 (s)	98,5
7		162,5		163,0
8		104,0		104,4
9		156,0		156,5
10		104,6		105,0
1'		121,6		122,0
2'	8,02(d; 8,7)	128,9	8,02 (d; 8,4)	129,4
3'	6,89(d;8,7)	115,8	6,88 (d; 8,4)	116,2
4'		161,1		161,6
5'	6,89(d;8,7)	115,8	6,88 (d; 8,4)	116,2
6'	8,02(d; 8,7)	128,9	8,02 (d; 8,4)	129,4
1''	4,68(d,9,9)	73,3	4,68 (d; 9,9)	73,7
2''	3,74-3,89(m)	70,8	3,79 (nd)	71,1
3''	3,32(s)	78,6	3,28 (nd)	79,0
4''	3,37(m)	70,5	3,46 (nd)	70,3
5''	3,25(s)	81,8	3,25 (nd)	82,1
6''	3,48-3,54(m)	61,2	3,53 (nd)	61,6

^{a)} CD₃OD e ^{b)} DMSO



Através do mapa de contornos HMBC (**Figura 28**), foi possível estabelecer a posição da unidade glicosídica no C-8, pela correlação do carbono C-8 em δ_c 104,0 com o hidrogênio H-1'' em δ_H 4,68 (**Tabela 18**)

Considerando os dados dos espectros de RMN de 1H , ^{13}C e HSQC, e a comparação com os dados da literatura (TANAKA *et al.*, 2005) determinou-se a estrutura do composto **VC-4** como sendo a da vitexina.

Tabela 18: Dados de RMN de ^{13}C e de HMBC da substância VC-4

VC-1		
Posição	^{13}C	HMBC
2	163,9	H-3
3	102,4	-
4	182,1	H-3
5	160,3	OH-5
6	98,1	-
7	162,5	-
8	104,0	H-1''
9	156,0	H-1''
10	104,6	H-6
1'	121,6	H-3 e H-3'
2'	128,9	H-6'
3'	115,8	H-1''
4'	161,1	-
5'	115,8	-
6'	128,9	-
1''	73,3	-
2''	70,8	-
3''	78,6	-
4''	70,5	-
5''	81,8	-
6''	61,2	-

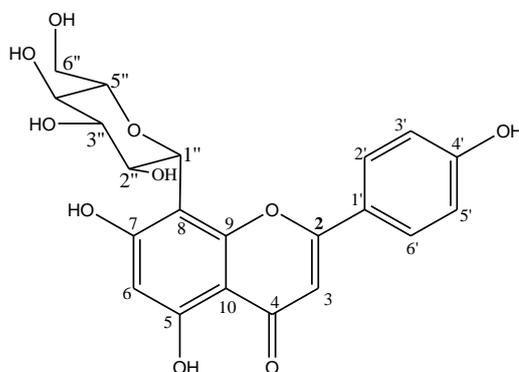
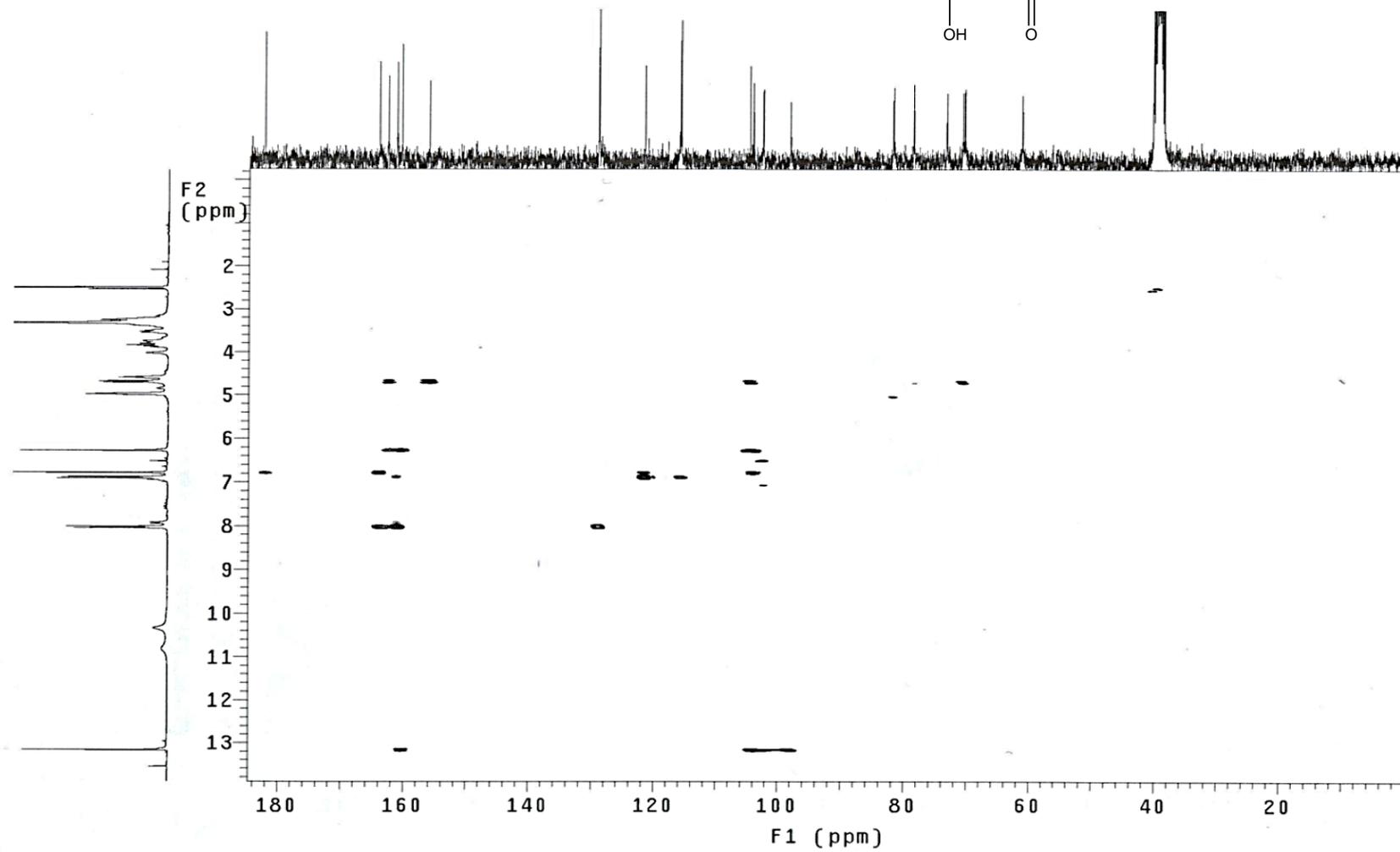
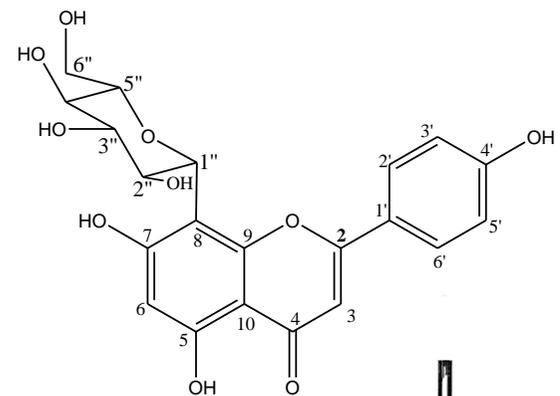


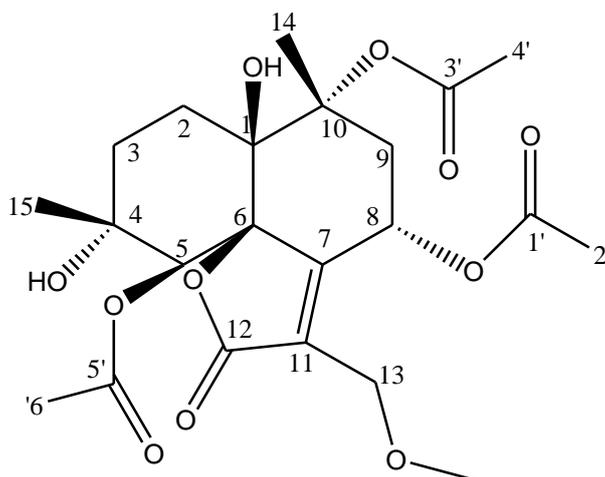
Figura 28: Espectro de HMBC (DMSO 75 MHz) de VC-4

4.1.2- Lactonas Sesquiterpênicas

4.1.2.1 – Substância LI-4

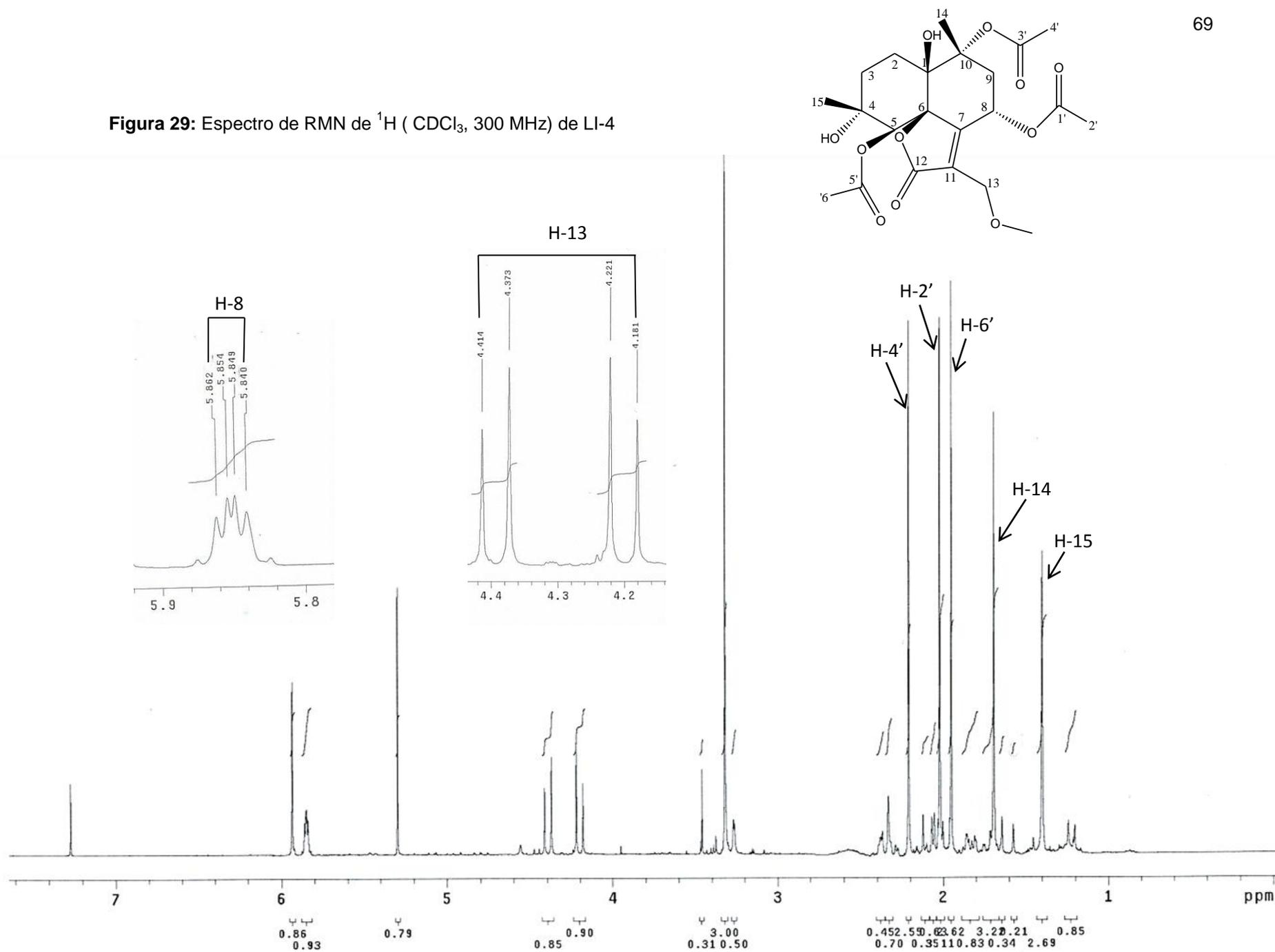
A substância **LI-4** foi isolada da fração diclorometano VI-DC-6.6.3, da espécie *Lessingianthus intermedius*, na forma de óleo e identificada como sendo o 8- α -O-acetil-13-O-metil vernojalcanolídeo através de comparação de seus dados de RMN com os da literatura (JAKUPOVIC *et al.*, 1986 e RAGASA, *et al.*, 2001)

O espectro de RMN ^1H desta substância (**Figura 29**) apresentou dois dupletos em δ_{H} 4,39 e 4,20, com $J = 12,0$ Hz, característicos de hidrogênios diastereotópicos (H-13) ligados a oxigênio, um duplo duplete em δ_{H} 5,85 ($J = 4,0$ e $2,4$ Hz) e um simpleto largo em δ_{H} 5,90, típicos de hidrogênios oximetínicos, atribuídos aos hidrogênios H-8 e H-5, respectivamente. Os simpletos em δ_{H} 1,69, 1,40, 2,02, 2,21, 1,95, sendo os três últimos sinais característicos de metilas de grupos acetatos, foram atribuídos aos hidrogênios H-14, H-15, H-2', H-4', H-6', respectivamente. O sinal em δ_{H} 3,32 corresponde aos hidrogênios da metoxila (**Tabela 19**).



LI-4

Figura 29: Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de LI-4



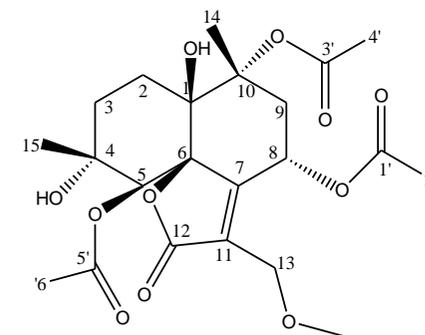
Pela análise do espectro de RMN ^{13}C (**Figura 30**) em conjunto com o espectro de DEPT (**Figura 31**) e HSQC (**Figura 32**) foi possível observar a presença de 22 sinais, sendo aqueles em 129,8(C-11), 171,5(C-12), 157,5(C-7) e 73,4(C-6) característicos do anel lactônico. A presença deste anel associada aos sinais dos demais carbonos (C-1 a C-5 e C-8 a C-10) do sistema decalínico, sendo três carbonos metilênicos em δ_{C} 30,6(C-2), 35,9(C-3) e 34,1(C-9), dois oximetínicos em δ_{C} 76,1 (C-5) e δ_{C} 65,1(C-8) e três carbonos não hidrogenados ligados a oxigênio em δ_{C} 84,5 (C-1), δ_{C} 89,4 (C-4) e δ_{C} 77,0 (C-10), evidenciou que **LI-4** se trata de uma lactona sesquiterpênica pertencente à classe dos cadinanolídeos (**Tabela 20**) (BUSKUHL *et al.*,2010).

Pelo espectro de HSQC foi observada uma correlação entre o sinal em δ_{C} 76,1 com o sinal em δ_{H} 5,90 H-5, sendo este atribuído ao C-5. Pelo espectro de HMBC observou-se uma correlação entre o H-5 com o carbono não hidrogenado em δ_{C} 73,4, atribuído ao C-4 (**Figura 33**). As atribuições dos deslocamentos químicos e posicionamento dos substituintes presentes foram confirmados com auxílio dos dados de HMBC (**Figura 33, Tabela 21**).

A correlação do grupo acetóxi em δ_{C} 171,6 (C-5') com o H-5 (δ_{H} 5,90) confirmou sua posição em C-5. O sinal em δ_{C} 171,5 apresentou correlação no espectro de HMBC com H-13 (δ_{H} 4,39 e 4,20), portanto foi atribuído à carbonila da lactona. (**Tabela 21**)

Os sinais para carbonos não ligados a hidrogênios em δ_{C} 171,6, 170,7 e 169,2 característicos de carbonilas de grupos acetóxi, foram atribuídos aos carbonos C-5', C-1' e C-3', respectivamente (**Tabela 21**), com base nas correlações entre os sinais em δ_{H} 1,95 (H-6'), δ_{H} 2,02 (H-2') e δ_{H} 2,20 (H-4'), respectivamente, as quais permitiram também atribuir os respectivos grupos metilas.

Figura 30: Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75,5MHz) de LI-4



LI-4 ^a	
Posição	δ_{C}
1	77,0
2	30,7
3	35,9
4	73,4
5	76,1
6	89,4
7	157,5
8	65,1
9	34,1
10	84,5
11	129,8
12	171,5
13	63,1
14	19,9
15	23,4
1'	170,7
2'	20,6
3'	169,2
4'	23,1
5'	171,6
6'	21,3
OMe	58,7

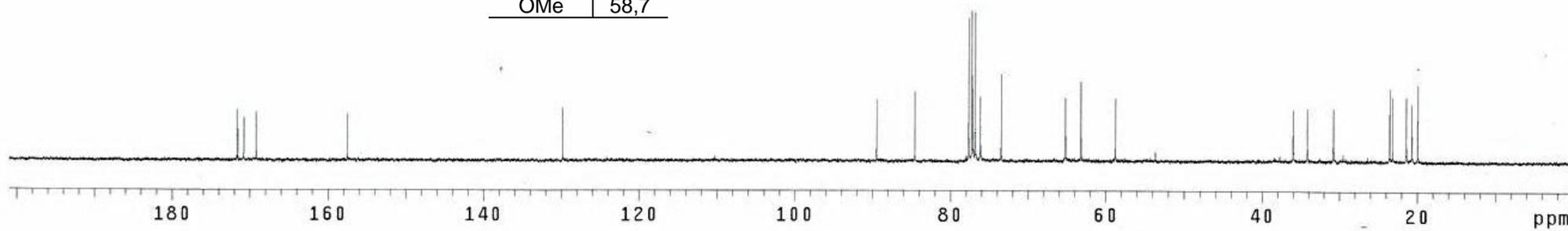
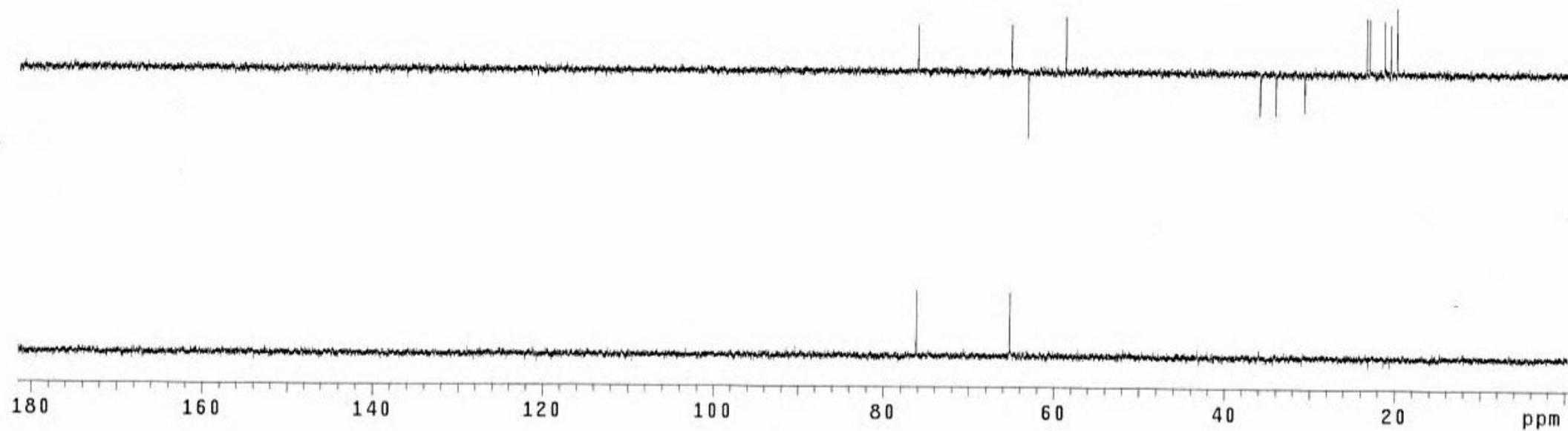
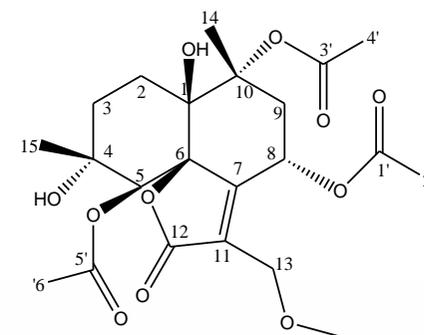


Figura 31: Espectro de DEPT (CDCl_3 , 75,5MHz) de LI-4



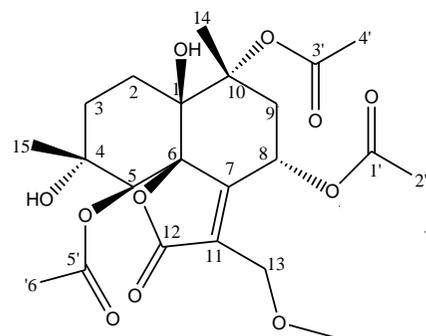
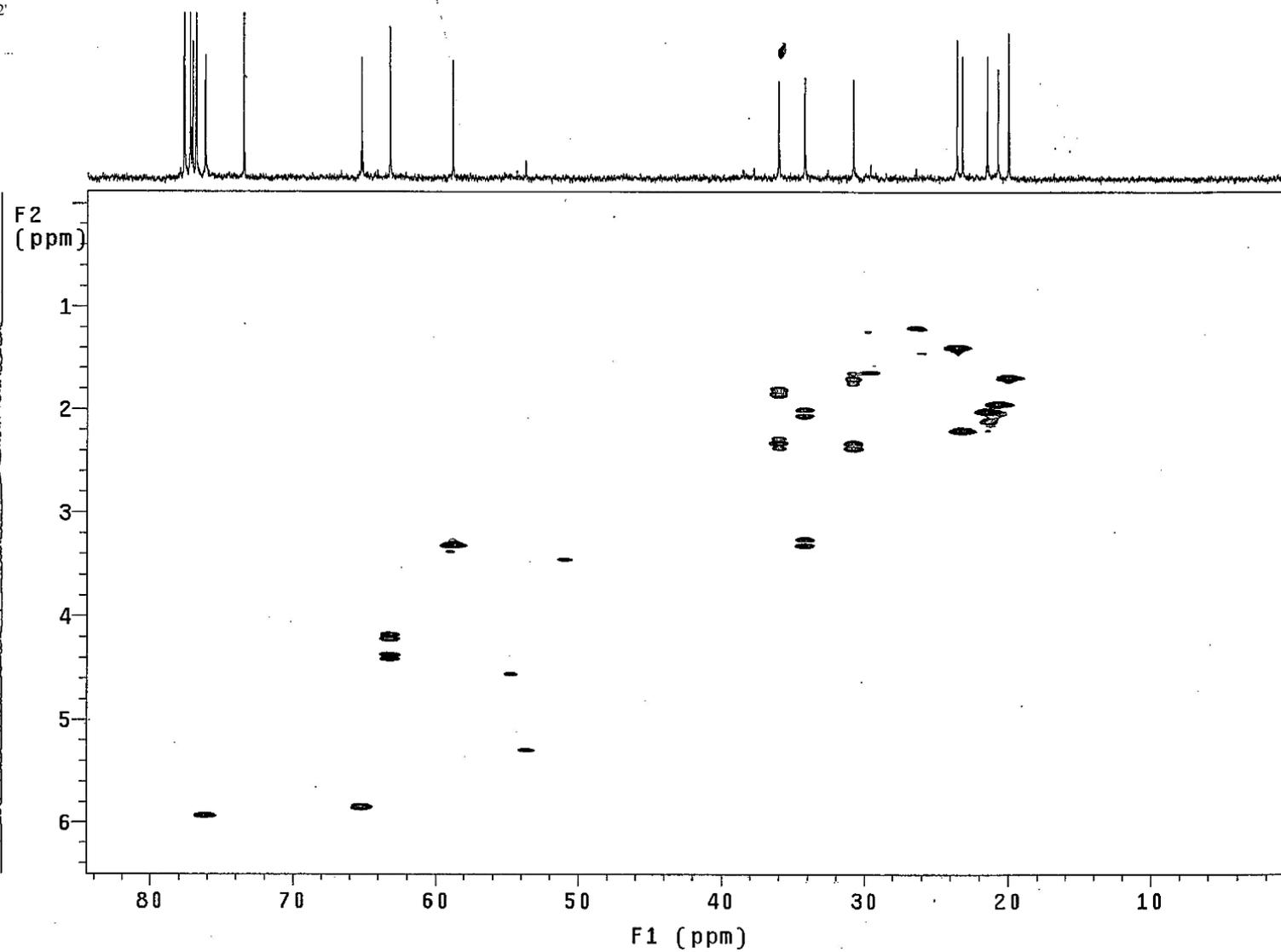


Figura 32: Espectro de HSQC (CDCl_3 , 75,5MHz) de LI-4



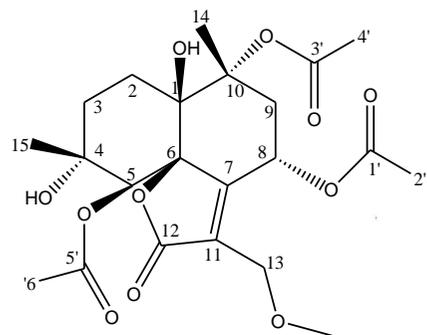


Figura 33: Expansão do espectro de HSQC (CDCl_3 , 75,5MHz) de LI-4

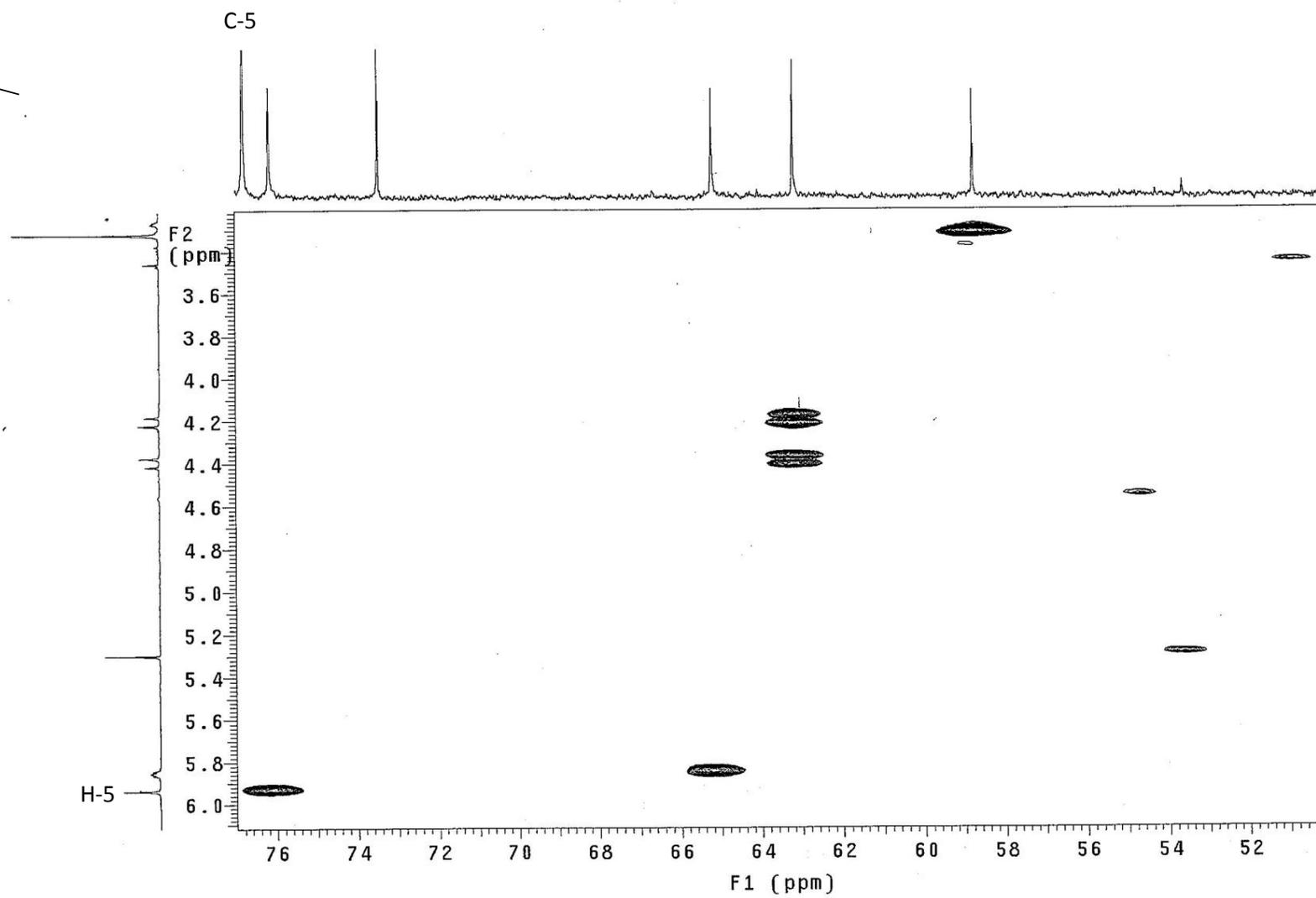


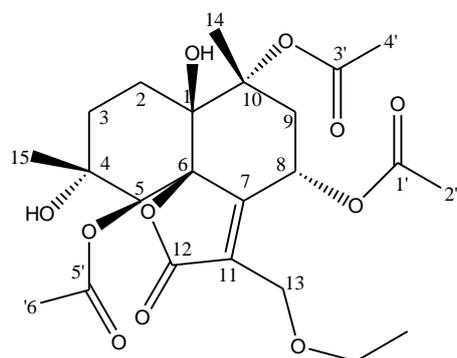
Tabela 19: Dados de RMN de ^1H da substância LI-4 e para o 8-O-acetil-13-O-metil vernojalcanolideo(Jakupovic)^a e 8-O-acetil-13-O-etil vernojalcanolideo (Ragasa)^b

Posição	LI-4 ^a	8-O-acetil-13-O-etil vernojalcanolideo	
	δ_{H} (mult., J em Hz)	δ_{H} (mult., J em Hz) ^a	δ_{H} (mult., J em Hz) ^b
1	-	-	-
2	2,32 (m) 1,71 (m)	2,38(m) 1,67(m)	2,05 (m) 1,45 (m)
3	2,36 (m) 1,82 (m)	2,33(m) 1,86(m)	2,38 (dt, $J=4,5, 14,0$) 1,77 (m)
4	-	-	-
5	5,90 (s)	5,92(s)	6,15 (s)
6	-	-	-
7	-	-	-
8	5,85 (dd, 4,0 e 2,4)	5,87(dd, 4 e 2,0)	6,01 (dd, $J=2,4$ e 4,0)
9 _{eq}	3,26 (dd, 10,6 e 2,1) 2,04 (dd, 10,5 e 3,9)	3,32 (dd, 15 e 4,0) 2,03 (dd, 15 e 4,0)	3,38 (dd, $J=2,4, 16,0$) 2,05 (dd, $J=4,0, 16,0$)
10	-	-	-
11	-	-	-
12	-	-	-
13	4,39 (d, 12) 4,20 (d, 12)	4,41 (d, 11,5) 4,23 (d, 11,5)	4,62 ($J=12,4$) 4,39 ($J=12,4$)
14	1,69 (s)	1,70 (s)	1,66 (s)
15	1,40 (s)	1,40 (s)	1,62 (s)
1'	-	-	-
2'	2,02 (s)	2,03 (s)	1,95
3'	-	-	-
4'	2,21(s)	2,21 (s)	2,09
5'	-	-	-
6'	1,95 (s)	1,97 (s)	1,72
OMe	3,32 (sl)	3,34 (s)	-

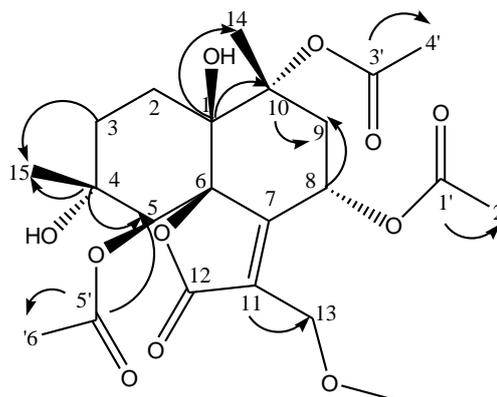
a) CDCl₃ e b) C₆D₆

As diferenças de deslocamentos químicos entre os carbonos C-1 e C-6 de LI-4 com os deslocamentos descritos por JAKUPOVIC *et. al.*, (1986) (**Tabela 20**) levou a uma investigação de que estes valores poderiam estar trocados. Esta hipótese foi confirmada pela análise do mapa de contornos HMBC, onde observou-se uma correlação do carbono em δ_{C} 77,0 com os hidrogênios em δ_{H} 3,26 (H-9) e 1,69 (H-14), sendo este atribuído ao carbono (C-1) e não ao C-6 como atribuído por Jakupovic (1986) No entanto, nenhuma correlação do sinal em δ_{C} 89,4 foi observada.

Ao comparar LI-4 com um análogo contendo o grupo etoxila ao invés da metoxila no C-13, isolado por RAGASA *et. al.*, (2001) foi possível verificar concordância com todos os sinais (Tabelas 19 e 20).



Análogo de LI-4



LI-4

Tabela 20: Dados de RMN de ^{13}C da substância LI-4 e para o 8-O-acetil-13-O-metil vernojalcanolideo (Jakupovic) e Ragasa.

	LI-4 ^a	JAKUPOVIC ^a	RAGASA ^b
C	^{13}C	^{13}C	^{13}C
1	77,0	89,2	76,9
2	30,7	30,6	30,5
3	35,9	35,9	36,3
4	73,4	73,3	73,2
5	76,1	76,1	76,6
6	89,4	76,9	91,5
7	157,5	157,1	157,1
8	65,1	64,9	66,5
9	34,1	34,1	34,1
10	84,5	84,4	84,3
11	129,8	129,7	130,6
12	171,5	168,9	171,3
13	63,1	63,1	61,6
14	19,9	19,1	19,8
15	23,4	23,4	23,7
1'	170,7	171,1	170,1
2'	20,6	20,4	20,9
3'	169,2	170,4	168,5
4'	23,1	22,9	22,7
5'	171,6	171,3	171,3
6'	21,3	21,1	20,0
OMe	58,7	58,5	-

a) CDCl_3 b) CDCl_3
3 6 6

A correlação dos hidrogênios metílicos H-14 (δ_H 1,69) com C-10 (δ_C 84,5) e C-1 (77,0) confirmou a posição do grupo metila em C-10. O carbono C-3 (δ_C 35,9) apresenta uma correlação com os hidrogênios metílicos H-15 confirmando a posição deste grupo metila no C-4.

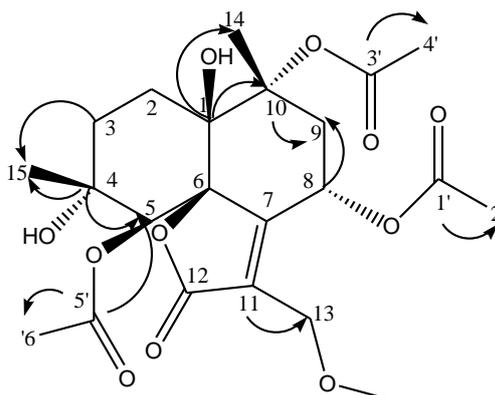


Tabela 21: Dados de RMN de ^{13}C e de HMBC da substância LI-4

LI-4		
Posição	δ_C	HMBC
1	77,0	H-14 e H-9
2	30,7	-
3	35,9	H-15
4	73,4	H-5 e H-15
5	76,1	H-15
6	89,4	-
7	157,5	H-13 _a e H-13 _b
8	65,1	H-9 _{eq}
9	34,1	H-14
10	84,5	H-14 e H-9 _{eq}
11	129,8	H-13 _a e H13 _b
12	171,5	H-13 _a e H13 _b
13	63,1	OCH ₃
14	19,9	-
15	23,4	-
1'	170,7	H-2'
2'	20,6	-
3'	169,2	H-4'
4'	23,1	-
5'	171,6	H-5 e H-6
6'	21,3	-
(OMe)	58,7	-

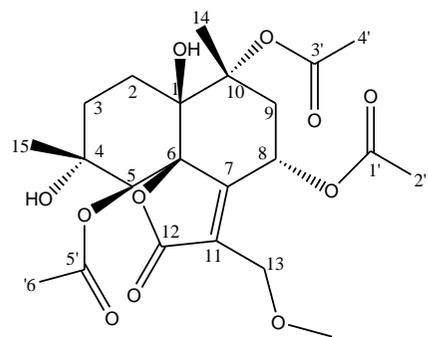
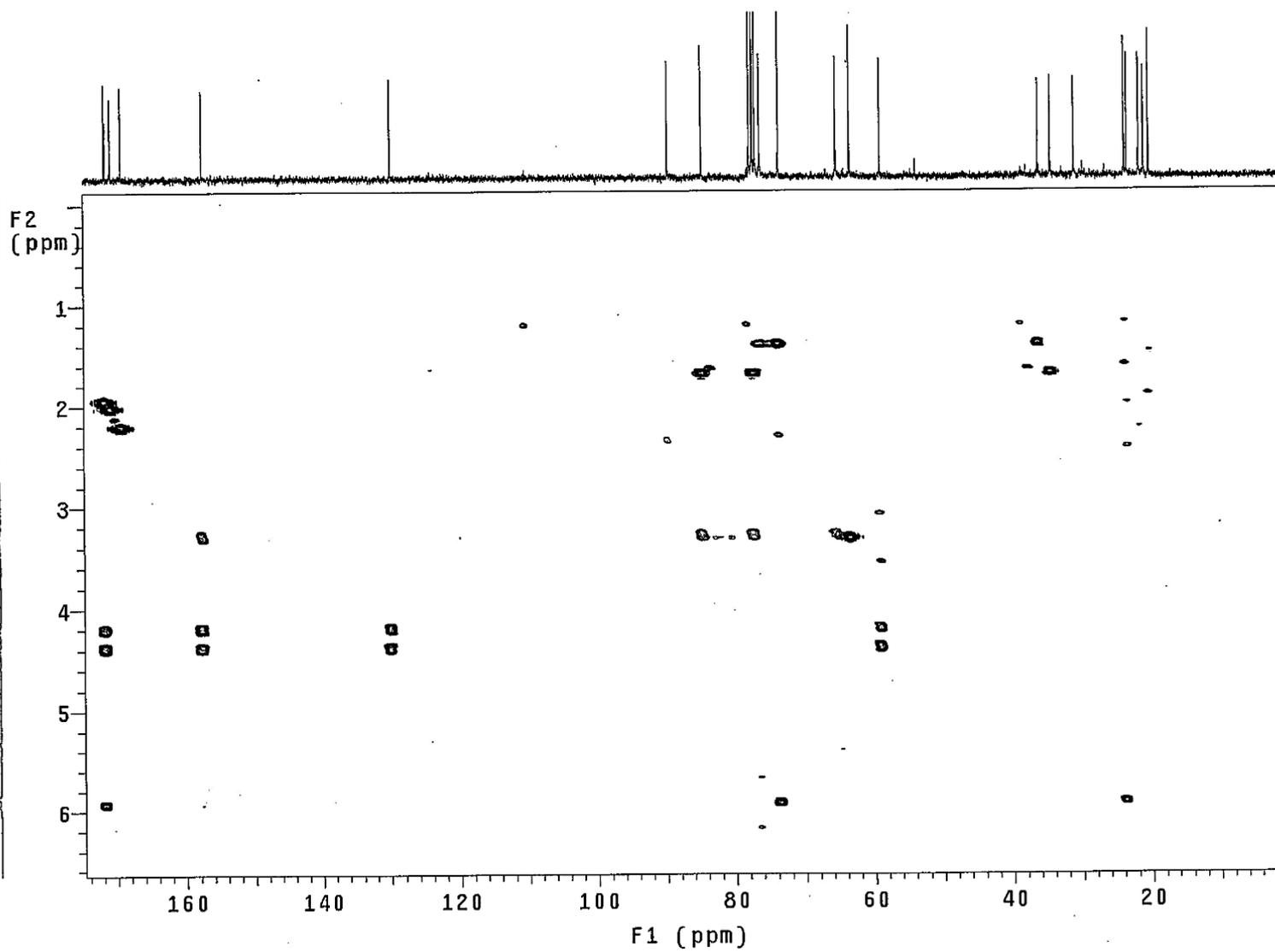
Figura 33: Mapa de contornos HMBC (CDCl_3) de LI-4

Figura 33a: Expansão do espectro de HMBC (CDCl_3) de LI-4

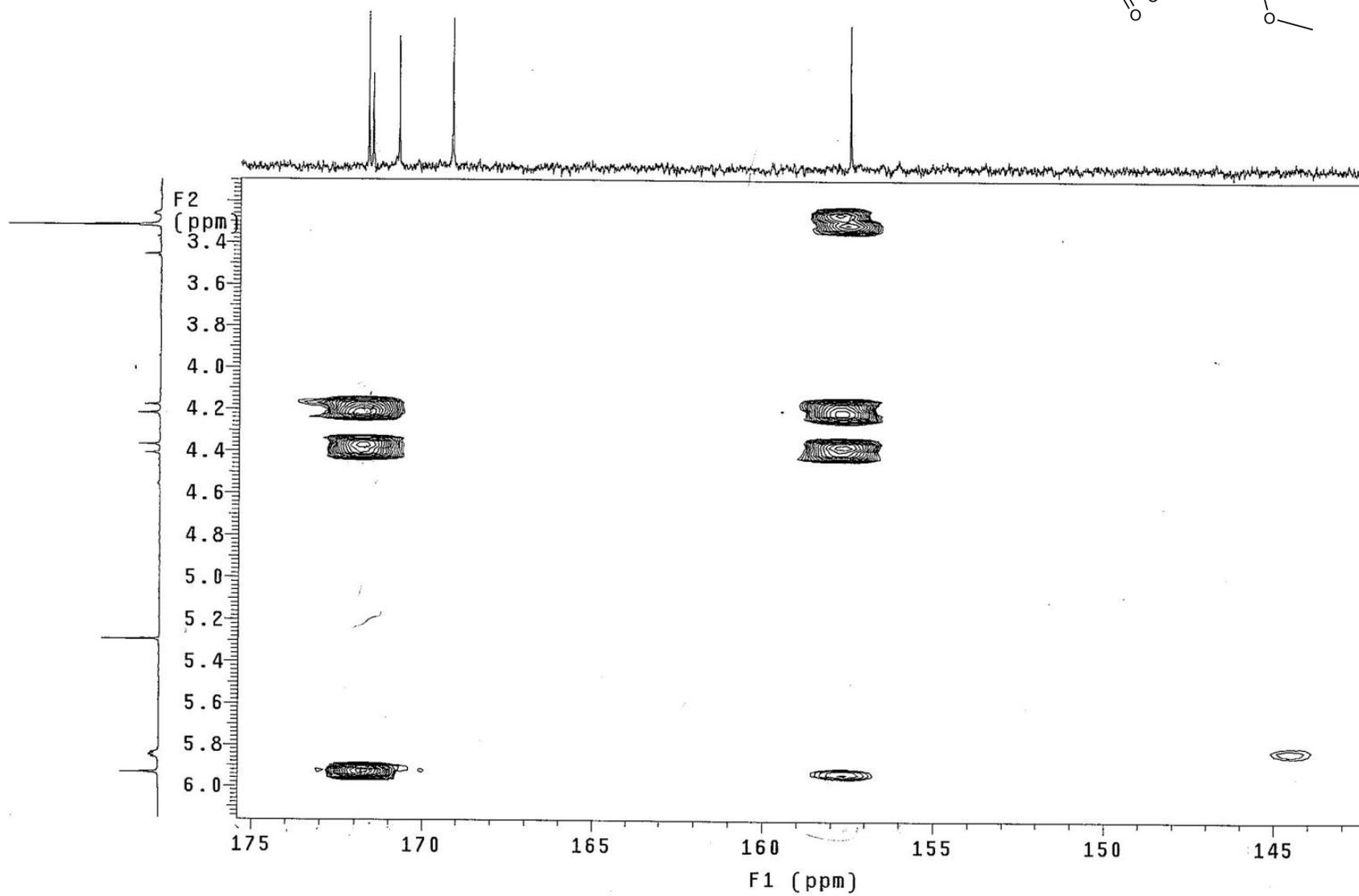
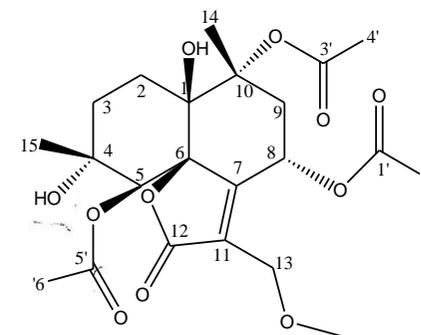
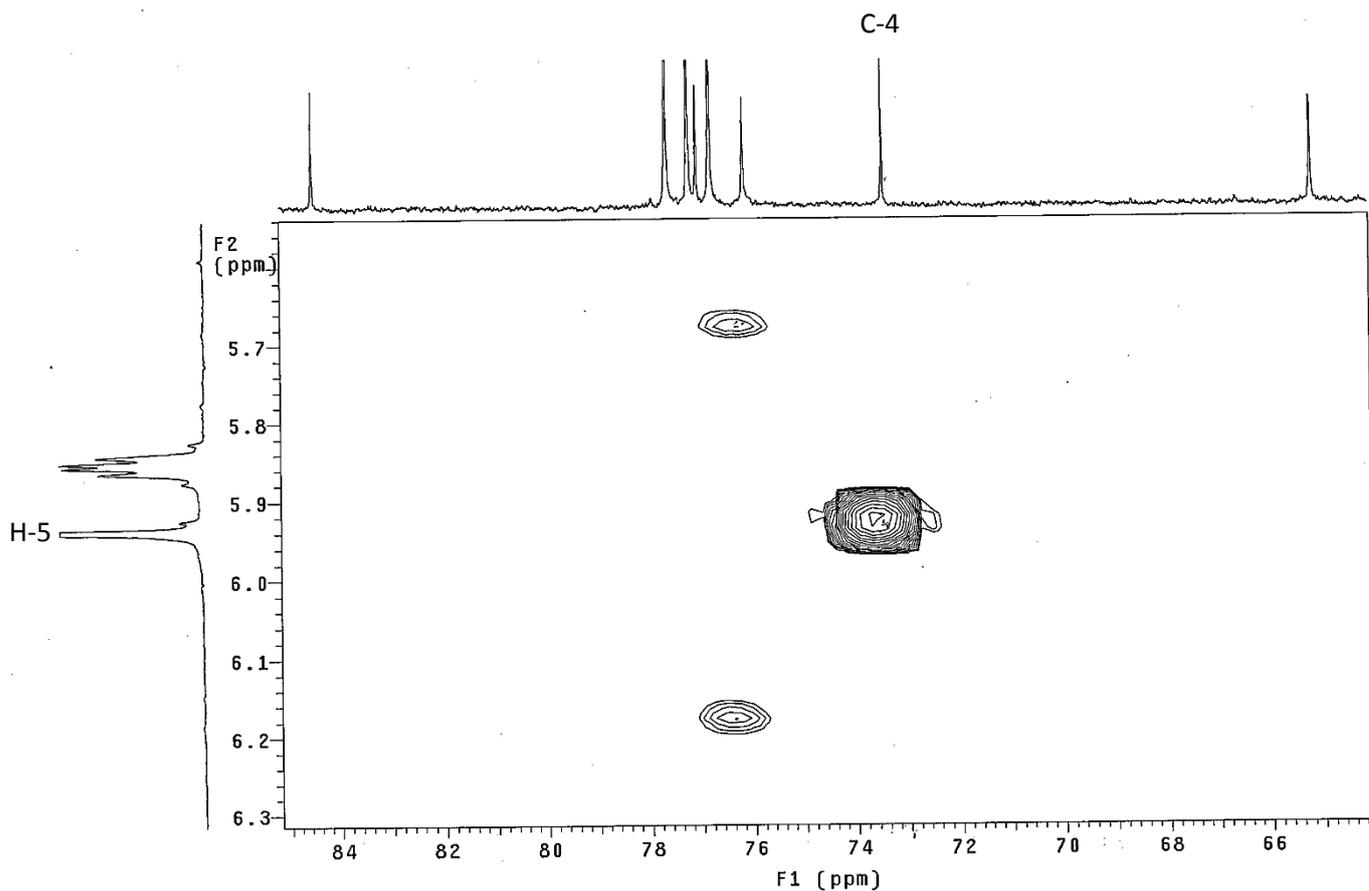
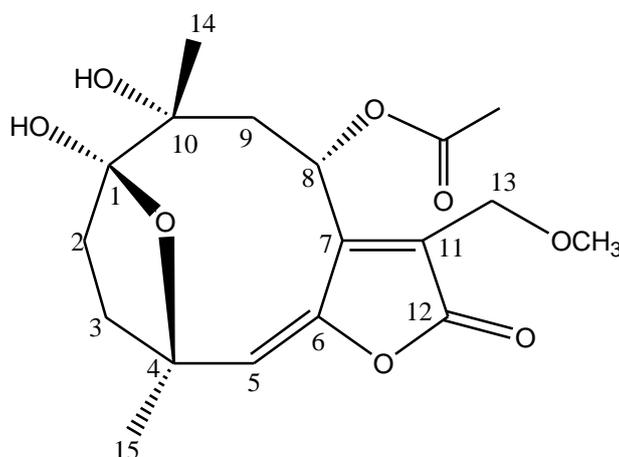


Figura 33b: Expansão do espectro de HMBC (CDCl_3) de LI-4

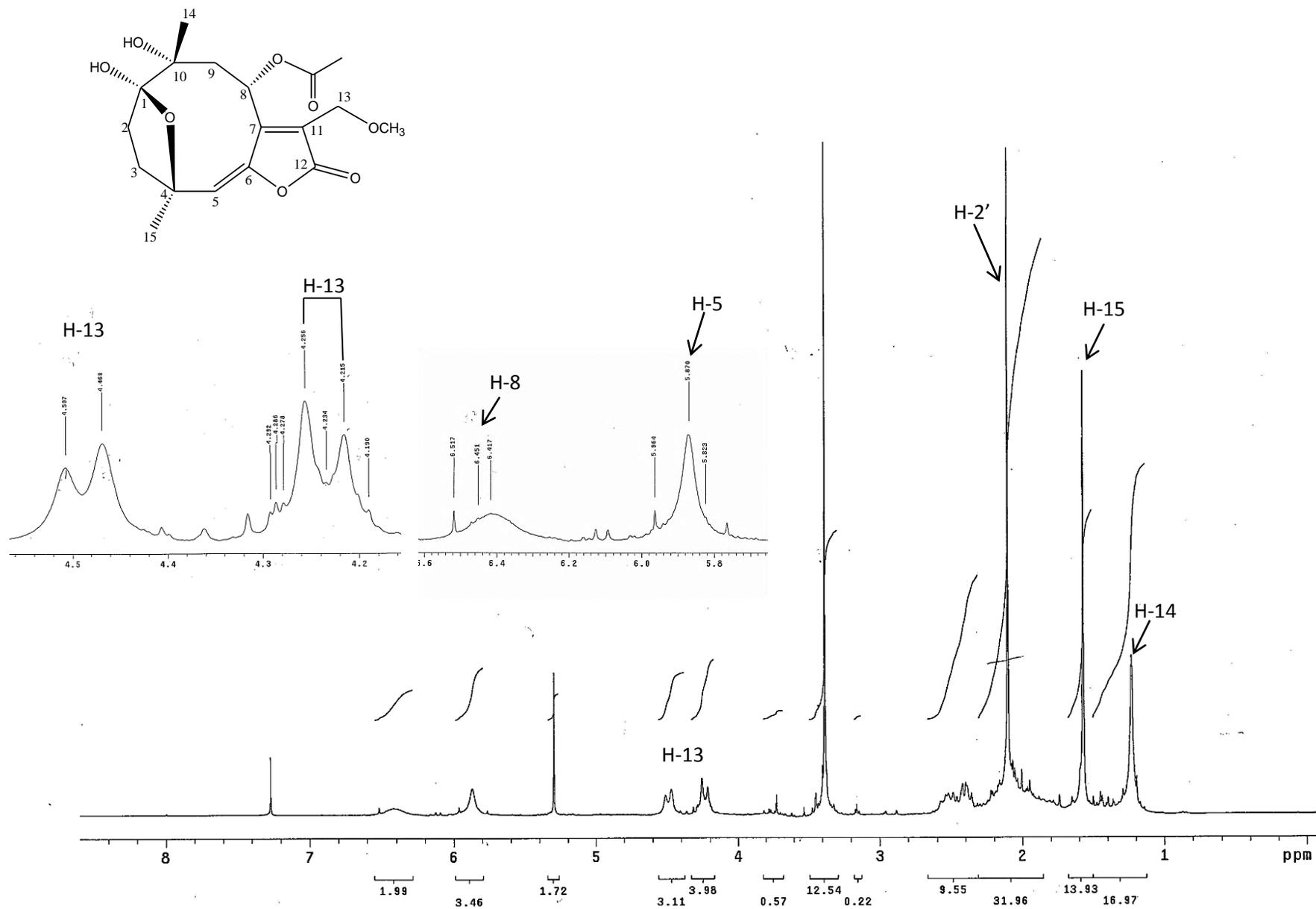


A partir do mapa de contorno COSY (**Figura 34**) observou-se a correlação entre o hidrogênio H-8 (δ_{H} 5,85) com os hidrogênios H-9 equatorial (δ_{H} 3,26) e H-9 axial (δ_{H} 2,04). Os valores encontrados para os J de 2,4 e 4,0 Hz indicam um acoplamento equatorial-equatorial e axial-equatorial entre H-8 e H-9 eq e H-8 e H-9ax, respectivamente. Concluindo que H-8 se encontra na posição equatorial do anel e, portanto o grupo acetoxila se encontra na posição axial.

4.1.2.2 – Substância LI-5.



A substância **LI-5** foi isolada da fração diclorometano VI-DC-6.6.2.3.2 de *Lessingianthus intermedius* como um óleo incolor solúvel em clorofórmio. O espectro de RMN ^1H desta substância (**Figura 35**) apresentou dois simpletos largos desblindados, um de hidrogênio oximetínico em δ_{H} 6,42 e outro de hidrogênio olefínico em δ_{H} 5,87; dois dupletos em δ_{H} 4,48 e 4,23 ($J=12,3$ Hz) característicos de hidrogênios oximetilênicos geminais; dois simpletos em δ_{H} 1,57 e 1,23, característicos de grupos metila; dois simpletos em δ_{H} 2,10 e 3,38, sendo o primeiro de grupo acetoxila e o segundo sinal de hidrogênios de metoxila, além de multipletos na região de δ_{H} 1,80 a 2,60 (**Tabela 22**).

Figura 35: Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300,06 MHz) de LI-5

Os sinais no espectro de RMN ^1H mostraram-se alargados não fornecendo, a princípio, informações conclusivas sobre o tipo de esqueleto presente em **LI-5**. A evidência de lactona sesquiperpênica, contendo o esqueleto hirsutinolídeo, foi baseada principalmente nos dados de RMN ^{13}C (**Figuras 36 e 37**) em conjunto com os experimentos de DEPT (**Figura 38**) e HSQC (**Figura 39**).

Pela análise do espectro de RMN ^{13}C (**Figuras 36 e 37**), em conjunto com os experimentos de DEPT (**Figura 38**) e HSQC (**Figura 39**), foi possível evidenciar a presença de um anel lactônico α,β -insaturado através dos sinais em δ_c 167,8 (C-12), 133,2 (C-11) e 144,1 (C-7), dois carbonos olefínicos em δ_c 125,9 (C-5) e δ_c 150,8 (C-6), um sinal de carbono de hemiacetal em δ_c 108,7 (C-1), de carbono oximetínico de anel 1,4-éter cíclico em δ_c 82,2 (C-4), três carbonos metilênicos em δ_c 38,4 (C-2), 32,0 (C-3) e 38,4 (C-9), sendo estes característicos de hirsutinolídeos. Além destes, observou-se sinais para um grupo acetóxi em δ_c 169,6 (C-1') e 21,3 (C-2'), um grupo metóxi-metilênico em 63,7 (C-13) e para dois grupos metilas em δ_c 29,5 (C-15) e 25,4 (C-14). (**Tabela 22**).

Estes dados em conjunto comparados aos da literatura, apresentados por GAO-SHANG *et al.*, (2012) possibilitaram a elucidação da estrutura da substância **LI-5** como sendo 8 α -acetóxi-10 α -hidróxi-13-O-metil hirsutinolídeo (**Tabela 22**).

BUSKUHL *et al.*, (2010) realizaram experimentos de RMN de ^1H à baixa temperatura (0 $^\circ\text{C}$) com um análogo de VI-5 e obtiveram sinais mais resolvidos, sendo possível a atribuição de todos os sinais presentes no espectro de RMN ^1H .

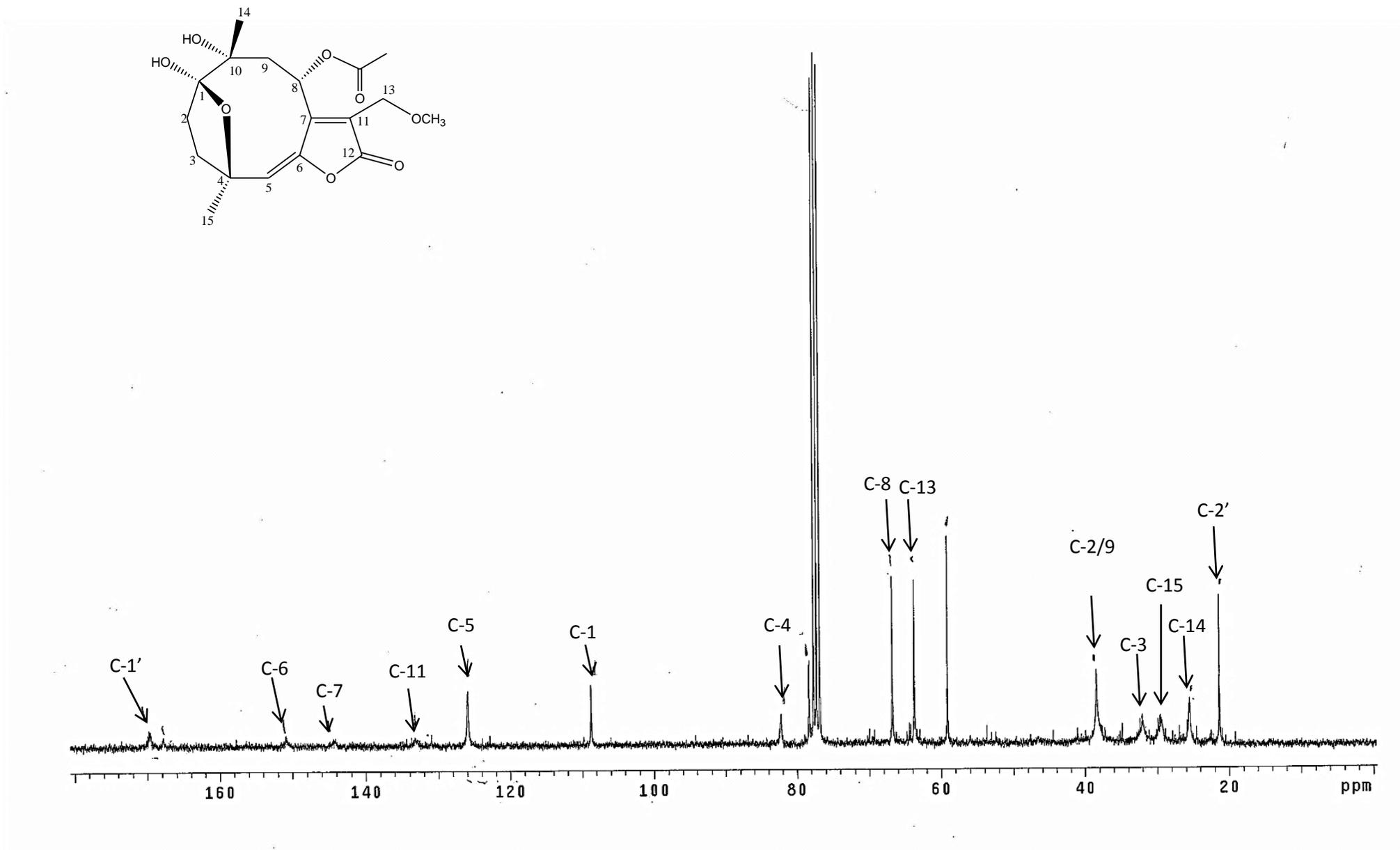
Figura 36: Espectro de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) de LI-5

Figura 37: Expansão do espectro de ^{13}C de LI-5 em CDCl_3

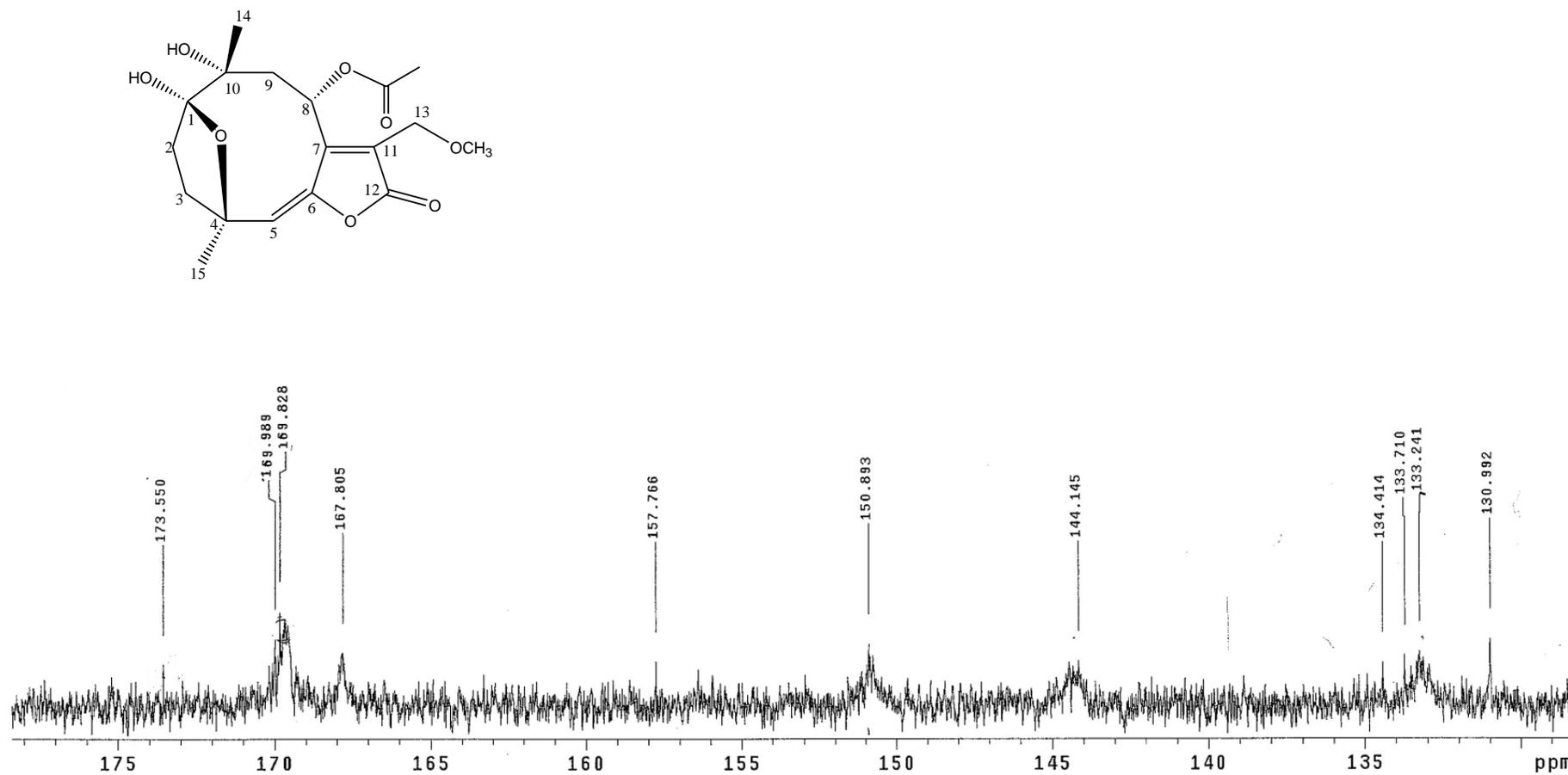
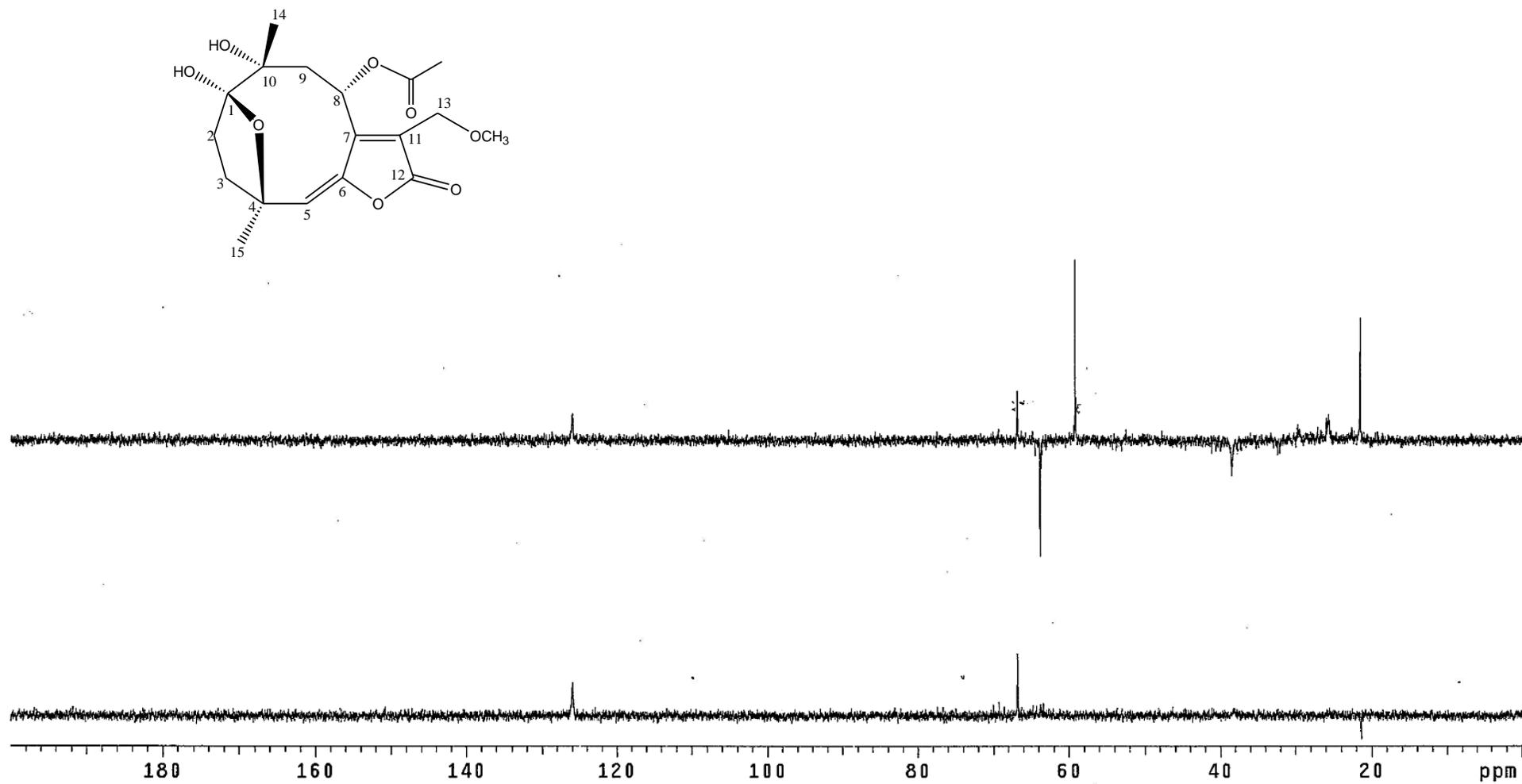


Figura 38: Espectro de DEPT (CDCl_3 , 75,5MHz) de LI-5

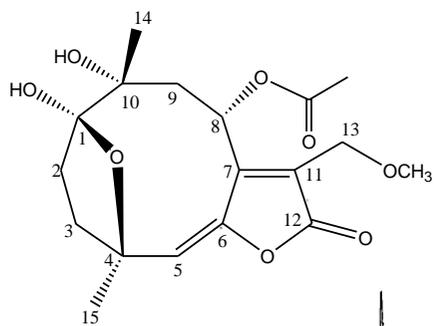


Figura 39: Espectro de HSQC (CDCl₃, 75,5MHz) de LI-5

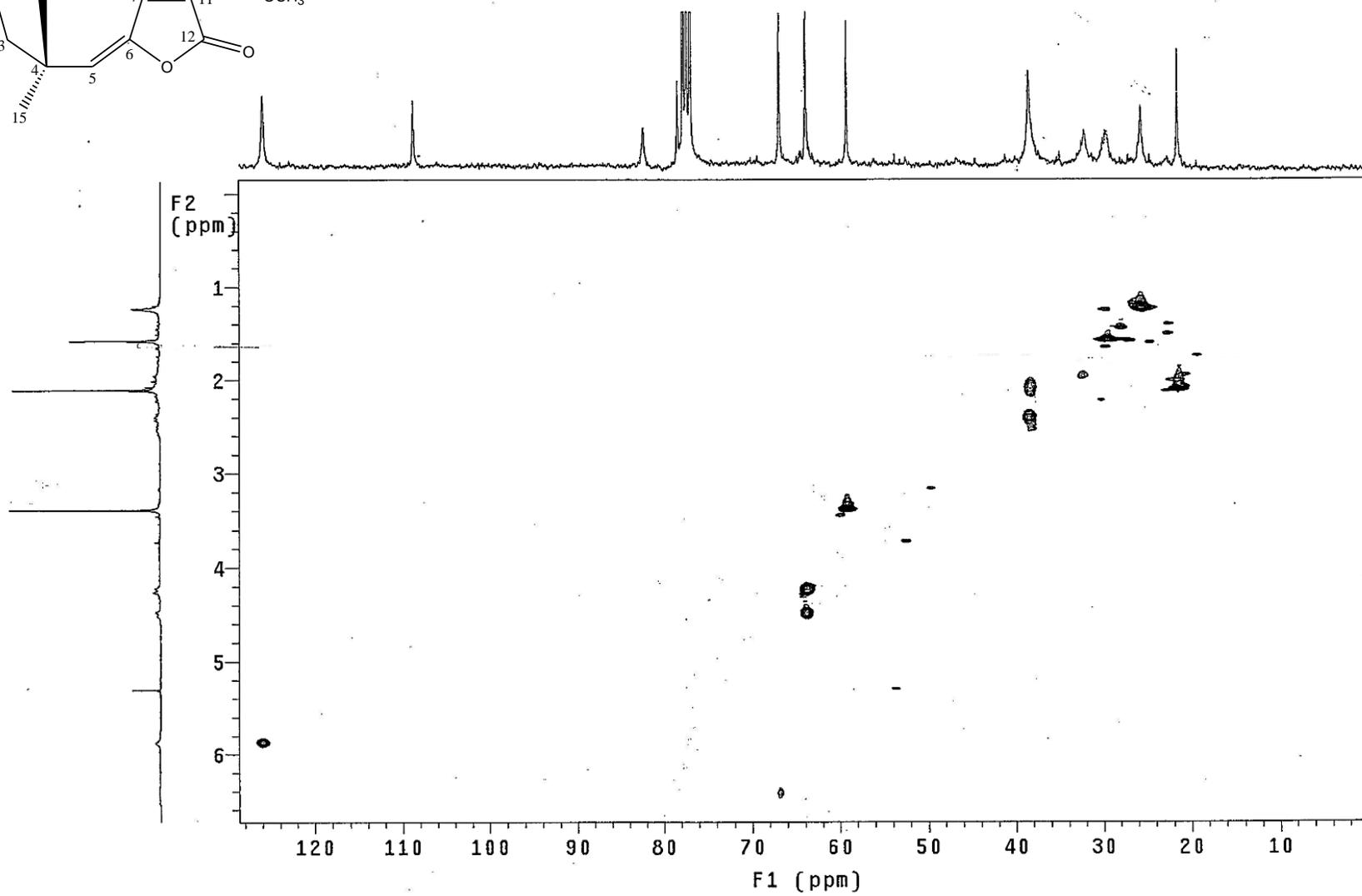


Tabela 22: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância LI-5 e para 8 α -acetóxi-10 α -hidróxi-13-O-metil Hirsutinólídeo

Posição	VI-5 ^a 8 α -acetóxi-10 α -hidróxi-13-O-metil Hirsutinólídeo ^a				
	δ_{H} (mult., J em Hz)	^{13}C	HMBC	δ_{H} (mult., J em Hz)	^{13}C
1	-	108,7			108,5
2	2,40(m) 2,00(m)	38,4		2,40 (dd, 12,0, 11,6) 1,70-1,95 (m)	37,7
3	1,53(m) 1,94(m)	32,0		Não atribuído	31,4
4	-	82,2		-	82,0
5	5,87(sl)	125,9		5,87(sl)	125,8
6	-	150,8		-	150,5
7	-	144,1		-	144,2
8	6,42 (sl)	66,7		6,43 (sl)	66,7
9	1,90 (m) 2,50 (m)	38,4		2,53(m) 2,15(m)	38,1
10	-	78,3		-	76,8
11	-	133,2		-	133,2
12	-	167,8		-	167,7
13	4,23(d,12,3) 4,48(d,11,3)	63,7		4,49(d,11,2) 4,24(d,11,6)	63,4
14	1,23(sl)	25,4	C-9(38,4), C-10 (78,3) e C-1 (108,7)	1,58(sl)	25,14
15	1,57(sl)	29,5	C-2(38,4), C-4(82,2) e C-5(125,9)	1,23(sl)	29,7
1'		169,6		-	169,5
2'	2,10(sl)	21,3	C-1'(169,6)	2,11(sl)	21,1
OMe	3,38(sl)	59,0	C-13(63,7)	3,39(sl)	59,0

^a(CDCl₃)

As correlações observadas no espectro de HMBC (**Figuras 40, 41, 42, 43 e Tabela 23**) forneceram as atribuições dos deslocamentos químicos e o posicionamento dos substituintes ligados aos C-10 (δ_c 78,3) e C-4 (δ_c 82,2) através da correlação dos hidrogênios metílicos H-14 (δ_H 1,23) com C-9 (δ_c 38,4), C-10 (δ_c 78,3) e C-1 (δ_c 108,7), e dos hidrogênios metílicos H-15 (δ_H 1,57) com C-2 (δ_c 38,4), C-4 (δ_c 82,2) e C-5 (δ_c 125,9). Na literatura a atribuição destes grupos metilas se encontram invertidas. Essas correlações confirmam também a conectividade do anel éter cíclico aos C-1 e C-4, característicos dos hirsutinolídeos.

A atribuição da posição do grupo metila δ_H em 2,10 foi realizada através de sua correlação com C-1' (δ_c 169,6), confirmando sua relação com o grupo acetato.

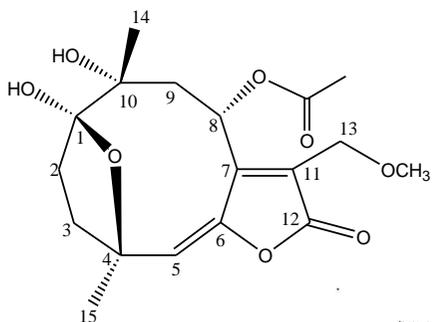
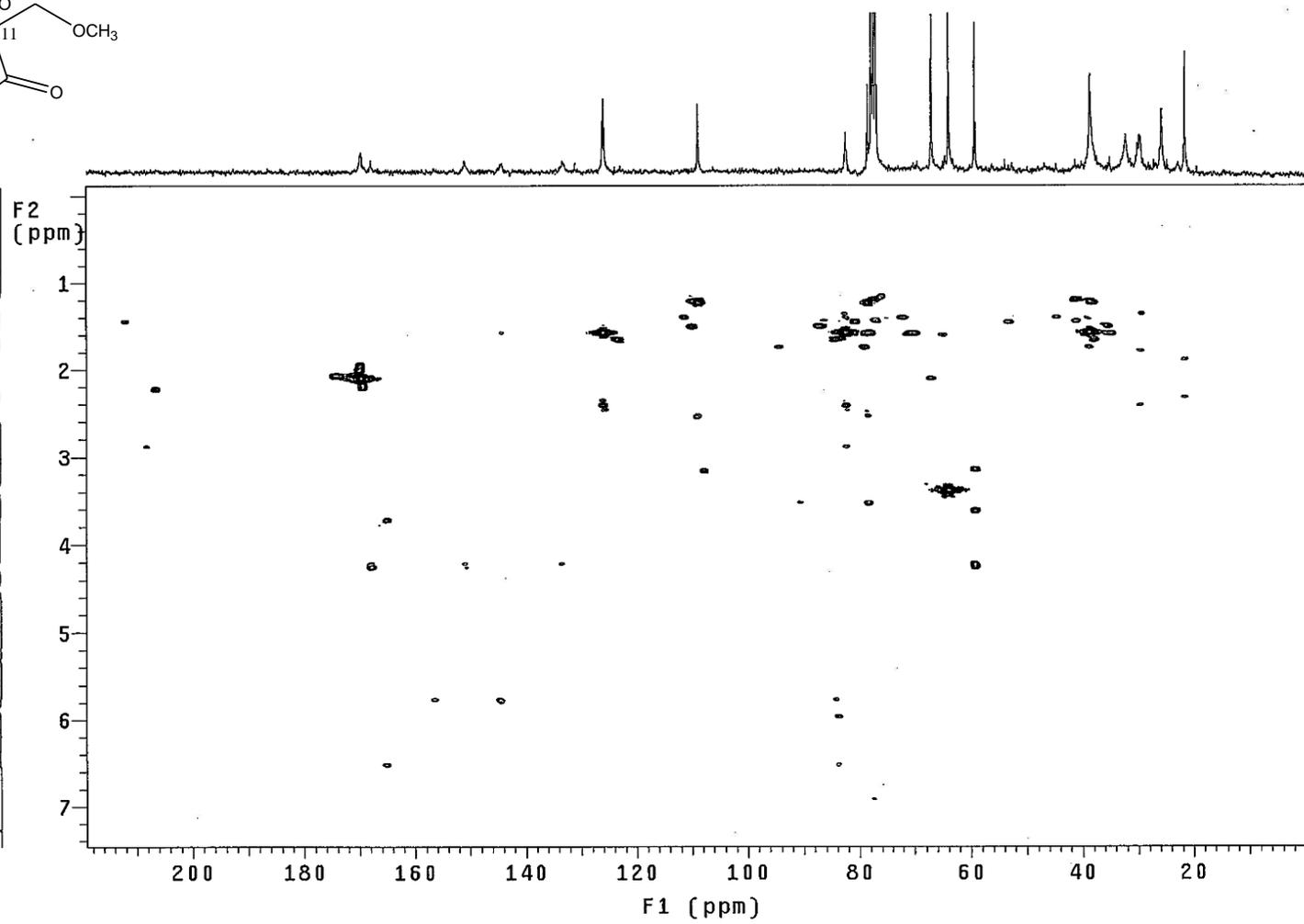


Figura 40: Espectro de HMBC (CDCl₃, 75,5MHz) de LI-5



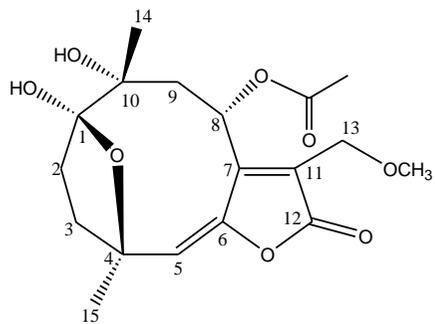
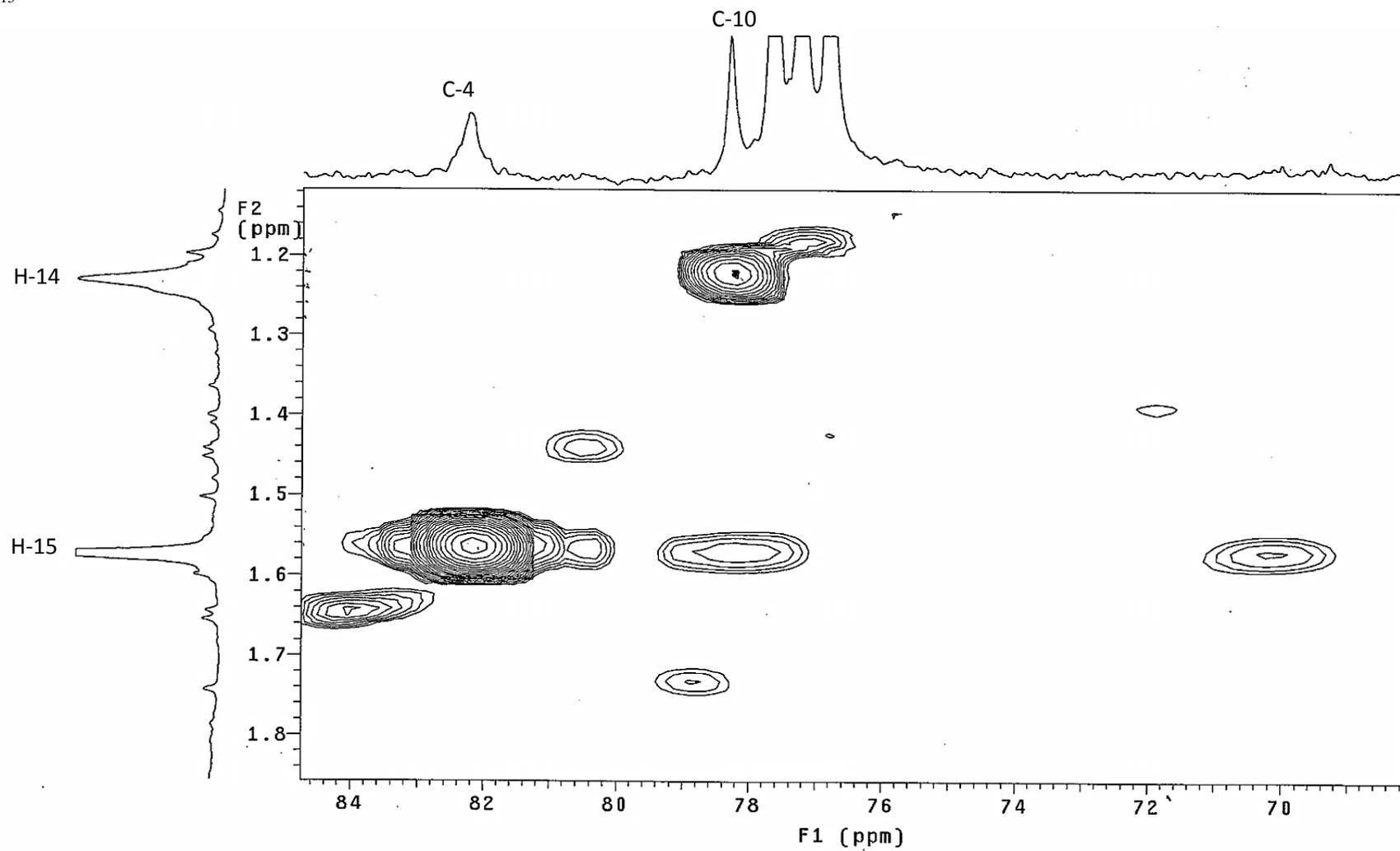


Figura 41: Expansão do espectro de HMBC (CDCl_3 , 75,5MHz de LI-5)



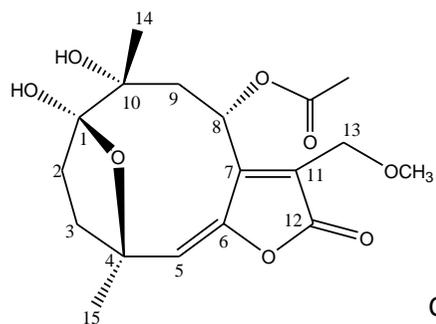
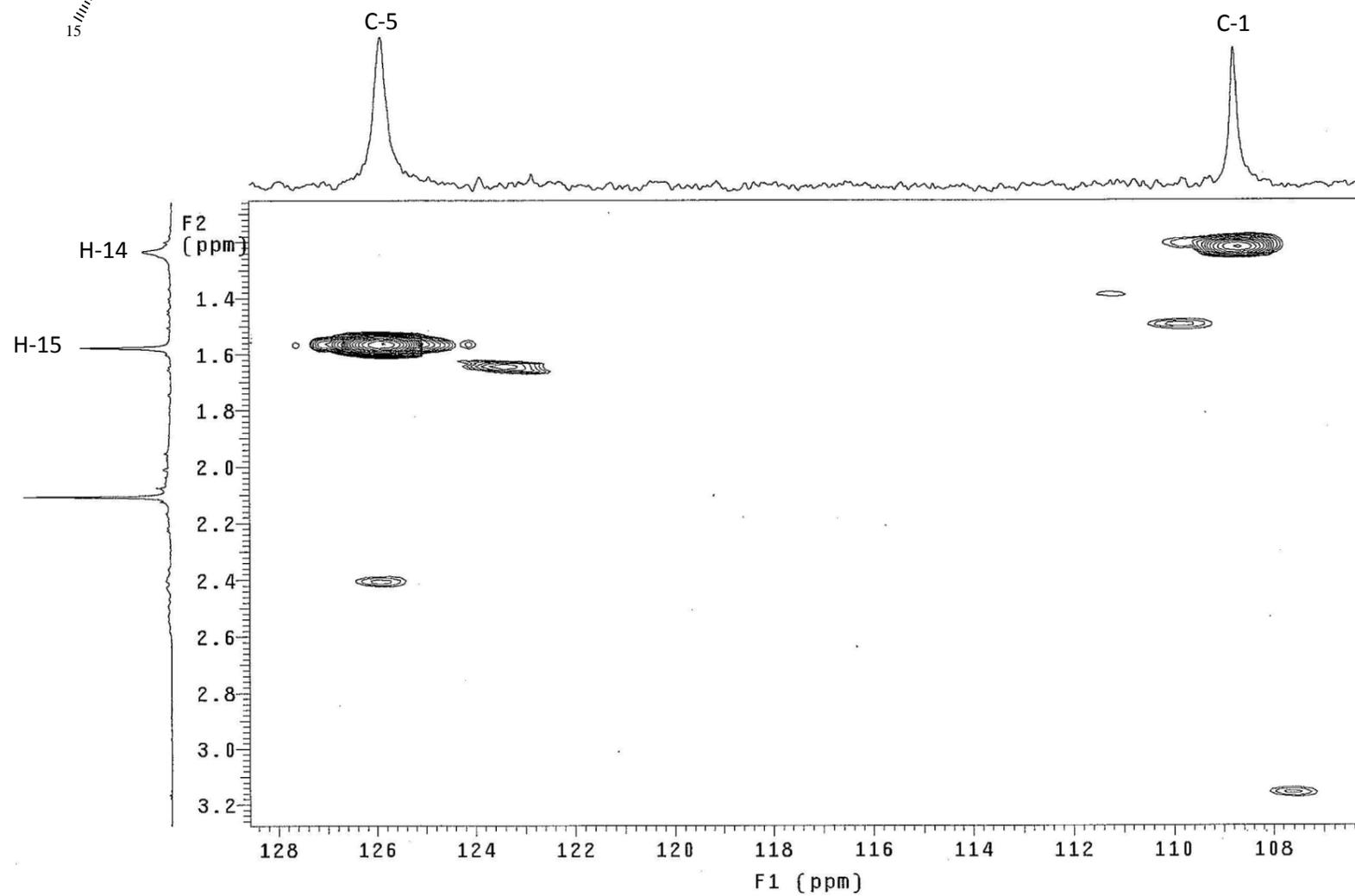


Figura 42: Expansão do espectro de HMBC (CDCl_3 , 75,5MHz) de LI-5



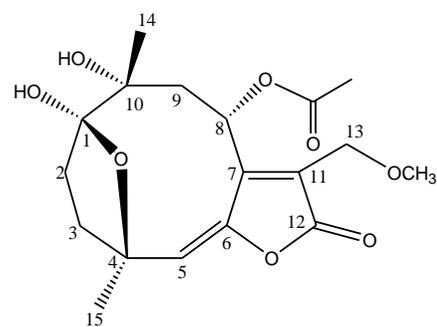


Figura 43: Expansão do espectro de HMBC (CDCl_3 , 75,5MHz) de LI-5

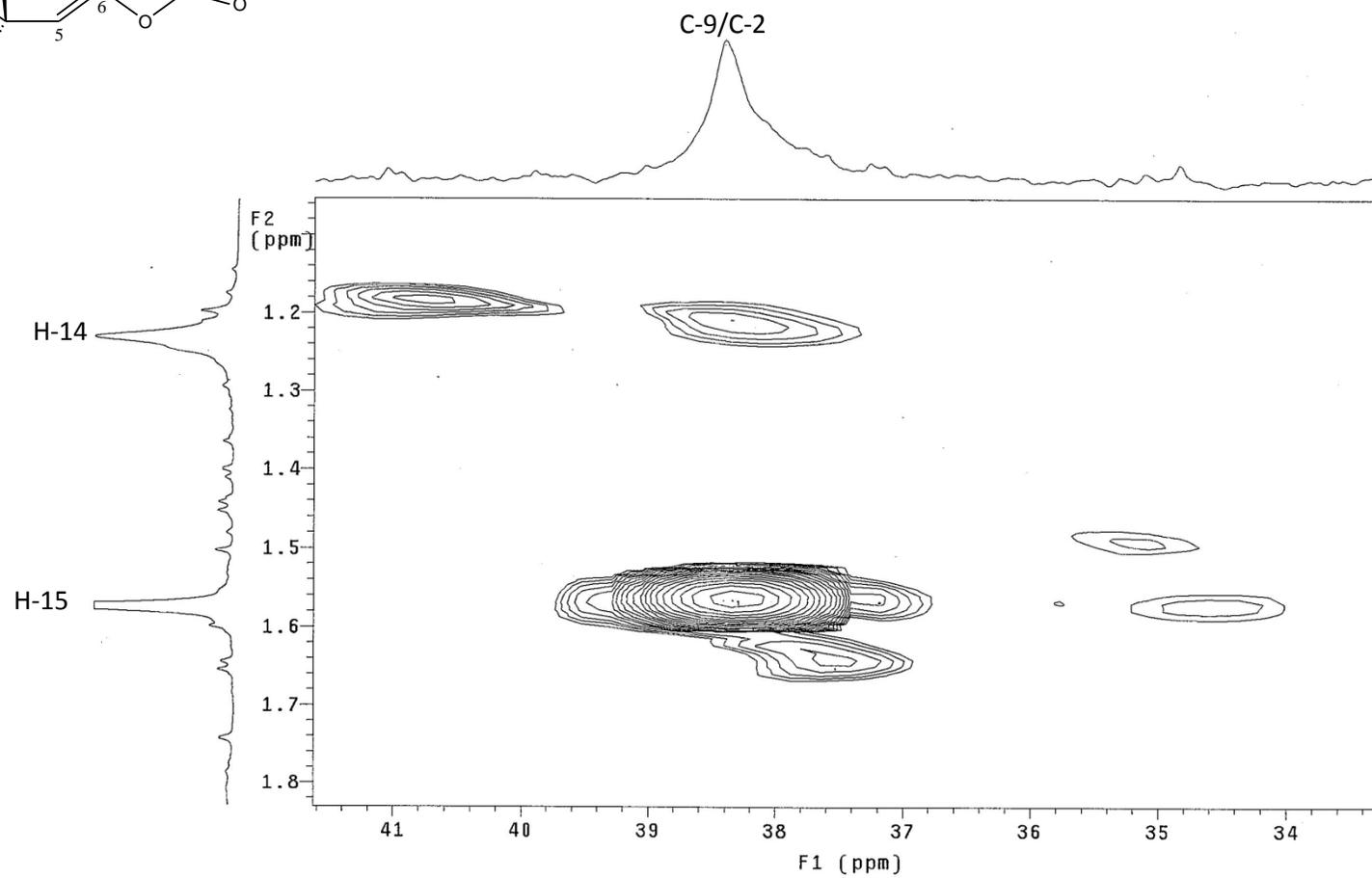
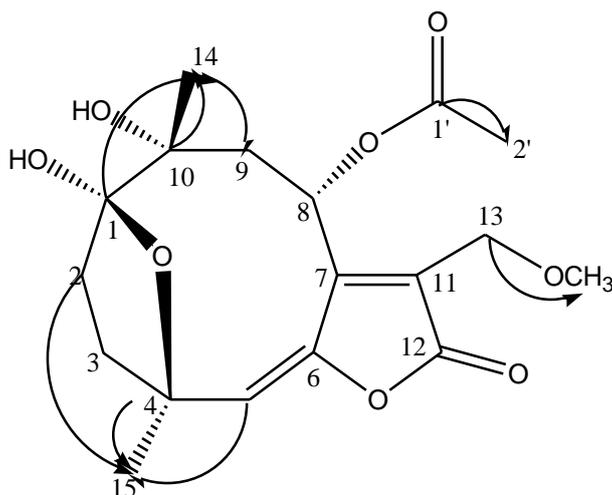


Tabela 23: Dados de RMN de ^{13}C e de HMBC da substância LI-5

LI-5		
Posição	^{13}C	HMBC
1	108,7	H-14
2	38,4	-
3	32,0	-
4	82,2	H-15
5	125,9	H-15
6	144,1	-
7	150,8	-
8	66,7	-
9	38,4	H-14
10	78,3	H-14
11	133,2	-
12	167,8	-
13	63,7	H-OMe
14	25,4	-
15	29,5	-
(OMe)	59,0	H-13
1'	169,6	H-2'
2'	21,3	-



Principais correlações observadas no espectro de HMBC para LI-5

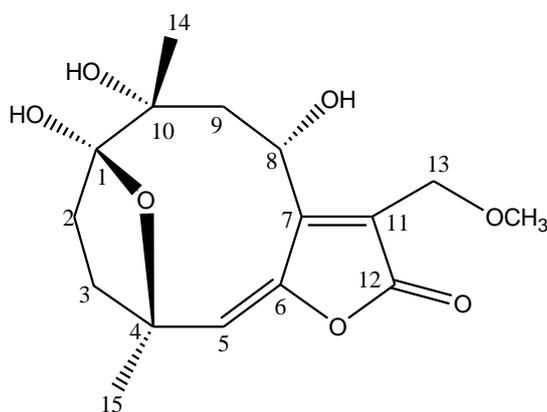
4.1.2.3 – Mistura das substâncias LI-5 e LI-6

A fração VI-DC-6.6.2.4.2 forneceu uma mistura de substâncias identificadas como sendo o 8 α -acetóxi-10 α -hidróxi-13-O-metil hirsutinólídeo (**LI-5**) e o espicatolídeo (**LI-6**), a partir da comparação dos dados de RMN obtidos com os de **LI-5** e da literatura (YANG et al., 2007).

A maior concentração de **LI-6** na amostra, que resultou em maior intensidade dos sinais observados nos espectros de RMN ^1H (**Figura 44**), ^{13}C e DEPT (**Figuras 45 e 46**), além do conhecimento prévio dos sinais da substância já identificada **LI-5**, possibilitou sua identificação. Devido à mistura e ao equilíbrio conformacional presente nas duas substâncias, o espectro de RMN ^1H apresentou sinais sobrepostos e não resolvidos, não sendo possível a atribuição das multiplicidades para todos os hidrogênios. A diferença entre as duas estruturas é o substituinte no C-8 que em **LI-5** é um grupo acetóxi, enquanto em **LI-6** há um grupo hidroxila nesta posição.

A presença da hidroxila em **LI-6** foi confirmada pelo sinal de H-8 em δ_{H} 5,47, correlacionado no espectro de HSQC (**Figuras 47**) com C-8 (δ_{C} 64,0) (**Tabela 24**). O sinal do H-8 para a substância **LI-6** aparece em região de maior blindagem que o de **LI-5** (δ_{H} 6,42), o que está coerente com o efeito de um grupo hidroxila comparado ao grupo acetoxila.

Os dados de RMN ^1H e ^{13}C estão apresentados na **Tabela 24**. A concordância destes com os dados da literatura possibilitou a caracterização de **LI-6** como sendo o espicatolídeo (YANG et al., 2007).



LI-6

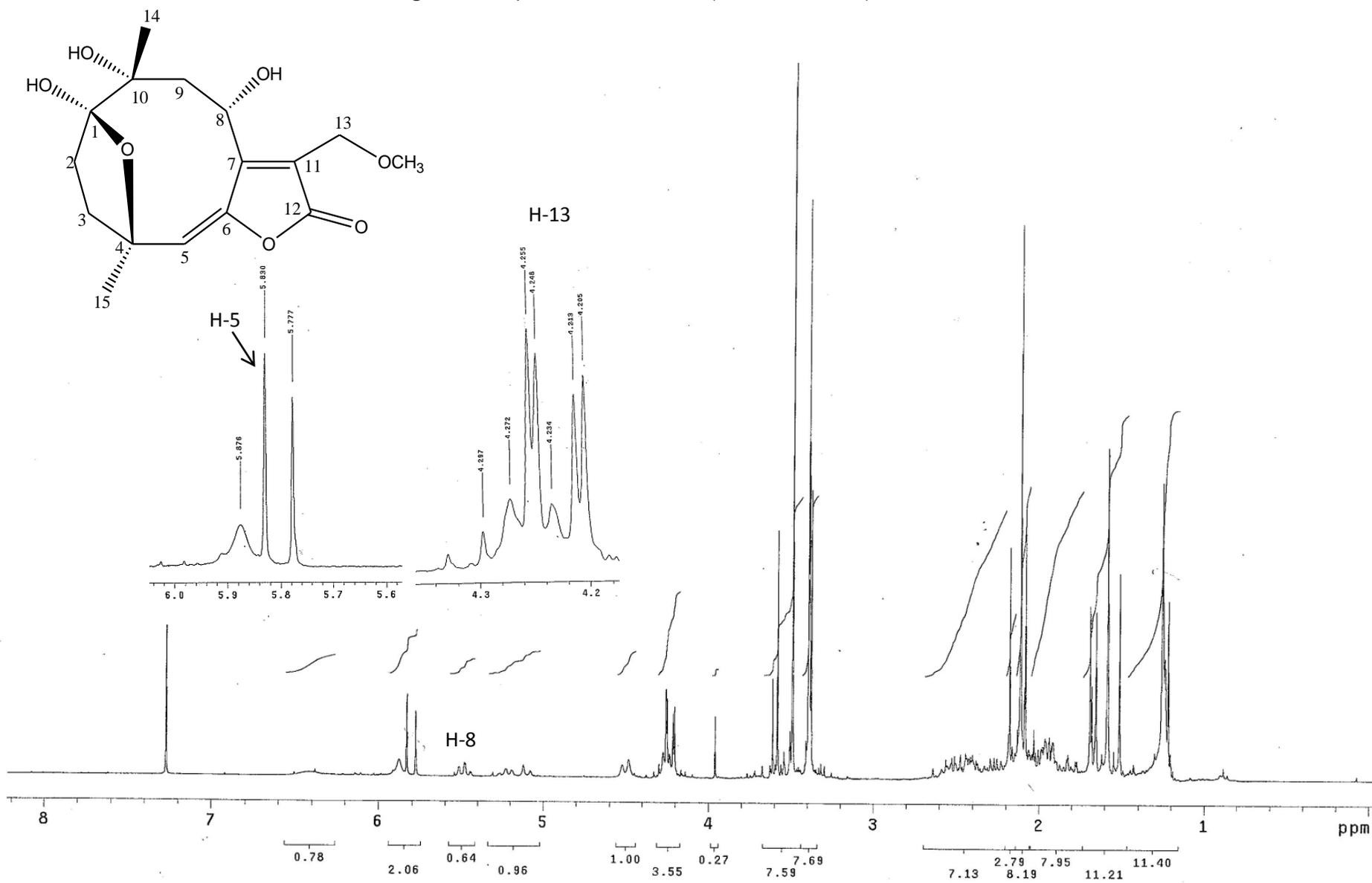
Figura 44: Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de LI-6

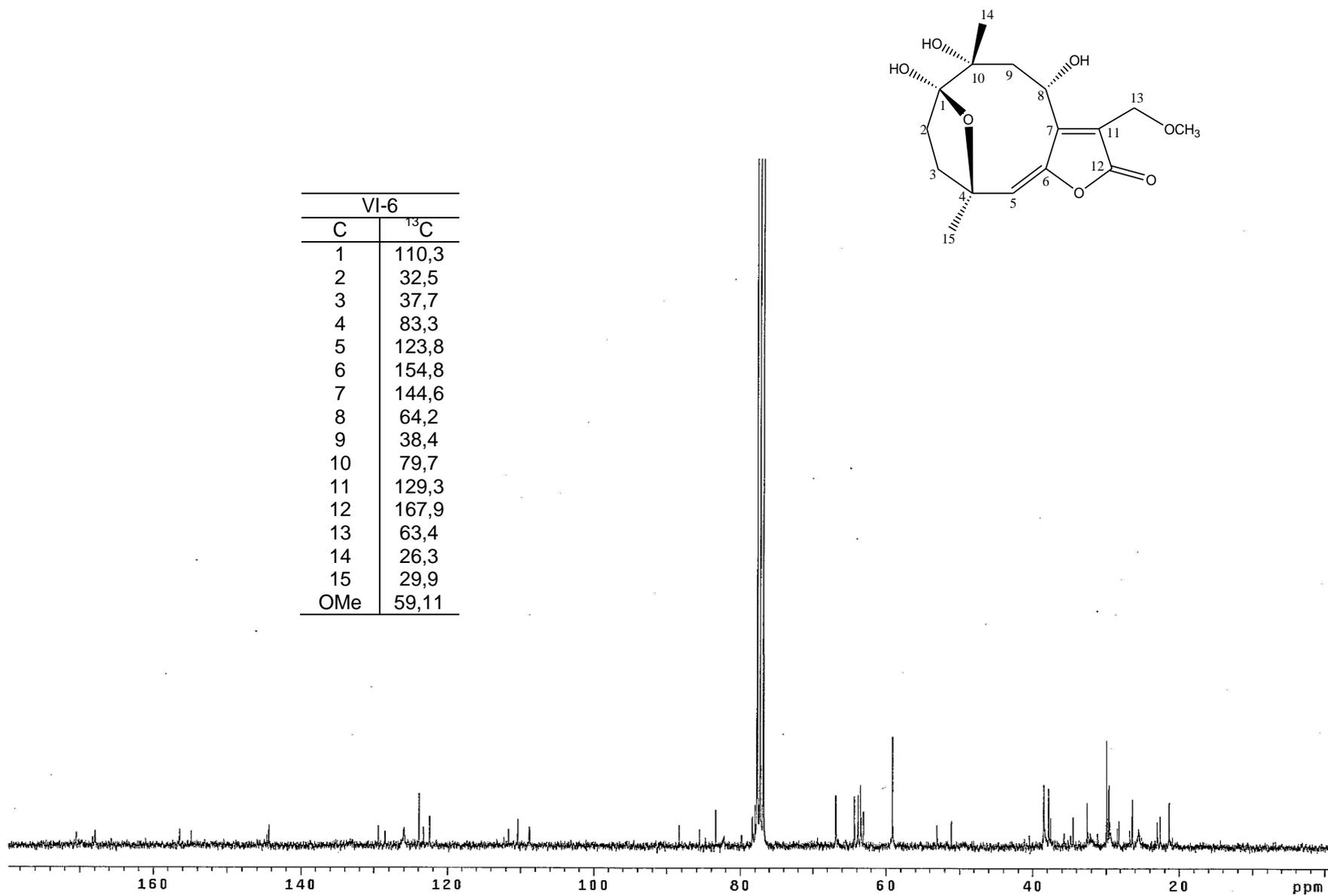
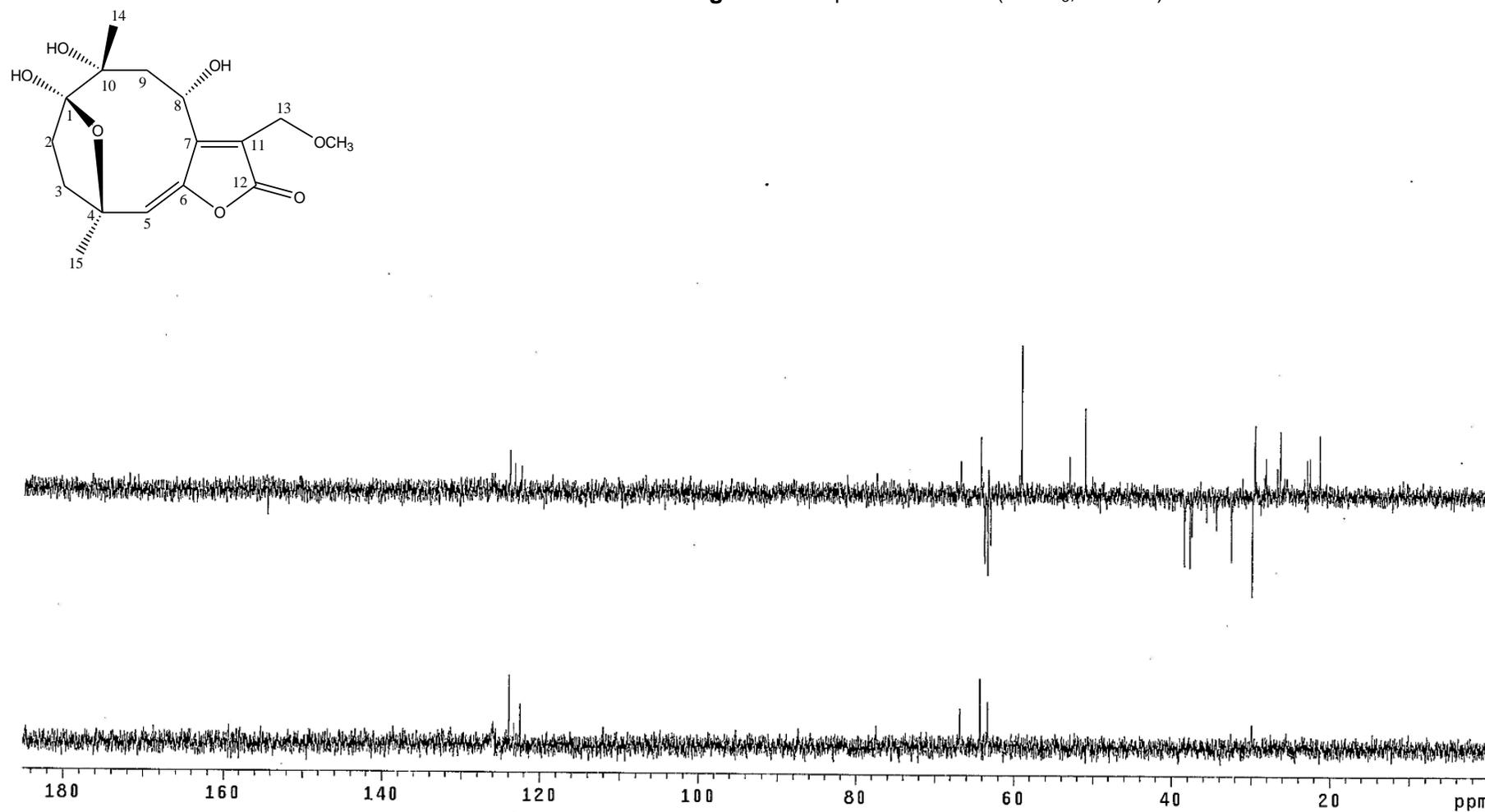
Figura 45: Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) de LI-6

Figura 46: Espectro de DEPT (CDCl_3 , 75 MHz) de LI-6

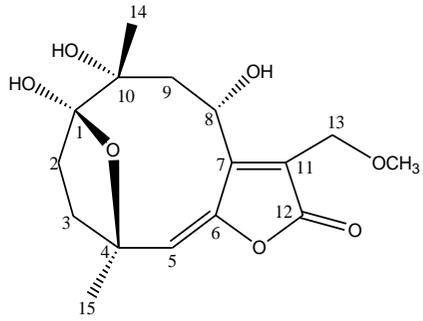


Figura 47: Espectro de HSQC (CDCl₃, 75 MHz) de LI-6

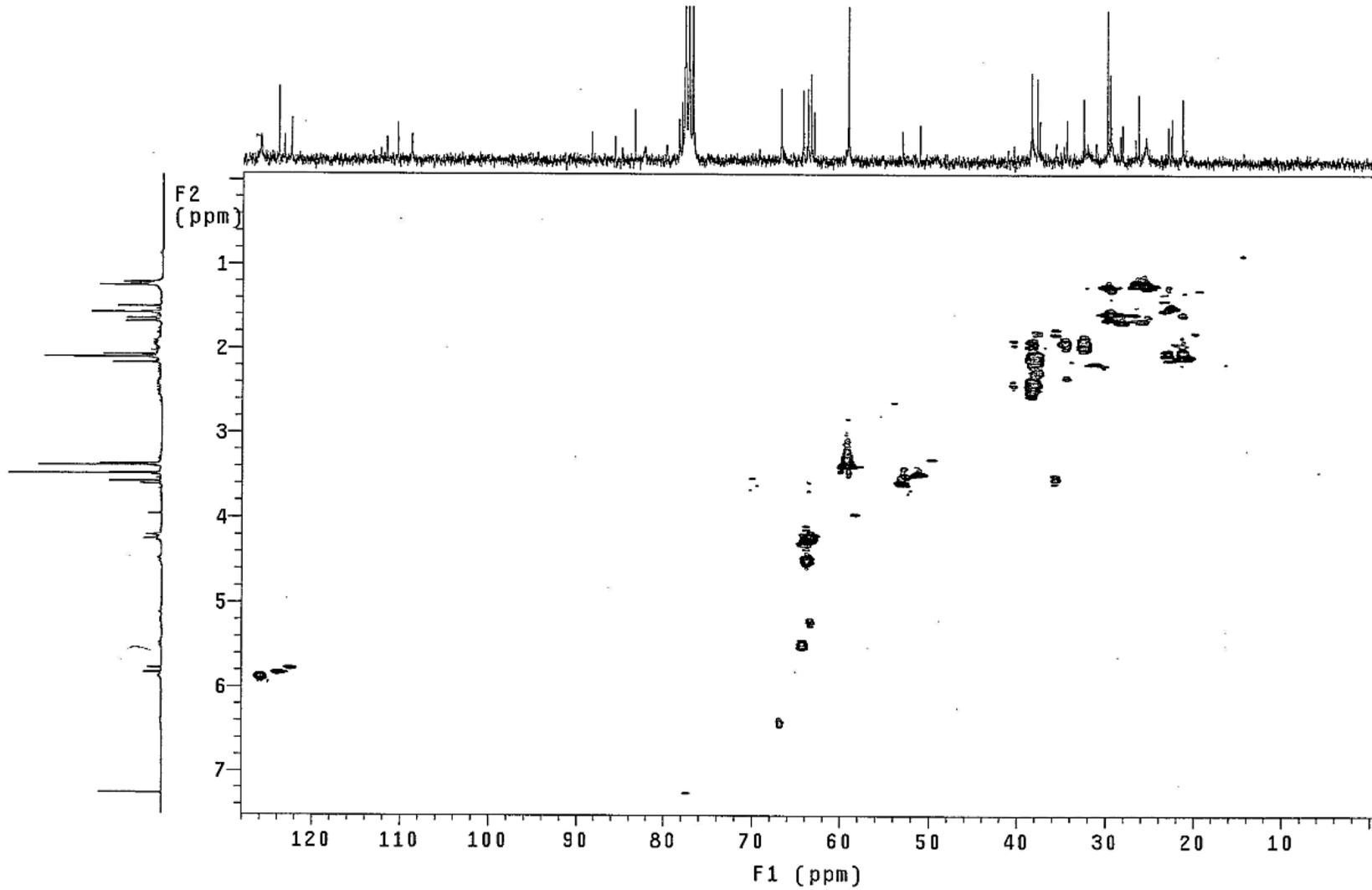


Tabela 24: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da mistura LI-5 e LI-6 (CDCl_3) e para o espicatolídeo.

Posição	LI-6		LI-5		Espicatolídeo.	
	δ_{H} (mult., J)	δ_{C}	δ_{H} (mult., J)	δ_{C}	δ_{H} (mult., J)	δ_{C}
1	-	110,3	-	108,7	-	110,1
2	1,95-1,98(m) 1,86-1,89 (m)	32,5	2,40(m) 2,00(m)	38,4	1,89(dddd, 12,8;12,0;6,8 e 2,4) 1,98(dd; 12,8 e 6,8)	32,3
3	2,22-2,29(m) 2,13-2,18(m)	37,7	1,53(m) 1,94(m)	32,0	2,15(dd,12,8 e 6,8) 2,42(ddd, 14;12,4 e 7,2)	37,5
4	-	83,3	-	82,2	-	83,1
5	5,83(s)	123,8	5,87(sl)	125,9	5,82(s)	123,6
6	-	154,8	-	150,8	-	154,6
7	-	144,6	-	144,1	-	144,1
8	5,47(dd, 10,8 e 1,8) 1,91-1,93(m) 2,52-2,56(m)	64,2 38,4	6,42 (sl) 2,5(m) 1,90(m)	66,7 38,4	5,45(ddd, 12,0;11,0 e 2,0) 1,94(dd, 16,0 e 2,0)	64,0 38,2
9					2,52(dd, 16,0 e 11)	
10	-	79,7	-	78,3	-	77,7
11	-	129,3	-	133,2	-	129,1
12		167,9		167,8		167,6
13	4,22 (d,12,6) 4,23(d,12,6)	63,4	4,48(d,11,3) 4,23(d,12,3)	63,7	4,21(d, 12,4) 4,25(d, 12,4)	63,1
14	1,22(s)	26,3	1,57(sl)	25,4	1,21(s)	26,1
15	1,67(s)	29,9	1,23(sl)	29,5	1,64(s)	29,3
OMe	3,40(s)	59,11	3,38(sl)	59,0	3,37(s)	58,8

As correlações apresentadas no espectro de HMBC (**figura 48**) mostraram que os hidrogênios metílicos H-14 δ_{H} em 1,22(s) correlaciona-se com C-1 (δ_{C} 110,3) e com C-10 (δ_{C} 79,7), confirmando o grupo metila nesta posição. As demais correlações estão apresentadas na **tabela 25**.

Tabela 25: Dados de RMN de ^{13}C e de HMBC da substância VI-6

VI-6		
Posição	δ_{C}	HMBC
1	110,3	H-14 e H-3
2	32,5	-
3	37,7	-
4	83,3	H-5
5	123,8	-
6	154,8	-
7	144,6	-
8	64,2	-
9	38,4	-
10	79,7	H-14
11	129,3	H-13'
12	167,9	-
13	63,4	O-Me
14	26,3	-
15	29,9	-
OMe	59,11	-

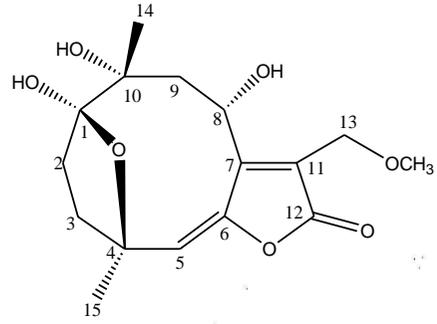
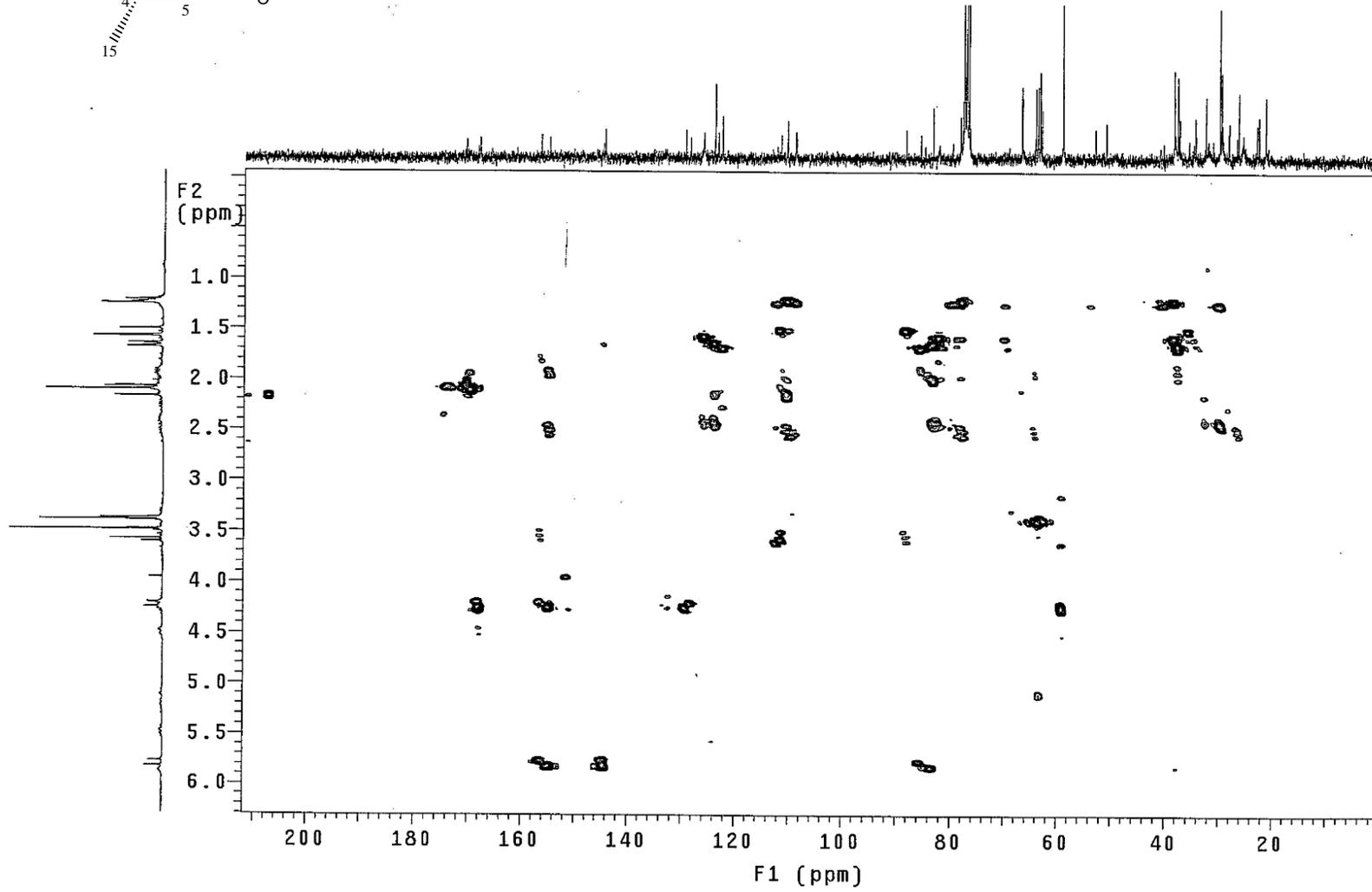


Figura 48: Mapa de contornos HMBC (CDCl_3 , 75 MHz) de LI-6

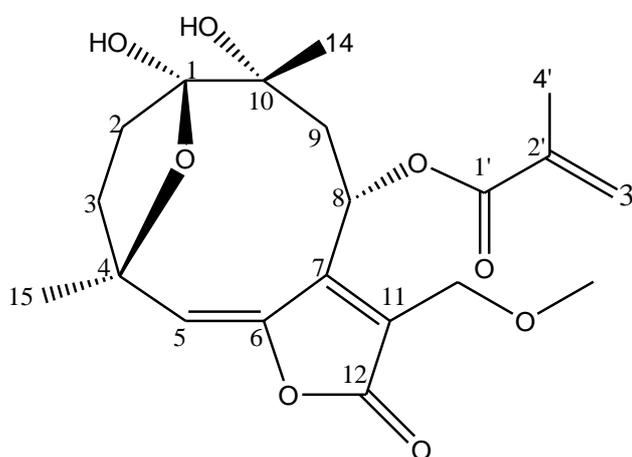


4.1.2.4- Substância VC-1

A substância codificada como **VC-1** foi isolada da fração diclorometano VC-DC-4.5 da espécie *Vernonanthura crassa* na forma de sólido amorfo.

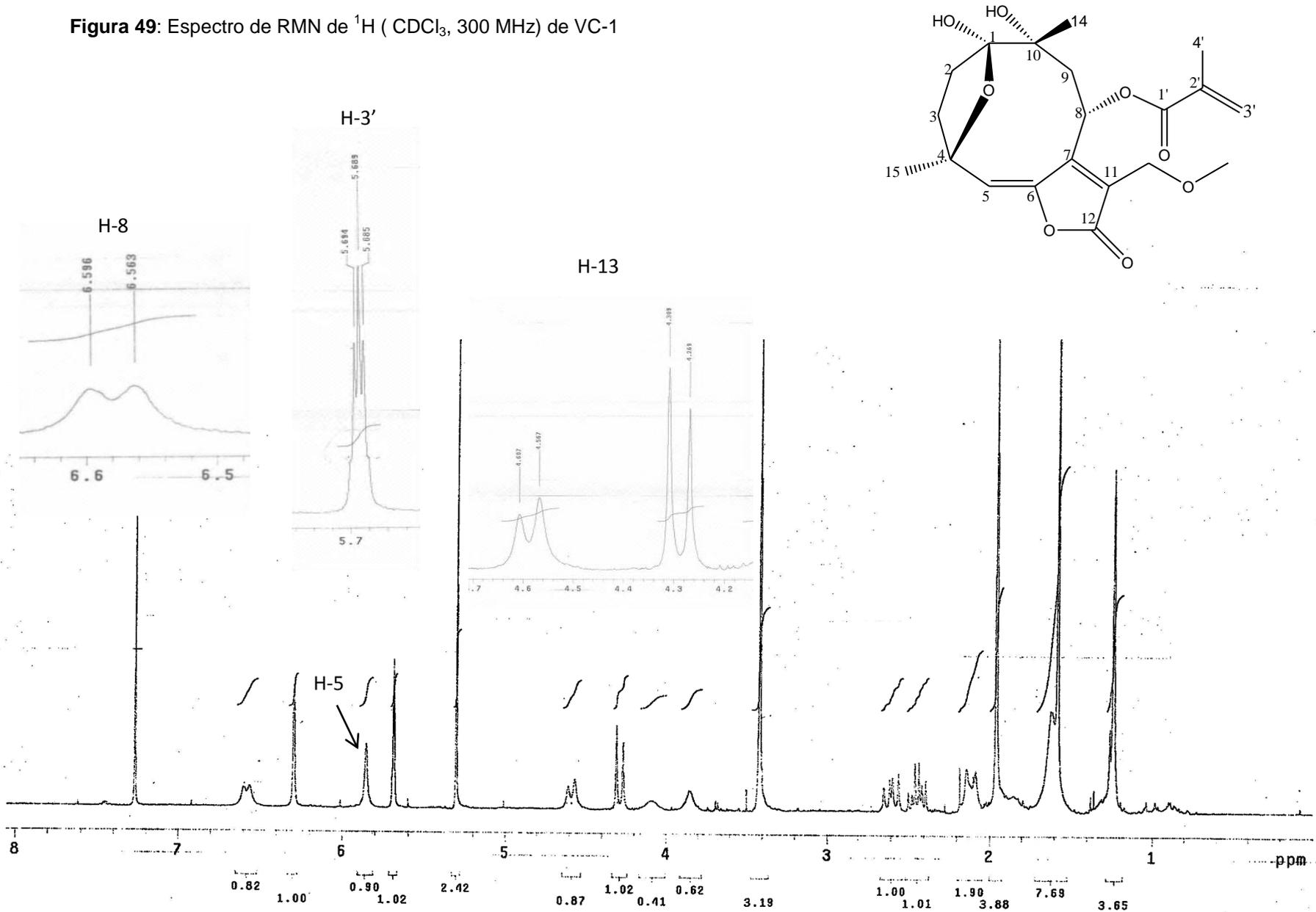
As análises espectroscópicas, em especial a de RMN de ^1H (**Figura 49**) mostraram um duplete largo em δ_{H} 6,57 ($J=9,9$ Hz) referente ao hidrogênio H-8, sinal muito semelhante à lactona LI-5, além dos dupletos em 4,28 ($J=12\text{Hz}$) e 4,58($J=12\text{Hz}$) referentes aos hidrogênios metilênicos diasterotópicos H-13.

Os sinais que diferenciam **VC-1** das outras substâncias isoladas de *Lessigianthus intermedius* são o simpleto em δ_{H} 6,29 e, o quinteto em 5,68 ($J=7,2\text{Hz}$) referente aos hidrogênios olefínicos H-3'a e H-3'b, respectivamente. (**Figura 49 e Tabela 25**).



VC-1

Figura 49: Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de VC-1



O espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 50**) em conjunto com DEPT (**Figura 51**) revelou a presença de um carbono metilênico em δ_c 127,4, característico de dupla ligação terminal correspondente ao C-3', sinal ausente nos espectros das outras lactonas.

Os demais sinais apresentados no espectro de RMN de ^{13}C apresentam deslocamentos químicos similares aos de LI-5 e LI-6, o que facilitou a identificação de VC-1. A análise destes sinais em conjunto com os demais sinais de RMN de ^{13}C e ^1H e a comparação com os dados da literatura (GAO-SHANG *et al.*, 2012) resultou na identificação de VC-1 como sendo a 8- α -metacrilóilóxi-10-hidróxi-13-O-metil-hirsutinólídeo (**Tabela 25a**).

Figura 50: Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) de VC-1

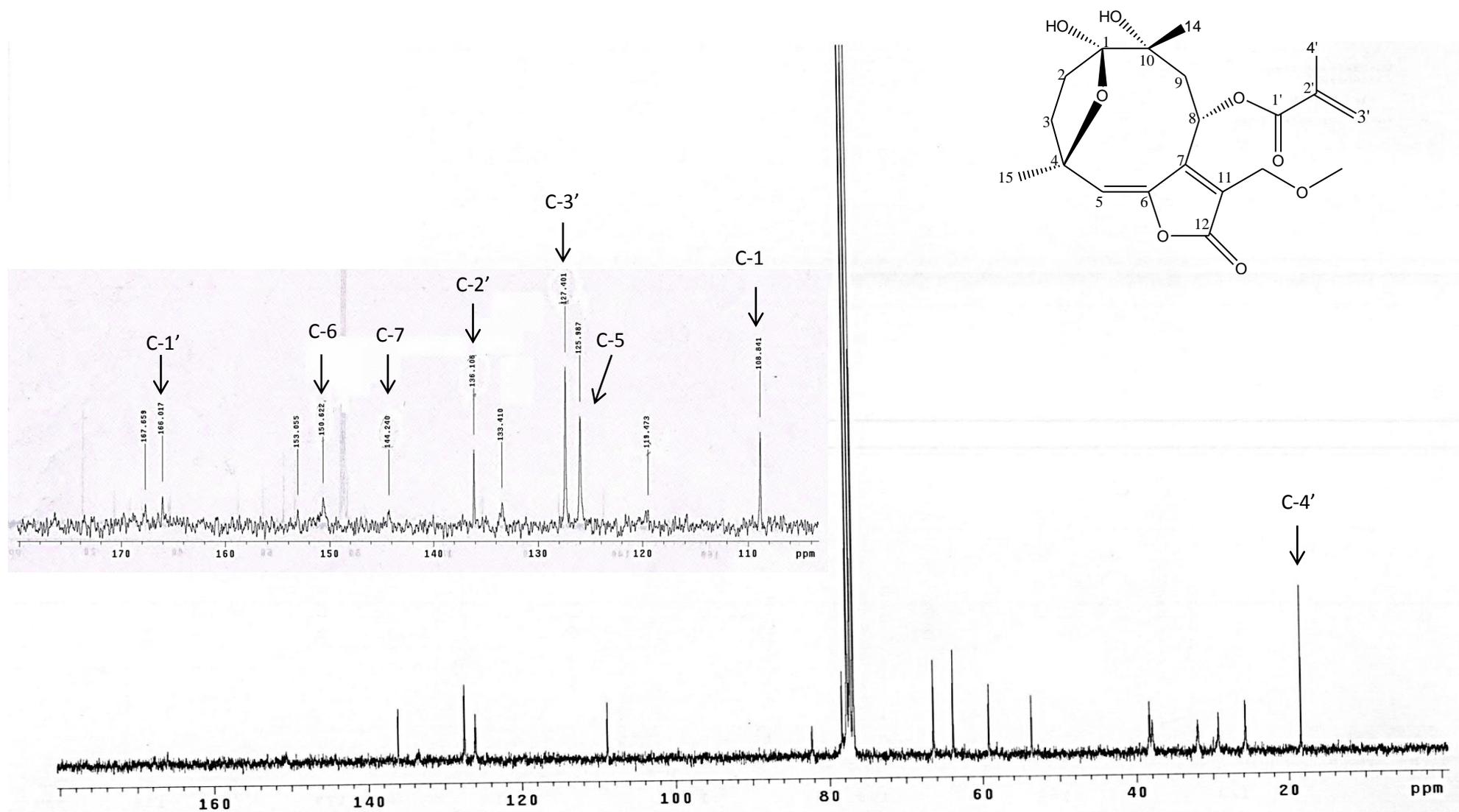
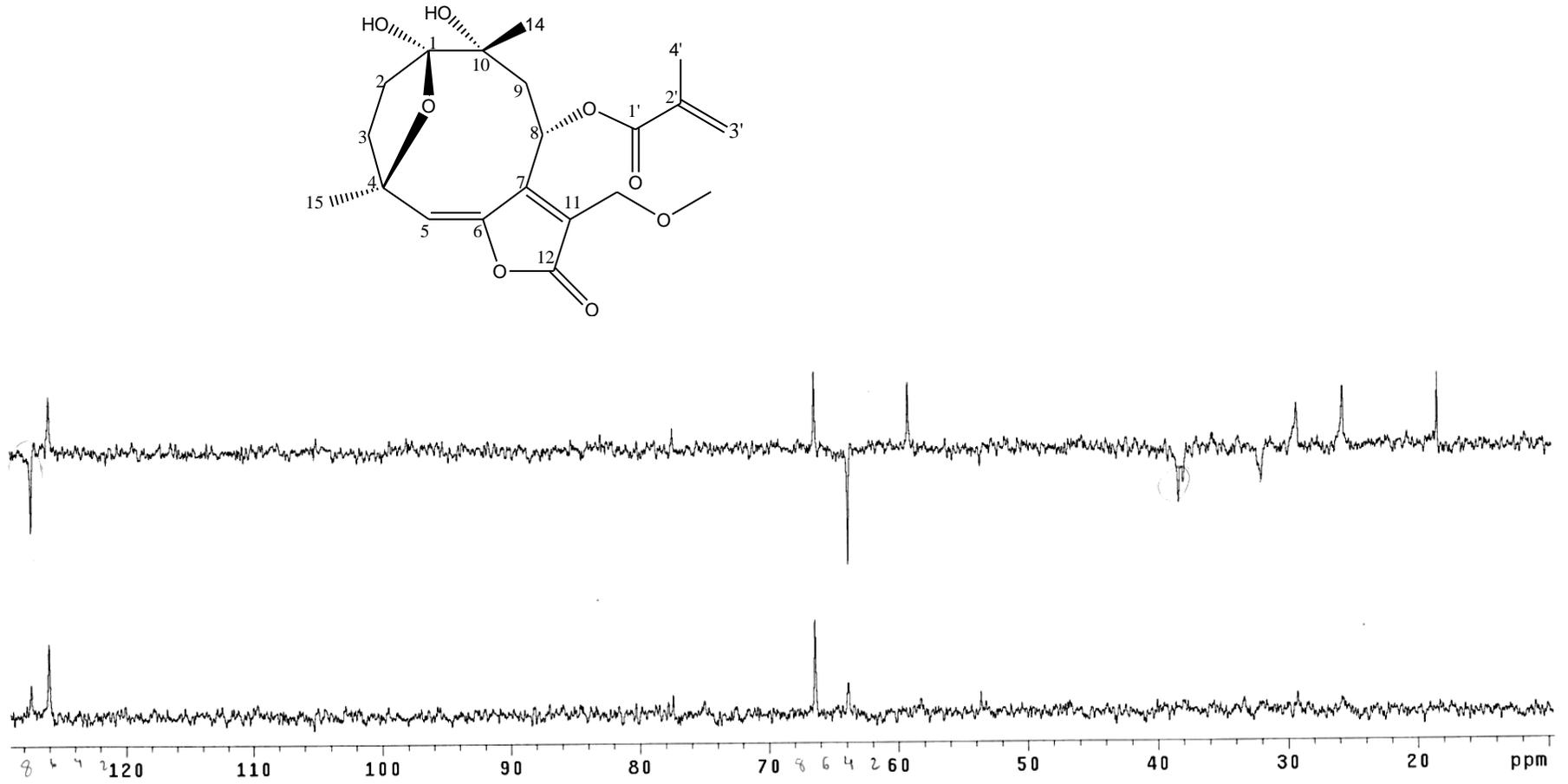


Figura 51: Espectro de DEPT (CDCl_3 , 75 MHz) de VC-1

A análise por HSQC (**Figura 52**) revelou uma diferença na atribuição dos sinais dos grupos metilas H-14 em δ_H 1,23 e H-15 em δ_H 1,58 e também dos carbonos δ_C 38,3 (C-2) e δ_C 37,9 (C-9). A literatura (GAO-SHANG *et al.*, 2012) apresenta esses valores invertidos (**Tabela 25a**). Através do mapa de contornos HMBC (**Figuras 53, 54 e 55**) foi possível verificar que o sinal em δ_H 1,23 correlaciona-se com os sinais dos carbonos C-10, em δ_C 78,3, e C-1 em δ_C 108,8, podendo-se concluir, portanto, que o sinal em δ_H 1,23 se trata do grupo metila H-14 e não de H-15 como apresentado na literatura. Já o sinal em δ_H 1,58 apresenta correlação com o carbono C-4 em δ_C 82,3 e com o carbono C-5 em δ_C 125,9, sendo possível concluir que este sinal é referente ao grupo metila H-15. Foi observado também as correlações de C-9, em δ_C 37,9 com o grupo metila em δ_H 1,23 H-14 e de C-2 em δ_C 38,3 com o grupo metila H-15 em δ_H 1,58. As demais correlações são apresentadas na **Tabela 26**

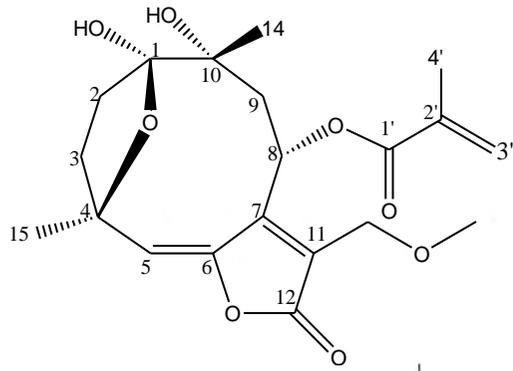
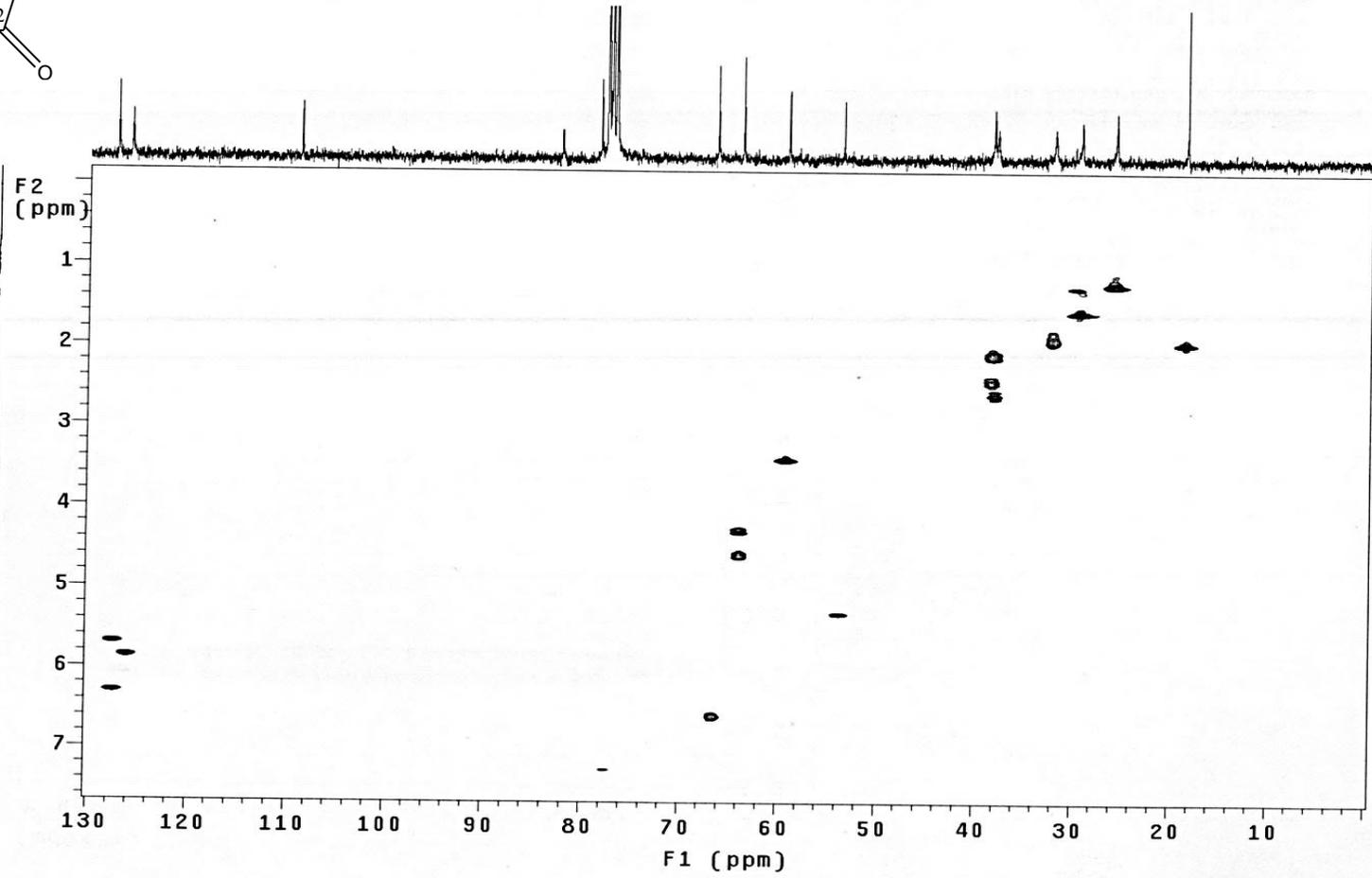


Figura 52: Espectro de HSQC (CDCl_3 , 75 MHz) de VC-1



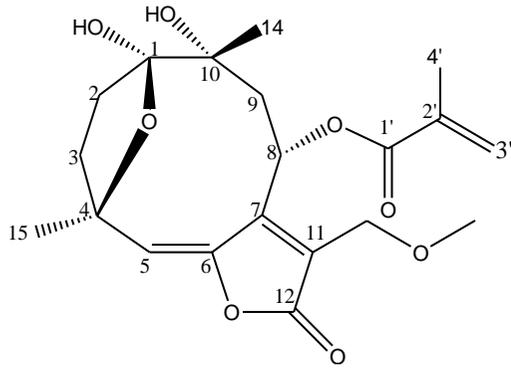
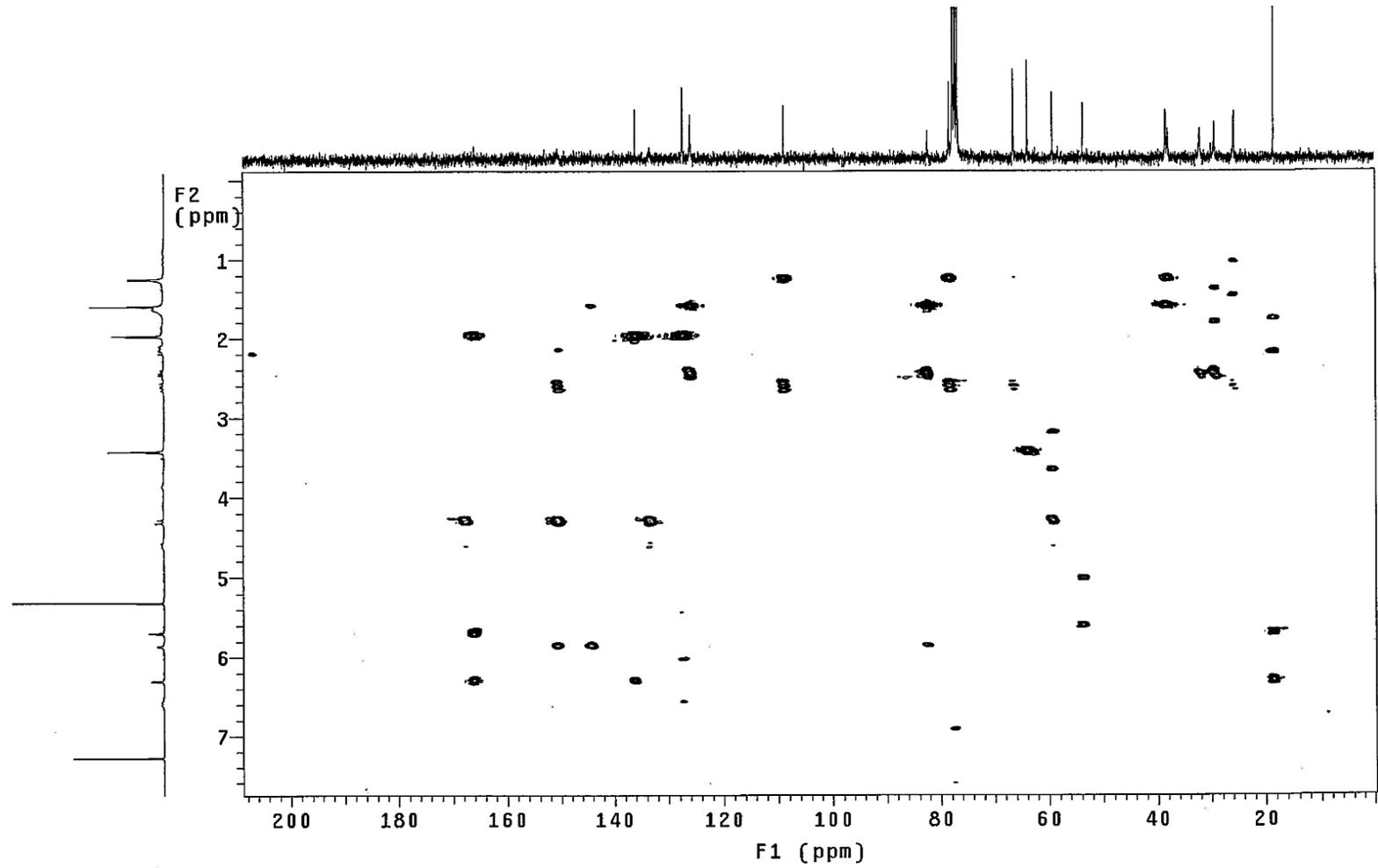


Figura 53: Espectro de HMBC (CDCl_3 , 75 MHz) de VC-1



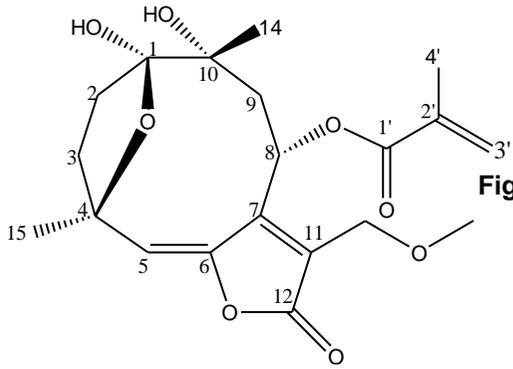


Figura 55: Espectro de HMBC (CDCl_3 , 75 MHz) de VC-1

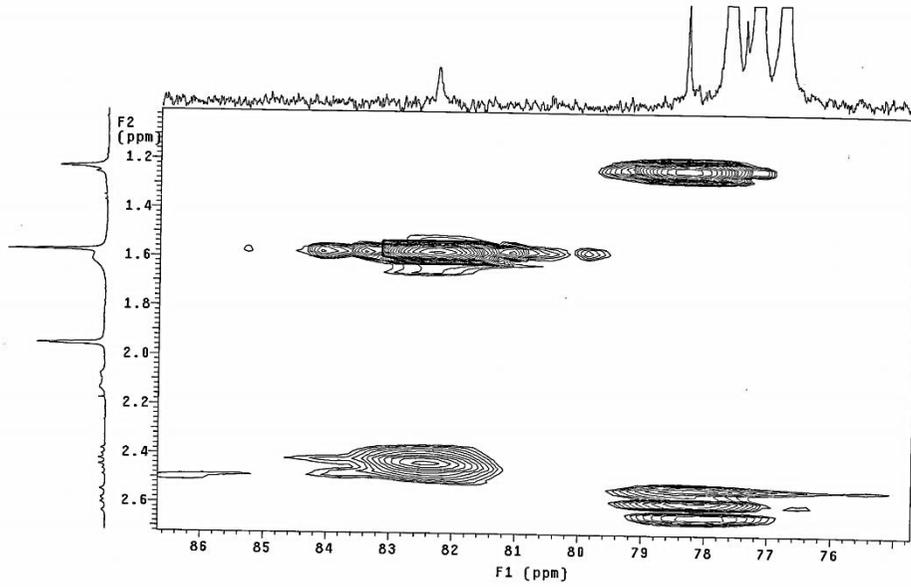


Figura 54: Espectro de HMBC (CDCl_3 , 75 MHz) de VC-1

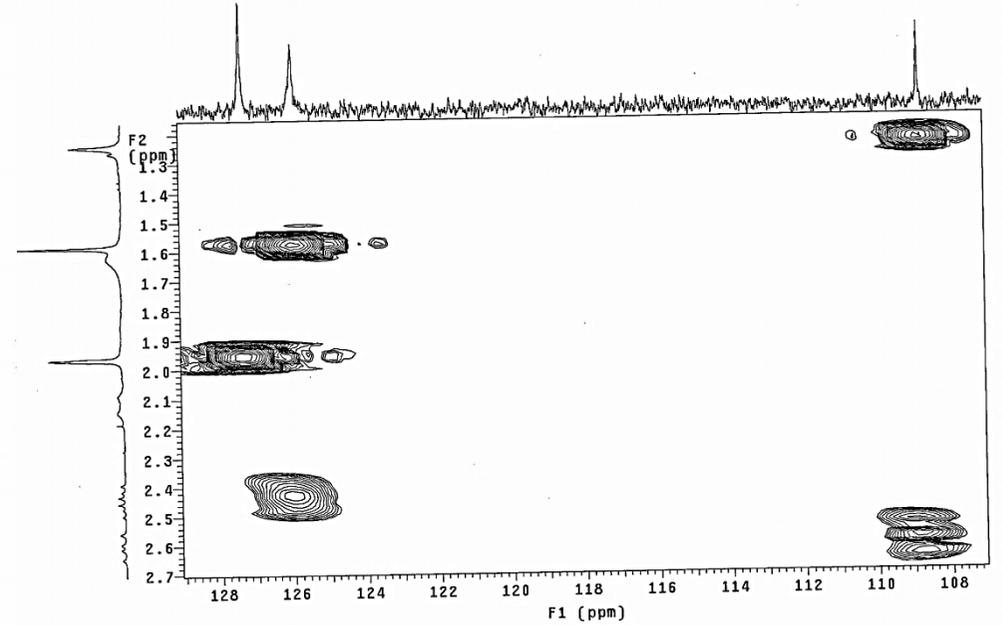


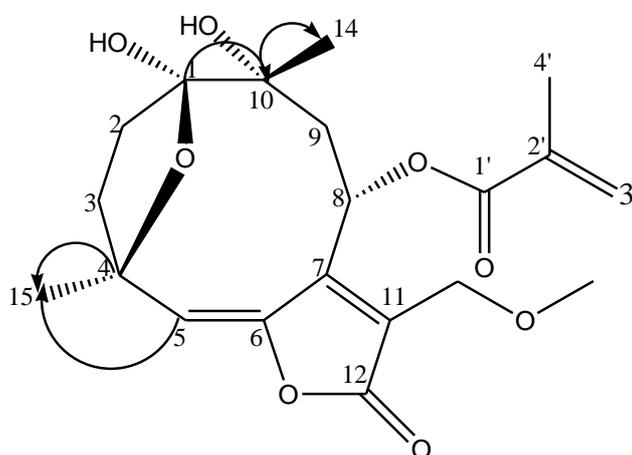
Tabela 25a: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância VC-1 (CDCl_3) e para 8 α -metilacrilóilóxi-10-hidroxi-13-O-metil-hirsutinólídeo

	VC-1		8 α -metilacrilóilóxi-10-hidroxi-13-O-metil-hirsutinólídeo	
Posição	δ_{H} (mult., J em Hz)	δ_{C}	δ_{H} (mult., J em Hz)	δ_{C}
1	-	108,8	-	108,7
2 _{exo}	2,41 (dd, J=12,3 e 6,9)	37,9	2,44 (dd, J = 1,0, 7,2)	37,7
2 _{endo}	2,08-2,09 (m)	31,9	1,80-1,90 (m)	
3	1,79-1,89 (m)	31,9	-	31,8
4	-	82,3	-	82,1
5	5,85 (s)	125,9	5,85 (s)	125,9
6	-	150,6	-	150,5
7	-	144,2	-	144,1
8	6,57(d, J=10,0)	66,4	6,57(d, J = 10,4)	66,3
9 α	2,59 (dd, J=16,0, 10,0)	38,3	2,60 (dd, J = 15,2, 12,0)	38,1
9 β	2,08-2,13 (m)		2,11 (d, J= 15,6)	
10	-	78,3	-	77,5
11	-	133,4	-	133,2
12	-	167,6	-	167,6
13	4,58 (d, J=12,0)	63,8	4,59 (d, J = 11,8)	63,7
	4,28 (d, J=12,0)		4,27 (d, J = 11,8)	
14	1,23 (s)	25,6	1,57(s)	25,6
15	1,58 (s)	29,2	1,22 (s)	29,7
OMe	3,41 (s)	59,1	3,44(s)	59,1
1'	-	166,0	-	165,9
2'	-	136,1	-	135,9
3'	6,29 (s)	127,4	6,9 (s)	127,3
	5,68 (quinteto, J=7,6)		5,69 (s)	
4'	1,96 (s)	18,3	1,95 (s)	18,2

Tabela 26: Dados de RMN de ^{13}C e de HMBC da substância VC-1

Posição	^{13}C	HMBC
1	108,8	H-14 e H-9 α
2	38,3	H-15
3	31,9	H-2 _{exo}
4	82,3	H-15, H-2 _{exo} e H-5
5	125,9	H-15
6	150,6	H-13 e H-5
7	144,2	H-5
8	66,4	H-9 α
9	37,9	H-14
10	78,3	H-14 e H-9 α
11	133,4	H-13
12	167,6	H-13
13	63,8	OMe
14	25,6	-
15	29,2	H-2a
OMe	59,1	13b
1'	166,0	H-3'
2'	136,1	H-3' e H-4'
3'	127,4	H-8 e H-4'
4'	18,3	H-3'

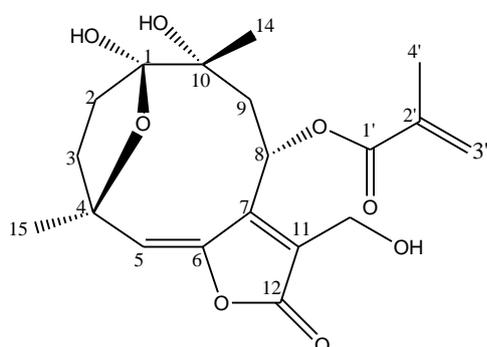
Algumas correlações observadas no HMBC para VC-1



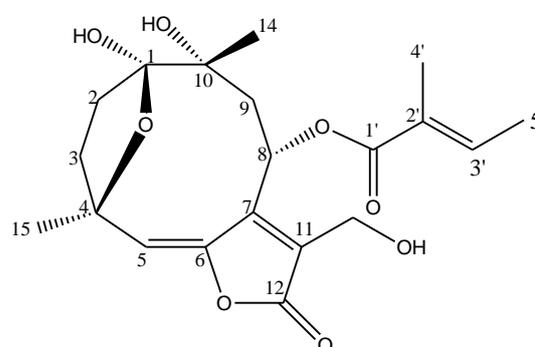
4.1.2.5 – Mistura VN-1

As lactonas sequiterpênicas **VN-1a** e **VN-1b** foram obtidas como mistura de proporção aproximada 2:1, da fração diclorometano **VN-DC 1.2**, da espécie *Vernonanthura nudiflora* na forma de sólido amorfo. A comparação dos dados de RMN de ^1H (**Tabela 27**) obtidos com a literatura (COWALL *et al.*, 1981) levou a identificar **VN-1a** como sendo o fitocarpol C que diferencia de VC-1 apenas pela presença de hidroxila em C-13 ao invés de metoxila. A substância, da mistura codificada como **VN-1b** não apresentou relatos na literatura e foram comparadas com os dados da substância espicatolídeo E (YANG *et al.*, 2007). A única diferença entre **VN-1b** e o espicatolídeo E está na posição C-13 onde o espicatolídeo E apresenta uma metoxila e **VN-1b** apresenta uma hidroxila.

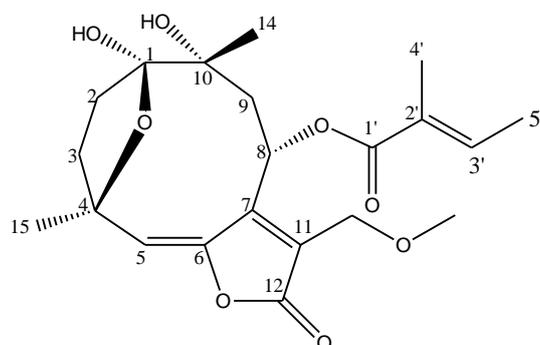
A comparação do espectro RMN de ^1H (**Figura 56**) de **VN-1** com de **VC-1** mostrou a presença de sinais adicionais à mistura; como um quinteto em δ_{H} 7,06 ($J=7,2\text{Hz}$) e dois simpletos em δ_{H} 1,81 e 1,85 todos característicos de hidrogênios de grupo tigloil e ausência do sinal do grupo metila ligada a oxigênio, sugerindo que a mistura apresenta o mesmo esqueleto básico de **VC-1**, dos hirsutinolídeos, porém com substituintes diferentes.



VN-1a



VN-1b



Espicatolídeo

Figura 56: Espectro de ^1H (CDCl_3 , 75 MHz) de VN-1

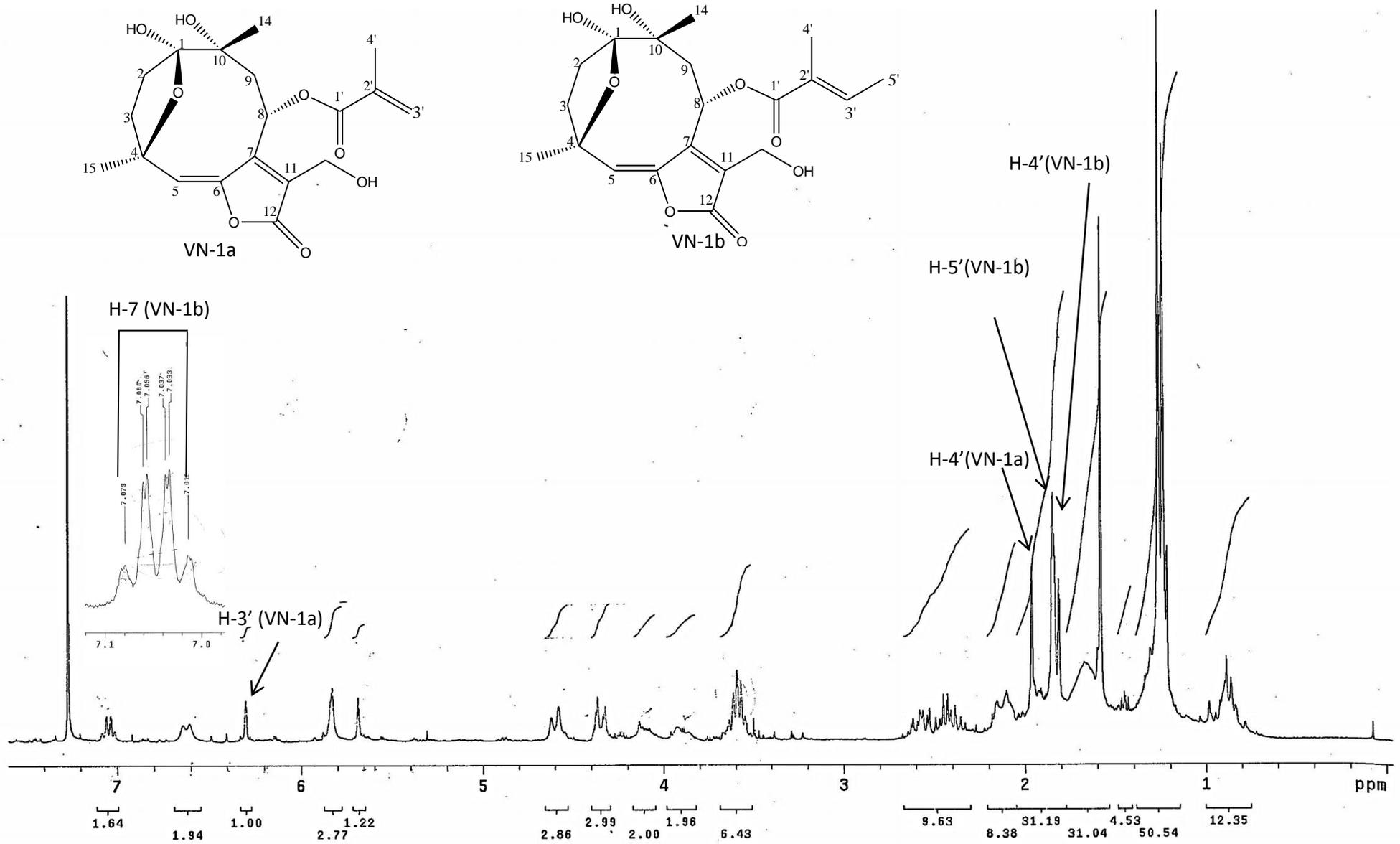
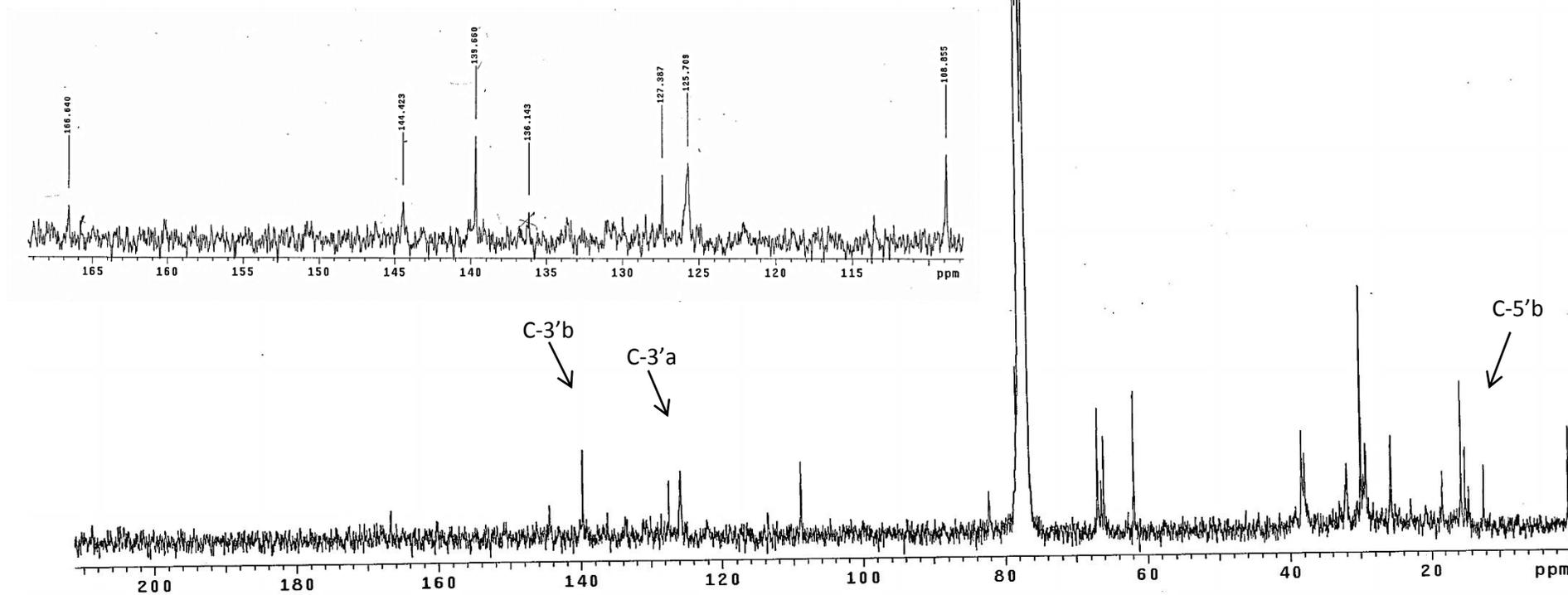
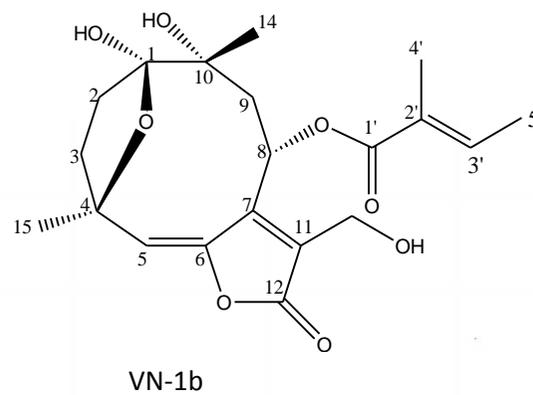
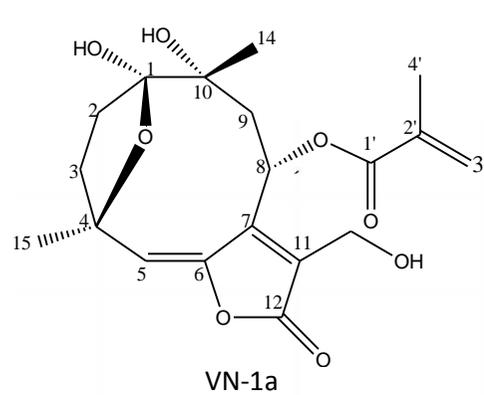


Figura 57: Espectro de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) de VN-1

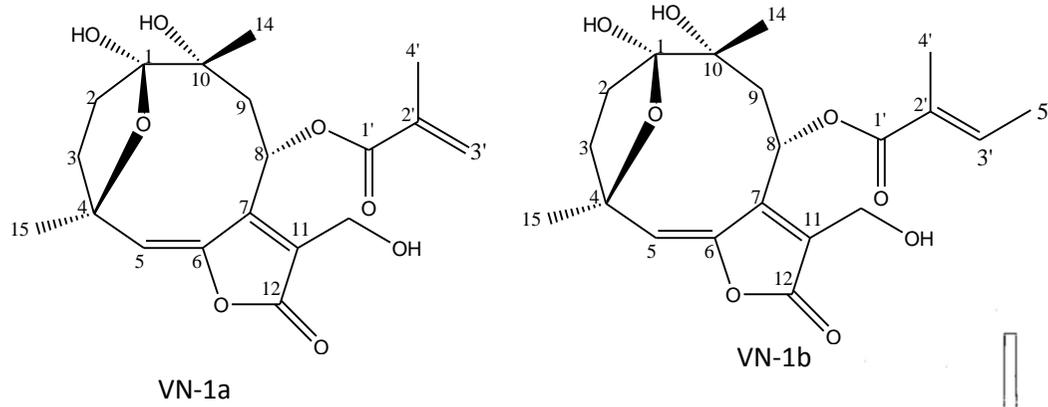
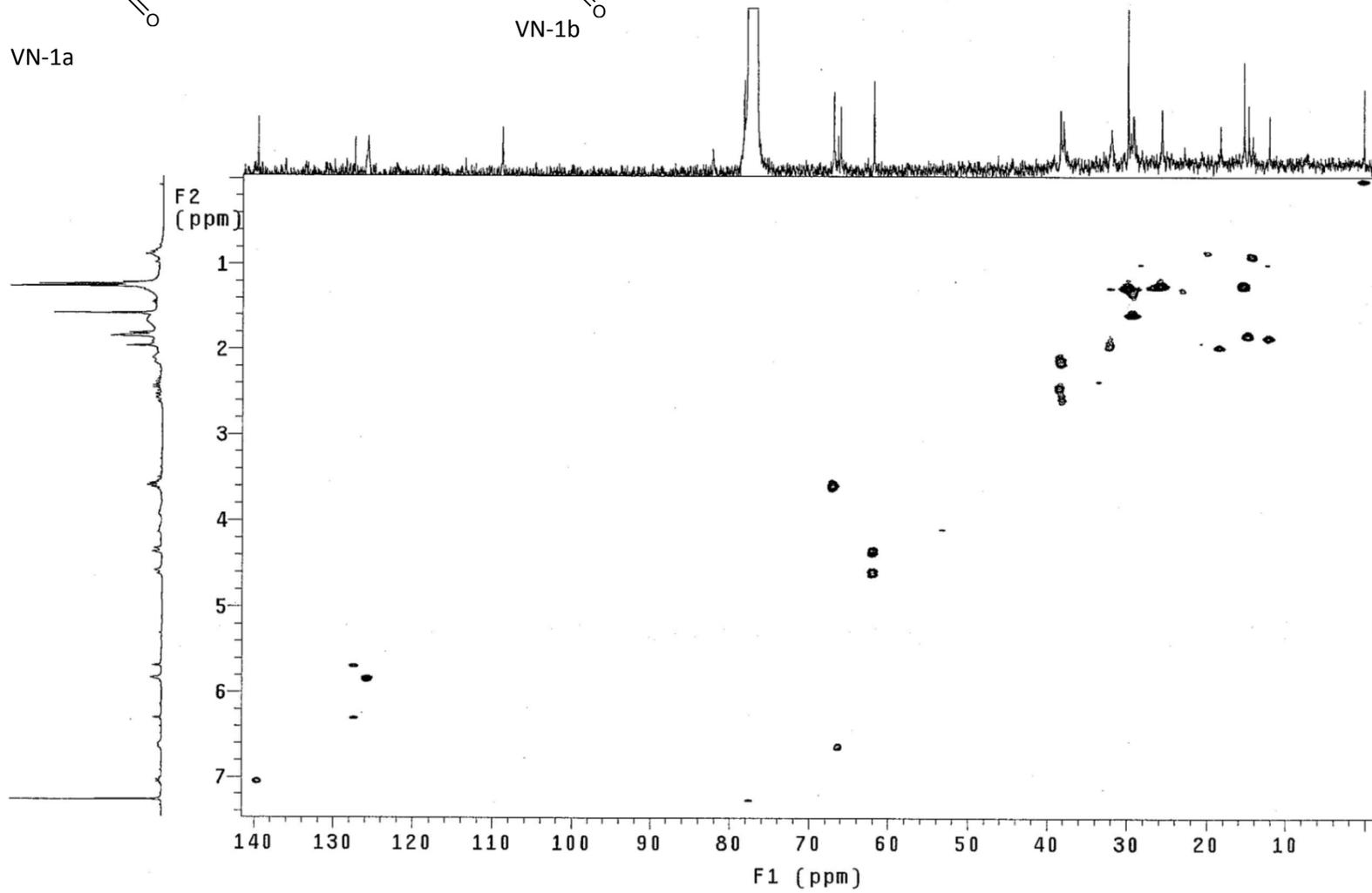


Figura 58: Espectro de HSQC (CDCl₃, 75 MHz) de VN-1



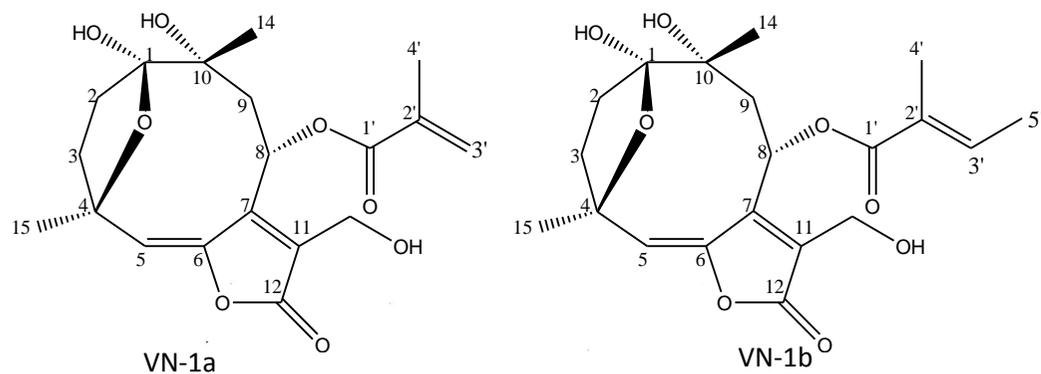
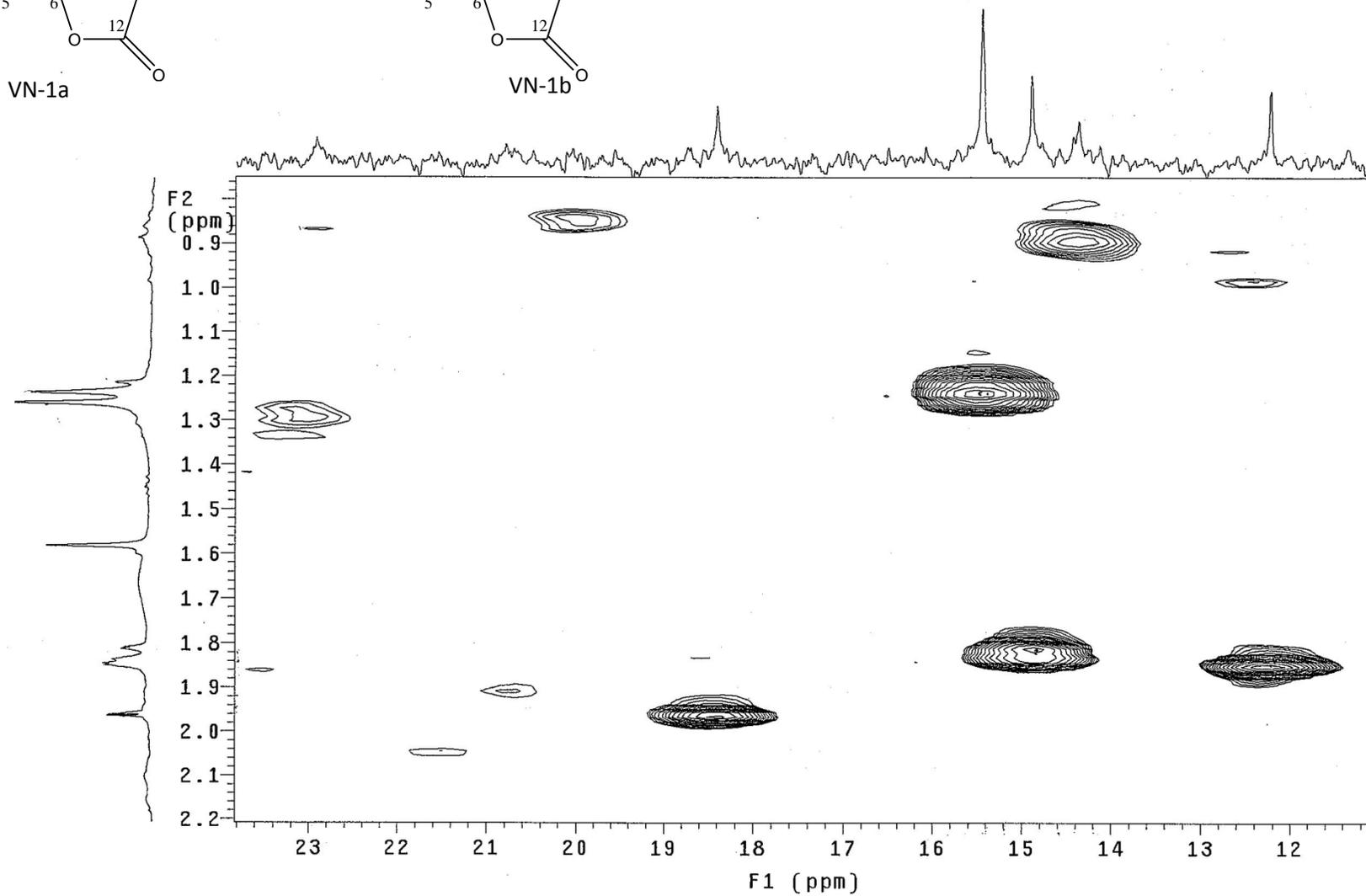


Figura 59: Expansão do espectro de HSQC (CDCl₃, 75 MHz) de VN-1



A maior concentração de VN-1b na amostra resultou em maior intensidade dos sinais observados no espectro de RMN de ^1H e ^{13}C para esta lactona, o que possibilitou a atribuição dos dados de RMN para VN-1a e VN-1b.

Os sinais observados no espectro de RMN de ^1H em δ_{H} 1,81 , 1,85 e 7,06 ; δ_{C} 12,2 , 14,8, 139,6, 136,1, 166,6 no espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 57**) em conjunto com DEPT (**Figura 58**) e HSQC (**Figura 58 e 59**) comprovaram a presença de um grupo éster tigloil para a lactona sesquiterpênica VN-1b (**Tabela 28**). Da mesma forma, os sinais em δ_{H} 1,96 (s), 5,70(s) e 6,29(s); δ_{C} 18,3, 127,3, 136,1 e 165,8 comprovaram a presença de um grupo metacrilóil para a lactona sesquiterpênica VN-1a (**Tabela 27**).

A atribuição completa dos sinais de carbono de ambas substâncias foi realizada com auxílio do espectro de HMBC (**Figuras 60,61 e 62**), pois não foi possível observar todos os sinais no espectro RMN de ^{13}C . O sinal do carbono (C-12), em δ_{C} 167,4, pertencente ao anel lactônico foi observado apenas no HMBC e foi atribuído nesta posição pela sua correlação com H-13 em δ_{H} 4,34 (d, $J=12,0$ Hz). Da mesma forma, O sinal do carbono C-11 em δ_{C} 133,6, foi observado no HMBC e apresentou também uma correlação com H-13 em δ_{H} 4,34. A substância VN-1a foi previamente isolada de *Piptocarpha chontalensis* (Asteraceae) por COWALL *et al.* (1981) e apresenta apenas valores de deslocamentos químicos de RMN de ^1H , sendo que não foram realizadas análises de RMN de ^{13}C e nem análises bidimensionais.

A insuficiência de dados espectrais na literatura levou a comparação os dados de RMN de ^{13}C de VN-1a com 8 α -metacrilóilóxi-10-hidroxi-13-O-metil-hirsutinolídeo (GAO-SHANG *et al.*, 2012), ou seja VC-1.

Tabela 27: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância VN-1a (CDCl_3) e para fitocapol C

Posição	VN-1a		fitocapol C	
	δ_{H} (mult., J em Hz)	δ_{C}	δ_{H} (mult., J em Hz)	δ_{C}
1	-	108,8	-	108,7
2	2,3-2,4(m)	38,3	2,44 (dt, $J = 7,0$ e $12,5$) 1,7-2,2(m)	38,1
3	2,1 (m) 1,94-1,96(m)	31,9	1,7-2,2(m) 1,7-2,2(m)	31,8
4	-	82,2	-	82,1
5	5,82 (s)	125,7	5,88 (s)	125,9
6	-	155,5	-	150,5
7	-	144,4	-	144,1
8	6,62(dl, $J=10,2$)	66,0	6,55(d, $J = 11,0$)	66,3
9	2,52-2,58 (m)	37,9	2,63 (dd, $J = 11,0$ e $15,6$) 2,12 (d, $J = 15,6$)	37,7
10	-	78,3	-	77,5
11	-	133,6	-	133,2
12	-	167,4	-	167,6
13	4,34 (d, $J=12,0$)	61,8	4,61 (d, $J = 13,5$)	63,7
13	4,60(d, $J=12,0$)		4,65 (d, $J = 13,5$)	
14	1,23 (s)	25,7	1,23(s)	25,6
15	1,58 (s)	29,2	1,57 (s)	29,7
1'	-	165,8	-	165,9
2'	-	136,1	-	135,9
3'	6,29 (s)		6,30 (m)	
3'	5,70 (m)	127,3	5,70 (s)	127,3
4'	1,96 (s)	18,3	1,95 (s)	18,2

Tabela 28: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância VN-1b (CDCl_3) e para Espicatólideo E.

VN-1b			Espicatólideo E	
Posição	δ_{H} (mult., J em Hz)	δ_{C}	δ_{H} (mult., J em Hz)	δ_{C}
1		108,8		108,6
2	1,94-1,96(m)	31,9	1,90 (m) 1,97 (m)	31,7
3	2,1 (m) 2,3-2,4	37,9	2,15 (m) 2,42 (ddd, J =14,0, 12,4, 7,2)	37,7
4		82,2		81,9
5	5,82 (s)	125,7	5,83 (s)	125,6
6		150,2		146,8
7		144,6		154,2
8	6,62(d, J=10,2)	66,0	6,57 (d, J =8,8)	65,8
9	2,52-2,58 (m)	38,3	1,93 (m)	38,0
10		78,3		78,0
11		133,6		128,4
12		167,4		169,2
13	4,34 (d, J=12,0)	61,8	4,25 (d, J= 10,8)	63,5
13	4,60(d, J=12,0)		4,28 (d, J=10,8)	
14	1,23 (s)	25,7	1,22 (s)	25,6
15	1,58 (s)	29,2	1,56 (s)	28,9
1'		166,6		166,4
2'		136,1		139,2
3'	7,06(q, J=7,2)	139,6	7,03 (q, J =7,2)	139,4
4'	1,81 s	14,8	1,82 (d, J =7,2)	11,9
5'	1,85 s	12,2	1,83 (s)	14,6

O experimento de HMBC (**Figuras 60,61 e 62**) foi utilizado para comprovar as atribuições, principalmente dos grupos ligados ao C-8. Os hidrogênios do grupo metila H-4' apresentaram correlação com o carbono C-3' de VN-1a, evidenciando a presença de um grupo metacrilóil em VN-1a.

Para a lactona majoritária, VN-1b, foi possível observar a correlação dos hidrogênios H-4' e H-5' com o carbono C-3' confirmando a presença do grupo tigloil nesta substância. As demais correlações estão apresentadas na **Tabela 29**. A posição

dos grupos metacrilóil em VN-1a e tigloil em VN-1b foi baseada na comparação dos valores de deslocamento químico destas substâncias com os da literatura.

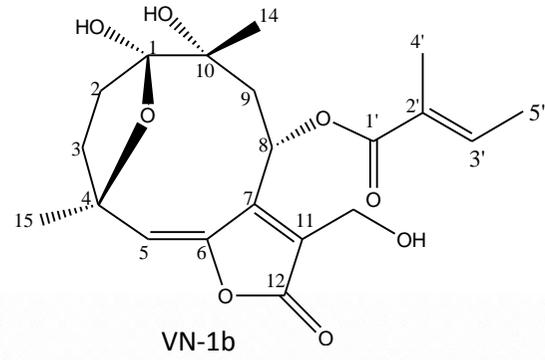
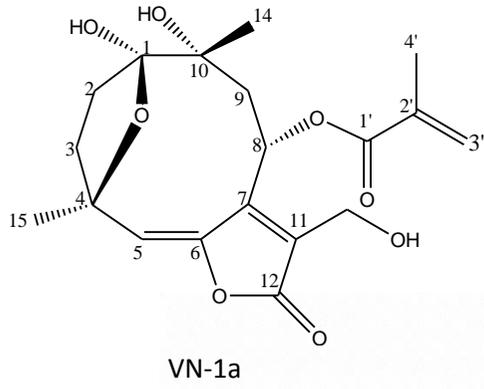


Figura 60: Espectro de HMBC (CDCl_3 , 75 MHz) de VN-1

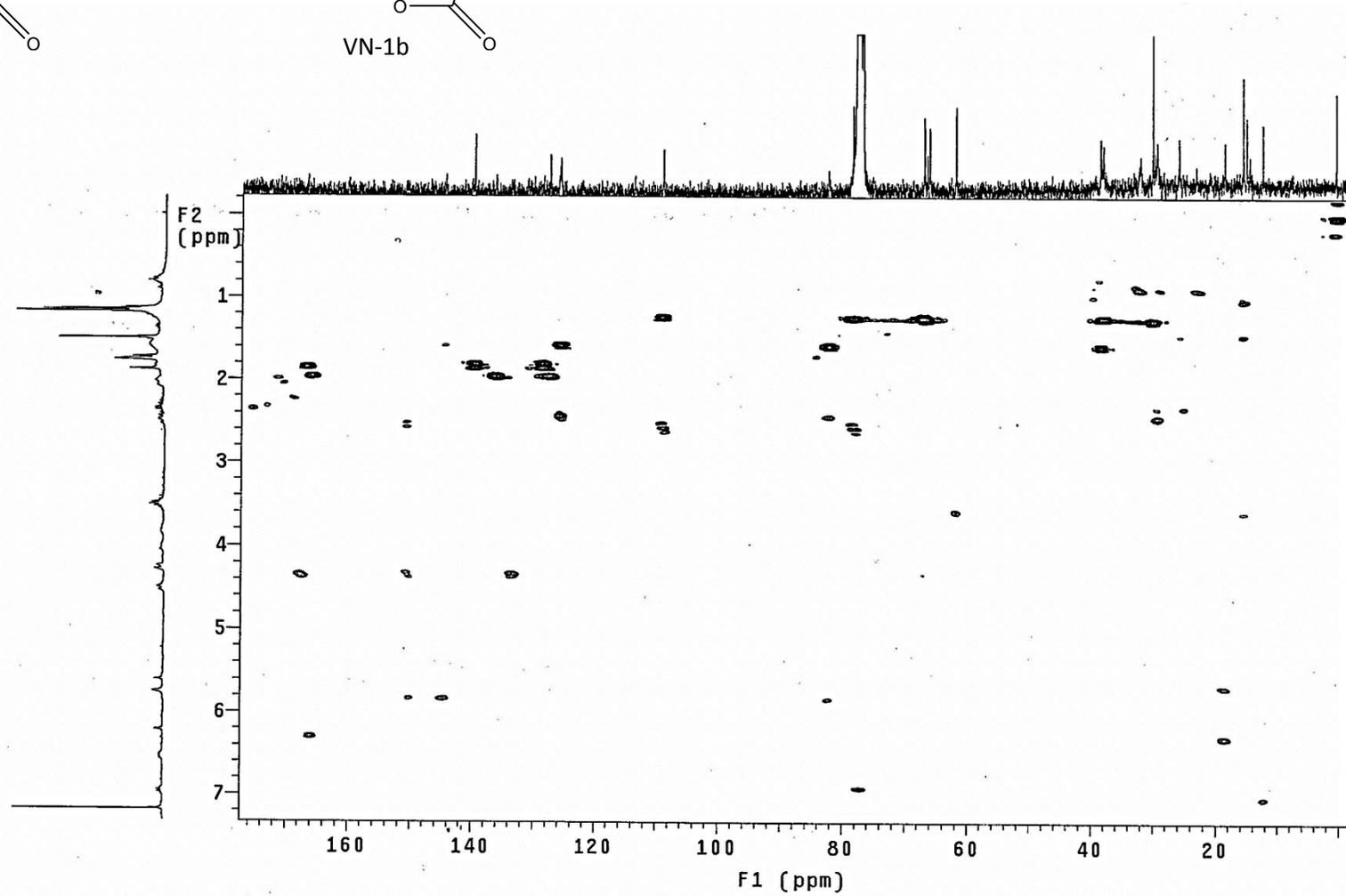
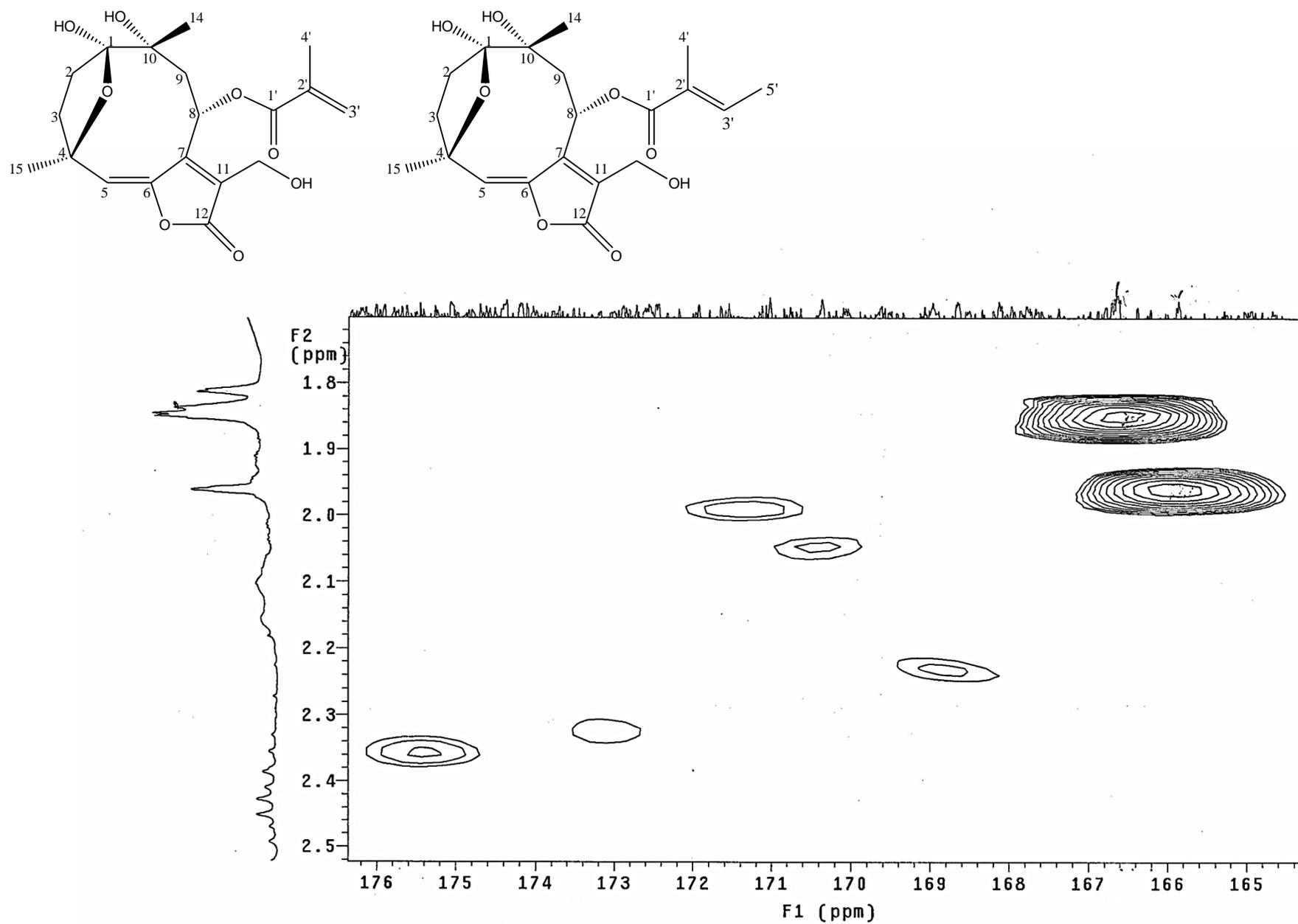


Figura 61: Espectro de HMBC (CDCl₃, 75 MHz) de VN-1

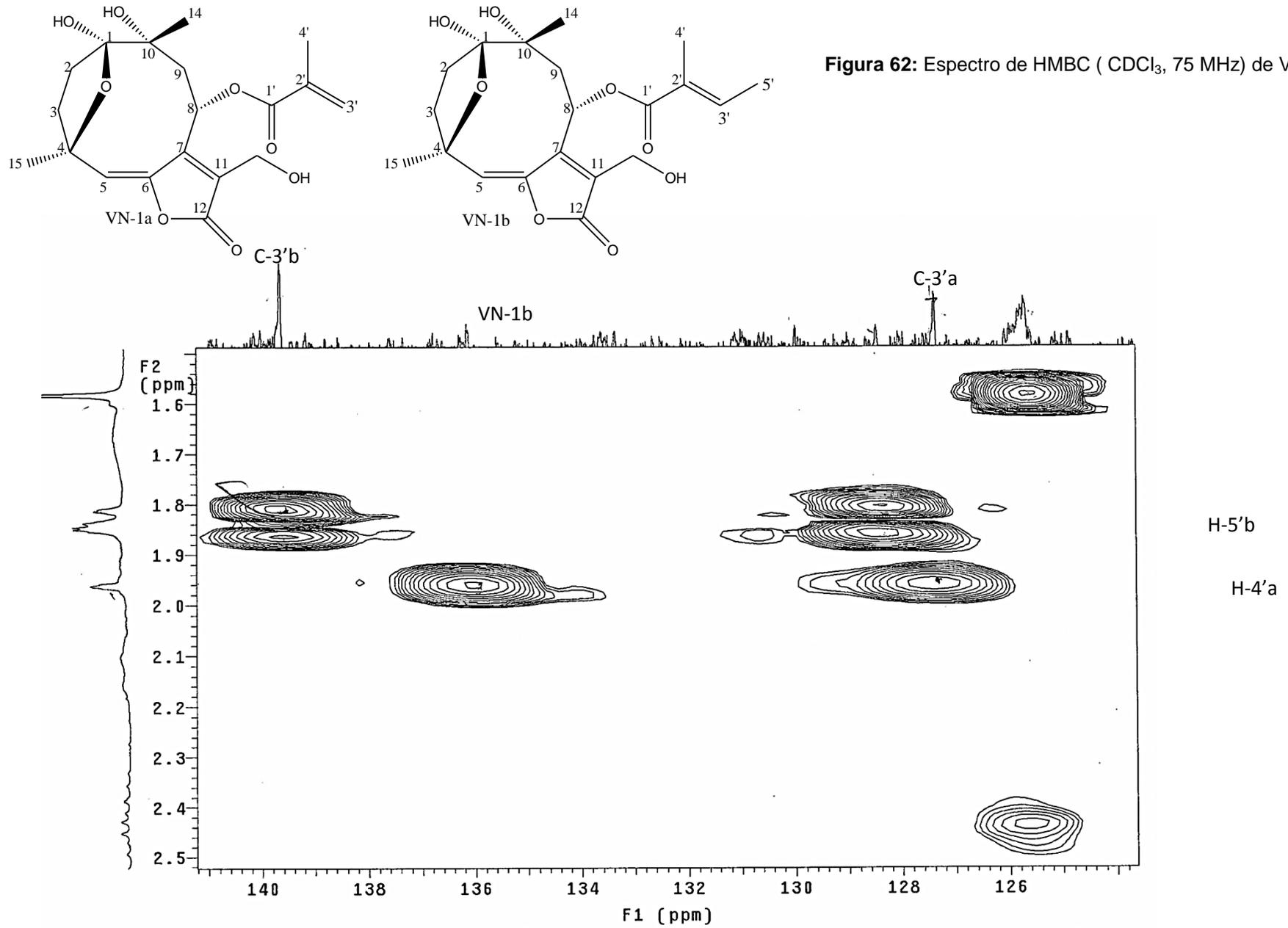
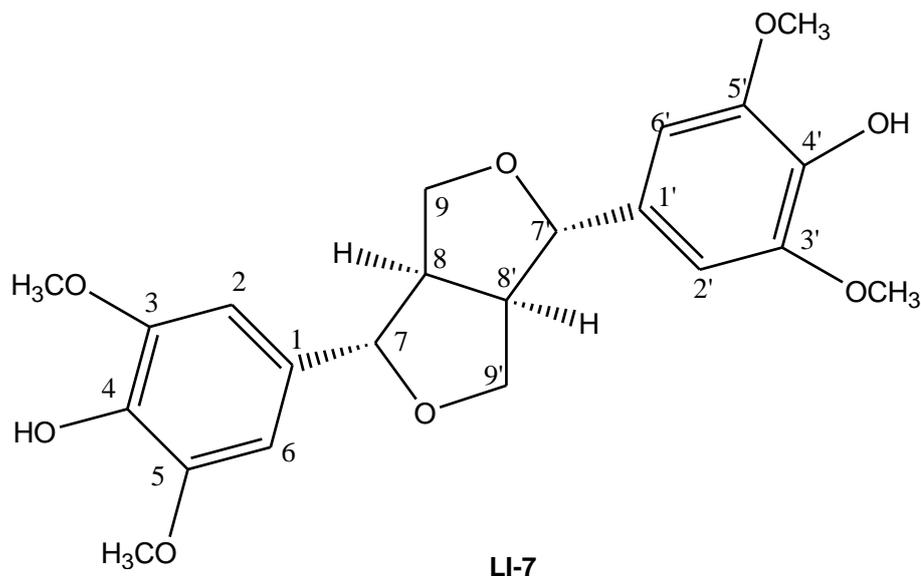


Tabela 29: Dados de RMN de ^{13}C e de HMBC das substâncias VN-1a e VN-1b

VN-1a		Correlações	VN-1b	
C	^{13}C		^{13}C	Correlações
1	108,8	H-14 e H-9	108,8	H-14 e H-9
2	31,9		31,9	-
3	38,3	H-15	38,3	H-15
4	82,2	H-15	82,2	H-15
5	125,7	H-15	125,7	H-15
6	155,5	-	144,6	-
7	144,4	H-5	150,2	H-5
8	66,0	-	66,0	-
9	37,9	H-14	37,9	H-14
10	78,3	H-14	78,3	H-14
11	133,6	-	133,6	-
12	167,4	H-13	167,4	H-13
13	61,8	-	61,8	-
14	25,7	-	25,7	-
15	29,2	-	29,2	-
1'	165,8	H-4'	166,6	H-5'
2'	136,1	H-4'	136,1	-
3'	127,3	H-4'	139,6	H-4' e H5'
4'	18,3	-	14,8	-
5'	-	-	12,2	-

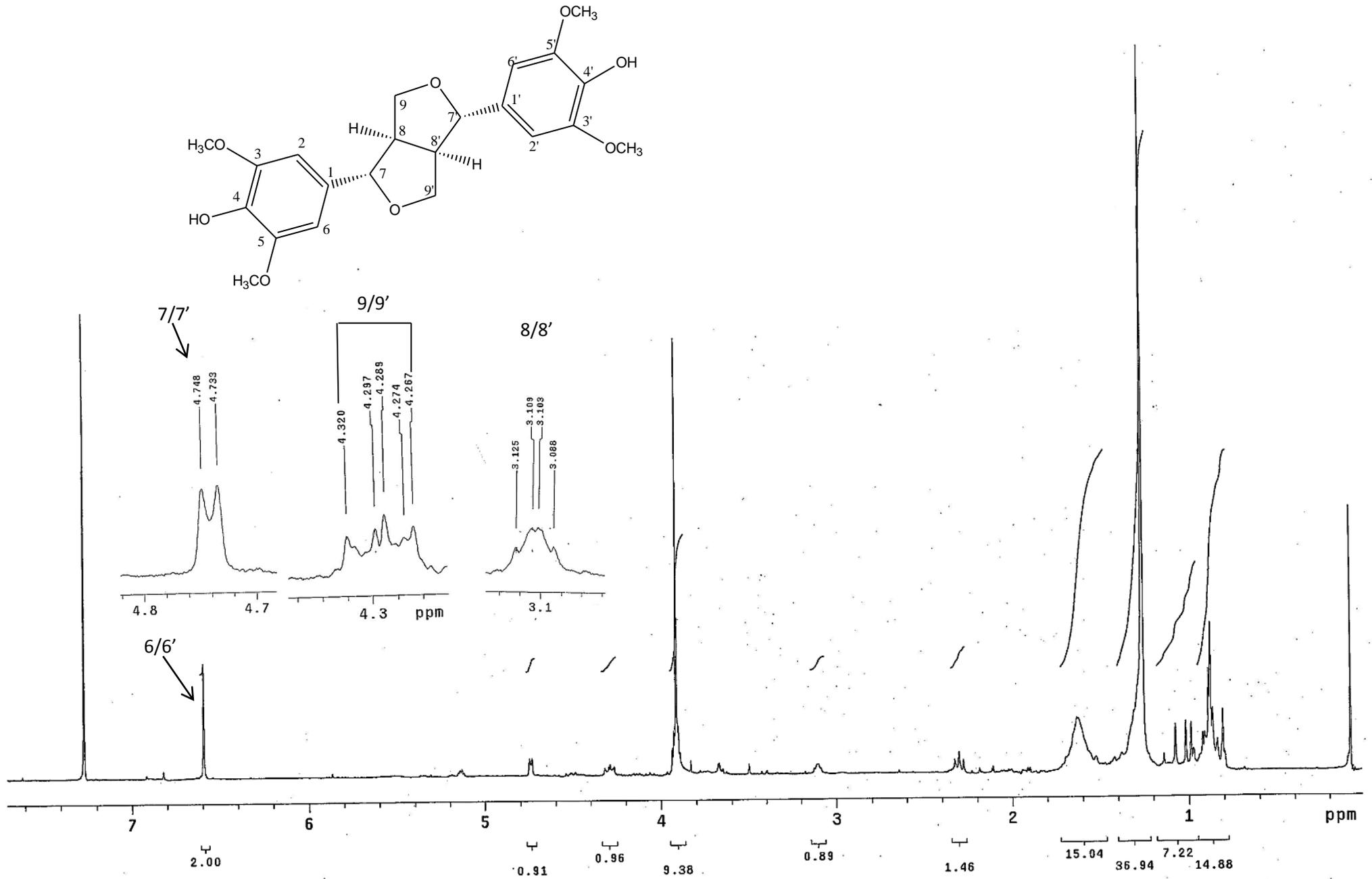
4.1.3-Outros metabólitos isolados de *Lessingianthus intermedius*, *Vernonanthura crassa* e *Vernonanthura nudiflora*.

4.1.3.1 – Substância LI-7



A substância **LI-7** foi isolada da fração diclorometano LI-DC-7.6.1 de *Lessingianthus intermedius* na forma de cristais incolores. O espectro de RMN ^1H desta substância (**Figura 63**) apresentou um duplete em δ_{H} 4,74 ($J=4,5\text{Hz}$) correspondente aos hidrogênios oximetínicos H-7/7', um multiplete em δ_{H} 3,91 e um duplo duplete em δ_{H} 4,29 ($J=9,3$ e $6,9$ Hz) referentes aos hidrogênios H-9/9', além de um multiplete em δ_{H} 3,08-3,12 correspondente aos hidrogênios H-8/8'. O simpleto em δ_{H} 3,91 foi atribuído aos grupos metoxila. A presença de um único sinal na região de sistema aromático em δ_{H} 6,59 (s) está de acordo com a existência de um plano de simetria na substância. GREGER e HOFER (1980) relatam que a semelhança magnética entre os hidrogênios H-7/7' se deve a presença de ambos no mesmo plano. Pelo espectro de COSY (**Figura 64**) é possível observar a correlação entre os hidrogênios em δ_{H} 4,74 (H-7/7') com os hidrogênios em δ_{H} 3,08-3,12 (H-8/8'), e destes últimos com os hidrogênios em δ_{H} 4,29 (H-9/9'). Todos esses dados corroboram para a proposta de um sistema com dois anéis tetrahidrofurânicos.

Figura 63: Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de LI-7



O espectro de RMN ^{13}C (**Figura 65**) em conjunto com o espectro de HSQC (**Figura 66**) mostrou sinais para carbonos sp^2 não hidrogenados em δ_{c} 147,3 (C-3/3' e C-5/5'), em δ_{c} 134,4(C-4/4') e em δ_{c} 132,2(C-1/1'), um sinal de carbonos metínicos em δ_{c} 102,8 (C-2/2' e C-6/6'), um sinal em δ_{c} 72,0 atribuído aos carbonos oximetilênicos (C-9/9') e um sinal de carbono metílico característico de grupo metoxila em δ_{c} 56,5.

Estes dados foram comparados aos descritos na literatura por MONTEIRO *et al.*, 2007 e possibilitaram a elucidação da estrutura da substância **LI-7** como sendo a lignana siringaresinol. (**Tabela 30**)

Tabela 30: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância LI-7 e para o siringaresinol.

Posição	LI-7 ^a		Siringaresinol ^b	
	δ_{H} (mult., J em Hz)	δ_{C}	δ_{H} (mult., J em Hz)	δ_{C}
1/1'		132,2		134,7
2/2'	6,59(s)	102,8	6,59(s)	103,6
3/3'		147,3		147,9
4/4'	-	134,4	-	131,4
5/5'		147,3		147,9
6/6''	6,59(s)	102,8	6,59(s)	103,6
7/7'	4,74(d, 4,5)	86,2	4,61 (d, 4,0)	85,3
8/8'	3,08-3,12(m)	54,5	3,04(m)	53,6
9eq/9'eq	4,29(dd, 9,3 e 6,9)	72,0	4,15 (dd, 5,0 e 7,0)	71,0
9ax	3,91(m)	72,0	3,77(dd, 3,5 e 7,0)	71,0
3-OCH ₃ /3'-OCH ₃	3,91(sl)	56,5	3,75(sl)	56,0
5-OCH ₃ /5'-OCH ₃	3,91(sl)	56,5	3,75(sl)	56,0

^a CDCl₃, ^b DMSO

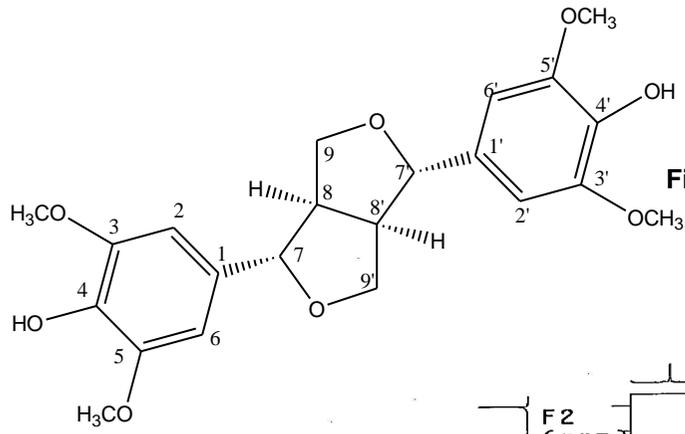


Figura 64: Espectro de COSY (CDCl₃, 300 MHz) de LI-7

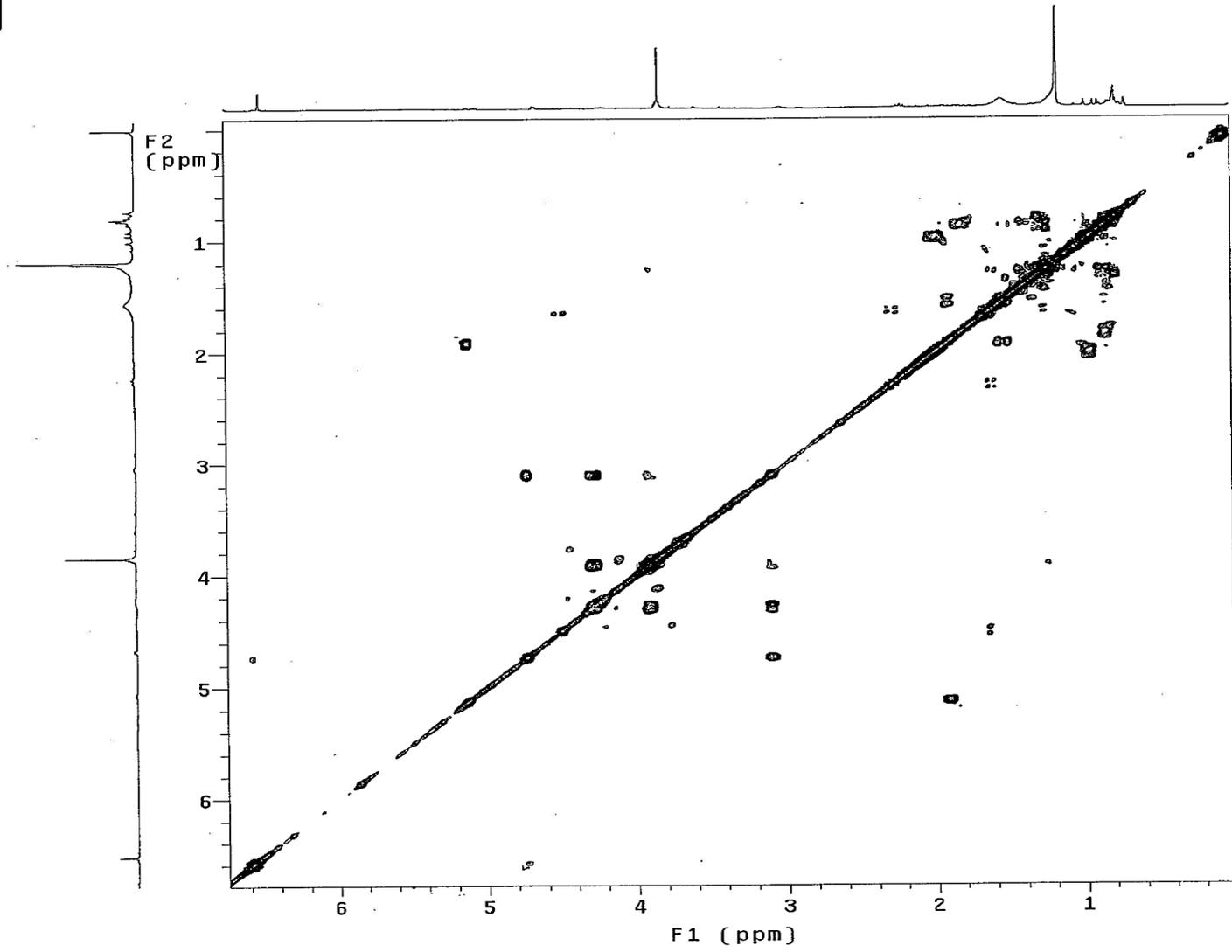


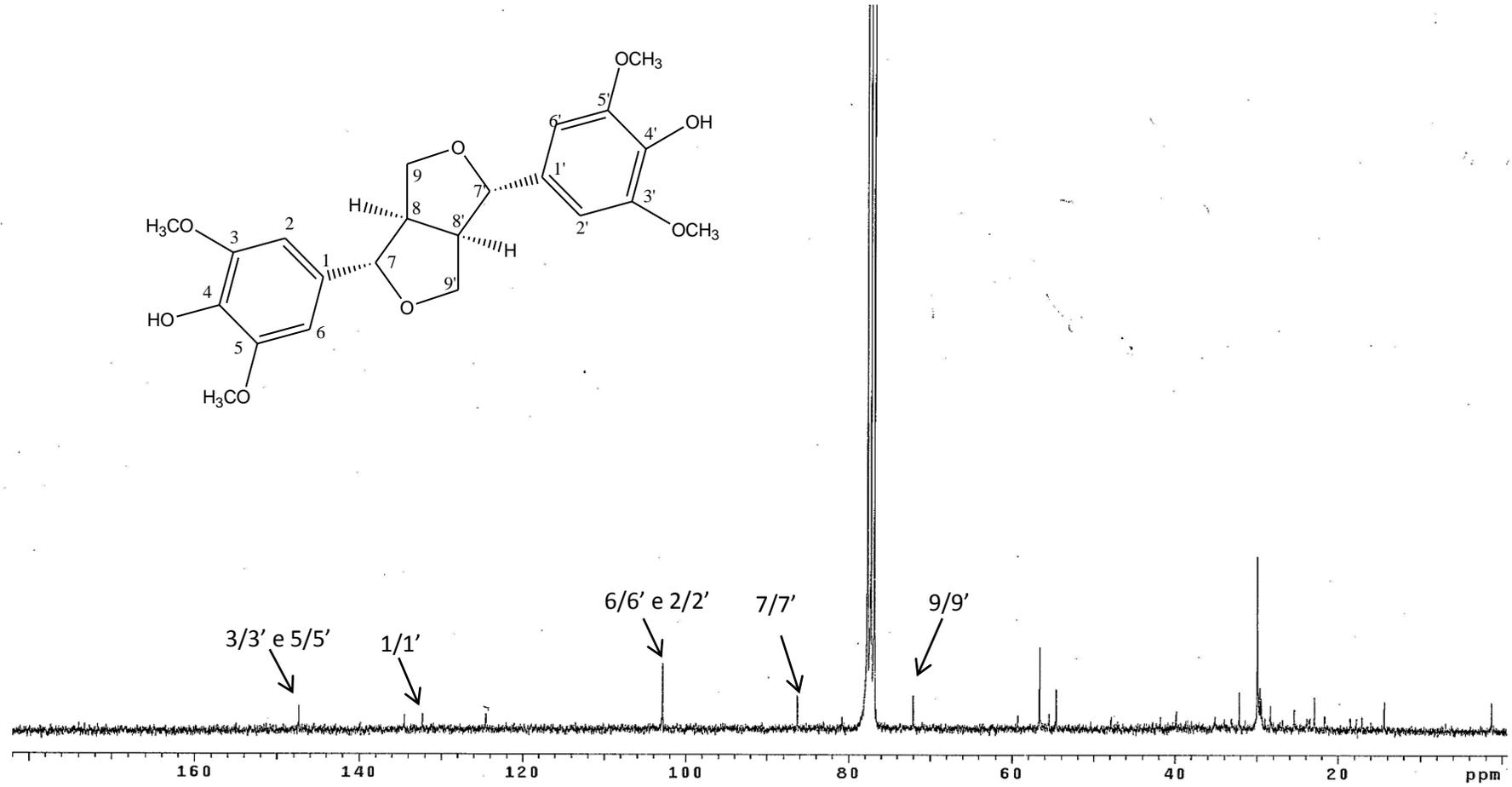
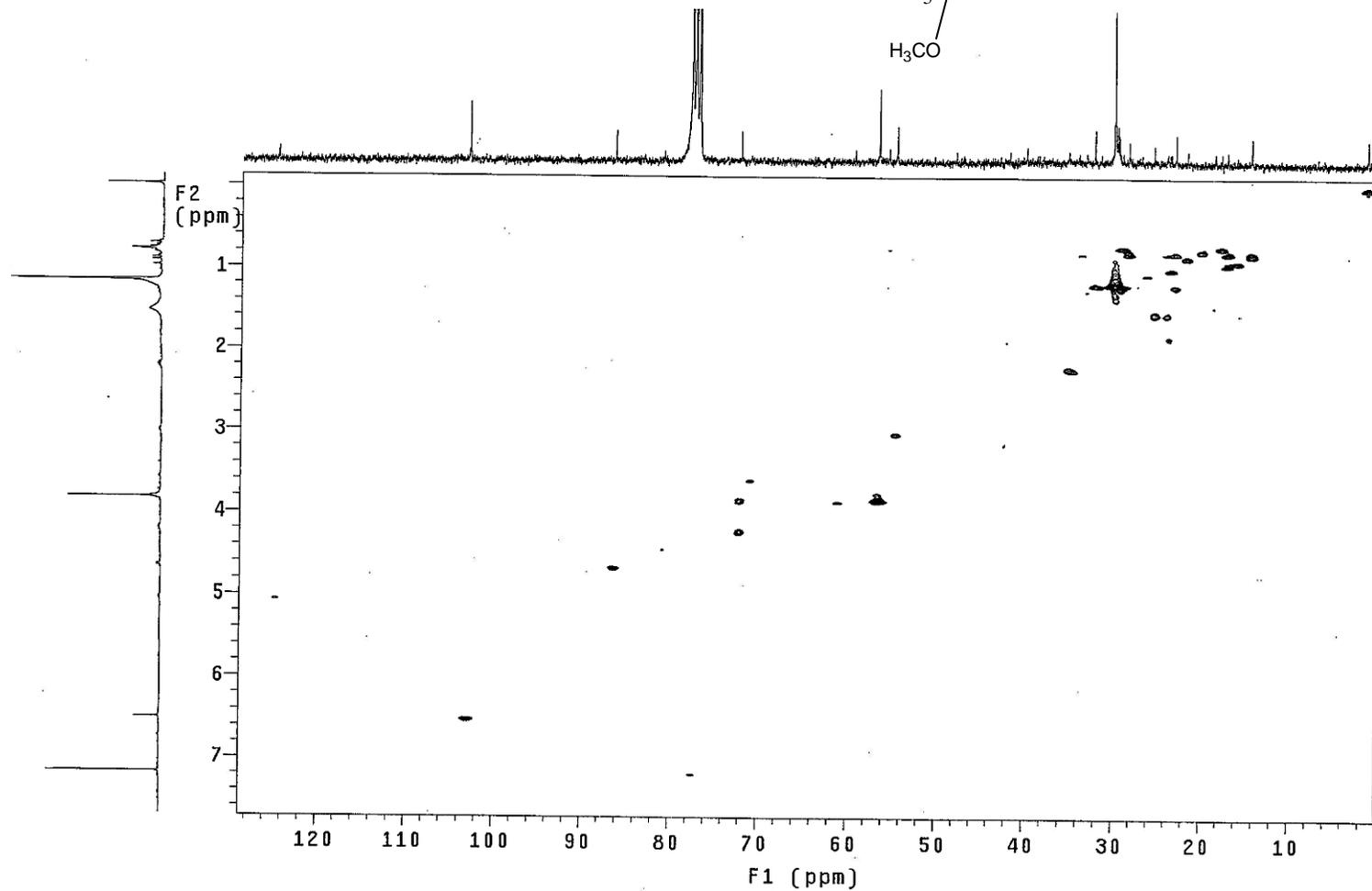
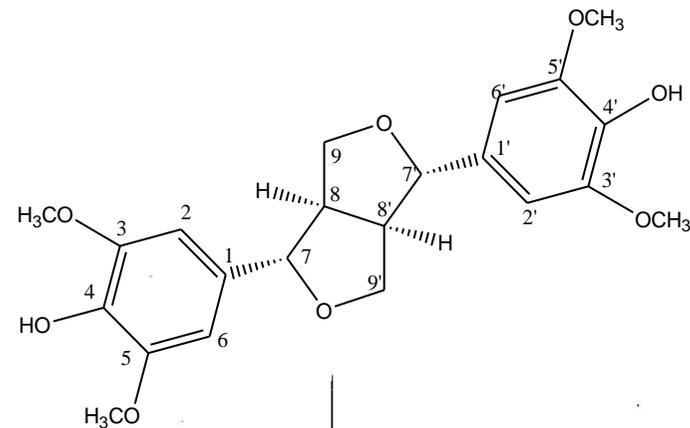
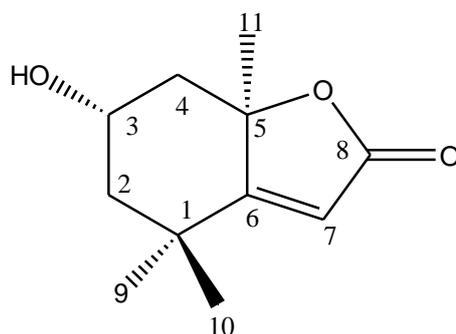
Figura 65: Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) de LI-7

Figura 66: Espectro de HSQC (CDCl₃, 75 MHz) de LI-7



4.1.3.2– Substância VC-2



VC-2

A substância codificada como **VC-2** foi isolada da fração diclorometano, na forma de cristais brancos de *Vernonanthura crassa*. A identificação de **VC-2** foi realizada baseada na comparação de seus dados de RMN de ^1H com os da literatura (CONEGERO *et al.*, 2003). O espectro de RMN ^1H (Figura 67) apresenta sinais correspondentes a 3 metilas em δ_{H} 1,28 (sl) H-9, δ_{H} 1,47 (sl) H-10 e δ_{H} 1,78 (sl) H-11, para um hidrogênio hidroximetínico em δ_{H} 4,33 (quint, $J=3,4\text{Hz}$) H-3, e para dois grupos de hidrogênios metilênicos em δ_{H} 1,53 (dd, $J=14,4$ e $3,6\text{ Hz}$) H-2a, δ_{H} 1,98 (dt, $J=14,7$ e $2,4\text{ Hz}$) H-2b e δ_{H} 1,79 Hz (dd, $J=13,0$ e $3,9\text{ Hz}$) H-4a/ δ_{H} 2,46 (dt, $J=14,1$ e $2,7\text{ Hz}$) H-4b e um hidrogênio vinílico em δ_{H} 5,70 (sl) H-7 (Tabela 31).

Os valores das constantes de acoplamento dos hidrogênios em δ_{H} 1,98 (H-2b) e δ_{H} 2,46 (H-4b) de J (2,4-2,7 Hz) mostram que os mesmos estão em posição equatorial. (Tabela 31, Figura 67).

A análise destes sinais e a comparação com os dados da literatura (CONEGERO *et al.*, 2003) resultou na identificação de VC-2 como sendo a lolilida

Figura 67: Espectro de ^1H (CDCl_3 , 300 Mz) de VC-2

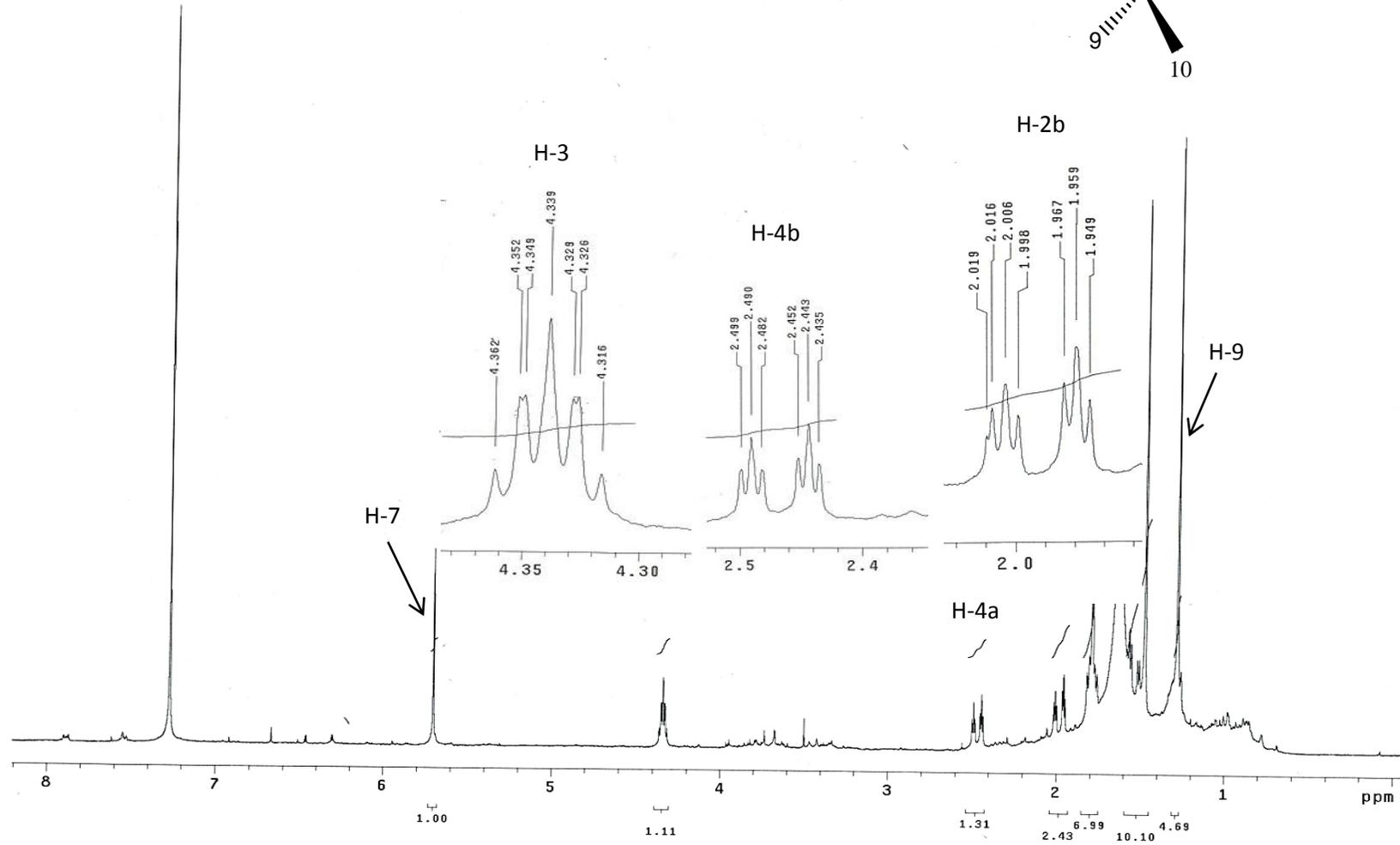
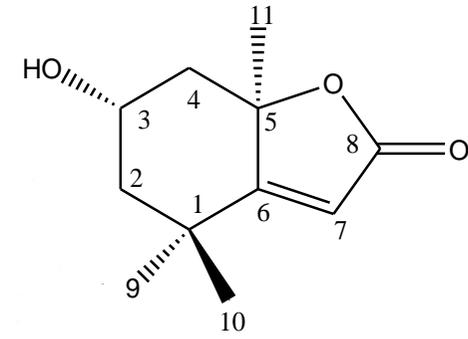


Tabela 31: Dados de RMN de ^1H da substância VC-2 e loliolida.

	VC-2 ^a	Loliolida ^a
H	δ_{H} (mult., J)	δ_{H} (mult., J)
1	-	-
2a	1,53(dd, J=14,4 e 3,6 Hz)	1,53 (dd, J=14,4 e 3,5 Hz)
2b	1,98(dt, J=14,7 e 2,4 Hz)	1,98 (dt, J= 14,6 e 2,6Hz)
3	4,33(quint, J=3,4 Hz)	4,33 (quint, J=3,5 Hz)
4a	1,79(dd, J= 13,0 e 3,9 Hz)	1,79 (dd, J=14,0 e 3,5 Hz)
4b	2,46 (dt, J=14,1 e 2,7 Hz)	2,46 (dt, J=14,0 e 2,7 Hz)
5		
6		
7	5,70(sl)	5,70 (s)
8		
9	1,28 (sl)	1,27(sl)
10	1,47(sl)	1,47(sl)
11	1,78(sl)	1,78 (sl)

^a CDCl_3

4.1.3.3– Mistura LI-8

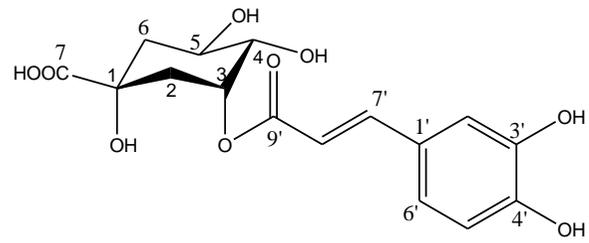
A mistura codificada como (LI-8) foi isolada da fração hidrometanólica como um sólido marrom escuro e caracterizada como sendo os ácidos clorogênicos ácido 3-O-cafeoilquínico (LI-8a), ácido 4-O-cafeoilquínico (LI-8b), e ácido 5-O-cafeoilquínico (LI-8c), através da comparação dos dados espectroscópicos de RMN com os descritos na literatura FERNANDES (2010); BAJKO *et al.*(2015) e LIU *et al.*(2013).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 67) da mistura apresentou sinais característicos de sistemas aromáticos em δ_{H} 7,03 (sl), 6,98 (sl), e 6,77(d, $J=8,4\text{Hz}$) (Tabelas 32, 33 e 34) e sinais característicos de uma unidade cafeoíla, devido à presença de dois dupletos em δ_{H} 7,48 ($J=15,3\text{Hz}$) e 6,21 ($J=15,3\text{Hz}$) referentes a hidrogênios olefínicos em posição *trans*. O espectro de RMN de ^1H exibiu ainda sinais em δ_{H} 5,20, 3,85, 5,38 e 4,96 característicos de hidrogênios oximetínicos.

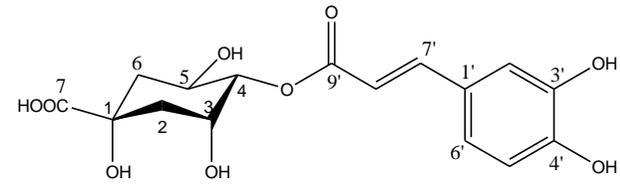
Pelo espectro de RMN de ^{13}C em conjunto com os experimentos de DEPT e HSQC (Figuras 68,69 e 70) foi possível confirmar a presença da unidade cafeoila pelos sinais correspondentes ao anel benzênico em δ_{C} 125,6;114,8;148,4;148,5;115,8 e 121,4, e ao sistema carbonílico α , β -insaturado conjugado ao anel em δ_{C} 165,7; 145,6 e 114,2. Além destes, observou-se também sinais de carbonos oximetínicos em δ_{C} 75,4; 74,8; 73,0 e 68,3 e sinais de carbonos metilênicos em δ_{C} 37,5; 35,8 e 34,1. Estes sinais, em conjunto com o sinal para carbono de carboxila em δ_{C} 175,1, confirmam a presença da unidade de ácido quínico. Os sinais oximetínicos e metilênicos foram atribuídos pelo HSQC (Figuras 71-73) porque não apareceram ou estavam em intensidade baixa no espectro de RMN de ^1H provavelmente devido a mistura e variação da posição do grupo cafeoíla na unidade do ácido quínico.

Pelo número e intensidade dos sinais referentes aos carbonos metilênicos verificou-se que se tratava de uma mistura de isômeros. As correlações observadas no espectro de HMBC (Figura 72) entre os hidrogênios em δ_{H} 7,48 (H-7') e δ_{H} 6,21 (H-8') com o carbono em δ_{C} 165,7(C-9'), confirmaram o sistema carbonílico α , β -insaturado conjugado ao anel.

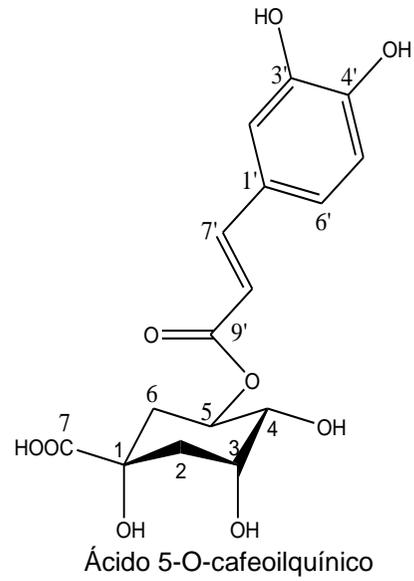
As posições dos grupos cafeoíla foram determinadas com base nos valores de deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono, além dos valores de J para as posições-3, -4 e -5 e, comparação destes com os da literatura para os ácidos: 3-O-cafeoilquínico (FERNANDES, 2010) , 4-O-cafeoilquínico (LIU *et al.*,2013) e 5-O-cafeoilquínico (BAJKO *et al.*,2015) (Tabelas 32, 33 e 34).



Ácido 3-O-caffeoilquínico



Ácido 4-O-caffeoilquínico



Ácido 5-O-caffeoilquínico

Figura 69: Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO, 75,5 Mz) de LI-8

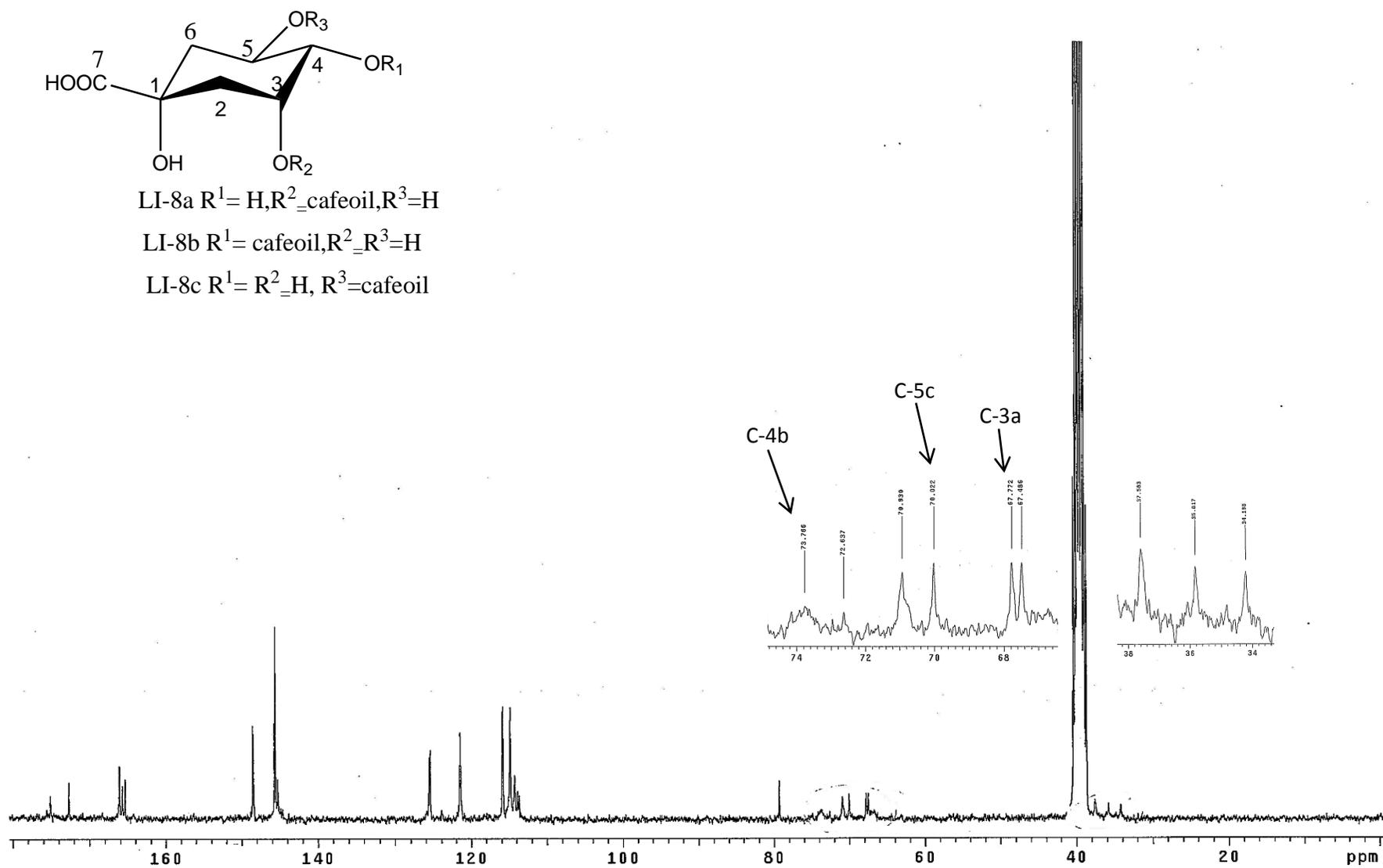
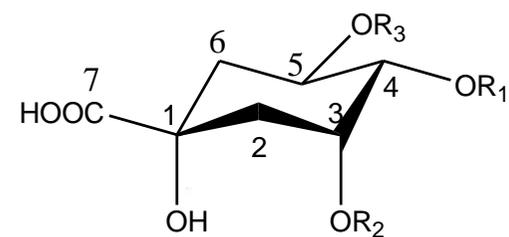


Figura 70: Espectro de DEPT (DMSO, 75,5 Mz) de LI-8

LI-8a $R^1 = H, R^2 = \text{cafeoil}, R^3 = H$

LI-8b $R^1 = \text{cafeoil}, R^2 = R^3 = H$

LI-8c $R^1 = R^2 = H, R^3 = \text{cafeoil}$

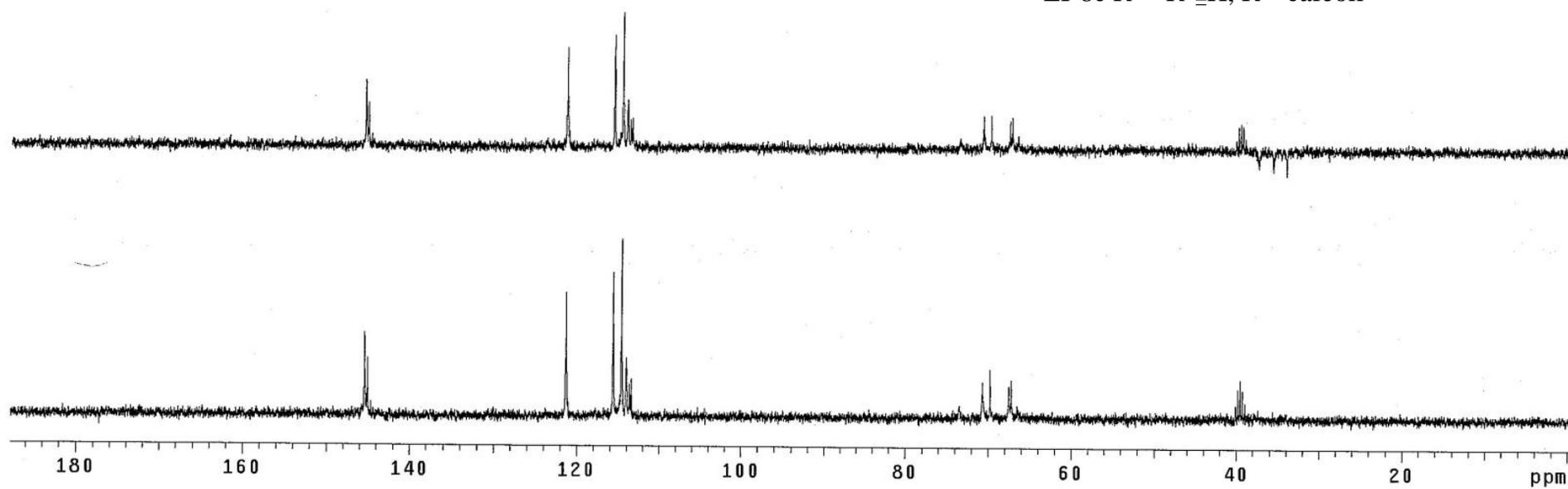
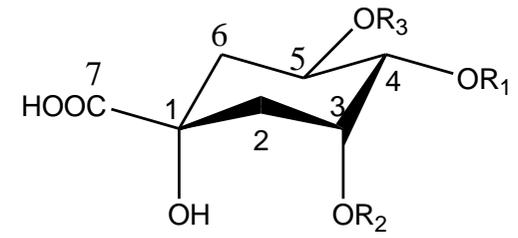


Figura 71: Espectro de HSQC (DMSO, 75,5 Mz) de LI-8



LI-8a R¹= H, R²=cafeoil, R³=H

LI-8b R¹= cafeoil, R²=R³=H

LI-8c R¹= R²=H, R³=cafeoil

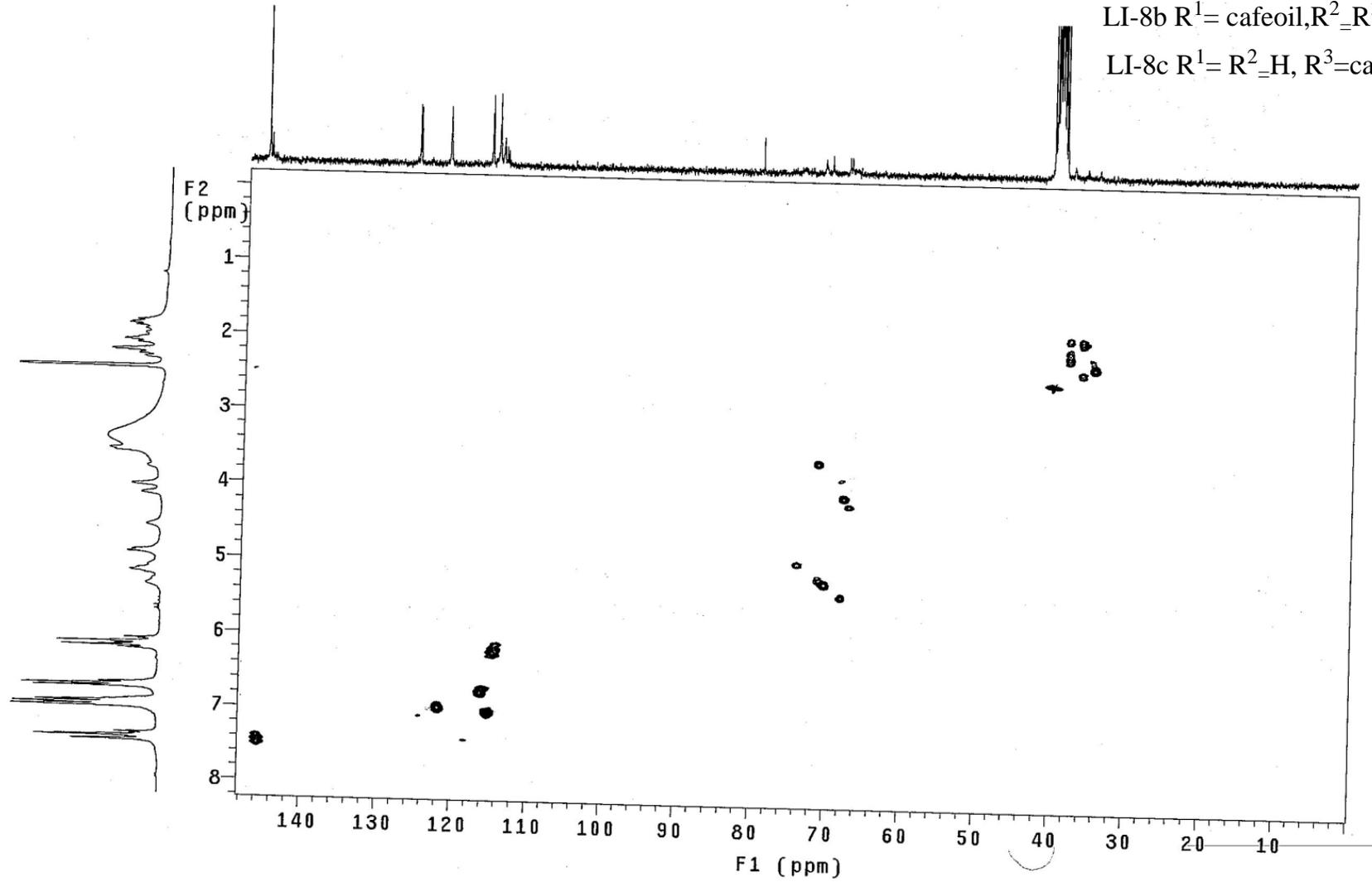
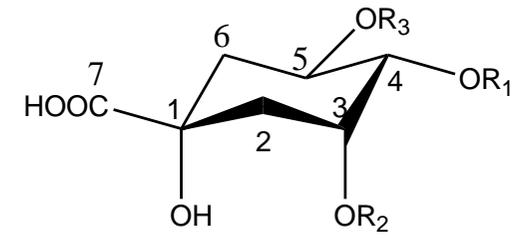


Figura 72: Expansão do espectro de HSQC (DMSO, 75,5 Mz) de LI-8



LI-8a $R^1 = H, R^2 = \text{cafeoil}, R^3 = H$

LI-8b $R^1 = \text{cafeoil}, R^2 = R^3 = H$

LI-8c $R^1 = R^2 = H, R^3 = \text{cafeoil}$

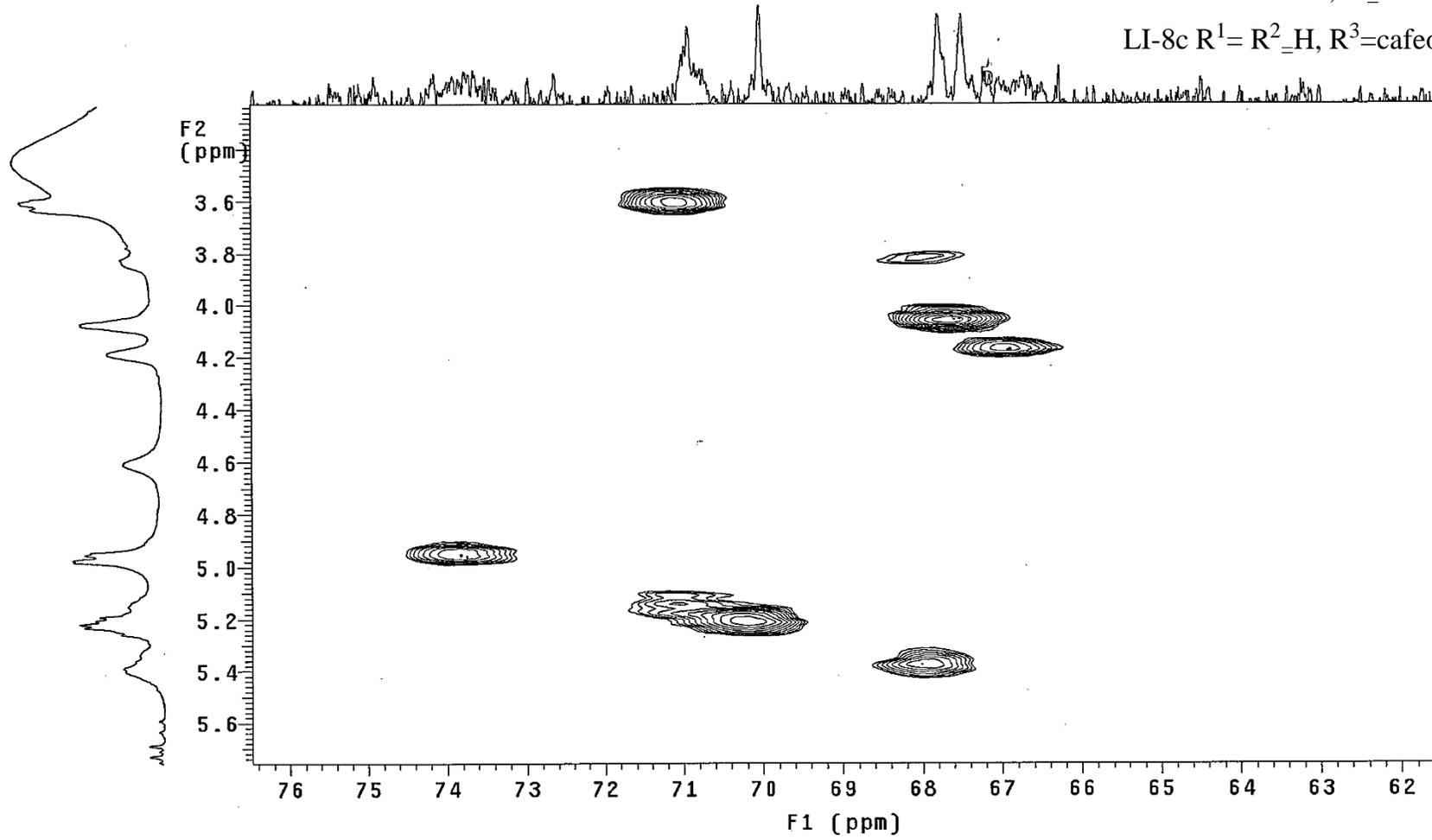
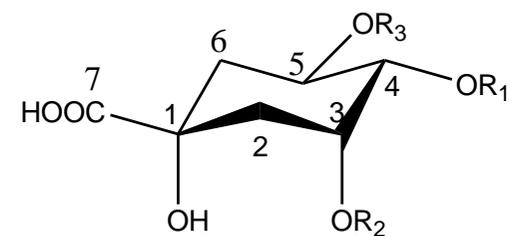


Figura 73: Expansão do espectro de HSQC (DMSO, 75,5 Mz) de LI-8



LI-8a $R^1 = H, R^2 = \text{cafeoil}, R^3 = H$

LI-8b $R^1 = \text{cafeoil}, R^2 = R^3 = H$

LI-8c $R^1 = R^2 = H, R^3 = \text{cafeoil}$

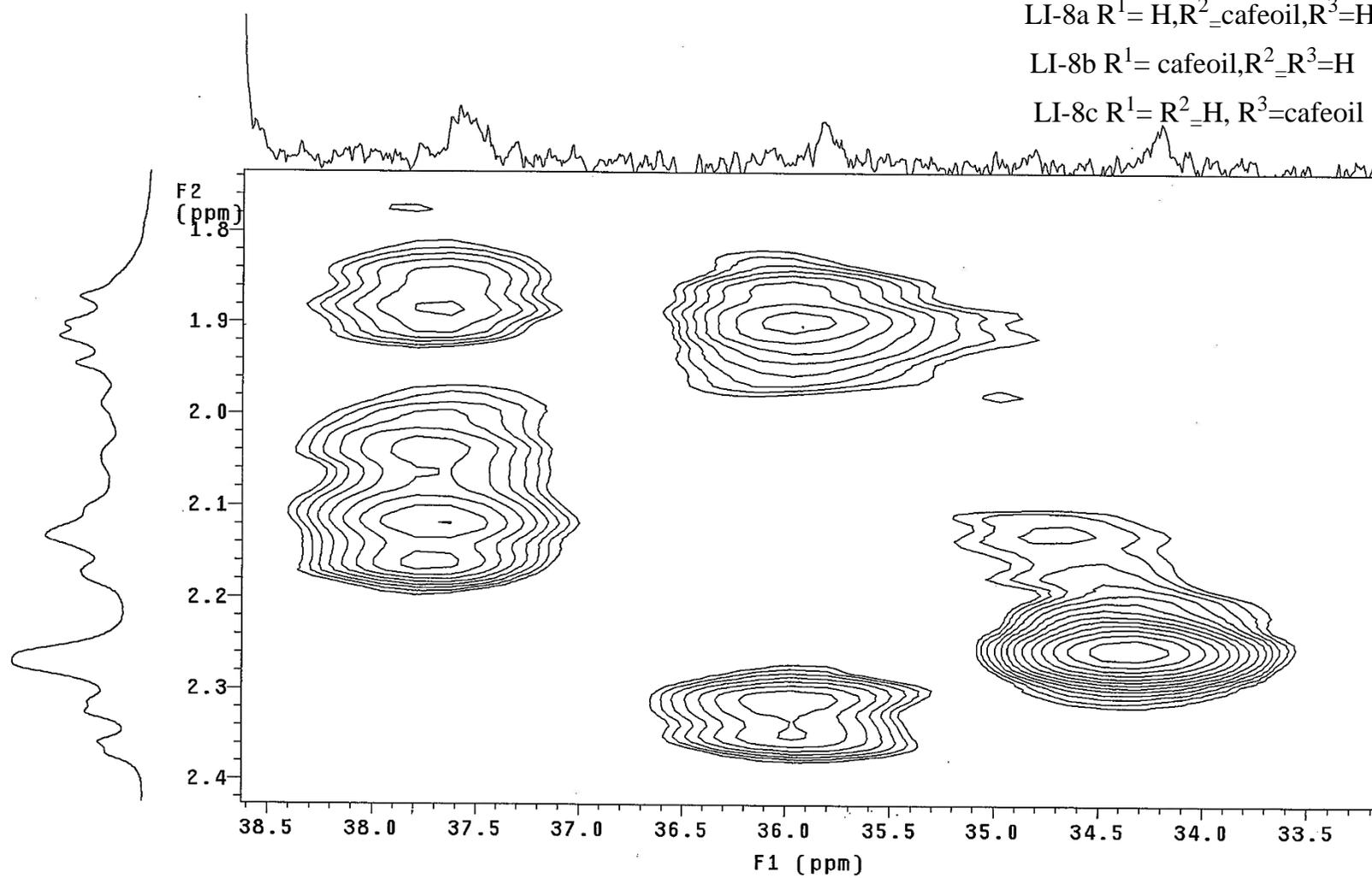
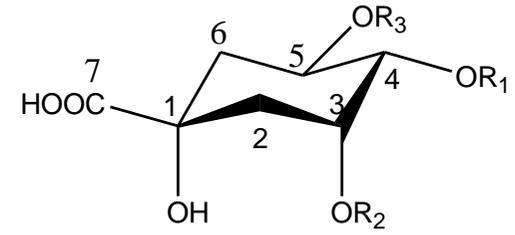


Figura 74: Espectro de HMBC (DMSO, 75,5 Mz) de LI-8



LI-8a $R^1 = H, R^2 = \text{cafeoil}, R^3 = H$

LI-8b $R^1 = \text{cafeoil}, R^2 = R^3 = H$

LI-8c $R^1 = R^2 = H, R^3 = \text{cafeoil}$

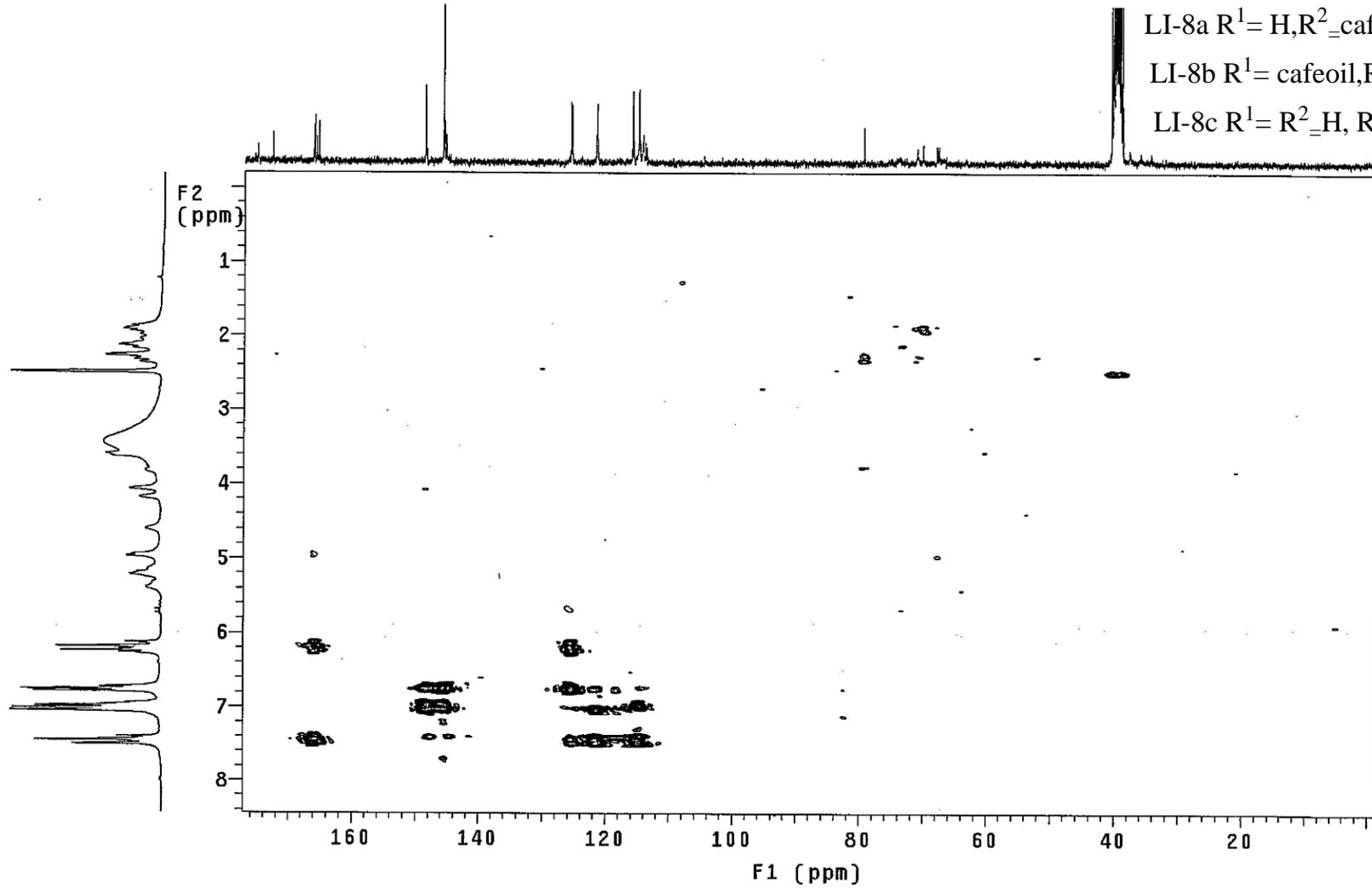
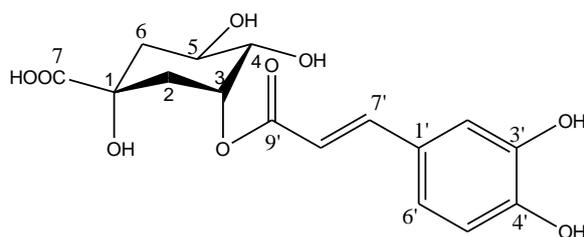


Tabela 32: Dados de RMN de ^1H de ^{13}C de LI-8a (DMSO) e do Ácido 3-O-cafeoilquínico (CD_3OD)

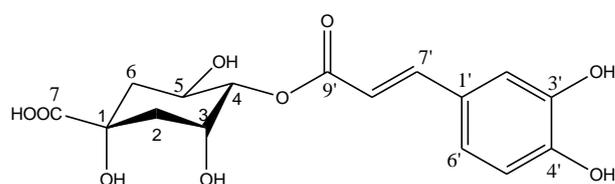
LI-8a			Ácido 3-O-cafeoilquínico	
Posição	δ_{H} (mult., J em Hz)	δ_{C}	δ_{H} (mult., J em Hz)	δ_{C}
1	- 2,13(m)	73,7	-	72,9
2	1,87(m)	37,5	1,97-2,01 (m)	35,1
3	5,38 (m)	67,7	5,17 (m)	70,9
4	3,60-3,62(m)	70,9	3,53 (d ; 4,0)	71,2
5	4,18 (m)	66,8	3,85 (m)	67,2
6	2,31(m) 1,91(m)	35,8	- 1,83-1,91 (m)	39,0
7	-	175,1	-	176,1
1'	-	125,6	-	125,7
2'	6,9 (sl)	114,8	7,00 (d ; 2,0)	114,5
3'	-	148,4	-	145,5
4'	-	148,5	-	148,9
5'	6,77(d, $J=8,4$)	115,8	6,75 (d ; 8,0)	115,7
6'	7,03 (sl)	121,4	6,95 (dd ; 8,0; 2,0)	121,0
7'	7,48 (d, $J=15,3$)	145,6	7,44 (d ; 16,0)	144,3
8'	6,21 (d, $J=16,2$)	114,2	6,19 (d ; 16,0)	115,0
9'	-	165,7	-	166,0



Ácido 3-O-cafeoilquínico

Tabela 33: Dados de RMN de ^1H de ^{13}C de LI-8b (DMSO) e do Ácido 4-O-cafeoilquínico (CD_3OD)

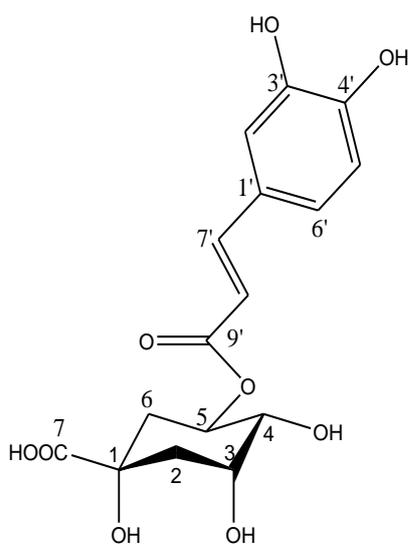
	LI-8b		Ácido 4-O-cafeoilquínico ^a	
Posição	$\bar{\delta}_\text{H}$ (mult., J em Hz)	$\bar{\delta}_\text{C}$	$\bar{\delta}_\text{H}$ (mult., J em Hz)	$\bar{\delta}_\text{C}$
1	-	79,3	-	75,4
2	2,13(m)			
	1,87(m)	37,5	1,95-2,20 (m)	38,1
3	4,07 (sl)	67,7	4,24 (m)	67,2
4	4,96 (dd, $J=8,2; 3,0$)	73,7	4,84(dd, $J=9,6; 2,4$)	73,6
5	4,18 (m)	66,8	4,24 (m)	68,8
	1,91(m)			
6	2,31(m)	35,8	1,95-2,20 (m)	37,8
7		175,1		175,2
1'	6,9 (sl)	125,6		127,6
2'	6,9 (sl)	114,8	7,06 (1H, s)	115,2
3'		148,4		146,7
4'		148,5		149,8
5'	6,77(d, $J=8,4$)	115,8	6,76 (d, $J=7,8$)	116,6
6'	7,03 (sl)	121,4	6,98 (d, $J=7,8$)	123,0
7'	7,48(d, $J=15,3$)	145,6	7,63 (d, $J=15,6$)	147,2
8'	6,21 (d, $J=16,2$)	114,2	6,37 (1H, d, $J=15,6$)	115,0
9'		165,7		168,3



Ácido 4-O-cafeoilquínico

Tabela 34: Dados de RMN de ^1H de ^{13}C de LI-8c (DMSO) e do Ácido 5-O-cafeoilquínico (DMSO)

Posição	LI-8c		Ácido 5-O-cafeoilquínico ^a	
	δ_{H} (mult., <i>J</i> em Hz)	δ_{C}	δ_{H} (mult., <i>J</i> em Hz)	δ_{C}
1	-	73,7	-	73,6
2ax	2,13(m)		2,03 (dd, <i>J</i> = 13,1; 2,9 Hz)	
2eq	1,87(m)	37,5	1,80 (dd, <i>J</i> = 13,1; 7,7 Hz,)	37,3
3	4,07 (sl)	67,4	3,94 (ddd, 7,7; 2,9; 2,9 Hz)	68,2
4	3,60-3,62(m)	70,9	3,58(dd, <i>J</i> = 6,9; 2,9 Hz,)	70,5
5	5,20 (ddd, <i>J</i> =8,7; 8,7;4,5)	70,0	5,08 (ddd, <i>J</i> = 6,9; 6,8; 4,2 Hz)	71,0
6ax	2,31(m)		2,01 (dd, <i>J</i> = 13,3; 6,8 Hz)	
6eq	1,91(m)	35,8	1,96 (dd, <i>J</i> = 13,3; 4,2 Hz)	36,4
7	-	175,1	-	175,0
1'	-	125,6	-	125,7
2'	6,98 (sl)	114,8	7,04 (d, <i>J</i> = 2,0 Hz, H-2)	114,9
3'	-	148,4	-	145,6
4'	-	148,5	-	148,4
5'	6,77(d, <i>J</i> =8,4)	115,8	6,77 (d, <i>J</i> = 8,2 Hz)	115,9
6'	7,03 (sl)	121,4	6,98 (dd, <i>J</i> = 8,2;2,0 Hz)	121,5
7'	7,48(d, <i>J</i> =15,3)	145,6	7,43 (d, <i>J</i> = 15,9 Hz)	145,0
8'	6,21 (d, <i>J</i> =16,2)	114,2	6,16 (d, <i>J</i> = 15,9 Hz)	114,4
9'	-	165,7	-	165,9



Ácido 5-O-cafeoilquínico

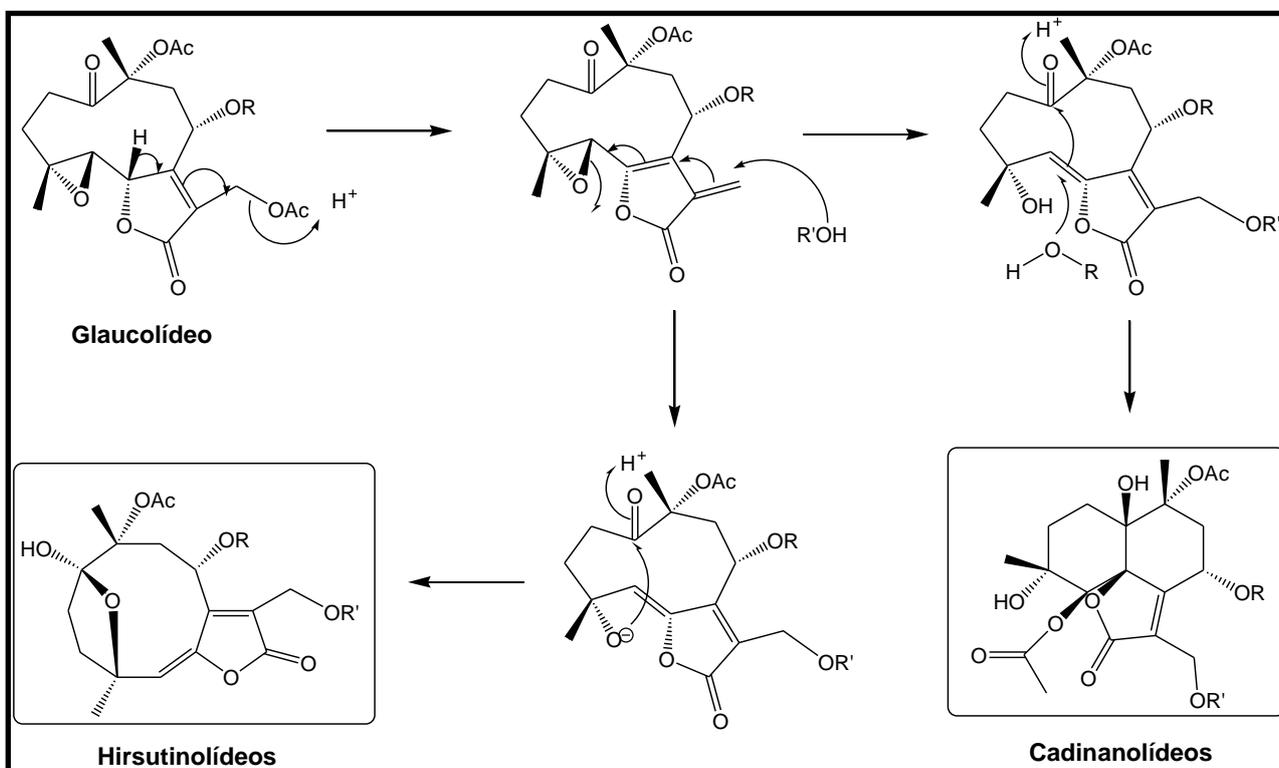
4.2- Método quimiométrico-PCA

Como discutido anteriormente, neste trabalho foram isoladas lactonas sesquiterpênicas da classe dos hirsutinólídeos (**LI-5**, **LI-6**, **VN-1a**, **VN-1b** e **VC-1**), e, também uma com o esqueleto cadinanolídeo (**LI-4**).

Segundo MARTINEZ-VASQUEZ et al (1992), hirsutinólídeos e cadinanolídeos podem ser artefatos resultantes da transformação do glaucólídeo A, uma molécula isolada de várias espécies de Vernônias, por rearranjo catalisado por sílica gel sob condições de reação que se assemelham ao procedimento habitual para o isolamento de metabólitos de material vegetal (**Figura 75**)

Por outro lado, alguns autores relatam que hirsutinólídeos são produtos naturais porque foram detectados em frações antes da purificação por cromatografia em coluna de sílica gel com metanol, e também sem a utilização de sílica gel, e na ausência de metanol ou etanol (KOS et al., 2006).

Figura 75: Transformação de glaucólídeo em cadinanolídeo e hirsutinólídeo.



Diante deste contexto, em nosso trabalho realizamos análise dos componentes principais PCA (Principal Component Analysis) da fração diclorometano (**LI-DC**) de *Lessingianthus intermedius* e das substâncias **LI-4** e **LI-5**, isoladas dessa fração. O PCA trata-se de um método de reconhecimento de padrões não supervisionado capaz de transformar uma tabela de dados experimentais em gráficos informativos acerca da similaridade entre as amostras e as respectivas variáveis responsáveis por isso.

O primeiro passo para a realização da PCA consistiu em normalizar os espectros para retirar as influências das diferenças de concentração utilizada no preparo das amostras. A **Figura 76** apresenta os espectros de RMN de ^1H antes e após a normalização.

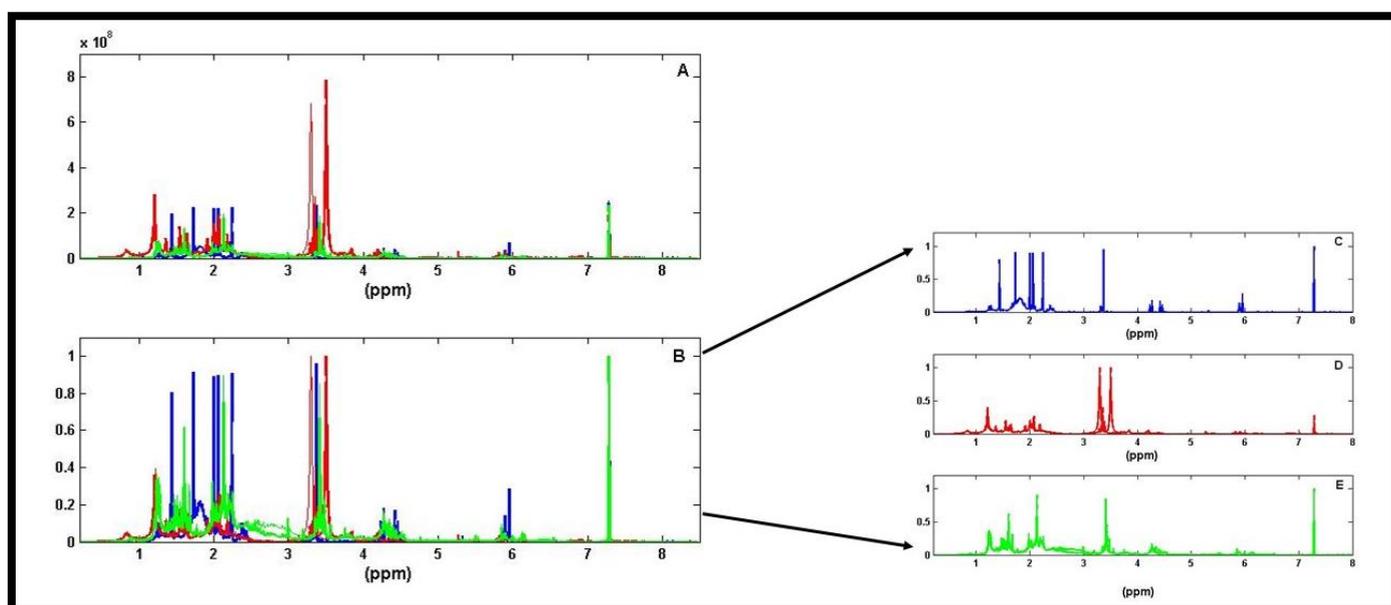
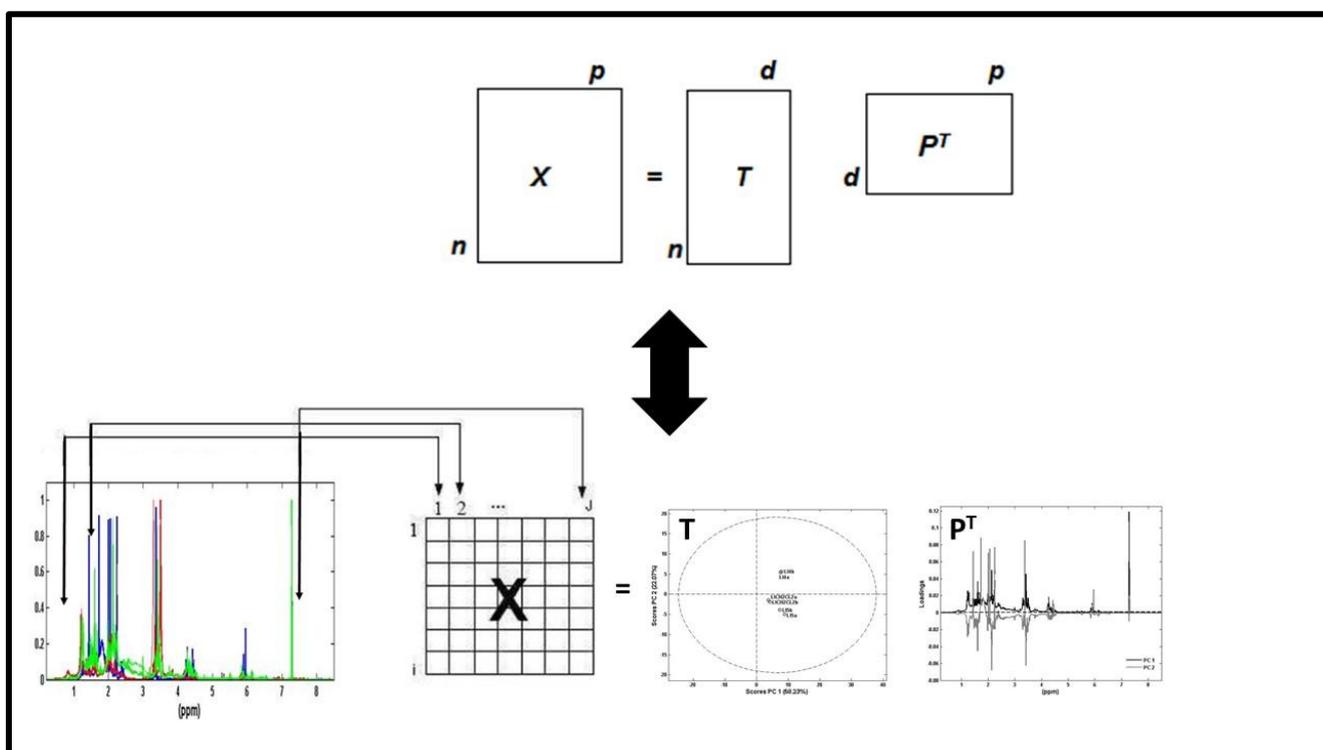


Figura 76. Espectros de RMN ^1H . (A) Antes da normalização. (B) Após a normalização. (C) Espectro normalizado para o composto LI-4. (D) Espectro normalizado para a fração LI-DC. (E) Espectro normalizado para o composto LI-5. (—) composto LI-4; (—) fração LI-DC; (—) composto LI-5.

A **Figura 77** apresenta o processo para realização da PCA. Primeiramente, os espectros são organizados no formato de uma matriz **X**. Para tanto, cada linha da matriz **X** contém um espectro enquanto cada coluna da matriz **X** apresenta as informações dos diferentes deslocamentos químicos observados no espectro de RMN ^1H . O princípio da PCA, segundo WOLD

(1987), consiste em decompor a matriz X em um produto de duas outras matrizes, uma matriz denominada de *scores* (T) e outra chamada de *loadings* (P^T) e isso acontece quando novos eixos, denominados componentes principais (PCs), são calculados. A matriz de *scores* carrega informações acerca das amostras, ou seja, das linhas da matriz X , enquanto que os *loadings* fornecem informações sobre as variáveis, ou colunas de X . Os resultados da decomposição da matriz X em *scores* e *loadings* podem ser interpretados graficamente (VALDERRAMA, *et al.*,(2015)

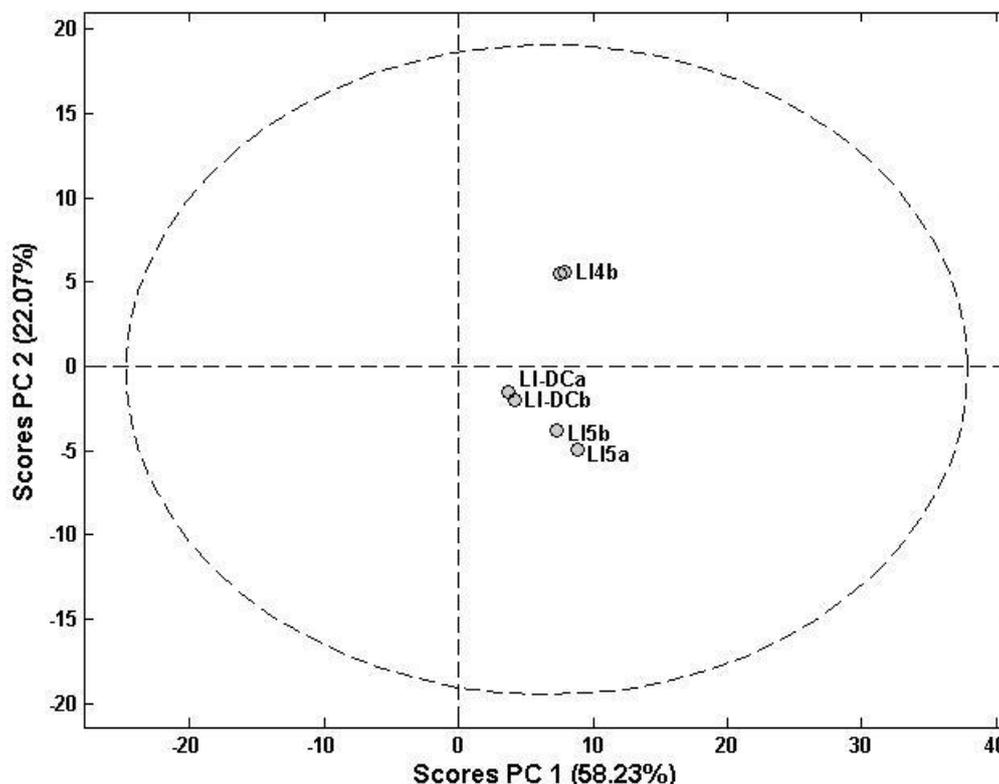
Figura 77: Processo para a realização da PCA.



A análise de componentes principais, realizada nos espectros normalizados, mostrou que duas PCs são suficientes para explicar mais de 80% da variância dos espectros de RMN de ^1H . O gráfico dos scores, apresentado na **Figura 78**, mostra que na PC1, responsável pela explicação da maior percentagem de variância dos dados, as substâncias **LI-4** e **LI-5** e a fração **LI-DC** são semelhantes, pois todos se encontram na parte positiva de PC1. Segundo esse resultado, não se pode descartar a hipótese de que as

substâncias **LI-4** e **LI-5** tenham similaridade com a fração **LI-DC**. Analisando a PC2 verifica-se que a fração **LI-DC** e o composto **LI-5** são semelhantes na parte negativa de PC2, enquanto que o composto **LI-4** encontra-se na parte positiva de PC2 mostrando alguma diferença em relação a fração **LI-DC** e a substância **LI-5**.

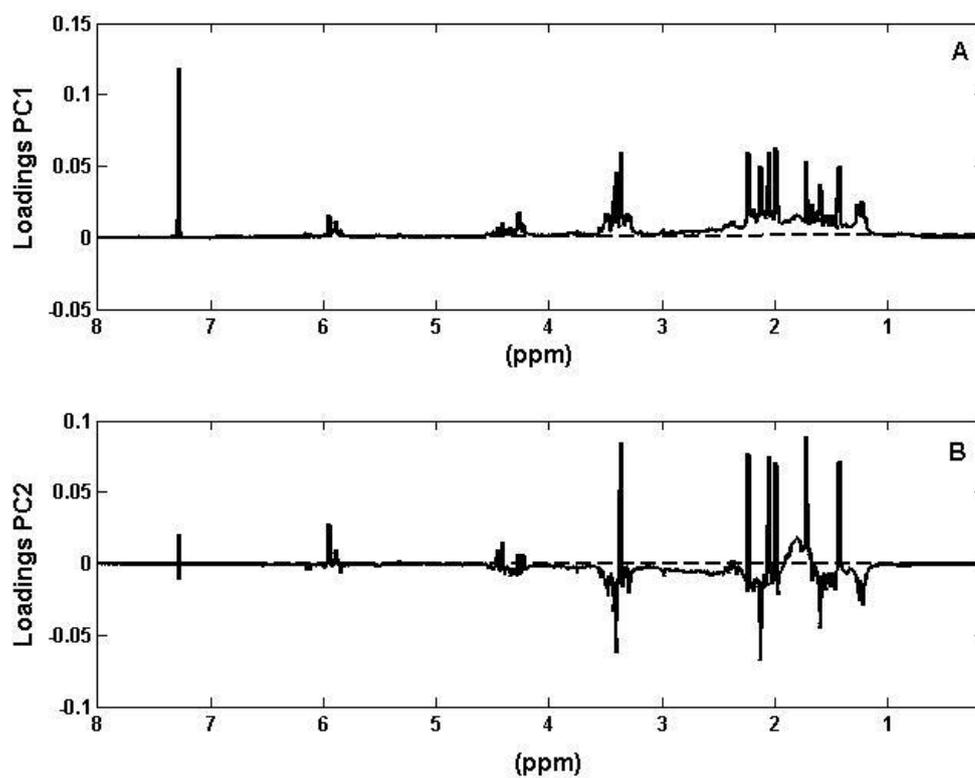
Figura 78. Gráfico dos scores



Através do gráfico dos *loadings*, apresentado na **Figura 79**, pode-se encontrar quais partes do espectro são responsáveis pela similaridade e diferenças entre as amostras observadas no gráfico dos scores. Na parte positiva da PC1, os *loadings* mostram os deslocamentos químicos comuns às substâncias **LI-4** e **LI-5** e à fração **LI-DC**. Na PC2 verifica-se que **LI-4** mostrou diferença em relação ao composto **LI-5** e a fração **LI-DC** devido aos deslocamentos químicos localizados na parte positiva dos *loadings* dessa PC. Portanto, os resultados da PCA evidenciam que a fração **LI-DC** contém **LI-4** e

LI5, o que colabora para sustentar a hipótese de que essas substâncias estão na fração **LI-DC** e não foram originadas no processo de purificação com sílica.

Figura 79. Gráfico dos *loadings* de (A) PC1 e (B) PC2.



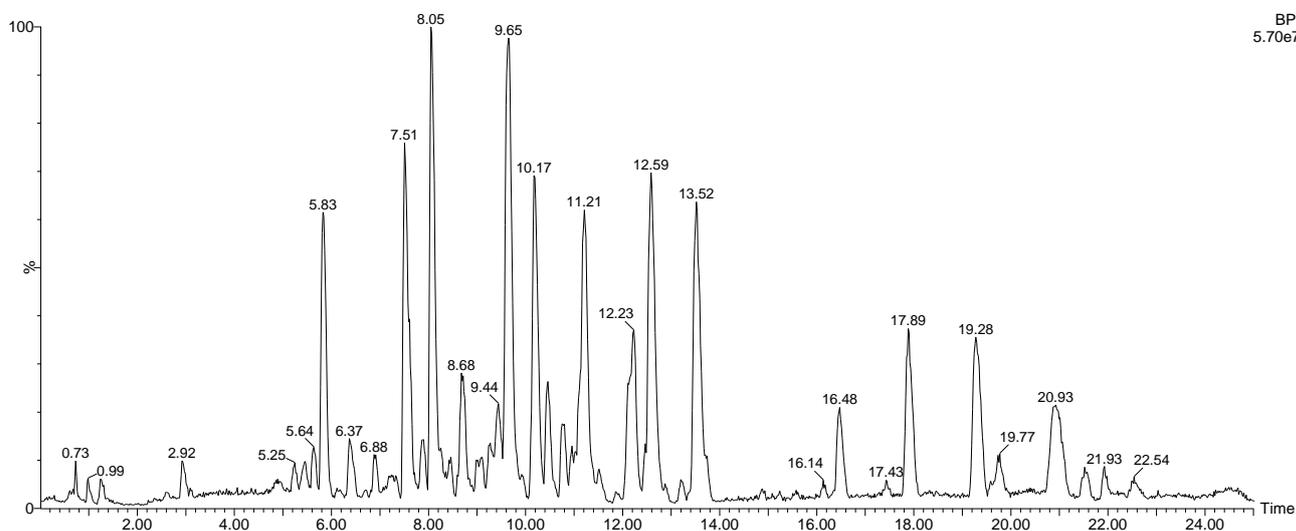
4.3 Análises por LC-ESI-MS/MS

Em nosso trabalho foram realizadas análises por cromatografia líquida por eletrospray (LC-ESI-MS/MS), em modo de ionização positivo, com o objetivo de obter o máximo de informações sobre a composição das frações diclorometano de *L. intermedius* e *V. crassa*. Os dados de íon molecular $[M+H]^+$ e de fragmentação obtidos para as lactonas **LI-4**, **LI-5** e **VC-1** foram utilizados como padrão, para detectar outras lactonas com o mesmo esqueleto nas frações.

4.3.1- Análise da fração diclorometano de *L. intermedius*

O cromatograma de íons totais da fração diclorometano de *L. intermedius* adquiridos no modo positivo está apresentado na **Figura 80**.

Figura 80: Cromatograma de íons totais da fração diclorometano de *L. intermedius* adquiridos no modo positivo.



O espectro de massas obtido por MS/MS da substância **LI-5** (**Figura 81**) apresentou íon molecular com m/z 391 $[M+Na]^+$ com fórmula molecular deduzida para $C_{18}H_{24}O_8$. O principal fragmento observado no espectro é o m/z 331 resultante da perda de ácido acético a partir da molécula protonada m/z 391 (**Figura 82**)

Figura 81: Espectro de fragmentação ESI(+)-MS/MS da substância **LI-5** (23 eV).

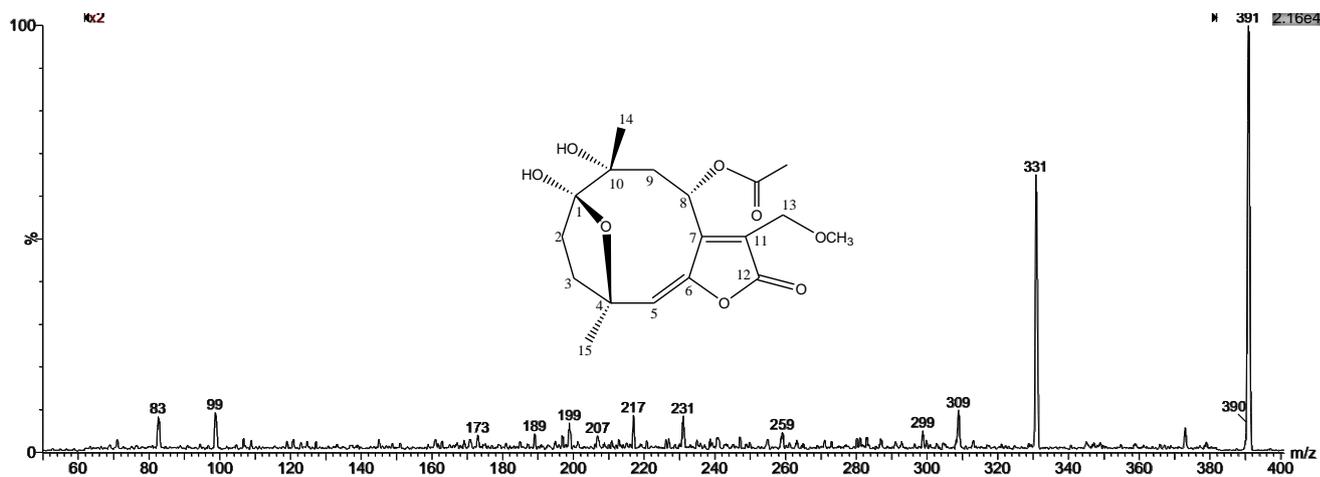
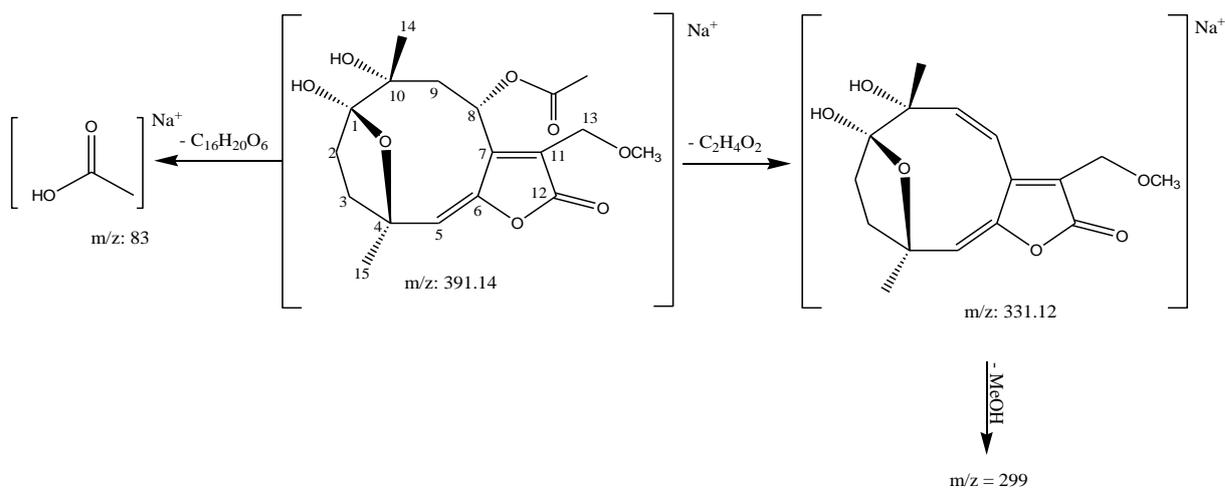
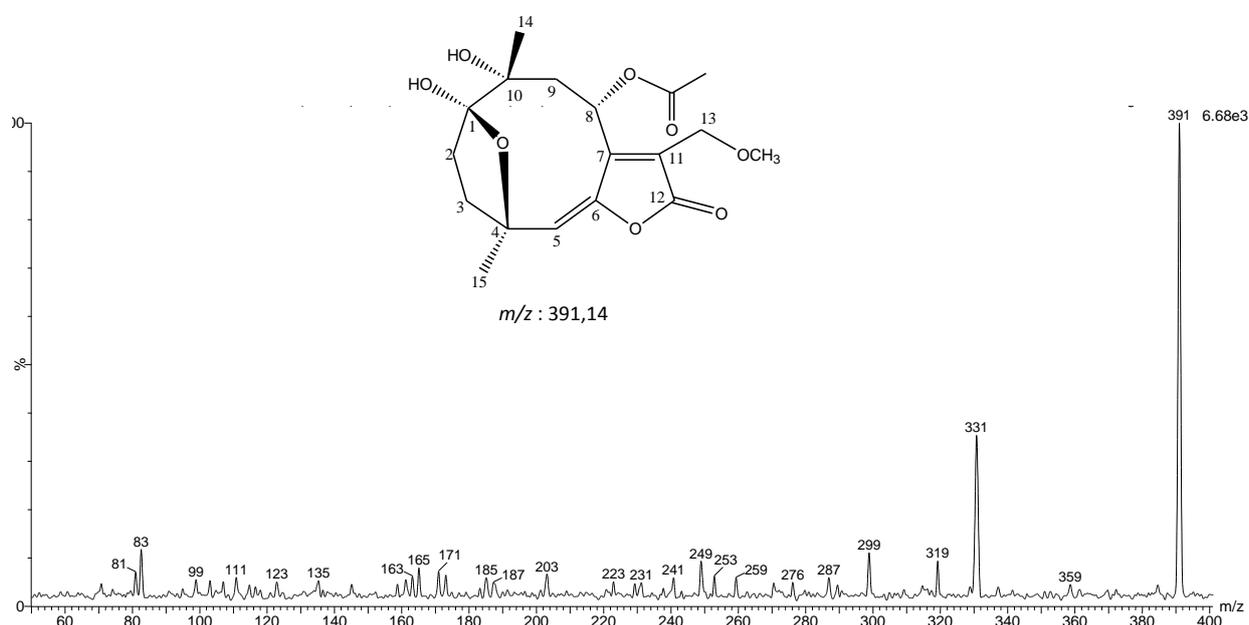


Figura 82: Proposta de fragmentação ESI(+)-MS/MS da substância **LI-5** (23 eV)



A substância LI-5 foi encontrada na fração **LI-DC** (**Figura 83**) com tempo de retenção igual a 9,65 minutos e com *m/z* 391 apresentando fragmentação idêntica da substância pura.

Figura 83: Espectro de fragmentação ESI(+)-MS/MS da substância **LI-5** na fração LI-DC



O espectro de massas obtido por MS/MS da substância **LI-4** apresentou o íon molecular em m/z 471 $[M+H]^+$ com fórmula molecular deduzida $C_{22}H_{31}O_{11}$. Os principais fragmentos observados no espectro de massas da substância **LI-4** foram m/z 351, m/z 291, m/z 259 e m/z 213 (**Figura 84**). A molécula protonada (m/z 471) pode perder ácido acético dando origem ao fragmento de menor intensidade m/z 411, ou, perder água formando o fragmento m/z 453. O fragmento m/z 351 pode ser resultante da perda de ácido acético, a partir de m/z 411. O fragmento m/z 291 deve ser proveniente da perda de água, seguido da perda de ceteno, a partir do fragmento m/z 351. A perda de metanol de m/z 333 gera o fragmento m/z 259 (**Figura 85**)

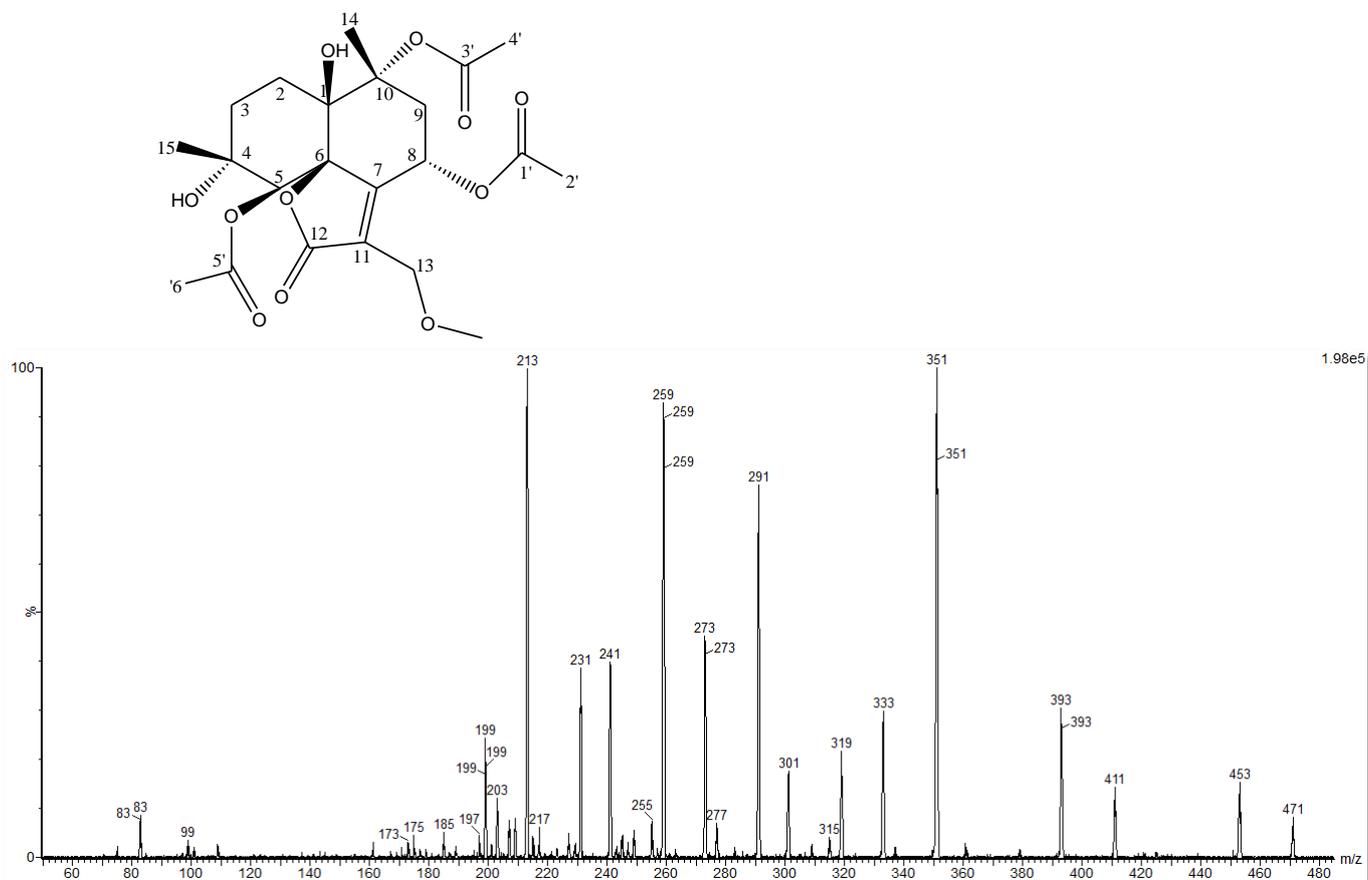
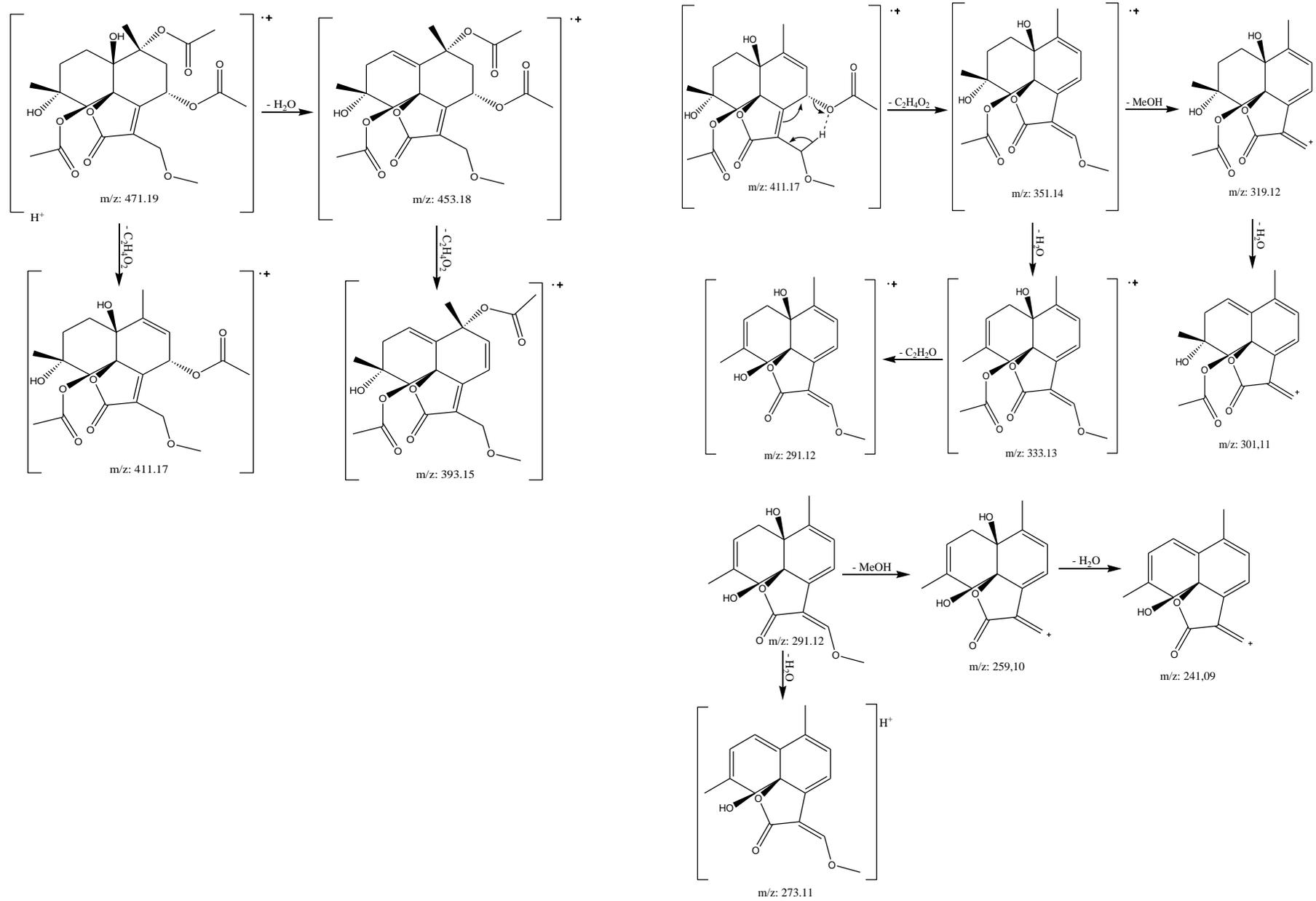
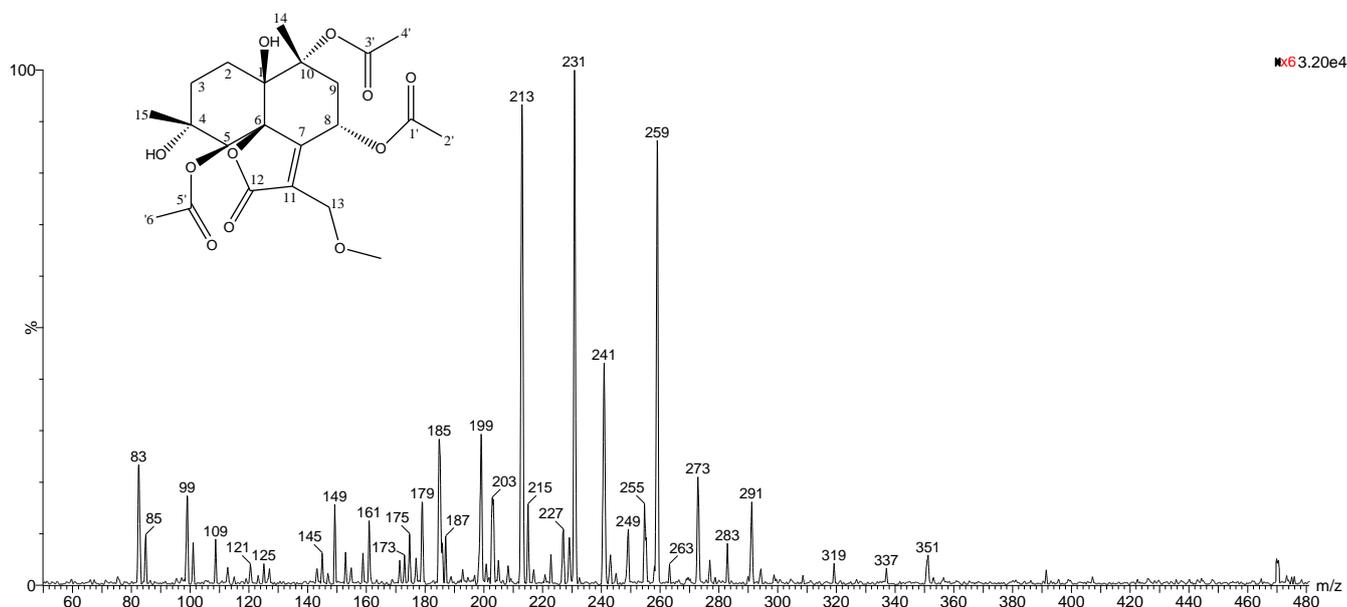
Figura 84: Espectro de fragmentação ESI(+)-MS/MS de LI-4 (15 eV).

Figura 85: Proposta de fragmentação da substância LI-4



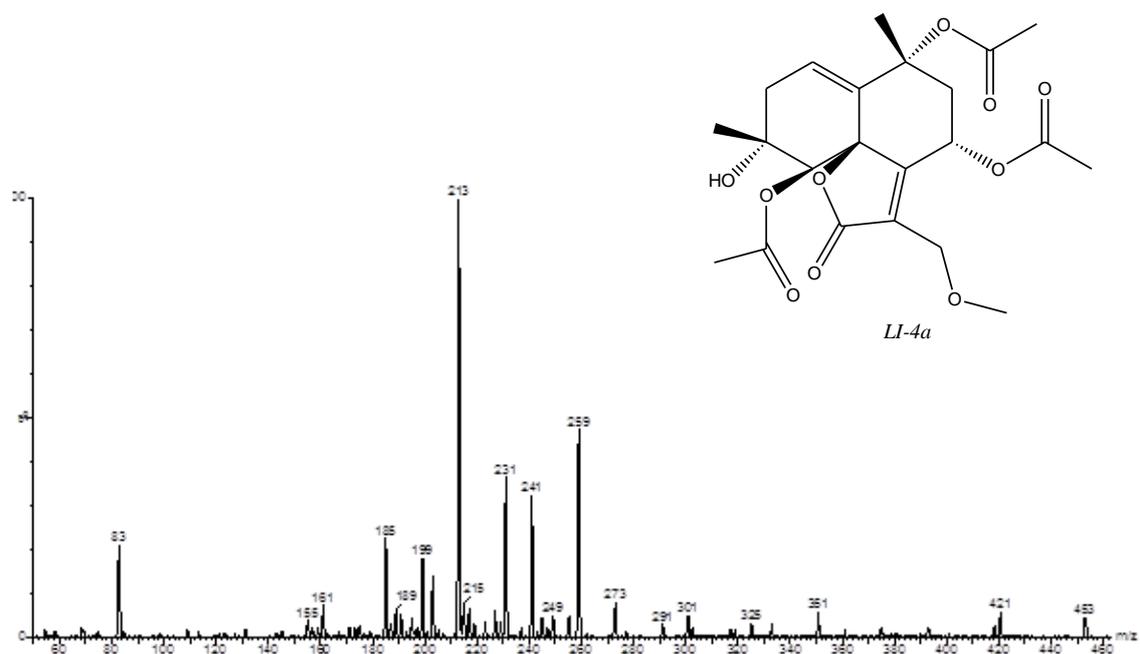
A substância **LI-4** também foi detectada na fração **LI-DC** com tempo de retenção 8,68 min e m/z 471 (**Figura 86**). O espectro de MS/MS observado para LI-4 presente na fração é idêntico à substância isolada.

Figura 86: Espectro de MS/MS da substância LI-4 detectada na fração LI-DC



A partir da análise dos dados de **LI-4** foi possível identificar uma nova substância (codificada como **LI-4a**), não isolada no presente estudo, com tempo de retenção de 8,73 minutos e m/z 453, diferindo de **LI-4** de 18 unidades a menos. O espectro de massas de **LI-4a** apresentou os fragmentos em m/z 351,301, 291, 259, 213, 199, 185 e 83, idênticos aos de **LI-4** (**Figura 87**) o que caracteriza a presença do esqueleto dos cadinanolídeos. Com base nestes dados sugerimos que **LI-4a** apresente uma ligação dupla entre os C-1 e C-2 (**Figura 86**). Não foram encontrados relatos desta substância na literatura.

Figura 87. Espectro de MS/MS da substância **LI-4a** detectada na fração LI-DC



Os flavonóides **LI-1** (**Figura 88**), **LI-2** (**Figura 89**) e **LI-3** (**Figura 90**) também foram detectados na fração diclorometano com tempos de retenção iguais a 13,52, 12,23, e 12,59 minutos e m/z $[M+H]^+$ 285, 317 e 331, respectivamente.

Figura 88: Espectro de MS/MS da substância LI-1 detectada na fração LI-DC



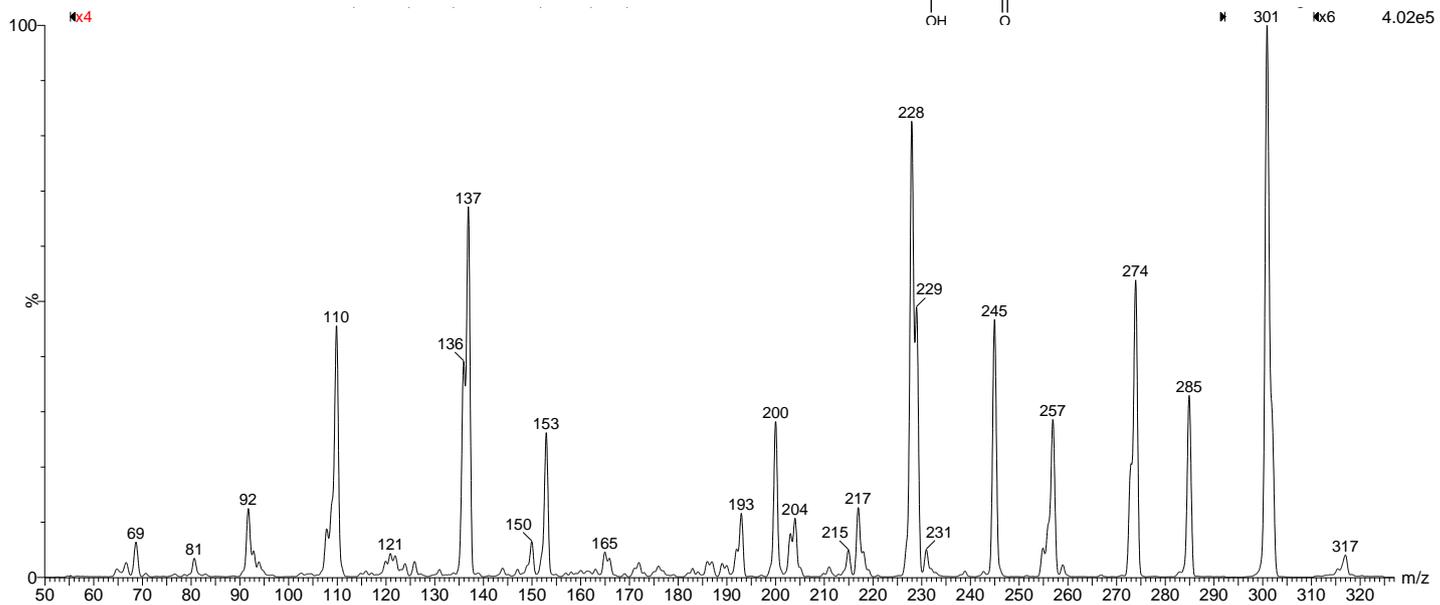
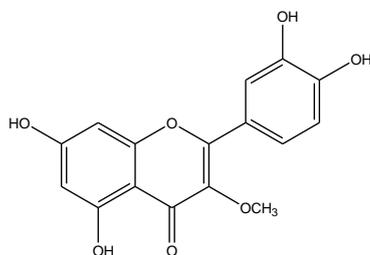
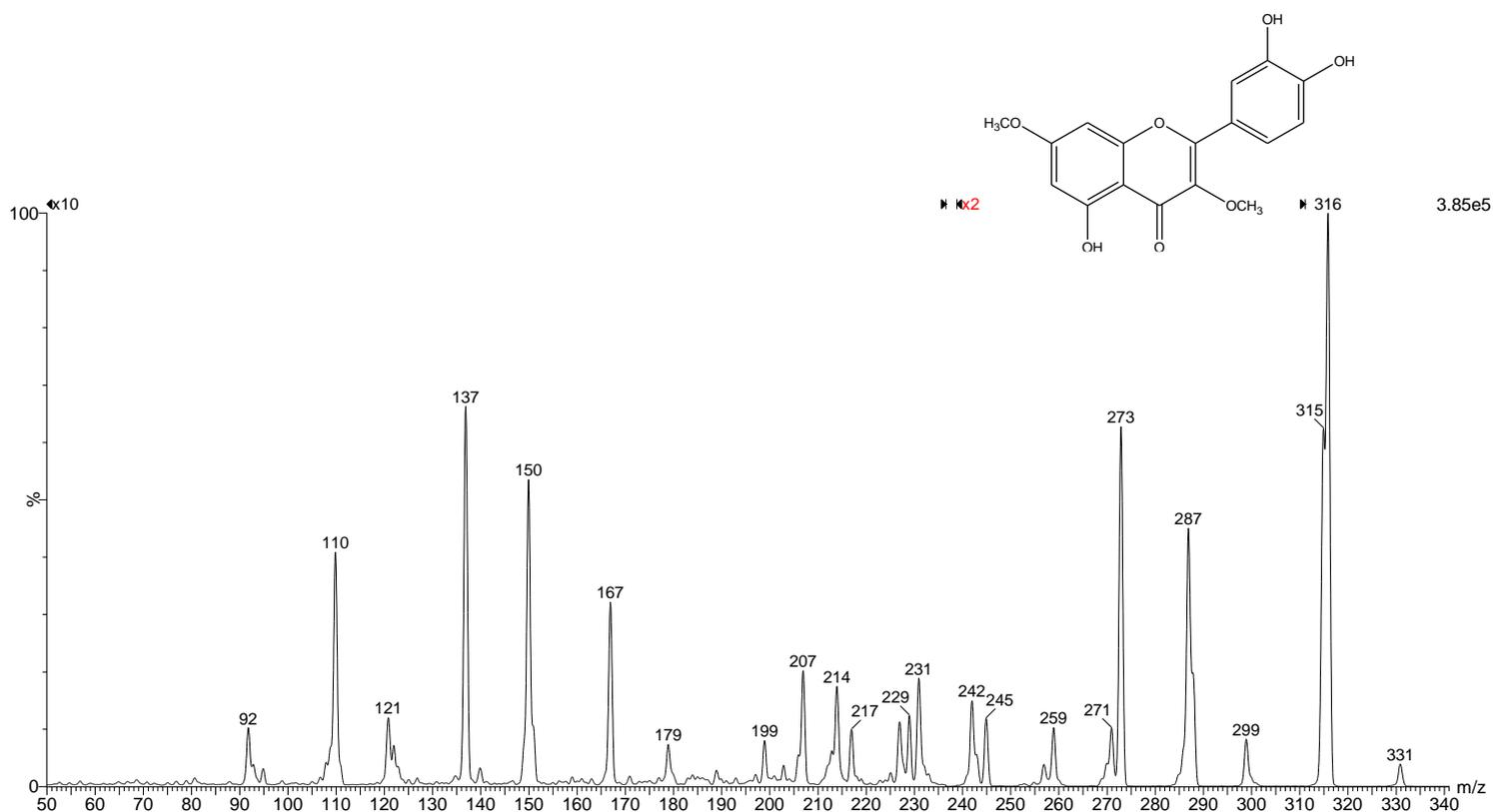


Figura 90: Espectro de MS/MS da substância LI-3 detectada na fração LI-DC



Além destes, foram detectados outros flavonoides, não isolados no presente trabalho, cujos dados de fragmentação e íon molecular $[M+H]^+$ sugerem a presença de apigenina (**Figura 91**), kaempferol (**Figura 92**) com tempos de retenção de 10,17 e 11,21 minutos e $[M+H]^+$ m/z 271 e 287, respectivamente.

Figura 91: Espectro de MS/MS da apigenina detectada na fração LI-DC

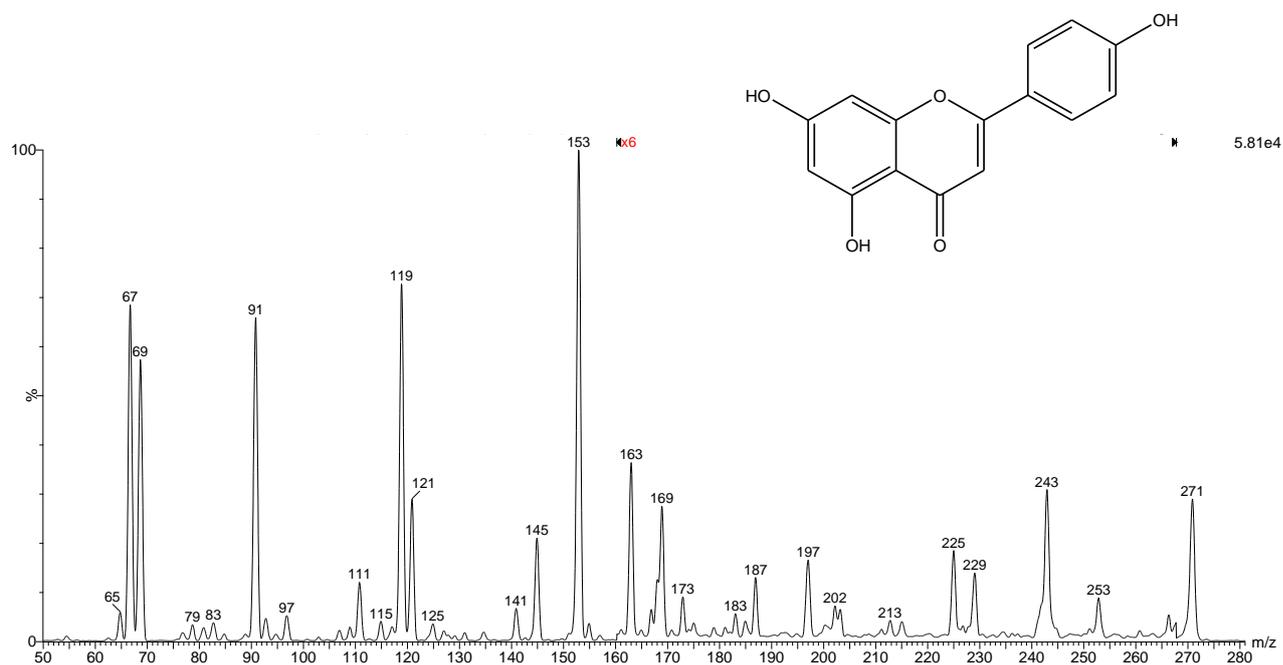
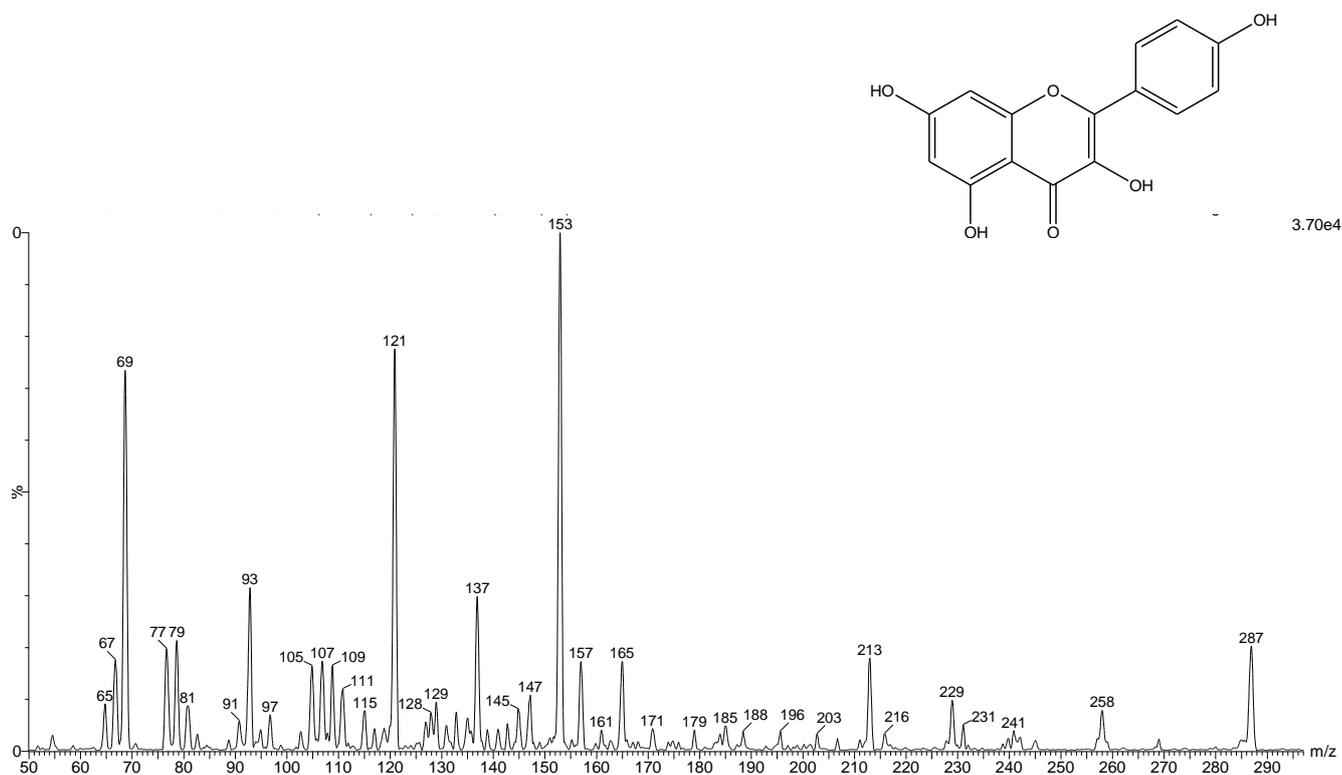


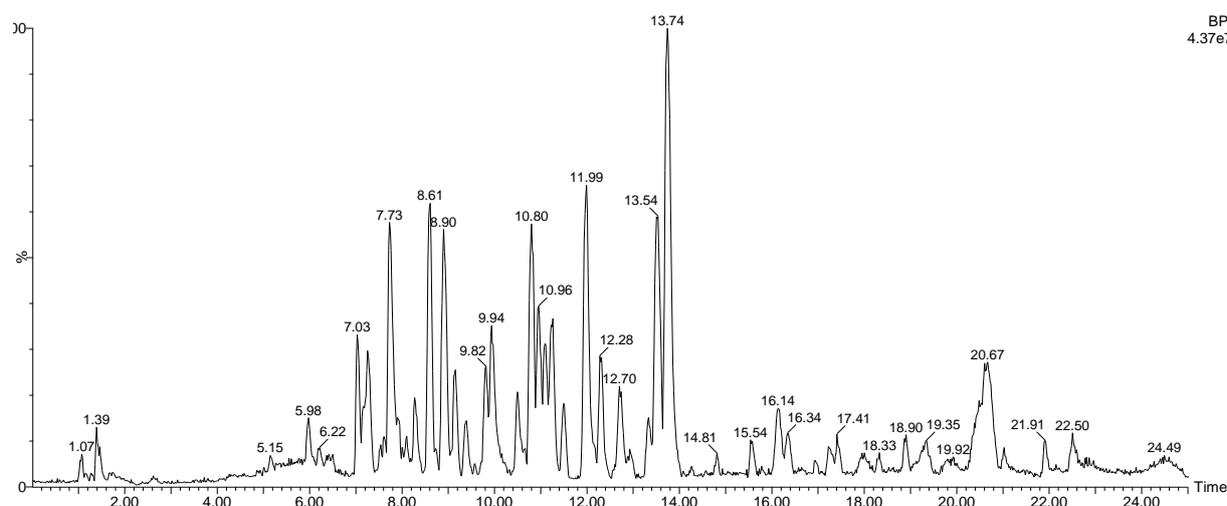
Figura 92: Espectro de MS/MS da substancia kaempferol detectada na fração LI-DC



4.3.2- Análise da fração diclorometano de *Vernonanthura crassa*

O cromatograma de íons totais da fração diclorometano *Vernonanthura crassa* (VC-DC) adquiridos no modo positivo está apresentado na **Figura 93**. A substância VC-1 foi utilizada como padrão com objetivo de encontrar outras lactonas com o mesmo esqueleto.

Figura 93: Cromatograma de íons totais da fração diclorometano de *V. crassa* adquiridos no modo positivo.



O espectro de massas obtido por MS/MS (**Figura 94**) da substância VC-1 apresentou íon molecular m/z 417 $[M+Na]^+$ com fórmula deduzida $C_{20}H_{26}O_8$. A molécula protonada m/z 417 pode perder metacrilato, originando o principal fragmento do espectro m/z 331 e também, perder água gerando o fragmento m/z 399 (**Figura 95**).

Figura 94: Espectro de fragmentação ESI-(+)-MS/MS da substância VC-1 (25 eV).

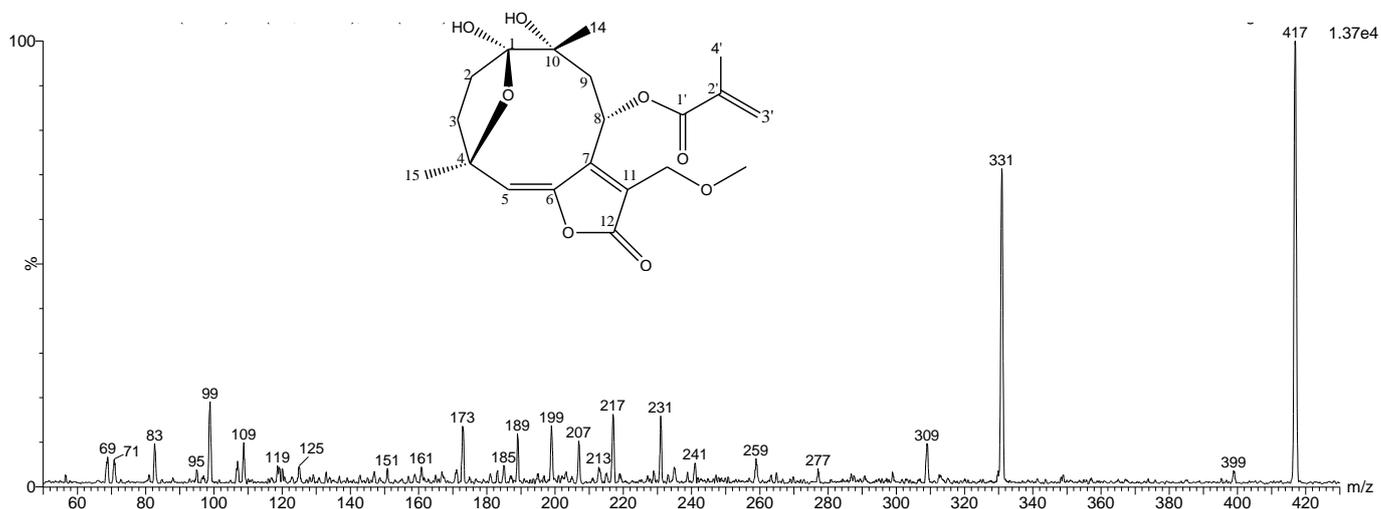
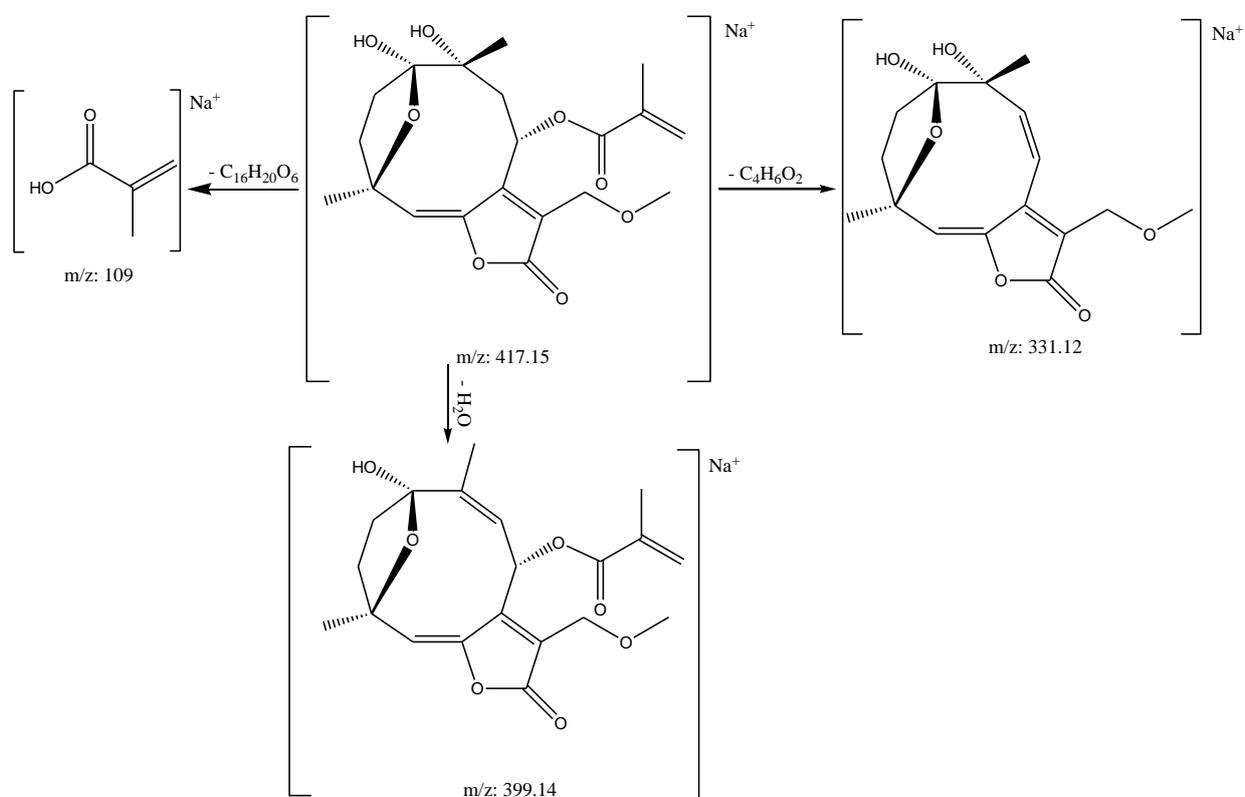
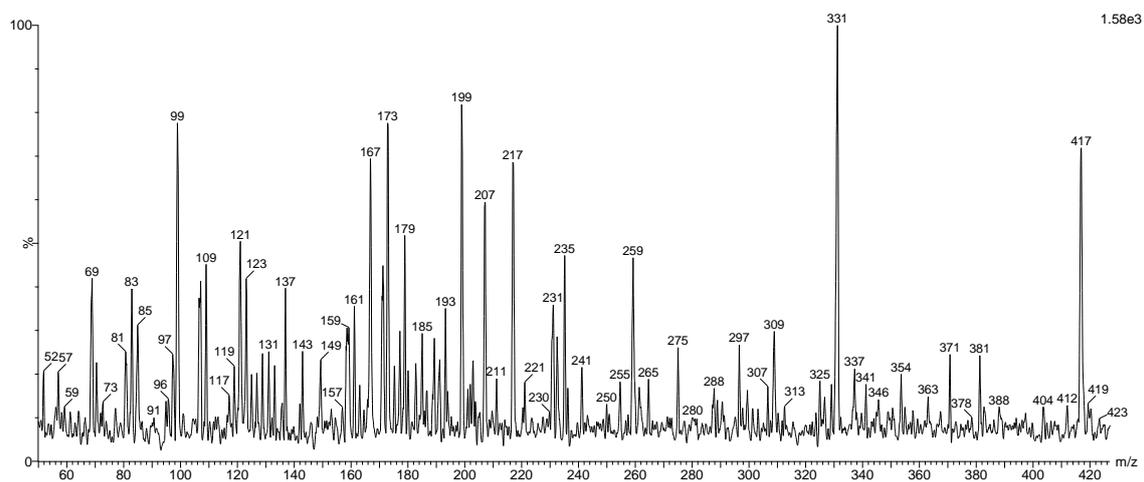


Figura 95: Proposta de fragmentação de VC-1



A substância **VC-1** foi detectada na fração VC-DC com tempo de retenção igual 11,99 minutos e m/z 417 $[\text{M}+\text{Na}^+]^+$ (**Figura 96**)

Figura 96: Espectro de MS/MS de VC-1 detectado na fração LI-DC



Com base nas fragmentações de VC-1 foi sugerido que o pico com tempo de retenção 7,22 minutos e m/z 433 $[M+Na^+]^+$ (**Figura 98**) seria correspondente à substância 8 α -4-hidroximetacrilóil-10-hidróxi13-metoxihirsutinólídeo (**Figura 97**), isolada de *Vernonia bockiana* por GAO-SHANG, *et al.*(2012).

Figura 97: 8 α -4-hidroximetacrilóil-10-hidróxi13-metoxihirsutinólídeo

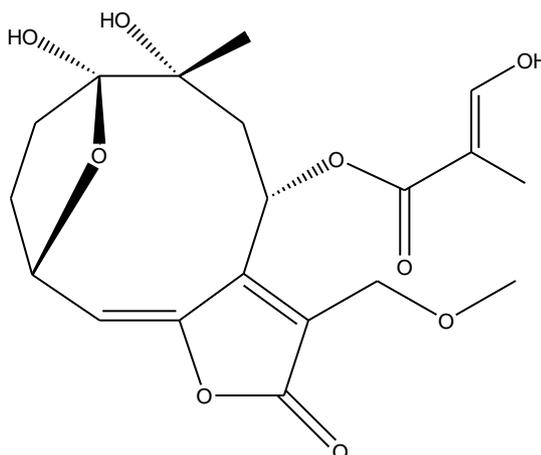
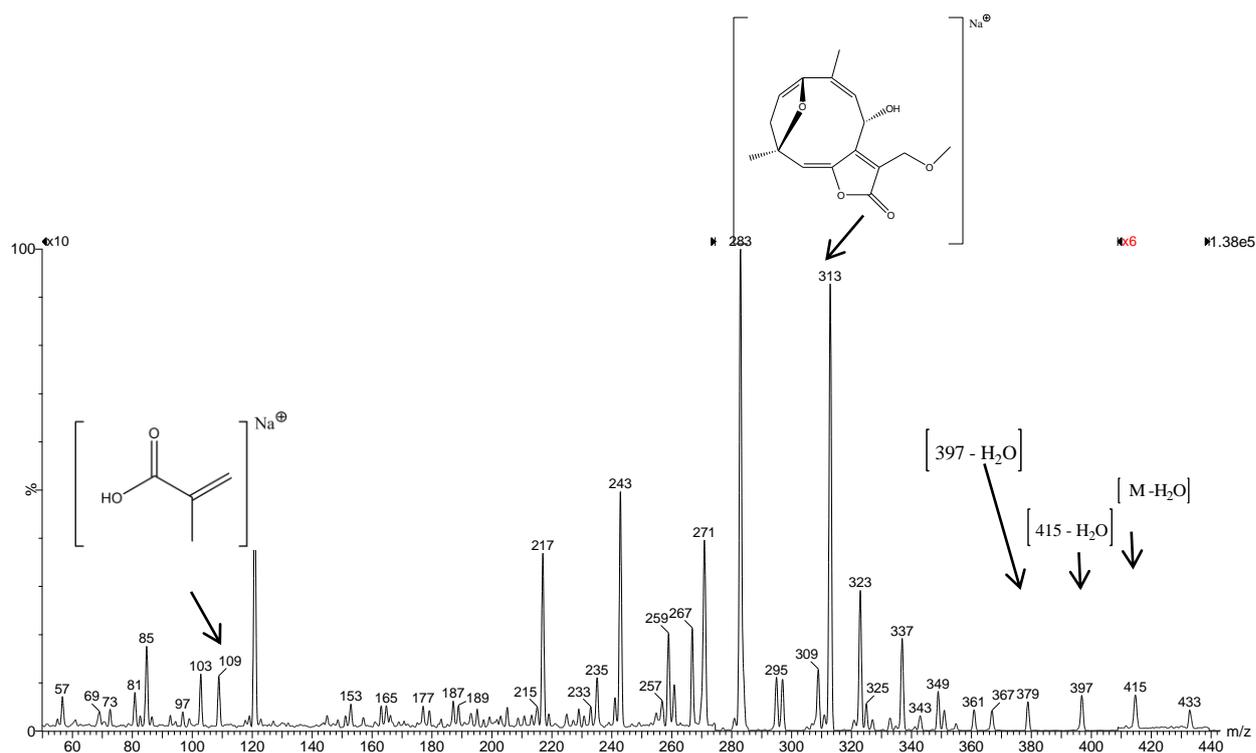


Figura 98: Espectro de MS/MS da substância 8 α -4-hidroximetacrilóil-10-hidróxi13-metoxihirsutinólídeo detectada na fração LI-DC



No presente trabalho não foi isolado nenhum flavonóide da fração diclorometano; no entanto, vários flavonóides foram detectados nesta fração através da técnica de LC-MS. Os flavonóides genkwanina (**Figura 99**), 3,7 di-O-metilquercetina (**Figura 100**) e apigenina (**Figura 101**) os dois primeiros isolados da fração diclorometano de *L. intermedius* foram detectados na espécie *V. crassa* com tempos de retenção 13,54, 11,43 e 10,80 minutos e m/z 285, 331 e 271, respectivamente.

Figura 99: Espectro de MS/MS da substância genkwanina presente na fração VC-DC

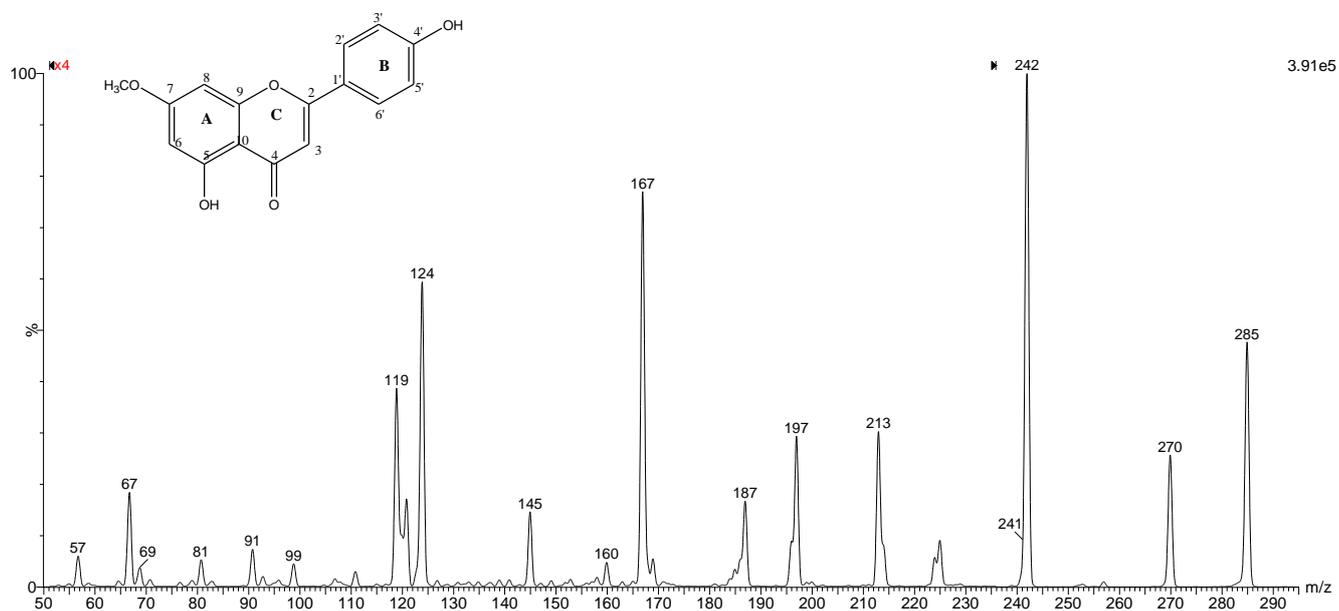
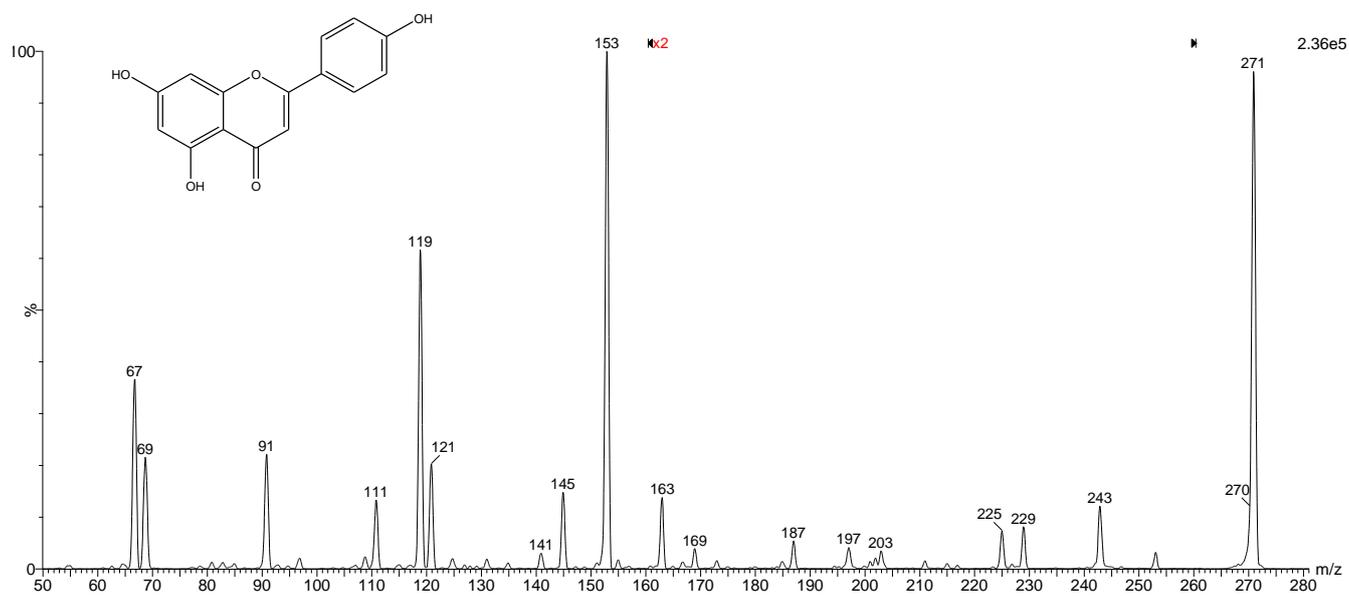


Figura 100: Espectro de MS/MS da substância 3,7 di-O-metilquercetina presente na fração VC-DC



Figura 101: Espectro de MS/MS da substância apigenina presente na fração VC-DC

4.4- Importância quimiotaxonômica

Como discutido na introdução, as espécies *Vernonia intermedia*, *Vernonia crassa* e *Vernonia nudiflora* foram reclassificadas em *Lessingianthus intermedius*, *Vernonantura crassa* e *Vernonanthura nudiflora*, respectivamente. A literatura apresenta poucos trabalhos relativos ao gênero *Lessingianthus* e *Vernonanthura* e nosso trabalho contribui com os estudos quimiotaxômicos destes gêneros.

A presença de flavona, flavonóis e de lactonas sesquiterpênicas, sendo a maior parte delas pertencente à classe de germacranolídeos, foi relatada na tribo Vernoniae. Compostos contendo os esqueletos de glaucolídeos e hirsutinolídeos são na sua maioria restritos à subtribo Vernoniinae e ocorrem amplamente no gênero *Vernonia* (IGUAL *et al.*, 2013).

A maioria dos compostos identificados das espécies investigadas no presente trabalho está de acordo com a composição química da subtribo Vernoniinae.

As flavonas isoladas de *Lessingianthus intermedius* (DC.) Dematt (*sin. Vernonia intermedia*), genkwanina (**LI-1**), 3-O-metilquercetina (**LI-2**) e 3,7-di-O-metilquercetina (**LI-3**) já foram isoladas das espécies *Vernonia nudiflora* (BARDÓN *et al.*, 1992), *Vernonia cinerascens* (TOYANG *et al.*, 2013) e *Vernonia polyanthes* (IGUAL *et al.*, 2013), respectivamente.

Dentre as lactonas sesquiterpênicas isoladas da espécie *Lessingianthus intermedius* (DC.) Dematt (*sin. Vernonia intermedia*), a 13-O-metil 8-O-acetato vernojalcanolídeo (**LI-4**) já foi relatada nas espécies *Vernonia jalcana* (JAKUPOVIC, *et al.*, 1986) e em *Lessingianthus rubricaulis* (BARDÓN *et al.*, 1993) enquanto que a lactona sequiterpênica 8 α -acetóxi-10 α -hidróxi-13-O-metil hirsutinolídeo (**LI-5**) foi isolada da espécie *Vernonia bockiana* (Gao- Shang, *et al.*, 2012) e o espicatolídeo (**LI-6**) foi isolado da espécie *Pseudoelephantopus spicatus*, pertencente à família Asteraceae.

Da espécie *Vernonanthura nudiflora* isolamos uma mistura de lactonas sesquiterpênicas: fitocarfol C (**VN-1a**), previamente isolado de *Piptocarpha chontalensis* (Asteraceae), e um análogo do espicatolídeo E (**VN-1b**), inédito na literatura.

As espécies *Lessingianthus intermedius* e *Vernonanthura nudiflora* já foram estudadas por BOHLMANN *et al.*, (1988) e BARDÓN *et al.*, (1991), respectivamente, e

todas as substâncias isoladas neste trabalho estão sendo relatadas nestas espécies pela primeira vez.

As substâncias isoladas de *Vernonanthura crassa* (Vell.) H.Rob. (sinonímia *Vernonia crassa*), 8 α -metilacrilóiloxi-10-hidróxi-13-O-metil-hirsutinolídeo (**VC-1**) e a loliolida (**VC-2**), foram isoladas de *Vernonia bockiana* (GAO-SHANG *et al.*, 2012) e *Vernonia mollissima* (CATALAN *et al.*, 1986), respectivamente, o que sugere uma proximidade entre os gêneros *Vernonanthura* e *Vernonia*.

Lactonas sesquiterpênicas (LS) com o esqueleto básico de hirsutinolídeos, como o das substâncias 8 α -acetóxi-10 α -hidróxi-13-O-metil hirsutinolídeo, espicatolídeo, 8 α -metilacrilóiloxi-10-hidroxi-13-O-metil-hirsutinolídeo e fitocarfol C isoladas em nosso trabalho de *Lessingianthus intermedius*, *V. crassa* e *V.nudiflora* já foram descritas para estes gêneros (BOHLMANN *et al.*, 1981, KOTOWICZ *et al.*, 1998). Isto nos leva a sugerir que as lactonas sesquiterpênicas possam ser consideradas marcadores químicos destes gêneros.

A flavona vitexina (**VC-4**) e a lignana siringaresinol (**VI-7**), isoladas das espécies *Vernonanthura crassa* (sin. *Vernonia crassa*) e *Lessingianthus intermedius*, respectivamente, estão sendo relatadas pela primeira vez nos gêneros estudados.

4.5- Avaliação da Atividade Biológica

4.5.1- Atividade Antitumoral

Foram avaliados os extratos brutos (**LI-EB** e **VC-EB**) frações hexânica (**LI-HE** e **VC-HE**), diclorometano (**LI-DC** e **VC-DC**), acetato (**LI-AE** e **VC-AE**) e aquosa (**LI-HM** e **VC-HM**) das espécies *Lessingianthus intermedius* e *Vernonanthura crassa*, respectivamente e também e das substâncias **LI-4** e **LI-5** isoladas de *L.intermedius*. As linhagens de células utilizadas na avaliação da atividade anticâncer foram cedidas pelo National Cancer Institute (NCI) dos Estados Unidos da América (EUA).

Na **Tabela 35** encontram-se os dados de inibição de crescimento, GI_{50} , para todas as amostras avaliadas.

O extrato bruto de *L.intermedius* (**LI-EB**) apresentou potente atividade para todas as células tumorais testadas, com valores de GI_{50} variando entre 2,70 e 5,83 $\mu\text{g/mL}$.

Os valores de GI_{50} encontrados para a fração acetato de etila de *L. intermedius* (**LI-AE**) indicam uma atividade moderada em relação ao extrato bruto, com seletividade para as células de ovário (OVCAR-03), com GI_{50} igual a 8,53 $\mu\text{g/mL}$. A fração diclorometano (**LI-DC**) foi a mais ativa dentre todas as frações exibindo atividade frente a todas as células estudadas. Com exceção da célula tumoral de ovário resistente (NCI/ADR-RES), esta fração foi mais ativa que o extrato bruto, com GI_{50} na faixa de 1,21 a 3,66 $\mu\text{g/mL}$ para as demais células avaliadas. A fração hexânica apresentou atividade moderada com GI_{50} na faixa de 26,57 a 34,89 $\mu\text{g/mL}$, enquanto a fração hidrometanólica foi a menos ativa dentre todas estudadas, com valores acima de 54 $\mu\text{g/mL}$.

Os valores de GI_{50} para o extrato bruto (**VC-EB**) e fração hexano (**VC-HE**) de *Vernonanthura crassa* revelaram uma atividade moderada para todas as células tumorais estudadas (**Tabela 35**)

A fração acetato de etila de *Vernonanthura crassa* (**VC-AE**) não apresentou atividade, sendo obtidos valores de GI_{50} maiores que 250 $\mu\text{g/mL}$ para oito das nove linhagens de células testadas.

A fração hidrometanólica (**VC-HM**) de *V. crassa* mostrou atividade e seletividade para as células de mama (**MCF7**) e pulmão (**NCI-H460**) com GI_{50} de 1,45 e 9,50 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

A fração mais ativa de *V. crassa* também foi a diclorometano (**VC-DC**) com potente atividade, apresentando GI_{50} menor que 10 $\mu\text{g/mL}$ para oito das nove células tumorais testadas.

As substâncias **LI-4** e **LI-5** foram isoladas da fração diclorometano de *Lessingianthus intermedius* (**LI-DC**) e também apresentaram potente atividade para a maioria das células tumorais testadas. Estes resultados indicam que a atividade observada para a fração diclorometano desta planta deve-se, provavelmente, a presença das lactonas sesquiterpênicas.

A lactona sesquiterpênica **LI-5** demonstrou maior atividade que **LI-4**, apresentando, exceto para a linhagem de rim, valores de GI_{50} menores que 5 $\mu\text{g/mL}$.

GAO-SHANG, *et al.*, (2012) reportam uma potente atividade de **LI-5** contra células leucêmicas (HL-60) com IC_{50} de 5,96 $\mu\text{mol/L}$.

Tabela 35. Avaliação da atividade antitumoral Valores de GI₅₀ µg/mL para extratos, frações e das substâncias LI-4 e LI-5 de *V. intermedia* e *V. crassa*.

	Glioma	Mama	Ovário Resistente	Rim	Pulmão	Próstata	Ovário	Leucemia	Cólon
	(U251)	(MCF7)	(NCI/ADR-RES)	(786-0)	(NCI-H460)	(PC-3)	(OVCAR-3)	K562	(HT29)
Doxorrubicina	0,03	0,56	0,66	0,06	0,011	0,11	0,13	0,06	0,06
<i>Lessingianthus intermedius</i>									
LI-EB	5,18	3,14	3,25	4,45	5,83	3,02	2,70	4,44	4,97
LI-HE	28,00	28,05	28,61	27,54	26,57	27,55	27,25	34,89	30,61
LI-DC	2,69	2,85	11,51	2,64	2,90	2,75	1,21	3,66	2,89
LI-AE	24,22	15,21	29,50	39,35	29,70	28,21	8,53	13,41	30,64
LI-HM	175,27	232,16	93,17	79,04	>250	89,63	54,38	70,84	>250
<i>Vernonanthura crassa</i>									
VC-EB	33,22	32,80	41,83	27,21	56,20	27,93	29,60	29,37	28,19
VC-HE	32,06	30,83	29,43	31,44	32,31	27,89	29,92	29,38	28,72
VC-DC	7,44	7,59	5,74	8,92	24,44	5,11	6,73	5,55	6,80
VC-AE	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	49,48
VC-HM	>250	1,45	>250	>250	9,50	>250	>250	>250	>250
LI-4	8,17	3,11	4,05	8,54	23,13	18,50	4,09	2,95	24,43
LI-5	3,06	2,96	3,02	20,37	3,50	2,52	3,29	2,75	2,75

4.5.1- Atividade Antileishmania

Foram avaliados os extratos brutos (**LI-EB** e **VC-EB**) frações hexânica (**LI-HE** e **VC-HE**), diclorometano (**LI-DC** e **VC-DC**), acetato (**LI-AE** e **VC-AE**) e aquosa (**LI-HM** e **VC-HM**) das espécies *Lessingianthus intermedius* e *Vernonathura crassa*, respectivamente.

Para cada extrato e frações testadas foram obtidos os valores de IC₅₀, em µg/mL, que corresponde à concentração da amostra que inibe 50% do crescimento do parasita, sendo consideradas inativas as amostras com IC₅₀ superiores a 100 µg/mL.

A avaliação da atividade antileishmania dos extratos e frações de *L. intermedius* e *V. crassa* mostrou que, as frações diclorometano (**VC-DC**) e (**LI-DC**) apresentaram maior atividade dentre todas as frações testadas, com CI₅₀ de 8,97 µg/mL e 9,15 µg/mL para *V. crassa* e *L. intermedius*. As demais amostras apresentaram atividade antileishmania moderada, conforme apresentado na **Tabela 36**.

Um estudo fitoquímico realizado por ODONNE *et al.*,(2011) para a espécie *Pseudelephantopus spiralis* (Asteraceae) levou ao isolamento de duas lactonas sesquiterpênicas com esqueleto dos hirsutinólídeos exibindo fortes atividades antileishmania. A potente atividade leishmanicida das frações diclorometano das espécies *V. crassa* e *L. intermedius* pode estar relacionada à presença das substâncias 8α-metilacrilóiloxi-10-hidróxi-13-O-metil-hirsutinólídeo (**VC-1**) e 8α-acetóxi-10α-hidróxi-13-O-metil-hirsutinólídeo (**LI-5**), pois as mesmas foram isoladas da fração diclorometano.

Tabela 36: Atividade antileishmania dos extratos e frações de *L. intermedius* e *V. crassa*

Amostras	*CI ₅₀ (µg/mL)
<i>Lessingianthus intermedius</i>	
LI-EB	60,59 ± 6,54
LI-HE	56,58 ± 8,61
LI-DC	9,15 ± 0,06
LI-AE	49,01 ± 2,01
LI-HM	45,18 ± 9,27
<i>Vernonanthura crassa</i>	
VC-EB	54,88 ± 14,98
VC-HE	54,89 ± 4
VC-DC	8,97 ± 1,68
VC-AE	87,66 ± 17,46
VC-HM	>500

5-Conclusões

O estudo químico das partes aéreas (folhas e caule) de *Lessingianthus intermedius* (DC.) Dematt. resultou no isolamento das substâncias genkwanina (**LI-1**), 3-O-metilquercetina (**LI-2**), 3,7-di-O-metilquercetina (**LI-3**), 8-O-acetil-13-O-metil vernojalcanolídeo (**LI-4**), 8 α -acetóxi-10 α -hidróxi-13-O-metil Hirsutinolídeo (**LI-5**), espicatolídeo (**LI-6**) e siringaresinol (**LI-7**).

Da espécie *Vernonanthura crassa* (Vell.) H.Rob. foram isoladas as substâncias: 8 α -metilacrilóiloxi-10-hidroxi-13-O-metil-hirsutinolídeo (**VC-1**), loliolida (**VC-2**), vitexina (**VC-3**) e uma mistura de ácidos clorogênicos ácido 3-O-cafeoilquínico (**LI-8a**), ácido 4-O-cafeoilquínico (**LI-8b**), e ácido 5-O-cafeoilquínico (**LI-8c**) e, de *Vernonanthura nudiflora*, uma mistura de lactonas sesquiterpênicas: piptocarphol C (**VN-1a**) e um análogo do espicatolídeo E (**VN-1b**) descrito pela primeira vez na literatura.

As frações diclorometano das espécies *Lessingianthus intermedius* (DC.)Dematt. e *Vernonanthura crassa* (Vell.) H.Rob. se mostraram ativas tanto para atividade antitumoral quanto para antileishmania.

Ambos os resultados sugerem as frações diclorometano, o qual apresenta as lactonas 8-O-acetil-13-O-metil vernojalcanolídeo e 8 α -acetóxi-10 α -hidróxi-13-O-metil hirsutinolídeo como candidatos promissores para atividade anticâncer. Estudos adicionais são necessários para melhor compreender o mecanismo de ação dos princípios ativos de *Lessingianthus intermedius* (DC.)Dematt. e *Vernonanthura crassa* (Vell.) H.Rob tanto para terapia anticâncer como para antileishmania.

É importante salientar que pela análise de PCA as lactonas **LI-4** e **LI5** estão contidas na fração diclorometano, portanto não foram originadas no processo de purificação com sílica.

Os resultados das análises de LC/MS para *L. intermedius* sugerem a presença dos flavonoides apigenina e kaempferol e uma lactona sesquiterpênica análoga de LI-4. Para a espécie *V. crassa* sugere-se a presença da lactona sesquiterpênica 8- α -4-hidroximetacrilóil-10-hidróxi-13-metóxi-hirsutinolídeo isolada de *Vernonia bockiana* e os flavonóides genkwanina, apigenina e 3,7-di-O-metilquercetina.

As substâncias 8α -metilacrilóiloxi-10-hidroxi-13-O-metil-hirsutinólídeo (**VC-1**) e, a lolíolida (**VC-2**), isoladas de *Vernonanthura crassa* (Vell.) H. Rob. (sinonímia *Vernonia crassa*), foram relatadas em *Vernonia bockiana* e *Vernonia mollissima* respectivamente, o que sugere uma proximidade entre os gêneros *Vernonanthura* e *Vernonia*.

As substâncias 8α -acetóxi-10 α -hidróxi-13-O-metil hirsutinólídeo (**LI-5**), 8α -metilacrilóiloxi-10-hidroxi-13-O-metil-hirsutinólídeo (**VC-1**) e piptocarphol C (**VN-1a**), com o esqueleto básico de hirsutinólídeos, isoladas em nosso trabalho de *Lessingianthus intermedius*, *V. crassa* e *V. nudiflora* já foram descritas para estes gêneros. Isto nos leva a sugerir que as lactonas sesquiterpênicas possam ser consideradas marcadores químicos destes gêneros.

6– Referências Bibliográficas Padronização

AGRAWAL, P.H. Carbon-13 NMR of flavonoides: **Studies in organic chemistry**. V.39, Lucknov, India, Elsevier, 1989.

ANDRADE, B. O.; KOZERA, C.; CURCIO, G. R.; GALVÃO, F. Vascular grassland plants of Tibagi River Spring, Ponta Grossa, Brazil. **Check List**, 7, pp. 257-262, 2011

BAJKO, E., KALINOWSKA, M., BOROWSKI, P., SIEGIEJCZYK, L., WODZIMIERS, L. 5-O-Caffeoylquinic acid: a spectroscopic study and biological screening for antimicrobial activity. **Food Science and Technology**, 2015. doi: 10.1016/j.lwt.2015.08.024.

GREGER, H., HOFFER, O. New unsymmetrically substituted tetrahydrofuran lignans from *Atermisia Absinthium*. **Tetrahedron**, 36, pp. 3551-3558.

BARDON, A., KAMIYA, N.I., CAROLINA A., A. N., CATALAN, C.A.N., DIAS, J.G., HERZ.W. Glaucolides and related sesquiterpene lactones from *Vernonia nudiflora* and *chrysolaena*. **Phytochemistry**, Vol. 31, No. 2, pp. 609-613, 1992

BARDON. A., MONTANARO, S., CATALAN, C.A.N., DIAZ, J.G., HERZ, W., Piptocarphols and other constituents of *chrysolaena verbascifolia* and *lessingianthus rubricaulis*. **Phytochemistry**, Vol. 34, No. 1, pp. 253-259, 1993

BERETTA, M.E., FERNANDES, C.A., SCHNEIDER, A.A., RITTER, M.R. A família Asteraceae no Parque Estadual de Itapuã, Viamão, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**. Porto Alegre, v. 6, n. 3, p. 189-216, 2008

BOHLMANN, F., MAHANTA, P.K., DUTTA, L.N., Weitere hirsutinolide aus vernonia-arten. **Phytochemistry**, Vol. 18, pp. 289-291, 1979.

BOHLMANN, F.; PAHUP, S.; NALEEN, B.; AKUPOVIC, J. Three Bourbonenolides and other sesquiterpenelactones from *Vernonia* species. **Phytochemistry**, Vol. 24 N° 10, pp. 2379-2382, 1981.

BORKOSKY.S, BARDON.A, CATALAN.C.A.N, DIAZ.J.G, HERZ.W. Diterpenes from *vernonanthura amplexicaulis*. **Phytochemistry**, Vol. 40, pp. 1477-1479, 1995.

BOSABALIDIS .A, GABRIELI. C, NIOPA, I. Flavone aglycones in glandular hairs of *Origanum x Intercedens*. **Phytochemistry** Vol. 49, No. 6, pp. 1549-1553, 1998

BUSKUHL, H.; OLIVEIRA, F.L.; *et.al.* Sesquiterpene lactones from *Vernonia scorpioides* and their in vitro cytotoxicity. **Phytochemistry** 71, pp 1539–1544, 2010.

CALIXTO, J.B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e cultura**, Vol. 35, n^o3, São Paulo, 2003;

CARRENHO,L.Z.B. Avaliação dos efeitos da subfração acetato de etila de *Vernonia scorpioides*. **Dissertação de mestrado**, São Paulo, 2009

CATALAN, C.A.N.; IGLESIAS, D.L.I.; Sesquiterpenes lactones and other constituents of *Vernonia mollissima* and *Vernonia squamulosa*. **Journal of Natural Products** Vol. 49, No. 2,pp. 351-353, 1986

CHATURVEDI, D. Sesquiterpene lactones: Structural diversity and their biological activities: Opportunity, Challenge and Scope of Natural Products. **Medicinal Chemistry**,: 313-334, 2011.

CERVI, A. C.; LINSINGEN, L.; HATSCHBACH, G.; RIBAS, O. S. A vegetação do Parque Estadual de Vila Velha, município de Ponta Grossa, Paraná, Brasil. **Boletim do museu botânico municipal**, 69, 1-52, 2007.

CONEGERO, L. S.; NAZARI, I. R. M.; SARRAGIOTTO, M. H., CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *Alchornea glandulosa* (EUPHORBIACEAE) **Química Nova**. 26 (6), pp.825-827, 2003.

COWALL, P.L., CASSADY, J.M., CHANG, C.J., KOZLOWSKI, J.F. Isolation and Structure Determination of Piptocarphins A-F, Cytotoxic Germacranolide Lactones from *Piptocarpha chontalensis*. **J. Org. Chem.**, 46, 1981.

CUI, C. B., Y. Tezuka, T. Kikuchi, H. Nakano, T. Tamaoki, J. H. Park, **Chem. Pharm. Bull.** 38, pp3218, 1990.

DHAMI, N., Trends in Pharmacognosy: A modern science of natural medicines, **Journal of herbal medicine**, 3, pp 123-131, 2013.

DERMATTEIS, M., ANGULO, M.B., Cytotaxonomy of some species of the South American genus *Lessingianthus* (Asteraceae, Vernonieae). **Plant Syst Evol**, 298:277–285, 2012.

FAKIM, G.A, Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine** 27, pp 1–93, 2006.

FARIAS, G.J. Controle de Alecrim do campo (*Vernonia nudiflora*) em pastagem natural com aplicação localizada de herbicidas em diferentes doses. **Dissertação de mestrado**, 2008.

FERNANDES, D. C. Estudo químico e atividade biológica de *Garcinia xanthochymus* (Clusiaceae). **Dissertação de mestrado**, 2010.

FLOR, J. B. S. Levantamento bibliográfico de *Calendula officinalis* (Asteraceae): espécie de interesse ao Sistema Único de Saúde (SUS). **Trabalho de conclusão de curso**, UFMS, 2010.

GAO-SHANG, L.; ZHEN, W.; JING, L.; TING-YUE, L.; TING-YUE, L. LI-JUAN, Z. QING-DE, L.; YONG-LIN, W. Cytotoxic sesquiterpene lactones from *Vernonia bockiana*. **Chinese Journal of Natural Medicines**, 10 (3): pp 230-233, 2012.

GASTEIGER, J., TERFLOTH, L., COSTA, B.F, Sesquiterpene lactone-based classification of three Asteraceae tribes: a study based on self-organizing neural networks applied to chemosystematics. **Phytochemistry**, 66, 345–353, 2005.

GHANTOUS, A; GALI-MUHTASIB, H; VUORELA, H; SALIBA, NA; DARWICHE, N. What made sesquiterpene lactones reach cancer clinical trials. **Drug Discov. Today** 15, 668-678, 2010.

GRAYER, J.R.; ECKERT, M.R.; LEVER, A.; VEITCH, N.C.; KITE, G.C.; PATON, A.J. Distribution of exudate flavonoids in the genus *Plectranthus*. **Biochemical Systematics and Ecology** 38, pp 335–341, 2010

IGUAL, M.O.; MARTUCCI, M.E.P.; COSTA, F.B.; NETO, L.G. Sesquiterpene lactones, chlorogenic acids and flavonoids from leaves of *Vernonia polyanthes* Less (Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, 51, 94–9, 2013.

JAKUPOVIC, J.; SCHMEDA HIRSCHMANN, G.; SCHUSTER, A.; ZDERO, C.; BOHLMANN, F.; KING, R. M.; Robinson, H.; PICKARDT, J. **Phytochemistry** 25, pp.145–158, 1986.

KOTOWICZ.C., BARDÓN.A, CATALAN.C.A.N., ROJAS.C.M., JOSEPH-NATHAN.P., Glaucolides and hirsutinolides from *vernonthura quamulosa*. **Phytochemistry**.,Vol 47, pp.425-428, 1998

KRAFCHYK,N.; GLOMB, A.M. Characterization of Phenolic Compounds in Rooibos Tea. **J. Agric. Food Chem.** 56, 3368–3376, 2008.

LEE, H.L.; KIM, H.J.; SONG, Y.S.; JIN, C.; LEE, K.T.; CHO, J.; LEE, Y.S. Constituents of the stems and fruits of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. **Archives of pharmacal research**. Vol. 26, n^o 12, p. 1018-1023, 2003

LIU, Y.; Alfarius E. Nugroho NUGROHO, E.A.; Vernodalidimers A and B, novel orthoester elemanolide dimers from seeds of *Vernonia anthelmintica*. **Tetrahedron Letters**, 51 pp 6584–6587, 2010.

LIU, H.; ZHANG, X., WU, C., WU, H., GUO, P., XU, X. Anti-hyperlipidemic caffeoylquinic acids from the fruits of *Pandanus tectorius* Soland. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, 3 (08), pp 16-19, 2013

MACÍAS, AF; FERNANDES A; VARELA, RM; MOLINILLO, JMG; TORRES, A; ALVES, PLCA. Sesquiterpene lactones as allelochemicals **J. NAT. PROD.**, 69, 795-800, 2006.

MARTINEZ-VÁZQUEZ, M.; SEPULVEDA, S.; BELMONT, M .A; RUBIO, M. The transformation of glaucolide A into cadinanolides and hirsutinolides. **Journal of Natural Products** Vol. 55, No. 7, pp. 884-898, 1992

MAGGIO.A., ROSSELI.S., BANCHEVA.S., BRUNO.M., Sesquiterpenoids in subtribe Centaureinae (Cass.) Dumort (tribe Cardueae, Asteraceae): Distribution, ¹³C NMR spectral data and biological properties. **Phytochemistry** 95 pp.19–93, 2013.

MERFORT, I. Perspectives on sesquiterpene lactones in inflammation and cancer. **CURR. DRUG TARGETS** 12, 1560-1573, 2011.

MITCHELL, J.C., TOWERS, G.H.N., RODRIGUEZ, E. Biological activities of sesquiterpene lactones. **Phytochemistry** , vol 15 pp 1573-1580, 1976.

MONTEIRO, M. C. M.; LEPTOKARYDIS, I. H. SILVA, H.G.; SILVA, V.C.; BOLZANI, V.C.; YOUNG, M.C.M.; LOPES, M.N.; Constituintes químicos isolados dos caules de *Michelia champaca* L. (Magnoliaceae). **Eclética Química**. Volume 32, número 3, 2007.

Monks, A.; Scudiero, D.; SKeahan, P.; Shoemaker, R.; Paull, K.; Vistica, D.; Hose, C.; Langley, J.; Cronise, P.; Vaigro-Wolff, A.; Gray-Goodrich, M.; Campbell, H.; Mayo, J.; Boyd, M., Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Tumor Cell Lines, **J. Nat. Cancer Inst.**, 83, 1991, 757-766.

NAKAJIMA,N.J.; SEMIR,J.; Asteraceae do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. **Revista brasileira Botânica**, Vol 24, pp 471-478, 2001.

NEWMAN, J.D., CRAGG, M.G., Gordon. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta** 1830, 3670–3695, 2013

ODONNE, G., HERBETTE, G., EPARVIER, V., BOURDY, G., ROJAS, R., SAUVAIN, M., STIEN, D. Antileishmanial sesquiterpene lactones from *Pseudelephantopus spicatus*, a traditional remedy from the Chayahuita Amerindians (Peru) **J. Ethnopharmacol.** 137, 875–879, 2011

PAREJO, I., VILADOMAT, F., BASTIDA, G.S.H., BURILLO, J.S., CODINA, C. Bioguided Isolation and Identification of the Nonvolatile Antioxidant Compounds from Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) Waste. **J. Agric. Food Chem.** 52, 1890–1897, 2004.

PIZZOLATTI, G.M., BRIGHENTE, C.M.I., VERDI, G.L., Gênero Baccharis (Asteraceae): Aspectos Químicos, econômicos e biológicos. **Quim. Nova**, Vol. 28, 85–94, 2005.

POLLA, G.C., BARDÓN, A., CATÁLAN, C.A.N., GEDRIS, T.E., HERZ, W., Elephantopus-type sesquiterpene lactones from a *Vernonanthura* species, *Vernonanthura nebulorum*. **Biochemical Systematics and Ecology**, 31, 397–405, 2003.

PORTILLO, A. VILLA, R., FREIXA, B., FERRO, E., PARELLA, T., CASANOVA, J., CANIGUERA, S. Antifungal sesquiterpene from the root of *Vernonanthura tweedieana*. **Journal of Ethnopharmacology** 97, 49–52, 2005.

RAGASA, C.Y., RIDEOUT, J.A. An Antifungal Cadinanolide from *Pseudelephantopus spicatus* **Chem. Pharm. Bull.** 49(10) 1359–1361 (2001)

RINGL, A.; PRINZ, S.; HUEFNER, A.; KURZMANN, M.; KOPP, B.; Chemosystematic Value of Flavonoids from *Crataegus x macrocarpa* (Rosaceae) with special Emphasis on (R)- and (S)-Eriodictyol-7-O-glucuronide and Luteolin-7-O-glucuronide. **Chemistry & Biodiversity** – Vol. 4, 2007

SARTORI, L.R.; FERREIRA, M.S.; PERAZZO, F.F.; MANDALHO L, L. CARVALHO, J.C.T. Atividade antiinflamatória do granulado de *Calendula officinalis* L. e *Matricaria recutita* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 2003.

SILVA, R.A., Florística, fitossociologia e fenologia de três fitofisionomias campestres no parque estadual de Vila Velha, Ponta Grossa, Paraná. **Dissertação de mestrado**, 2014.

SILVA, T.M.S., CARVALHO, M.G., FILHO, R.B., Estudo espectroscópico em elucidação estrutural de flavonoides de *Solanum jabrense* AGRA & NEE E *S. paludosum* MORIC. **Quim. Nova**, Vol. 32, No. 5, 1119-1128, 2009

SOUZA, F.O., Asteraceae no parque estadual da Ilha do Cardoso, Cananéia, SP. **Dissertação de mestrado**, 2007.

SUN-YUP, S.; HYE-SOOK, K.; HYEON-JIN, S.; YOUNG-JU, L., JEONG-RO, P.; SOON-SIL, C.; YOUNG-HWAN, S. Isolation and Identification of Flavonoids from Gujeolcho (*Chrysanthemum zawadskii* var. *latilobum*) as Inhibitor of Histamine Release. **Food Sci. Biotechnol.** 21(2): 613-617 (2012)

TANAKA, A. C.J.; SILVA, C.C.; FILHO, D.P.B.; NAKAMURA, V.C.; CARVALHO, E.J.; FOGGIO, A.N. CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *Luehea divaricata* MART. (TILIACEAE). **Química Nova**, Vol. 28, No. 5, 834-837, 2005.

Tomás-Barberán, F. A.; Clifford, M. N. Flavanones, chalcones and dihydrochalcones - nature, occurrence and dietary burden. **J. Sci. Food Agric.** 2000, 80, 1073-1080.

TOYANG, N.J.; VERPOORTE, R. A review of the medicinal potentials of plants of the genus *Vernonia* (Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology** 146, 681-723, 2013

VALDERRAMA. L., PAIVA, V.B, MARÇO, P.H., P. VALDERRAMA.P, Proposta experimental didática para o ensino de análise de componentes principais. **Química Nova**, aceito, 2015.

VERDI, L.G.; BRIGHENTE, C.M.I.; PIZZOLATTI, G.M. Gênero *Baccharis* (ASTERACEAE): Aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, Vol. 28, 85-94, 2005.

YANG.S.; LIU, M.; LIANG,N.; ZHAO,Q.; ZHANG.Y.; XUE, W.; YANG.S. **Chemistry Central Journal** pp 1-10, 2013

YANG, L.Y.; CHANG, M.S.; WU, C.C.; HSIEH, P.W.; CHEN, S.L.; CHANG, F.R.; HUNG, C.W.; ISSA, H.H.; WU, Y.C. Cytotoxic Sesquiterpene Lactones from *Pseudoelephantopus spicatus*. **J. Nat. Prod.** 70, 1761–1765, 2007

WOLD. S, Principal Component Analysis: Tutorial. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 2, p. 37-52, 1987.

ZHANG, L.; SHAO,Y.L.; HUA,L.; LIYA.; HUSSAIN, S.H.; ARFAN, M.; GAO,K.. Guaianolides and elemanolides from *Vernonia anthelmintica*. **Phytochemistry Letters** 7, 14–18, 2014