



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

“Isolamento e caracterização de metabólitos secundários de *Calea parvifolia* (Asteraceae) e produzidos por fungos endofíticos da planta”.

Tese apresentada por **Marcos Alessandro dos Santos Ribeiro** 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

2016



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

“Isolamento e caracterização de metabólitos secundários de *Calea parvifolia* (Asteraceae) e produzidos por fungos endofíticos da planta”.

Doutorando: MARCOS ALESSANDRO DOS SANTOS RIBEIRO

Orientadora: Prof^a. Dra. Maria Helena Sarragiotto



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 Marcos Alessandro dos Santos Ribeiro, perante a Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Química em 03 de março de 2016.

COMISSÃO JULGADORA:


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


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


.....
Prof. Dr. João Alencar Pamphile
MEMBRO - DBC/UEM


.....
Prof. Dra. Angela Regina Araujo
MEMBRO - UNESP


.....
Prof. Dr. Eduardo Cesar Meurer
MEMBRO - UFPR

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

R484i Ribeiro, Marcos Alessandro dos Santos
Isolamento e caracterização de metabólitos secundários de *Calea parvifolia* (Asteraceae) e produzidos por fungos endofíticos da planta / Marcos Alessandro dos Santos Ribeiro. -- Maringá, PR, 2016. 246 f.: il., 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, 2016.

1. *Calea parvifolia* - Atividade antioxidante. 2. *Calea parvifolia* - Atividade anticancer. 3. Asteraceae. 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

MRPB-003621

Dedico este trabalho ao meu Brasil,
minha esposa Andréia,
meu filho Luiz Henrique e Ana Luíza
meu pai Cláudio,
minha mãe Norma,
meu irmão Maycon,
pelo amor, paciência, compreensão, incentivo,
por acreditarem em mim e esperar...

AGRADECIMENTOS

À Deus por renovar em mim a força do Espírito Santo todos os dias.

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

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

A meu pai Cláudio, minha mãe Norma, que me ensinaram à capacidade de voar e sempre acreditaram em mim com amor incondicional.

A meu irmão Maycon, amigo Waldinei que me incentivam a continuar.

A minha linda esposa Andréia que me ofereceu a verdadeira amizade quando eu estava precisando de ajuda.

À Sandro, Júlio, Adriana, Beatriz, Carla, Letícia, Maria Augusta, Manuela, Josiane, Professor João, Darlon, e Professora Debora pelo aprendizado e amizade destes anos de convivência no laboratório 31 e microbiologia.

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

Ao Moacir pela colaboração técnica e pela amizade.

A todos que perto e a distância rezou e espera por mim.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1	Espécies vegetais como fontes de compostos bioativos	1
1.2	<i>Calea parvifolia</i>	2
1.3	Fungos endofíticos	9
1.4	Espectrometria de Massas (EM)	13
2.	OBJETIVOS	20
3.	PARTE EXPERIMENTAL	21
3.1	Procedimentos Gerais e Equipamentos Utilizados	21
3.2	Estudo Químico da espécie vegetal <i>Calea parvifolia</i>	22
3.2.1	Coleta do material	22
3.2.2	Preparação e Fracionamento do Extrato Bruto	22
3.2.3	Estudo das frações obtidas do fracionamento do CEB de <i>C. parvifolia</i>	24
3.2.3.1	Fração CFH	25
3.2.3.2	Fração CFD	25
3.2.3.3	Fração CFAC	28
3.2.3.4	Fração CFHM	29
3.3	Estudos dos metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos de <i>Calea parvifolia</i>	30
3.3.1	Isolamento dos fungos endofíticos	30
3.3.2	Agrupamento, caracterização e identificação dos fungos endofíticos baseados na morfologia.	31
3.3.3	Obtenção da frequência de colonização (FC)	31
3.3.4	Obtenção dos extratos metabólitos secundários dos fungos endofíticos isolados	31
3.3.5	Estudo Químico dos extratos brutos dos fungos endofíticos	33
4.	ENSAIOS BIOLÓGICOS	34
4.1	Atividade antioxidante	34
4.2	Atividade antibacteriana	34
4.3	Atividade antitumoral	35

4.4	Atividade Anti-leishmania	37
4.4.1	Parasita	37
4.4.2	Ensaio antiproliferativo	37
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1	Estudo da Espécie Vegetal <i>Calea parvifolia</i>	38
5.1.2	Identificação dos compostos isolados de <i>Calea parvifolia</i>	38
5.1.3	Lactonas sesquiterpênicas (compostos CP-III a CP-VIII)	38
5.2	Flavonoides (CP-I e CP-II)	99
5.3	Ácidos clorogênicos (compostos CP-IX a CP-X)	108
5.4	Análises por LC-MS dos compostos e frações da planta <i>Calea parvifolia</i>	129
5.5	Metabólitos Produzidos Pelos Fungos Endofíticos Isolados da Espécie Vegetal <i>C. parvifolia</i>	163
5.5.1	Composto CP-XI	169
5.5.2	Composto CP-XII	174
5.5.3	Compostos CP-XIII e CP-XIV	188
6.	ENSAIOS BIOLÓGICOS	204
6.1	Atividade antioxidante	204
6.2	Atividade antibacteriana das frações obtidas de <i>Calea parvifolia</i>	206
6.3	Atividade antitumoral	207
6.4	Atividade Antileishmania	209
7.	CONCLUSÕES	210
8.	REFERÊNCIA	213

ÍNDICE DE FIGURA

Figura 1	Estruturas das principais classes de metabólitos secundários isolados do gênero <i>Calea</i> .	3
Figura 2	Estruturas de lactonas sesquiterpênicas com esqueleto tipo furanoheliangolídeos isoladas das espécies vegetais <i>C. hymenolepis</i> e <i>C. lantanoides</i> .	4
Figura 3	Estruturas de lactonas sesquiterpênicas com esqueleto tipo heliangolídeo isoladas das espécies vegetais <i>C. teucrifolia</i> , <i>C. zacatechichi</i> e <i>C. oxylepisi</i> .	4
Figura 4	Estruturas de lactonas sesquiterpênicas com esqueleto tipo eudesmanoídeo isoladas das espécies vegetais <i>C. runtundifolia</i> e <i>C. trichomata</i> .	5
Figura 5	Estruturas de lactonas sesquiterpênicas com esqueleto tipo germacronolídeos isoladas das espécies vegetais <i>C. urtifolia</i> e <i>C. zacathechihii</i> .	6
Figura 6	Estruturas de compostos isolados da espécie vegetal <i>C. prunifolia</i> H.B.K.	6
Figura 7	Estruturas de compostos isolados da espécie vegetal <i>C. platylepis</i> .	7
Figura 8	Estruturas de compostos isolados da espécie vegetal <i>C. prunifolia</i> H.B.K.	8
Figura 9	Estruturas de compostos isolados da espécie vegetal <i>C. uniflora</i> .	8
Figura 10	Compostos identificados nos extratos dos fungos endofíticos <i>Aaspergillus parasiticus</i> e <i>Apiospora montagnei</i> , isolados das plantas <i>S. sempervirens</i> e <i>P. violacea</i> , respectivamente.	10
Figura 11	Compostos identificados nos extratos dos fungos endofíticos <i>P. microspora</i> e nas espécies endofíticas <i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Byssoschlamys</i> e <i>Septoria</i> .	11
Figura 12	Estruturas de compostos identificados no extrato do fungo endofítico <i>Gliomastrix murorum</i> isolado da planta <i>Paris polyphylla</i> var. <i>yunnanensis</i> .	12
Figura 13	Utilização de espectrometria de massas em diferentes áreas do conhecimento. Figura extraída do artigo escrito por CROTTI, 2006.	14
Figura 14	Número total de artigos publicados envolvendo as técnicas de ionização mais utilizadas. Baseado nos dados obtidos de pesquisa realizada em www.isiknowledge.com , no período de 1993 a 2004. Figura extraída do artigo escrito por CROTTI, 2006.	15
Figura 15	Estruturas dos goyazensolídeos estudados em cromatografia líquida/espectrômetro de massas sequencial (LC/MS/MS).	16
Figura 16	16 a) estruturas da budleina A e centratherina, 16 b) formação do fragmento do íon de m/z 293 a partir da protonação da budleina A via um rearranjo sigmatrópico.	17
Figura 17	Estruturas dos flavonoides 6-C e 8-C-glicosilados 43 a 46 .	18
Figura 18	Estruturas dos ácidos 3,5- e 4,5-dicafeoilquínicos 53 e 54 .	19
Figura 19	Estruturas dos ácidos 1,3- e 1,5-dicafeoilquínicos 55 e 56 .	19
Figura 20	Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) para o composto CP-V.	40
Figura 21	Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) para o composto CP-V.	41
Figura 22	Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 75,5 MHz), para o composto	42

	CP-V.	
Figura 23	Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 300 MHz), para o composto CP-V.	43
Figura 24	Espectro de HSQC (CDCl_3 ; 300 MHz) para o composto CP-V.	45
Figura 25	Expansão do Espectro de HSQC (CDCl_3 ; 300 MHz), para o composto CP-V.	46
Figura 26	Espectro de COSY (CDCl_3 ; 300 MHz), para o composto CP-V.	47
Figura 27	Espectro de COSY (CDCl_3 ; 300 MHz), para o composto CP-V.	48
Figura 28	Espectro de HMBC (CDCl_3 , 300 MHz), para o composto CP-V.	50
Figura 29	Expansão do espectro de HMBC (CDCl_3 , 300 MHz), para o composto CP-V.	51
Figura 30	Expansão do espectro de HMBC (CDCl_3 , 300 MHz), para o composto CP-V.	52
Figura 31	Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz), para o composto CP-VI.	56
Figura 32	Espectro de COSY (CDCl_3 , 300 MHz), para o composto CP-VI.	57
Figura 33	Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75,5 MHz), para o composto CP-VI.	59
Figura 34	Espectro HSQC (CDCl_3 , 300 MHz), para o composto CP-VI.	60
Figura 35	Espectro HMBC (CDCl_3 , 300,06 MHz), para o composto CP-VI.	61
Figura 36	Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 300 MHz), para os compostos CP-III e CP-IV.	66
Figura 37	Expansão do espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 300 MHz), para os compostos CP-III e CP-IV.	67
Figura 38	Expansão do espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 300 MHz), para os compostos CP-III e CP-IV.	68
Figura 39	Espectro de HSQC (CDCl_3 , 300MHz), para os compostos CP-III e CP-IV.	69
Figura 40	Espectro de HMBC (CDCl_3 , 300 MHz), para os compostos CP-III e CP-IV.	70
Figura 41	Expansão do espectro de HMBC (CDCl_3 , 300 MHz), para o composto CP-III e CP-IV.	71
Figura 42	Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz), para o composto CP-III.	75
Figura 43	Espectro de ^{13}C (CDCl_3 , 300 MHz), para o composto CP-III.	76
Figura 44	Espectro de COSY (CDCl_3 , 300 MHz), para o composto CP-III.	77
Figura 45	Espectro de HMQC (CDCl_3 , 300 MHz), para o composto CP-III.	78
Figura 46	Espectro de HMBC e expansão (CDCl_3 , 300,06 MHz), para o composto CP-III.	79
Figura 47	Expansão do espectro de HMBC (CDCl_3 , 300 MHz), para o composto CP-III.	80
Figura 48	Espectro de RMN de ^1H e expansão (CDCl_3 , 300 MHz) para o composto CP-VII.	82
Figura 49	Espectro de RMN ^{13}C do (CDCl_3 , 75,5 MHz), para o composto CP-VII.	83
Figura 50	Espectro de HMBC (CDCl_3 , 300 MHz), para o composto CP-VII.	84
Figura 51	Expansão do espectro de HMBC (CDCl_3 , 300 MHz), para o composto CP-VII.	85
Figura 52	Expansão do espectro de HMBC (CDCl_3 , 300,06 MHz), para o composto CP-V.	86
Figura 53	Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 300,06 MHz), para o composto CP-VIII.	90

Figura 54	Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz), para o composto CP-VIII.	91
Figura 55	Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75,5 MHz), para o composto CP-VIII.	92
Figura 56	Espectro de HSQC (CDCl_3 , 300 MHz), para o composto CP-VIII.	93
Figura 57	Espectro de COSY e expansão (CDCl_3 , 300 MHz), para o compostos CP-VIII.	94
Figura 58	Espectro de HMBC (CDCl_3 , 300 MHz), para o composto CP-VIII.	95
Figura 59	Expansão do espectro de HMBC (CDCl_3 , 300 MHz), para o composto CP-VIII.	96
Figura 60	Expansão do espectro de HMBC (CDCl_3 , 300MHz), para o composto CP-VIII.	97
Figura 61	Espectro de RMN ^1H (DMSO-d_6 , 300 MHz), dos compostos CP-I e CP-II.	101
Figura 62	Espectro de COSY (DMSO-d_6 , 300,06 MHz), dos compostos CP-I e CP-II.	102
Figura 63	Espectro de RMN ^{13}C (DMSO-d_6 , 75,5 MHz,) dos compostos CP-I e CP-II.	103
Figura 64	Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO-d_6 , 300,06 MHz), dos compostos CP-I e CP-II.	104
Figura 65	Espectro HSQC e expansão (DMSO-d_6 , 300,0 MHz), dos compotos CP- I e CP-II.	105
Figura 66	Espectro de NOESY (DMSO-d_6 , 300,0 MHz), dos compostos CP-I e CP-II.	106
Figura 67	Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 300 MHz), para o composto CP-IX.	109
Figura 68	Expansão do espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 300 MHz), para o composto CP-IX.	110
Figura 69	Espectro de RMN ^{13}C e suas expansões (CD_3OD , 75,5 MHz), para o composto CP-IX.	111
Figura 70	Espectro de HSQC e sua expansão (CD_3OD , 300 MHz), para o composto CP-IX.	113
Figura 71	Expansão do espectro HSQC (CD_3OD , 300 MHz), para o composto CP-IX.	114
Figura 72	Espectro de COSY e expansão (CD_3OD , 300 MHz), para o composto CP-IX.	115
Figura 73	Expansão do espectro de COSY (CD_3OD , 300 MHz), para o composto CP-IX.	116
Figura 74	Espectro de HMBC e expansão (CD_3OD , 300 MHz), para o composto CP-IX.	117
Figura 75	Expansão do espectro de HMBC (CD_3OD , 300 MHz), para o composto CP-IX.	118
Figura 76	Expansão do espectro de HMBC (CD_3OD , 300 MHz), para o composto CP-IX.	119
Figura 77	Espectro de RMN de ^1H e expansão (CD_3OD , 300 MHz), para o composto CP-X.	123
Figura 78	Expansão do espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 300 MHz), para o composto CP-X.	124
Figura 79	Espectro de COSY e expansão (CD_3OD , 300 MHz), para o	125

	composto CP-X.	
Figura 80	Expansão do espectro de COSY (CD ₃ OD, 300 MHz), para o composto CP-X.	126
Figura 81	Estruturas de derivados do ácido clorogênico com substituição nos carbonos C-3, C-4 e C-5.	127
Figura 82	Estruturas de lactonas tetra- e diidro-furanoelíngolídeos com seus respectivos sítios de protonação em fase gasosa.	129
Figura 83	Espectro de ESI-(+)-MS/MS para mistura de compostos CP-III e CP-IV.	130
Figura 84	Proposta de fragmentação para o composto CP-III.	132
Figura 85	Proposta de fragmentação para o composto CP-IV.	132
Figura 86	Proposta de fragmentação para o composto CP-IV.	133
Figura 87	Espectro de ESI-(+)-MS/MS para o composto CP-V.	134
Figura 88	Espectro de ESI-(+)-MS/MS para o composto CP-VI.	135
Figura 89	Espectro de ESI-(+)-MS/MS para o composto do composto CP-VII.	136
Figura 90	Espectro de ESI-(+)-MS/MS para o composto do composto CP-VIII.	137
Figura 91	Proposta de fragmentação para o composto CP-V.	140
Figura 92	Proposta de fragmentação para o composto CP-VI.	140
Figura 93	Proposta de fragmentação para o composto CP-VII.	141
Figura 94	Proposta de fragmentação para o composto CP-VIII.	141
Figura 95	Proposta de fragmentação para o composto CP-VIII.	142
Figura 96	Espectro de ESI-(+)-MS (full scan), para o composto do composto CP-V.	143
Figura 97	Espectro de massas sequencial MS/MS obtidos por dissociação induzida por colisão do íon de m/z 345 a 20 eV de colisão.	144
Figura 98	Espectro de massas sequencial MS/MS obtidos por dissociação induzida por colisão do íon de m/z 349 a 20 eV de colisão.	145
Figura 99	Cromatograma de íons totais da fração CFD.	147
Figura 100	Espectro de massas sequencial MS/MS obtidos por dissociação induzida por colisão do íon de m/z 346 a 20 eV de colisão.	149
Figura 101	Espectro de massas sequencial MS/MS obtidos por dissociação induzida por colisão do íon de m/z 366 a 20 eV de colisão.	150
Figura 102	Espectro de massas sequencial MS/MS obtidos por dissociação induzida por colisão do íon de m/z 347 a 20 eV de colisão.	151
Figura 103	Proposta de fragmentação para os íons de m/z 259 e 279 da fração CFD.	152
Figura 104	Espectro de massas sequencial MS/MS obtidos por dissociação induzida por colisão do íon de m/z 259 a 25 eV de colisão, a partir da fração CFD.	153
Figura 105	Espectro de massas sequencial MS/MS obtidos por dissociação induzida por colisão do íon de m/z 279 a 25 eV de colisão, a partir da fração CFD.	154
Figura 106	Proposta da biossíntese do composto rufescenolideo C, a partir de uma reação tipo Diels-Alder. Figura retirada do artigo escrito por REN, e et. al., 2013.	155
Figura 107	Espectro de massas sequencial MS/MS obtidos por dissociação	156

	induzida por colisão do íon de m/z 689 a 25 eV de colisão, a partir da fração CFD.	
Figura 108	Proposta de fragmentação para o íon de m/z 689 da fração CFD.	157
Figura 109	Continuação da proposta de fragmentação para o íon em m/z 689 da fração CFD.	157
Figura 110	Espectro de fragmentação ESI-(+)-MS/MS do íon de m/z 353 do composto CP-IX (15 eV).	159
Figura 111	Proposta de fragmentação para o íon de m/z 353 do composto CP-IX.	160
Figura 112	Espectro de fragmentação ESI-(+)-MS/MS do íon de m/z 515 do composto CP-X (15 eV).	161
Figura 113	Proposta de fragmentação para do íon de m/z 515 para o comoposto CP-X.	162
Figura 114	Placa cromatográfica (sílica gel; CHCl ₃ /MeOH 20%) referente aos extratos de metabólitos secundários provenientes dos fungos endofíticos extraídos da espécie vegetal <i>C. parvifolia</i> .	164
Figura 115	Ampliação do espectro de RMN de ¹ H (CD ₃ OD, 300 MHz), para os extratos brutos CF-7, CF-8, CF-11 e CF-12.	165
Figura 116	Ampliação do espectro de RMN de ¹ H (CD ₃ OD, 300 MHz), para os extratos brutos CF-7, CF-8, CF-11 e CF-12.	166
Figura 117	Ampliação do espectro de RMN de ¹ H (CD ₃ OD, 300 MHz), para os extratos brutos CF-4 e CF-6.	167
Figura 118	Ampliação do espectro de RMN de ¹ H (CD ₃ OD, 300 MHz), para os extratos brutos CF-13 e CF-16.	168
Figura 119	Espectro de RMN de ¹ H (D ₂ O, 300 MHz), para o composto CF-I.	170
Figura 120	Figura 120: Espectro de RMN de ¹³ C (D ₂ O, 75,5 MHz), para o composto CF-I.	171
Figura 121	Espectro de RMN de COSY (D ₂ O, 300 MHz), para o composto CF-I.	171
Figura 122	Curva de calibração para o composto CF-I e o ácido 3-nitropropiónico em CLAE (C18 – Shim-pack prep.-ODS 250 x 46 mm id (Shimadzu). Detector UV-VIS: modelo SPD-M20A. Fase móvel: 0,15% de ácido ortofórfórico (pH2,0). Fluxo de corrida: 0,9 mL/min. Amostra: 20 µL. a) Solução padrão de 3-NPA (≥97 %, Sigma) em triplicata, e b) comparação do composto CF-I em cor vermelho com o padrão em preto.	172
Figura 123	Proposta Biosintética do ácido 3-nitropropiónico proveniente de fungo.	173
Figura 124	Proposta Biosintética do 3-NPA em plantas.	173
Figura 125	Espectro de RMN de ¹ H (CD ₃ OD, 500 MHz), para o composto CF-II.	175
Figura 126	Espectro de RMN de ¹³ C (CD ₃ OD, 75,5 MHz), para o composto CF-II.	176
Figura 127	Espectro de HSQC e expansão (CD ₃ OD, 500 MHz), para o Composto CF-II.	178
Figura 128	Espectro de HMBC (CD ₃ OD, 500 MHz), para o Composto CF-II.	179
Figura 129	Expansão do espectro de HMBC (CD ₃ OD, 500 MHz), para o Composto CF-II.	180
Figura 130	Proposta da rota Biosintética do composto alternariol.	181

Figura 131	Espectro de fragmentação ESI-(+)-MS/MS do extrato bruto CF-12.	183
Figura 132	Espectro de fragmentação ESI-(+)-MS/MS do íon m/z 291 do extrato CF-12.	184
Figura 133	Proposta de fragmentação para o íon em m/z 291.	185
Figura 134	Espectro de fragmentação ESI-(+)-MS/MS do íon de m/z 273 do extrato CF-12.	186
Figura 135	Espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 300 MHz), para o Composto CP-XIII.	188
Figura 136	Espectro de RMN ^{13}C e expansão (CD_3OD , 300 MHz), para o Composto CP-XIII.	189
Figura 137	Espectro de RMN HSQC (CD_3OD , 300 MHz), para o Composto CP-XIII.	190
Figura 138	Espectro de RMN COSY e expansão (CD_3OD , 300 MHz), para o Composto CP-XIII.	191
Figura 139	Espectro de RMN HMBC e expansão (CD_3OD , 300 MHz), para o Composto CP-XIII.	193
Figura 140	Expansão do espectro de HMBC (CD_3OD , 300 MHz), para o Composto CP-XIII.	194
Figura 141	Formas de ressonância de um anel aromático N-oxidado.	195
Figura 142	Espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 300 MHz), para o Composto CP-XIV.	197
Figura 143	Espectro de RMN ^{13}C (CD_3OD , 300 MHz), para o Composto CP-XIV.	198
Figura 144	Espectro de RMN HSQC (CD_3OD , 300 MHz), para o Composto CP-XIV.	199
Figura 145	Espectro de RMN COSY (CD_3OD , 300 MHz), para o Composto CP-XIV.	201
Figura 146	Espectro de RMN HMBC (CD_3OD , 300 MHz), para o Composto CP-XIV.	202
Figura 147	Determinação da atividade antioxidante das frações da espécie vegetal <i>C. parvifolia</i> .	204
Figura 148	Determinação do percentual de inibição (IC_{50}) para a espécie vegetal <i>C. parvifolia</i> .	205
Figura 149	Teste de difusão em disco com a fração CFD da planta <i>Calea parvifolia</i> .	207
Figura 150	Gráfico do crescimento celular versus concentração dos resultados do teste antitumoral da fração FCD.	208

ÍNDICE DE TABELA

Tabela 1	Dados de massas e códigos das sub-frações da CC da fração CFH.	25
Tabela 2	Dados de massas e códigos das sub-frações da CC da fração CFD.	26
Tabela 3	Dados de massas e códigos das sub-frações da CC da fração CFD-3.	26
Tabela 4	Dados de massas e códigos das sub-frações da CC da fração CFD-3-2.	27
Tabela 5	Dados de massas e códigos das sub-frações da CC da fração CFD-3-2-3.	28
Tabela 6	Dados de massas e códigos das sub-frações da CC da fração CFD-3-2-5.	28
Tabela 7	Dados de massas e códigos das sub-frações da CC da fração CFHM.	29
Tabela 8	Dados de massas e códigos das sub-frações da CC da fração CFHM-6.	29
Tabela 9	Dados de massas para os fungos endofíticos isolados da espécie vegetal <i>Calea parvifolia</i> .	32
Tabela 10	Dados espectroscópicos de RMN de ^1H e ^{13}C (CDCl_3 , 300 MHz) do composto CP-V e do 15-deoxibudleina A.	53
Tabela 11	Dados espectroscópicos de RMN de ^1H e ^{13}C (CDCl_3 , 300 MHz) do composto CP-V e do 15-deoxigaiazensolideo.	54
Tabela 12	Dados espectroscópicos de RMN de ^1H e ^{13}C (CDCl_3 , 300 MHz) do composto CP-VI e 15-deoxibudleina A.	62
Tabela 13	Dados espectroscópicos de RMN de ^1H e ^{13}C (CDCl_3 , 300 MHz), do composto CP-VI e 2,3-di-hidro-15-deoxygoyazensolideo.	63
Tabela 14	Dados espectroscópicos de ^1H e ^{13}C (CDCl_3 , 300 MHz) do composto CP-IV e Tirofundina-3- <i>O</i> -metil eter.	72
Tabela 15	Dados espectroscópicos de ^1H e ^{13}C (CDCl_3 , 300 MHz) dos compostos CP-III e CP-IV.	74
Tabela 16	Dados espectroscópicos de ^1H e ^{13}C (CDCl_3 , 300 MHz) do composto CP-V e o derivado Zexbrevina.	87
Tabela 17	Dados espectroscópicos de RMN de ^1H e ^{13}C (300 MHz), do composto CP-VIII e 4,5-dihidro-15-deoxygoyazensolideo.	98
Tabela 18	Dados espectroscópicos de ^1H e ^{13}C (\square DMSO- d_6 , 300 MHz) para os compostos CP-I, CP-II, acacetina e Genkwanina.	107
Tabela 19	Comparação de dados de deslocamento químico relatados na literatura para os compostos os ácidos 3- <i>O</i> -cafeoilquínico (3-CQN) e 5- <i>O</i> -cafeoilquínico (5-CQN) e o compostos CP-IX.	120
Tabela 20	Dados espectroscópicos de ^1H e ^{13}C (CD_3OD , 300 MHz) do Ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquínico e o composto CP-IX.	121
Tabela 21	Dados espectroscópicos de ^1H e ^{13}C (CD_3OD , 300 MHz) do ácido 4,5- <i>O</i> -dicafeoilquínico e o composto CP-X.	128
Tabela 22	Principais fragmentos observados nas análises de ESI-(+)-MS/MS para os compostos CP-III a CP-VIII.	138
Tabela 23	Parâmetros da corrida cromatográfica para a fração CFD.	146
Tabela 24	Os principais íons observados e selecionados na análise de LC-MS da fração CFD.	148
Tabela 25	Dados espectroscópicos de RMN de ^1H e ^{13}C (300,0 MHz, D_2O) para o composto Ácido 3-nitropropionico.	169

Tabela 26	Dados espectroscópicos de RMN de ^1H e ^{13}C (500,0 MHz, CD_3OD) para o composto CP-XII e o composto alenusin.	181
Tabela 27	Dados espectroscópicos de RMN de ^1H e ^{13}C (300,0 MHz, CD_3OD) para o composto CP-XIII e para a 6-metil-2-piridona.	196
Tabela 28	Dados espectroscópicos de RMN de ^1H e ^{13}C (300,0 MHz, CD_3OD) para o composto CP-XIV e o tirosol.	203
Tabela 29	Valores de IC_{50} da atividade antioxidante para o extrato bruto e as respectivas frações da planta <i>C. parvifolia</i> .	205
Tabela 30	Avaliação da atividade antimicrobiana das frações de <i>Calea parvifolia</i> em relação à formação de halos de inibição, analisadas pelo teste estatístico de Tukey ($p < 0,05$).	207
Tabela 31	Avaliação da atividade antitumoral das frações obtidas da espécie vegetal <i>Calea parvifolia</i> .	208
Tabela 32	Atividade In vitro frente à forma promastigota de <i>Leishmania amazonensis</i> .	209

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1	Fracionamento do Extrato bruto da espécie <i>C. parvifolia</i> .	23
Esquema 2	Fracionamento das frações CFH, CFD, CFAC e CFHM da espécie <i>C. parvifolia</i> .	24

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
<i>d</i>	Dupleto
<i>dd</i>	Duplo Dupleto
<i>ddd</i>	Duplo Duplo Dupleto
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMSO	Dimetilsulfóxido
Decomp.	Decomposição
EM	Espectrometria de Massas
FAB	Rápido bombardeamento de átomos
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
Hz	Hertz
IES-EM	Espectrometria de massas com ionização por “electrospray”
IV	Infravermelho
IC₅₀	Concentração do fármaco que causa a inibição de 50% do crescimento celular
IC₁₀₀	Concentração do fármaco para inibição de 100% do crescimento celular - atividade citostática
<i>J</i>	Constante de acoplamento
LC/MS/MS	Cromatográfica líquida/espectrômetro de massas tandem
<i>m</i>	Multiplete
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
MG-MID	Mean-Graph Midpoint Values
MHz	Megahertz
MM	Massa Molecular
mmol	Milimol
ppm	Partes Por Milhão
Quint.	Quinteto
Rend.	Rendimento
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN ¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMCs	Reação Multicomponentes
<i>s</i>	Simpleto
<i>sl</i>	Simpleto Largo
sext.	Sexteto
SFB	Soro fetal bovino
<i>t</i>	Triplete
TCA	Ácido tricloroacético
<i>td</i>	Triplete de Dupleto
TFA	Ácido Trifluoroacético
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultravioleta
μM	MicroMolar
δ	Deslocamento Químico

δ_H Deslocamento Químico de Hidrogênio
 δ_C Deslocamento Químico de Carbono-13

RESUMO

Palavras-chave: *Calea parvifolia*, Asteraceae, furoheliantolídeos, atividade antioxidante, atividade anticancer.

A espécie vegetal *Calea parvifolia* pertence à tribo Helantheae, que faz parte da família Asteraceae. O gênero *Calea* possui aproximadamente 110 espécies, distribuídas no México, América Central e Sul. Este gênero é considerado taxonomicamente complexo e apresenta como principais metabólitos lactonas sesquiterpênicas com esqueletos básicos dos tipos eudesmanolídeos, furoheliantolídeos, germacrolídeos, guaianolídeos e heliantolídeos, além de outros compostos como benzofuranos, derivados acoranos, derivados do timol, flavonoides, germacrenos, *p*-hidroxiacetofenonas e tris-norsesquiterpenos. Dentre os compostos isolados destacam-se as lactonas sesquiterpênicas que apresenta uma gama de atividades biológicas como antileishmania, anti-inflamatória, anti-melanótica frente a células de melanoma B16 e antitumoral. Devido à importância do gênero *Calea*, e em continuidade ao nosso estudo de plantas da família Asteraceae, neste trabalho realizamos o estudo de *Calea parvifolia* e fungos endofíticos desta planta, uma espécie ainda não estudada biológica ou quimicamente. Mais especificamente, realizamos o isolamento e identificação dos principais constituintes desta espécie vegetal e dos microrganismos, além de ensaios de avaliação da atividade antitumoral, antioxidante, antibacteriana e antileishmania para os compostos isolados, extrato bruto e frações obtidas.

O estudo químico de *Calea parvifolia* (folhas) resultou, após fracionamento e purificação das frações pelo uso de técnicas cromatográficas no isolamento de lactonas sesquiterpênicas como tirofundina-3-*O*-metil éter (CP-IV), 15-deoxigoiazensolideo (CP-V), 2,3-di-hidro-15-deoxygoyazensolideo (CP-VI), derivado zexbrevina (CP-VII), 4,5-di-hidro-15-deoxygoyazensolideo (CP-VIII); da mistura dos *O*-metilflavonóides acacetina (CP-I) e genkwanina (CP-II), além dos ácidos clorogênicos 5-*O*-cafeoilquínico (CP-IX) e do ácido 4,5-*O*-dicafeoilquínico (CP-X) e os flavonoides acacetina (CP-I) e genkwanina (CP-II). Para os fungos endofíticos, o estudo cromatográfico e espectroscópico forneceu o isolamento do ácido 3-nitropropiónico, alenusina, *N*-óxido 2-metil-piridona e tirosol. As estruturas das substâncias isoladas foram determinadas pela análise de seus dados espectroscópicos de RMN de ¹H e de ¹³C e técnicas de COSY, DEPT, HMQC e HMBC, espectrometria de massas no modo MS e

MS/MS com resolução unitária para a confirmação estrutural e comparação com dados obtidos da literatura.

Os potenciais de atividade antioxidante foram determinados com base na atividade sequestradora de radical livre do 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) e mostraram atividade comparável ao do antioxidante padrão BHT para a fração hidrometanólica que apresentou IC_{50} 21,03 ($\mu\text{g/mL}$). Os resultados da avaliação da atividade antitumoral, frente a diversas linhagens de células tumorais humana, mostraram que a fração CFD com valores de IC_{50} de 2,9 (rim), 3,0 (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos) e 5,1 (próstata) $\mu\text{g/ml}$. Essa atividade está provavelmente relacionada às lactonas sesquiterpênicas isoladas da fração diclorometano. A atividade anti-leishmania para o extrato e as frações, mostraram que a CFH e o CEB exibiram um notável efeito sob esse microrganismo com IC_{50} de 7,14-2,29 e 1,04-0,89 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

ABSTRACT

Keywords: *Calea parvifolia*, Asteraceae, Furanoheliangolides, antioxidant activity, anticancer activity.

Calea parvifolia plant species belongs to the Helantheae tribe, which is part of the Asteraceae family. Calea the genus has about 110 species distributed in Mexico, Central and South America. This genre is considered taxonomically complex and main sesquiterpene lactones metabolites with basic types of shape eudesmanolides, furanoheliangolides, germacanolides, guaianolides and heliangolids, and other compounds such as benzofurans, germacrane, flavonoids, *p*-hydroxyacetophenone and derivatice from *tris*-norsesquiterpene, thymol and acoranos. Among the isolated compounds there are the sesquiterpene lactones has a range of biological activities such as Leishmania, anti-inflammatory, anti-melanoma B16 and antitumor activity against melanoma cells. Because of the large genus Calea, and continue our study of Asteraceae family plants, in this work we carried out the study *Calea parvifolia* and endophytic fungi of this plant, a species not yet studied biological or chemically. Performed isolation and identification of the main constituents of this plant species and microorganisms, and evaluation tests antitumor activity, antioxidant, antibacterial and antileishmania the single compounds, crude extract and fractions obtained. The chemical study of *Calea parvifolia* (leaves) resulted after fractionation and purification of fractions by using chromatographic techniques in isolation as sesquiterpene lactones tirtundin 3-*O*-methyl ether (CP-IV), 15-deoxygoyazensolide (CP-V), 2',3'-dihydro-15-deoxygoyazensolide (CP-VI), zexbrevine derivative (CP-VII), 4 β ,5-dyhydro-15-deoxygoyzensolide (CP-VIII); in addition to chlorogenic acid 5-*O*-caffeoylquinic (CP-IX) and 4,5-dicaffeoylquinic acid (CP-X), flavonoids acacetin (CP-I) and genkwanin (CP-II). For endophytic fungi, the chromatographic and spectroscopic study provided the isolation of 3-nitropropionic acid, altenusin, *N*-Oxide 2-methyl-pyridone and tyrosol. The structures of the isolated compounds were determined by analysis of spectroscopic data of ¹H and ¹³C NMR and COSY, DEPT, HMQC and HMBC techniques, and confirmed using tandem mass spectrometry and compared with data obtained from the literature. The potential antioxidant activity were determined based on the free radical scavenging activity of 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) and showed activity comparable to that of standard antioxidant BHT for hydromethanolic

fraction which showed IC_{50} 21.03 ($\mu\text{g}/\text{mL}$). The results of the evaluation of antitumor activity against several human tumor cell lines showed that the CFD fraction with IC_{50} values of 2.9 (kidney), 3.0 (resistant ovarian) and 5.1 (prostate) ($\mu\text{g}/\text{mL}$). This activity is probably related to isolated sesquiterpene lactones of dichloromethane fraction. The anti-leishmanial activity for the extract and the fractions showed that CFH and CEB exhibited a notable effect in this microorganism with IC_{50} from 7.14 to 2.29 and 1.04 to 0.89 ($\mu\text{g}/\text{mL}$), respectively.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Espécies vegetais como fontes de compostos bioativos

Em todo o mundo, muitas espécies de plantas são utilizadas por várias etnias há mais de 5000 anos, na cura de variadas doenças (GOLDMAN et al., 2001). Essa utilização deve-se aos princípios ativos presentes em plantas, as quais podem ser utilizadas na produção de remédios, sendo que aproximadamente 25% dos medicamentos modernos são provenientes de vegetais (LIU e WANG, 2008).

Segundo levantamento realizado por Newman e Gragg no período de 1940 até 2014, das 175 moléculas utilizadas no tratamento de câncer, 85 (49%) são produtos naturais ou derivados diretos (NEWMAN e CRAGG, 2016). Os dados apresentados pelos autores, não somente em relação a produtos usados contra o câncer, mas também como agentes antibacterianos, dentre outros, demonstram a importância e utilização de produtos naturais como fonte de novos compostos, os quais podem ser empregados na forma como isolados e/ou servir como modelos para síntese de medicamentos.

Neste contexto, o Brasil apresenta um perfil promissor devido à sua grande biodiversidade, a qual proporciona vasto conhecimento na medicina tradicional e uma rica fonte de novas substâncias bioativas (MENDES et al., 2009).

Das diversas famílias de plantas que servem como fontes potenciais de fármacos destaca-se a família Asteraceae, com aproximadamente 30.000 espécies e 1.700 gêneros, distribuídos em todo o mundo, exceto no continente da Antártida (FUNK et al., 2005). Espécies desta família apresentam lactonas sesquiterpênicas (COSTA et al., 2005; SCOTTI et al., 2012), flavonoides (EMERENCIANO, et al., 2001; NASCIMENTO et al., 2002, NASCIMENTO e OLIVEIRA, 2007) e compostos com o esqueleto diterpênicos (NUNEZ, et. al., 2004), muitos destes compostos de importância terapêutica e como marcadores quimiotaxonômicos.

Várias espécies de Asteraceae ocorrem na região dos Campos Gerais no Paraná (MORO, 2006), que constitui uma área de investigação de nosso grupo de pesquisa, registrando-se, dentre estas, a presença da espécie *Calea parvifolia*, ainda não estudada.

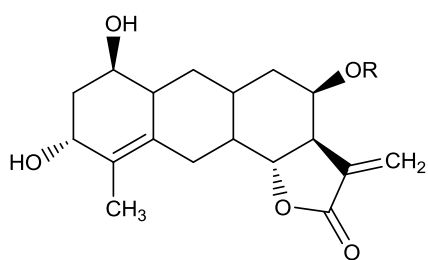
1.2. *Calea parvifolia*

A espécie vegetal *Calea parvifolia*, uma das espécies selecionadas neste estudo, pertence à tribo Helantheae, que faz parte da família Asteraceae. O gênero *Calea* possui aproximadamente 110 espécies, distribuídas no México, América Central e Sul (NASCIMENTO et al., 2004). Foi escolhida porque o gênero *Calea* apresenta uma gama de classes de compostos e um grande potencial farmacológico.

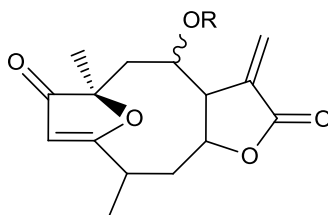
Estudos químicos descrevem uma diversidade de metabólitos secundários para o gênero *Calea*, tais como lactonas sesquiterpênicas com esqueletos básicos dos tipos eudesmanolídeos, furoheliandolídeos, germacrolídeos, guaianolídeos e heliantolídeos, além de outros compostos como benzofuranos, derivados acoranos, derivados do timol, flavonoides, germacrenos, *p*-hidroxiacetofenonas e tris-norsesquiterpenos (BOHLMANN, et al., 1981, 1982; JAKUPOVIC e BOHLMANN, 1983; MALDONADO, et al., 1992; NASCIMENTO, et al., 2002, 2004; OBER, et al., 1984, 1985; ORTEGA, et al.; 1989; YAMADA, et al., 2004). As estruturas das principais classes de compostos descritos estão apresentadas na Figura 1.

Dentre os compostos isolados destacam-se as lactonas sesquiterpênicas da classe dos furano-heliangolídeos, como exemplo, a budleína A (**1**) isolada das partes aéreas da espécie *C. hymenolepis* (BOHLMANN et al., 1982) e o 9 α -hidroxiatriplícolídeo-8-*O*-isobutirato (**2**) isolado das partes aéreas da espécie vegetal *C. rupicola* (SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 1986) (Figura 2).

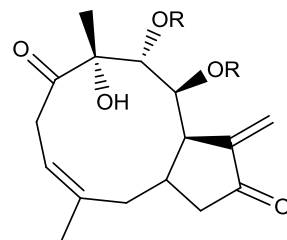
Figura 10: Estruturas das principais classes de metabólitos secundários isolados do gênero *Calea*.



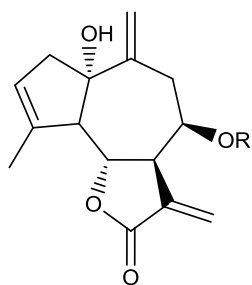
Eudesmanolideo



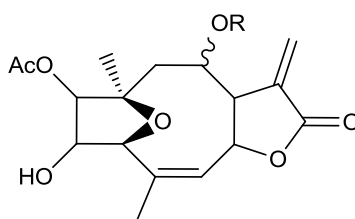
Furanoheliangolideo



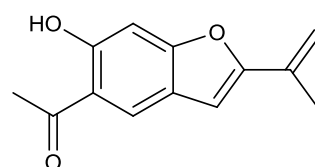
Germacranolideo



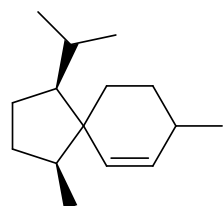
Guaianolideos



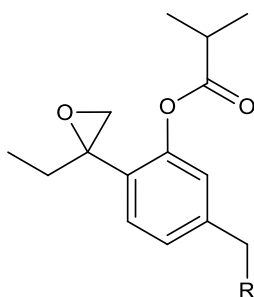
Heliangolideo



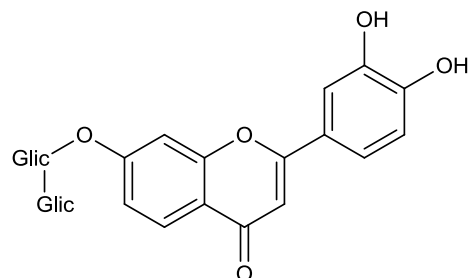
Benzofuranos



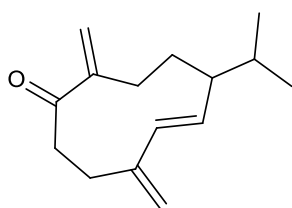
Derivados Acoranos



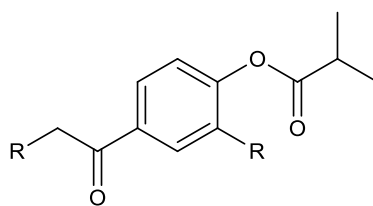
Derivado de Timol



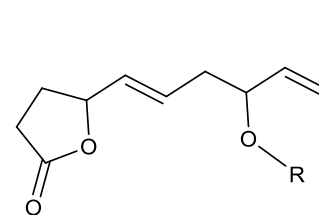
Flavonóides



Germacrenos

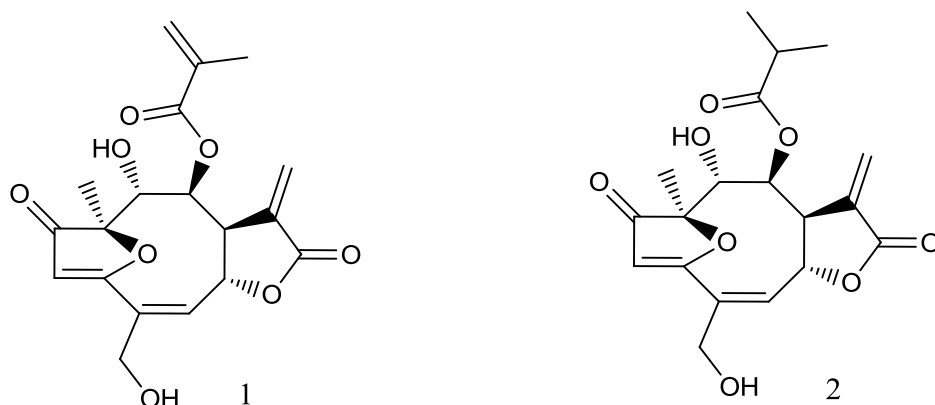


p-Hidroxiacetofenona



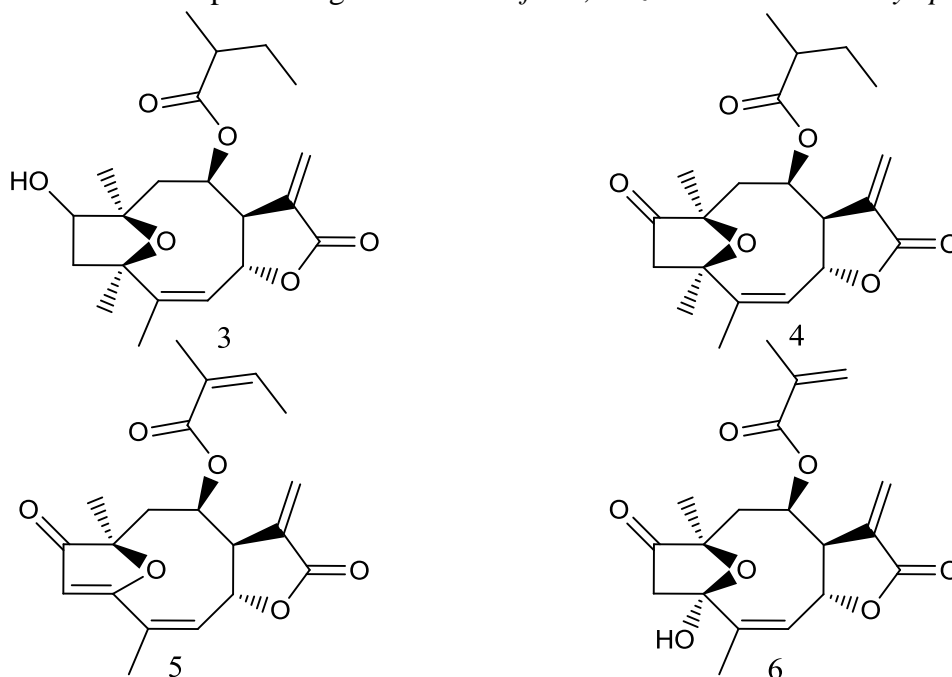
Tris-norsesquiterpenos

Figura 11: Estruturas de lactonas sesquiterpênicas com esqueleto tipo furanoheliangolídeos isoladas das espécies vegetais *C. hymenolepis* e *C. lantanoides*.



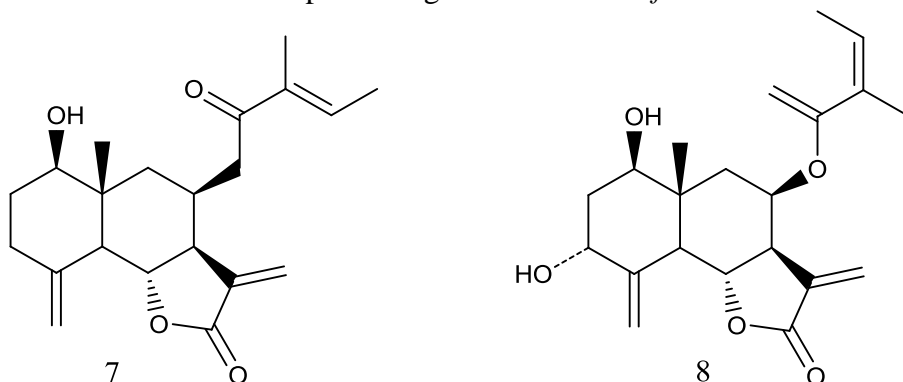
Compostos com o esqueleto tipo heliangolídeos como o 1 α -acetozaxatechinolídeo (**3**), isolado das partes aéreas da *C. teucrifolia* (BOHLMANN et al., 1981), o composto 1-oxo-8-desacetil-zacatequinolídeo-(2-metil butirato) (**4**), isolado das partes aéreas da espécie vegetal *C. oxylepisi* (BOHLMANN et al., 1982) e os compostos 15-deoxibudleína (**5**) e o análogo da orizabina (**6**) isolados de *Calea lantanoides* (VICHNEWSKI, et al., 1982) (Figura 3), também ocorrem no gênero.

Figura 12: Estruturas de lactonas sesquiterpênicas com esqueleto tipo heliangolídeo isoladas das espécies vegetais *C. teucrifolia*, *C. zacatechichi* e *C. oxylepisi*.



Lactonas sesquiterpênicas com esqueletos do tipo eudesmanolídeos como a 8 β -tiglinoiloxireinosina (**7**), isolada das partes aéreas *C. rotundifolia* (BOHLMANN et al., 1981), e o composto trichomatolídeo B (**8**), obtido das partes aéreas da espécie vegetal *C. trichomata* (OBER et al., 1984) (Figura 4) estão presente nesse gênero.

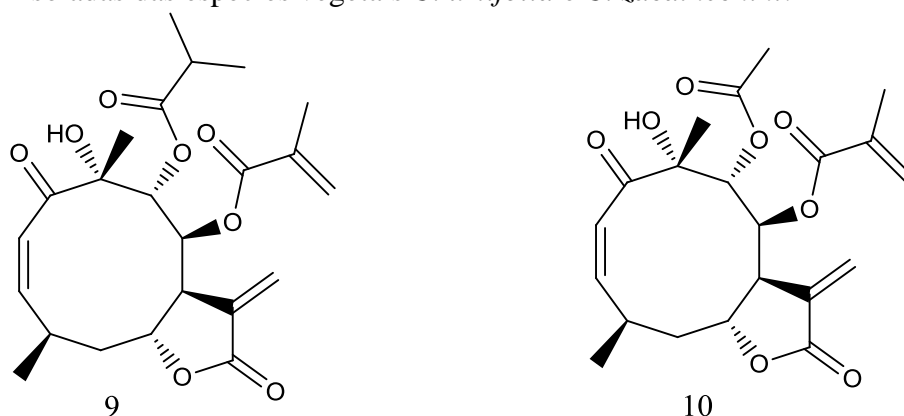
Figura 13: Estruturas de lactonas sesquiterpênicas com esqueleto tipo eudesmanoídeo isoladas das espécies vegetais *C. runtundifolia* e *C. trichomata*.



Observa-se também a ocorrência de compostos com o esqueleto do tipo germacronolídeos como a substância calealactona A (**9**), proveniente das folhas da espécie vegetal *C. urticifolia* (YAMADA et al., 2004), e o composto calealactona C (**10**), isolado de *C. zacathechichi*, que mostrou atividade antileishmania, com valor IC₅₀ de 1,9 μ M (WU, et. al., 2011) (Figura 5). Além disto, o extrato aquoso da *C. zacathechichi* mostrou também atividade anti-inflamatória frente a camundongos albinos Swiss e ratos Wistar (VENEGAS-FLORES, et. al., 2002).

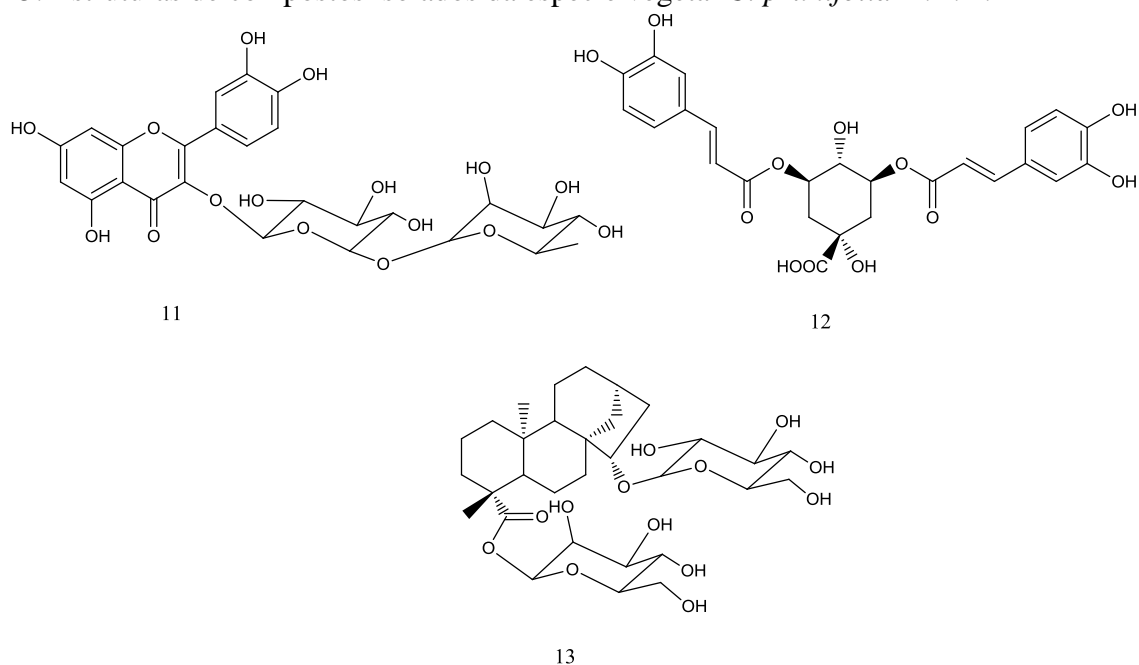
Uma série de lactonas sesquiterpênicas com esqueleto do tipo germacronolídeo, isoladas da espécie vegetal *C. urtifolia*, demonstrou atividade anti-melanótica frente a células de melanoma B16, com concentrações menores que 1,0 μ M (OHGUCHI et al., 2009)

Figura 14: Estruturas de lactonas sesquiterpênicas com esqueleto tipo germacronólídeos isoladas das espécies vegetais *C. urtifolia* e *C. zacathechihii*.



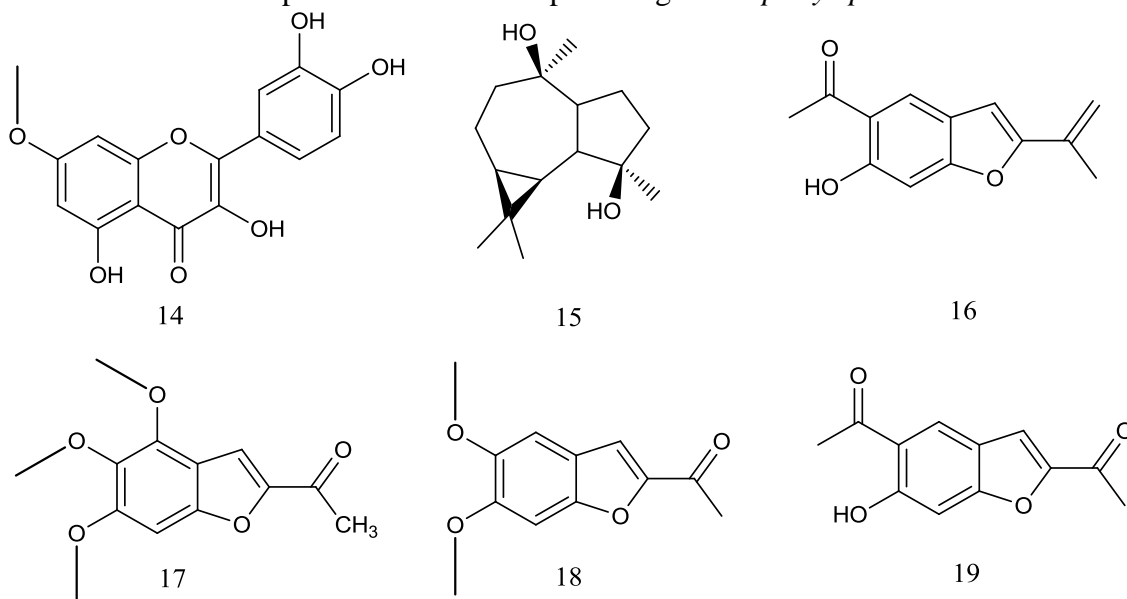
As folhas da *Calea prunifolia* H.B.K, espécie usada na medicina popular da Colômbia para a hipertensão, foram analisadas quanto à composição química, resultando no isolamento do quercetina 3-rutinosídeo (**11**), um derivado do ácido quínico, do ácido 3,5-di-*O*-[*E*]-cafeoilquínico (**12**) e de um glicosídeo diterpênico com esqueleto do tipo caurano, o ácido *enti*-15 β -(β -D-glucopiranosilóxi)-caur-16-en-19-óico (**13**) (Figura 6) (PUEBLA et al., 2011).

Figura 15: Estruturas de compostos isolados da espécie vegetal *C. prunifolia* H.B.K.



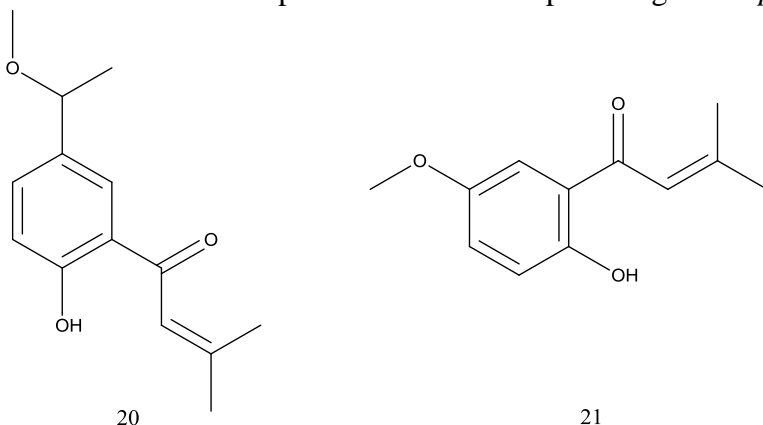
A fração diclorometano da espécie vegetal *C. platylepis* apresentou atividade antimicrobiana, sobre *Trichophyton mentagrophytes*, sendo que o estudo químico das flores resultou no isolamento dos compostos genkwanina (**14**), (+)-4 α ,7 β -aromadendranediol (**15**), euparina (**16**), caleprunina A (**17**), caleprunina B (**18**) e euparona (**19**) (NASCIMENTO et. al., 2004). As estruturas destes compostos estão mostradas na Figura 7.

Figura 16: Estruturas de compostos isolados da espécie vegetal *C. platylepis*.



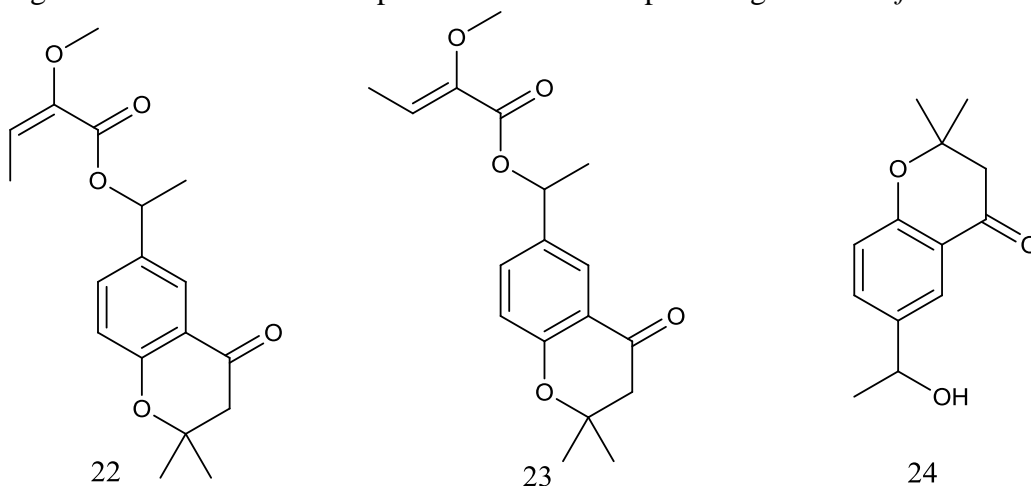
Derivados de *p*-hidroxiaacetofenona os compostos 1-(2-hidroxi-5-(1-metoxietil)fenil)-3-metilbut-2-en-1-ona (**20**) e 1-(2-hidroxi-5-metoxifenil)-3-metilbut-2-en-1-ona (**21**) (Figura 8) isolados das *C. prunifolia* H.B.K, apresentaram atividade anti-inflamatória em edema induzido em orelha de ratos (GÓMEZ et al., 2011).

Figura 17: Estruturas de compostos isolados da espécie vegetal *C. prunifolia* H.B.K.



Além destes, compostos com atividade leishmanicida, pertencentes à classe das cromanonas, como os compostos uniflorol A (**22**) e B (**23**) e o 2,2-dimetil-6-(1-hidróxi-2-propil)-chroman-4-ona (**24**) foram isolados de *Calea uniflora* (Figura 9) (NASCIMENTO et al., 2007).

Figura 18: Estruturas de compostos isolados da espécie vegetal *C. uniflora*.



1.3. Fungos endofíticos

Segundo Kobayashi et al. (2000), a palavra endofítico significa no “interior da planta” e o uso deste termo pode incluir bactérias, fungos, algas e insetos. Nesse sentido, microrganismos endofíticos ou endófitos são fungos e bactérias que habitam o interior das plantas, sendo encontrados em folhas, ramos, raízes e sementes, sem causar-lhes doenças nem produzir estruturas externas visíveis (AZEVEDO et al., 2000). Azevedo e Araújo (2007) complementam esta definição, onde “endófitos são todos aqueles microrganismos que podem ou não crescer em meio de cultura, que habitam o interior de tecidos e órgãos vegetais sem causar prejuízos ao seu hospedeiro e sem produzir estruturas externas emergindo dos vegetais”. Esta última definição acaba por excluir os microrganismos que produzem nódulos em raízes, como bactérias do gênero *Rhizobium* e fungos micorrízicos. Esta separação torna-se importante uma vez que estes microrganismos podem se comportar como endófitos. Porém, os endofíticos que não produzem estruturas externas, até pouco tempo atrás, eram pouco estudados em comparação aos fixadores simbióticos de nitrogênio (LACAVA et al., 2010).

Os primeiros relatos destes microrganismos foram descritos por Bary em 1866, sendo ignorados por mais de um século devido à falta de conhecimento sobre suas verdadeiras funções na planta e pela dificuldade de estudo uma vez que não há estruturas externas visíveis (PEIXOTO-NETO et al., 2002). Lewis, em 1924, relata a presença de fungos endofíticos em folhas de gramíneas, mas sem resultados promissores, sendo que os estudos mais detalhados de endófitos surgiram somente a partir da década de 80. Atualmente, devido à especificidade e às características únicas destes microrganismos em se adaptar e estabelecer intrínsecas relações simbióticas com a planta hospedeira (SCHULZ e BOYLE, 2005; KUSARI et al., 2014), aliada com o desenvolvimento do setor biotecnológico, os microrganismos endofíticos despertaram o interesse da comunidade científica como fontes alternativas de nutrientes às plantas, enzimas, compostos bioativos, além de aplicação no controle de pragas e patógenos, uso na biorremediação de áreas poluídas entre outras aplicações nos mais diversos ramos científicos e industriais (LACAVA et al. 2010).

No início dos anos 70, considerava-se que os microrganismos endofíticos não causavam danos ou benefícios às plantas; atualmente sabe-se que esses microrganismos,

em muitos casos, desempenham um papel importante na proteção de plantas contra predadores e patógenos (AZEVEDO et al., 2002).

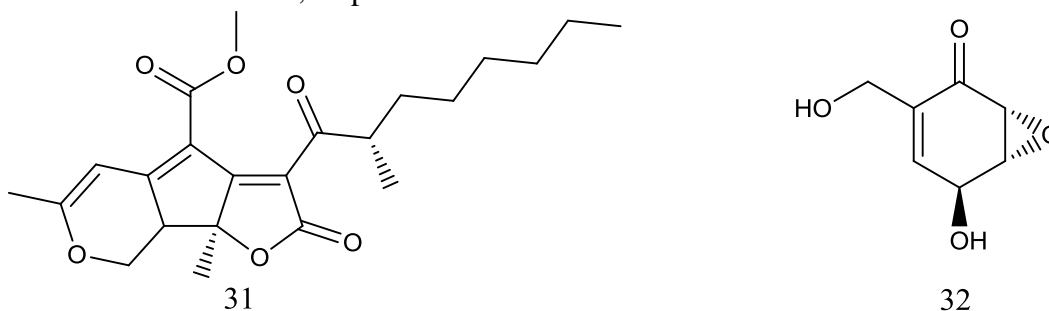
As influências mútuas dos fungos endofíticos com o hospedeiro ainda não são bem compreendidas, porém, sabe-se que os fungos são capazes de produzir metabólitos que podem trazer diversas vantagens às plantas, como resistência aos estresses bióticos e abióticos.

Além disso, podem produzir metabólitos que não interferem no metabolismo do vegetal, mas sim na defesa contra outros microrganismos. Nessa associação, a planta hospedeira protege e alimenta o endófito, que em resposta produz metabólitos bioativos para aumentar o crescimento e competitividade do hospedeiro e protegê-lo contra herbívoros e fitopatógenos (GUNATILAKA, 2006).

Várias classes de metabólitos secundários como alcaloides pirrolizidínicos, esteróides, terpenóides, sesquiterpenos, isocoumarinas, quinonas, flavonóides, fenilpropanóides, policetídeos, lactonas entre outros, são produzidos por fungos endofíticos, o que os caracterizam como uma fonte promissora para estudos de exploração do potencial biotecnológico de produtos aplicados em diversas áreas (KAUL et al., 2012, CHAPLA et al., 2013; BRADER et al., 2014).

Dentre esses compostos, destacam-se os agentes anticâncer como a substância sequoiatona A (**31**), obtida de extratos do fungo endofítico *Aspergillus parasiticus* isolado da espécie vegetal *Sequoia sempervirens* (STIERLE et. al., 1999), e o composto epiepoxidona (**32**), produzido pelo fungo endofítico *Apiospora montagnei*, isolado da planta *Polysiphonia violácea*, (KLEMKE et. al., 2004)(Figura 13).

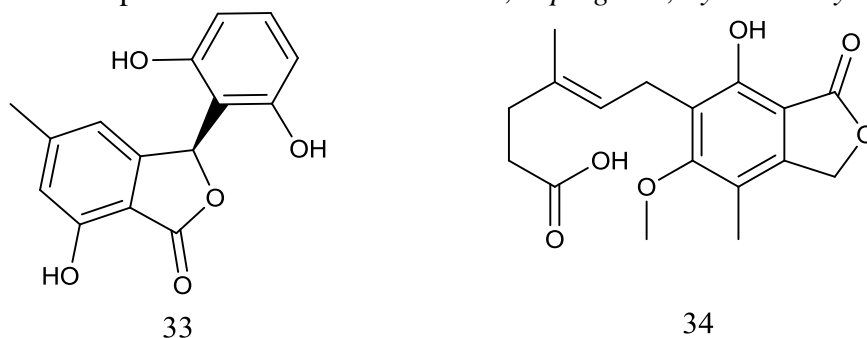
Figura 10: Compostos identificados nos extratos dos fungos endofíticos *Aaspergillus parasiticus* e *Apiospora montagnei*, isolados das plantas *S. sempervirens* e *P. violácea*, respectivamente.



O potencial de atividade biológica para os compostos provenientes de fungos endofíticos estende-se para outras áreas como atividade antioxidante, como por exemplo, a substância isopestacina (**33**) (Figura 14), produzida no fungo *Pestalotiopsis microspora*, que se comporta com um antioxidante que sequestra radicais superóxidos e hidroxilas livres (STROBEL et al., 2002).

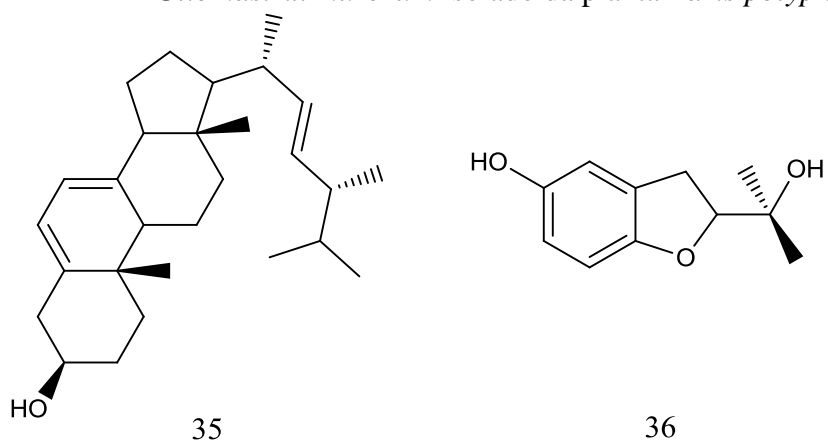
Uma das principais particularidades referente a metabólitos de fungos endofíticos é o emprego em testes de agentes imunomoduladores, como por exemplo, o ácido micofenólico (**34**) (Figura 11) obtido dos extratos de quatro espécies endofíticas *Penicillium*, *Aspergillus*, *Byssochlamys* e *Septoria*, o qual apresentou resultados de um potente imunossupressor usado para o tratamento de doenças autoimunes e no transplante de órgãos (BENTLEY 2000; LARSEN et al., 2005).

Figura 11: Compostos identificados nos extratos dos fungos endofíticos *P. microspora* e nas espécies endofíticas *Penicillium*, *Aspergillus*, *Byssochlamys* e *Septoria*.



Outra atividade exibida pelos metabólitos produzidos por fungos endofíticos foi a atividade antimicrobiana dos compostos ergosta-5,7,22-trien-3-ol (**35**) e 2,3-dihidro-5-hidroxi- α,α -dimetil-2-benzofurano metanol (**36**) (Figura 15), identificados no extrato do fungo *Gliomastrix murorum*, isolado da planta *Paris polyphylla var. yunnanensis*, frente às bactérias *A. tumefaciens*, *E. coli*, *P. lachrymans*, *R. solanacearum*, *X. visicatoria*, *B. subtilis* e *S. haemolyticus* (ZHAO et al., 2012).

Figura 19: Estruturas de compostos identificados no extrato do fungo endofítico *Gliomatrix murorum* isolado da planta *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*.



1.4. Espectrometria de Massas (EM)

A espectrometria de Massas (EM) teve seu surgimento, em 1897, pelo trabalho pioneiro de J. J. Thomson. Desde então é uma ferramenta muito utilizada em estudos de identificação e isolamento de compostos sintéticos, orgânicos e biomoleculares (CROTTI et. al., 2006; NEWMAN e CRAGG, 2012; PICHINI, et. al., 2016)(Figura 13). Estudos apontam o crescimento do uso dessa técnica no período de 1993 a 2004 (Figura 14) (CROTTI, et. al., 2006). Nesse estudo o autor relata a evolução dos trabalhos nas áreas que utilizam técnicas de espectrometria de massas, e apresenta a diversidade de analisadores de massa utilizados nesses equipamentos. A figura 14 retrata as principais técnicas que utiliza a espectrometria de massas, dentre elas, destaca-se a espectrometria de massas com ionização por “eletrospray” (IES-EM).

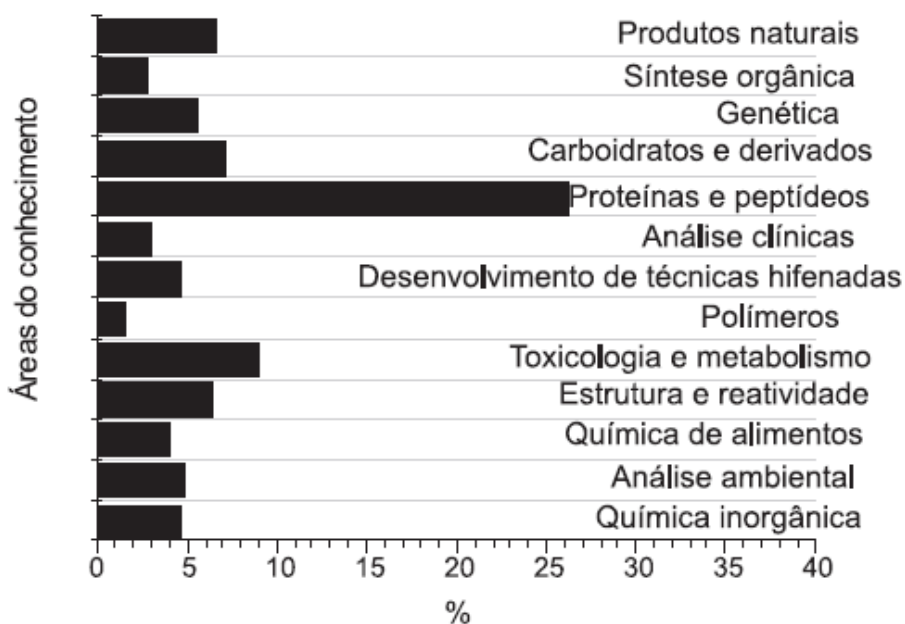
A técnica de ionização por IES envolve um processo de transferência de íons pré-existente em solução para a fase gasosa, utilizando uma quantidade de energia menor (soft ionization), em relação as técnicas anteriores como o bombardeamento de átomos (FAB) (MORAES e LAGO, 2003). Outra vantagem está associada à dessolvatação ocorrer gradualmente em temperaturas baixas (tipicamente, de temperatura ambiente até 80 °C), de forma a não gerar fragmentos de moléculas ionizadas e manter exatamente a mesma estrutura e carga das espécies em solução (MORAES e LAGO, 2003) e, possibilitar a análise de moléculas termolábeis e de alta massa molecular, como proteínas e peptídeos.

Devido a essa característica o número de artigos usando “eletrospray” passou de 100 para 7800 no período de 1980 a 2000, sendo que 80% destes estão relacionados com análise de biomoléculas e de compostos orgânicos; 10% são relativos à instrumentação e estudos sobre aspectos fundamentais de formação de “eletrospray” e 10% das publicações estão associadas a espécies organometálicas e inorgânicas nas mais diferentes formas (MORAES e LAGO, 2003). Porém, a versatilidade de equipamento que utilizam fonte de ionização por “eletrospray” se estende para análises de moléculas protonadas/desprotonada ($[M+H]^+$ / $[M-H]^-$) e moléculas cationizadas ($[M+Na]^+$ e $[M+K]^+$) ou anionizadas ($[M+Cl]^-$), todos provenientes de reações redox, ácido/base e de coordenação de cátions (CROTTI et. al., 2006).

Além, da possibilidade de analisar todas essas espécies ionizadas em solução, esse equipamento possibilita estudos em múltiplos estágios, utilizando analisador de massas como o triplo e pentaquatropolos, armadilha de íons (íon traps), setores elétricos

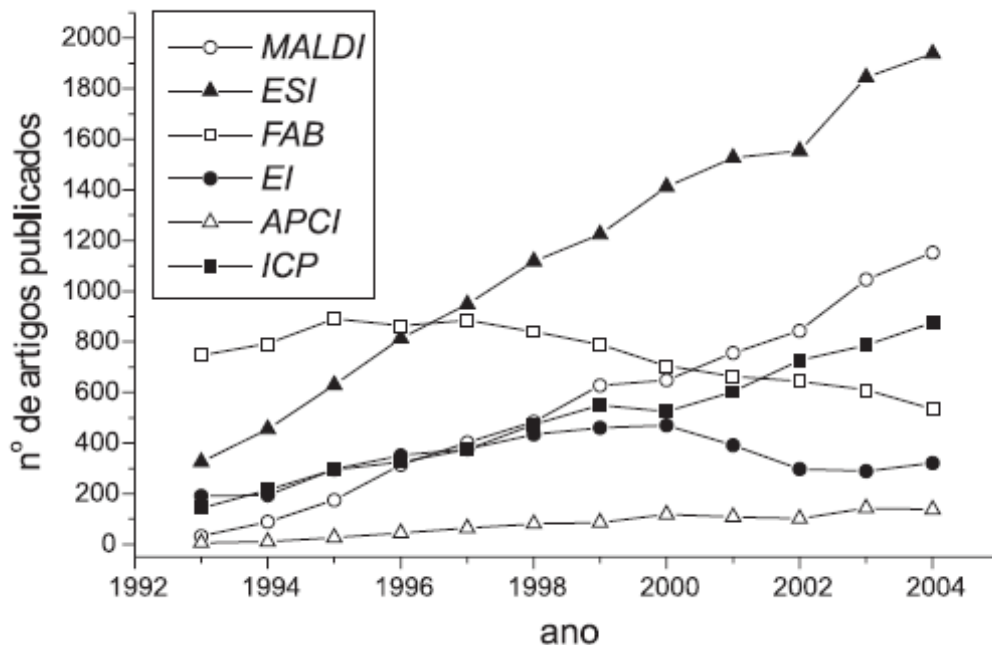
e magnéticos e equipamento híbridos (Q-tof, Q-trap) permitindo o acesso a técnicas de espectrometria de massas sequencial (MS/MS ou MSⁿ) e aumentando o potencial analítico da técnica (CHEN et. al., 2017).

Figura 20: Utilização de espectrometria de massas em diferentes áreas do conhecimento. Figura extraída do artigo escrito por CROTTI, 2006.



Todos os dados foram obtidos de pesquisa realizada em www.isiknowledge.com, no período de 1993 a 2004, considerando as 500 primeiras citações de cada ano. No gráfico aparecem apenas áreas que atingiram mais de 1%.

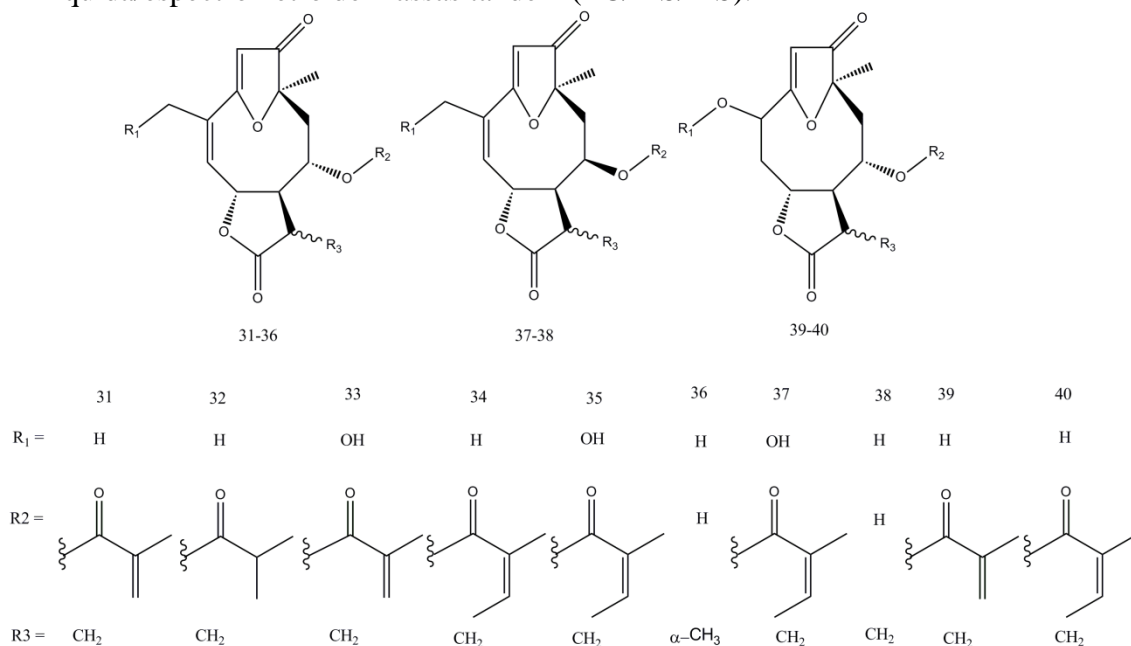
Figura 14: Número total de artigos publicados envolvendo as técnicas de ionização mais utilizadas. Baseado nos dados obtidos de pesquisa realizada em www.isiknowledge.com, no período de 1993 a 2004. Figura extraída do artigo escrito por CROTTI, 2006.



A possibilidade do uso de técnicas de espectrometria de massa sequencial permite a identificação da razão massa/carga (m/z) dos íons envolvidos, e também, fornece informações estruturais de todos os íons, permitindo, a “reconstrução” da molécula precursora. Como exemplo destaca-se o estudo de mecanismo de fragmentação de lactonas de cinco-membros utilizando ionização por eletrospray tandem (CROTTI, et. al., 2004). Nesse estudo foram observados os principais fragmentos de íons para lactonas de cinco-membros e, a partir de perda neutra preferencial de CO e/ou H₂O dessas moléculas, foi possível racionalizar a estabilidade de carbocátions envolvido nessas reações.

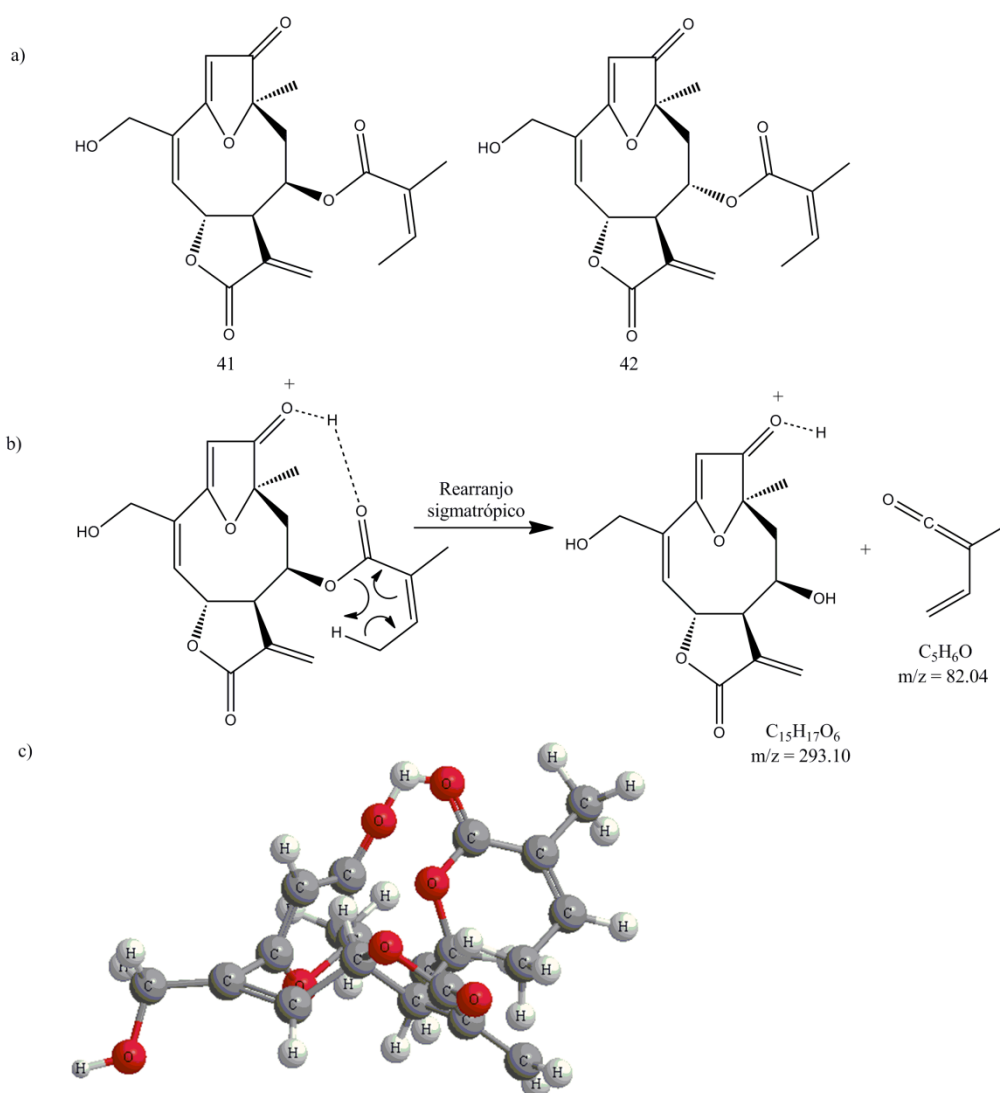
Outro trabalho relatado na literatura foi o uso dessa técnica para descrever o padrão de fragmentação de lactonas sesquiterpênicas com esqueleto goyazensolídeo (Figura 15). Nesse artigo o autor utiliza a ionização por eletrospray e investiga o padrão de dissociação, descrevendo o principal íon produto $[M+H-R_2CO_2H]^+$ formado e sugere a influência da estereoquímica do grupo aciloxila no carbono C8 na relativa abundância do produto de íons (CROTTI, et. al., 2005).

Figura 15: Estruturas dos goyazensolídeos estudados em cromatográfica líquida/espectrômetro de massas tandem (LC/MS/MS).



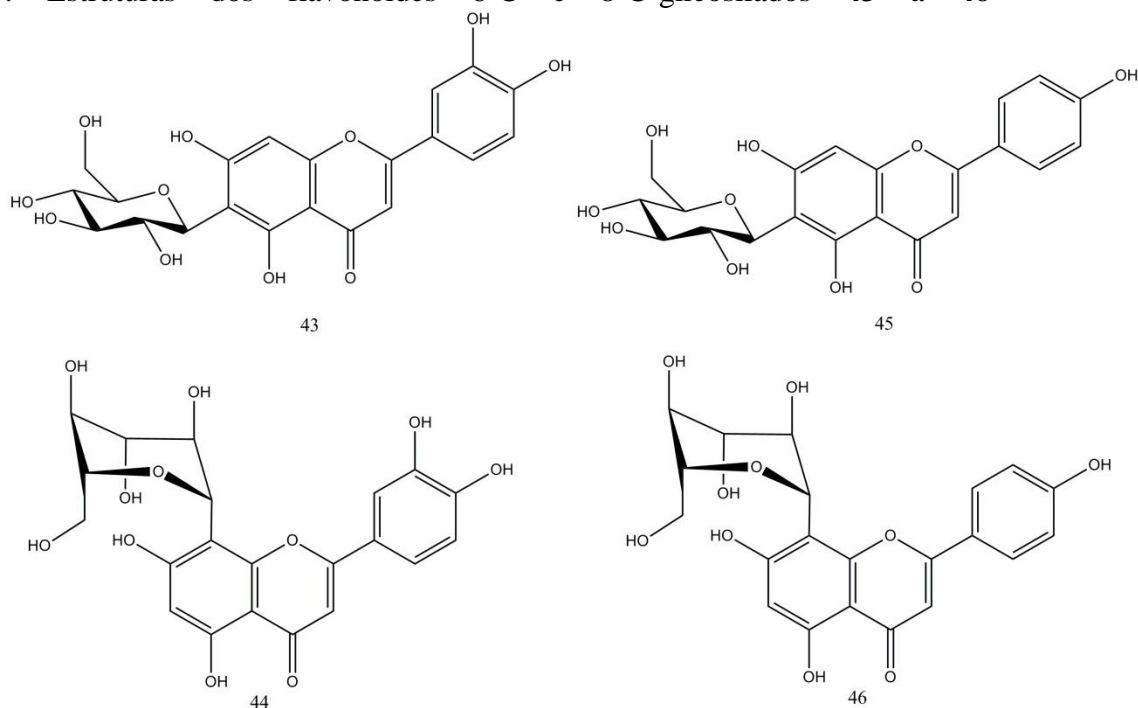
Análises de cromatográfica líquida/espectrômetro de massas tandem (LC/MS/MS) foram também utilizadas para avaliar a influência da α - ou β -orientação do C8 dos compostos budleina A (**47**) e centratherina (**48**) em seus perfis fragmentações (Figura 16). Nesse estudo foi observado que dependendo da orientação do C8 o caminho de fragmentação é dirigido. Para o composto budleina A (**47**) com orientação- β no carbono C8 (Figura 16b) o principal fragmento formado foi o íon com m/z 293, e para a centratherina (**48**) que apresenta orientação- α , o fragmento de íon preferencialmente formado foi com m/z 275. Este comportamento pode estar associado à proximidade entre os grupos cetonas presentes no composto budleina A (**47**) que possibilita uma coordenação com um átomo de hidrogênio, que dirige a fragmentação via um rearranjo sigmatrópico formando um íon preferencialmente de m/z 275 referente a eliminação do grupo éster. No composto centratherina (**48**), essa aproximação não é favorecida e o íon de m/z 293 não é preferencial (SARTORI, et. al., 2014).

Figura 16: a) estruturas da budleina A (**41**) e centratherina (**42**); b) formação do fragmento de íon m/z 293 a partir da protonação da budleina A via um rearranjo sigmatrópico; c) estrutura tridimensional da budleina A.



Outra classe de compostos amplamente estudada em espectrometria de massas por ionização de eletrospray são os flavonoides. Em um trabalho empregando espectrômetro de massas tandem de tempo-de-voe quadrupolo por ionização por eletrospray de alta-resolução (ESI Q-TOF MS/MS), foi possível diferenciar os flavonoides 6-C e 8-C-glicosilados como: isorientina (luteolina-6-glucosídeo) (**49**), orientina (luteolina-8-C-glucosídeo) (**50**), isovitexina (apigenina-6-C-glucosídeo) (**51**) e o vitexina (apigenina-8-C-glucosídeo) (**52**), considerados como de difícil elucidação (GUO, et. al., 2013).

Figura 27: Estruturas dos flavonoides 6-C e 8-C-glicosilados **43** a **46**



Flavonoides com o esqueleto monohidroxi- e pentahidroxi-substituídos, também tem sido estudados e diferenciados utilizando técnicas em sequência de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (tandem). Como exemplo, destaca-se o estudo de quatorze flavonoides em modo negativo $[M-H]^-$ e em modo positivo $[M+H]^+$, ferramenta muito explorada para compostos polifenólicos.

Também são relatados estudos utilizando essa técnica para compostos como ácidos clorogênicos, um exemplo foi o estudo de fragmentação do ácido 3,5- e 4,5-dicafeoilquínico (ADCQ) (**53** e **55** respectivamente). Nesse estudo foram exploradas as técnicas como ionização por bombardeamento de átomos rápidos (fast atom bombardment - FAB) e análises de ESI e EI. O autor observou que nas técnicas de FAB e EI uma perda de água característica do 3,5-ADCQ, mas não observada para o isômero 4,5-ACDQ. Porém quando analisado por ESI a informação estrutural foi maior, especialmente em modo íons negativo (MIKETOVA, et. al., 1999). O mesmo procedimento foi empregado para análise dos ácidos 1,3- e 1,5-dicafeoilquínico (**55** e **56** respectivamente) e foi observadas diferenças na abundância dos íons formados e/ou presença ou ausência de íons específicos, para 1,3- ACDQ apresenta o pico base de m/z 179 e o segundo mais intenso o produto de íon de m/z 335. Para o composto 1,5- ACDQ observa o íon $[M-H-18]$, ausente para o composto 1,3-dicafeoilquínico e a perda consecutiva de moléculas de água a partir do íon de m/z 353 e o íon de m/z 191 ausente

no espectro do composto 1,3-dicafeoilquínico. Dessa forma, possibilitando a identificação inequívoca desses compostos (SHRAM, et. al., 2004).

Figura 18: Estruturas dos ácidos 3,5- e 4,5-dicafeoilquínicos **53** e **54**

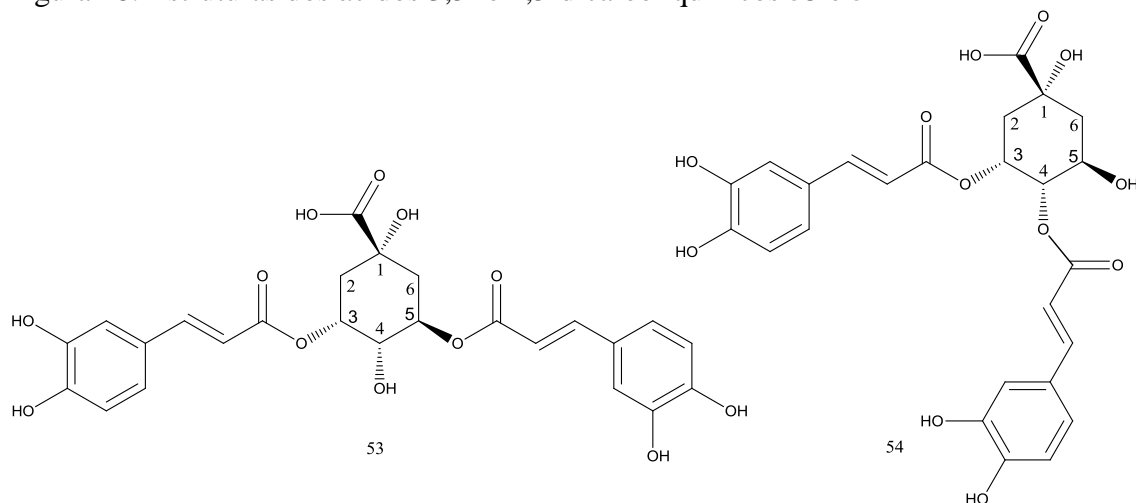
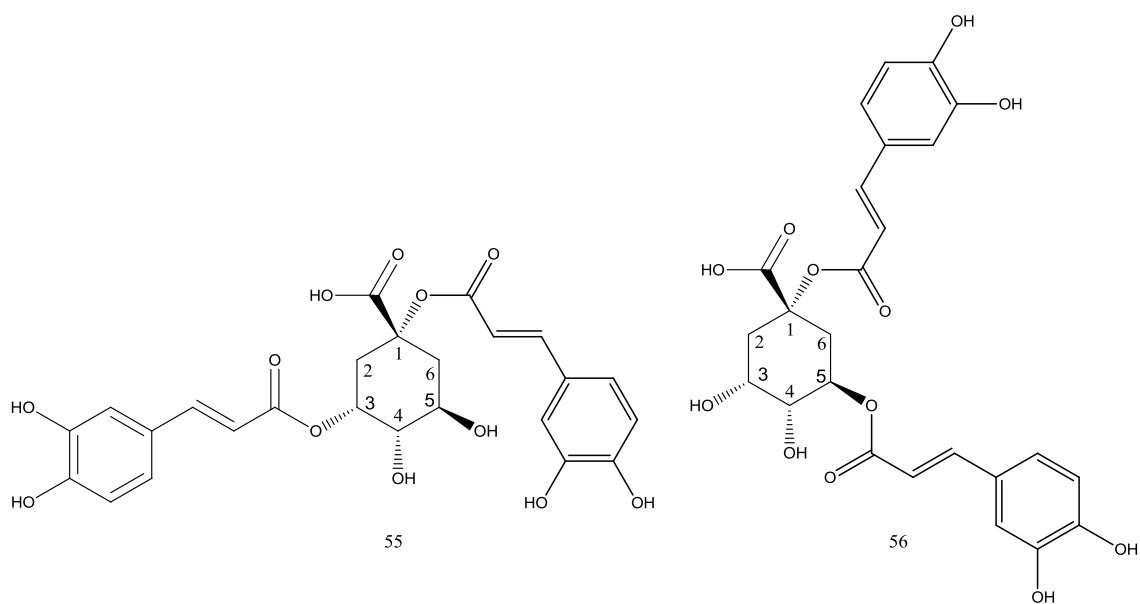


Figura 19: Estruturas dos ácidos 1,3- e 1,5-dicafeoilquínicos **55** e **56**.



2. OBJETIVOS

Constituem objetivos do nosso trabalho:

- I. - Isolar e elucidar as estruturas dos metabólitos secundários presente na espécie *Calea parvifolia*.
- II. - Identificar os metabólitos secundários de fungos endofíticos isolados da *C. parvifolia* quanto à estrutura química.
- III. - Avaliar a capacidade “sequestradora” de radicais livres das substâncias presente do extrato bruto e as respectivas frações da espécie *C. parvifolia*, e dos compostos isolados em maior quantidade.
- IV. - Avaliar as atividades: antitumoral, anti-leishmania, e antimicrobiana dos extratos, frações e compostos puros isolados em maior quantidade de *C. parvifolia*.
- V. - Estudo do perfil de fragmentação dos compostos isolados utilizando a espectrometria de massas com ionização por “eletrospray” (IES-EM).

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Procedimentos Gerais e Equipamentos Utilizados

As cromatografias em coluna (CC) foram realizadas em colunas de vidro, utilizando-se sílica gel 60 (0,063 – 0,200 mm) da Merck, sílica gel flash (0,035 – 0,070 mm) Sephadex LH-20 (Merck) e polivinilpolipirrolidona (PVPP) marca Sigma-Aldrich foram utilizadas como fase estacionária. As dimensões da coluna dependeram da quantidade do material cromatografado. As eluições foram feitas com solventes orgânicos destilados e de grau P. A (hexano, diclorometano, acetato de etila (AcOEt) e metanol, na forma pura ou em misturas binárias e ordem crescente e decrescente de polaridade. As frações coletadas foram concentradas sob pressão reduzida em evaporador rotativo.

Para a cromatografia em camada delgada, utilizou-se placas de vidro de 5,0 x 20,0 cm, preparadas com SiO₂ gel 60 G e 60 GF₂₅₄ (Aldrich ou Merck) suspensa em água destilada numa proporção de 1:2, e distribuída em uma espessura de aproximadamente 0,25 mm.

Para a revelação das placas cromatográficas utilizou-se irradiação com lâmpada UV nos comprimento de onda 254 – 366 nm, marca Desaga modelo Abnehmbar UV (254/366 nm) e a pulverização com reveladores químicos específicos e universais preparados em soluções de ácido acético/H₂SO₄/anisaldeído para terpenos, ácido sulfúrico/metanol 1:1 e vapores de iodo seguido de aquecimento.

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de ¹H e ¹³C foram obtidos em espectrômetro marca Varian, Mercury Plus – 300 MHz e Bruker AVANCE III HD – 300 e 500 MHz, utilizando CD₃OD, CDCl₃ e D₂O como solventes e TMS (δ = 0,0 ppm) como referência interna. A interpretação dos dados foi confirmada por dados espectroscópicos de correlações bidimensionais COSY, HSQC, NOESY e HMBC.

As análises de LC-MS/MS foram realizadas em cromatógrafo líquido Waters 1525μ acoplado ao espectrômetro Quattro micro API Waters (Beverly, EUA) com fonte de eletrospray e o software de aquisição utilizado foi MassLynx (Waters, Milford, USA), utilizando uma coluna Waters Symmetry® C18 (4,6 x 75 mm x 3,6 μm). As condições de operação do espectrômetro de massas foram: tensão capilar 2,5 kV (modo de ionização positivo e negativo) e a voltagem do cone de 25V. A temperatura do bloco

de gás e a temperatura de dessolvatação foram fixadas em 150 e 450 °C, respectivamente. O fluxo de gás do cone de dessolvatação foram 50 e 900 L/h, respectivamente. Os espectros foram registrados em modo positivo e negativo.

3.2. Estudo Químico da espécie vegetal *Calea parvifolia*

3.2.1. Coleta do material

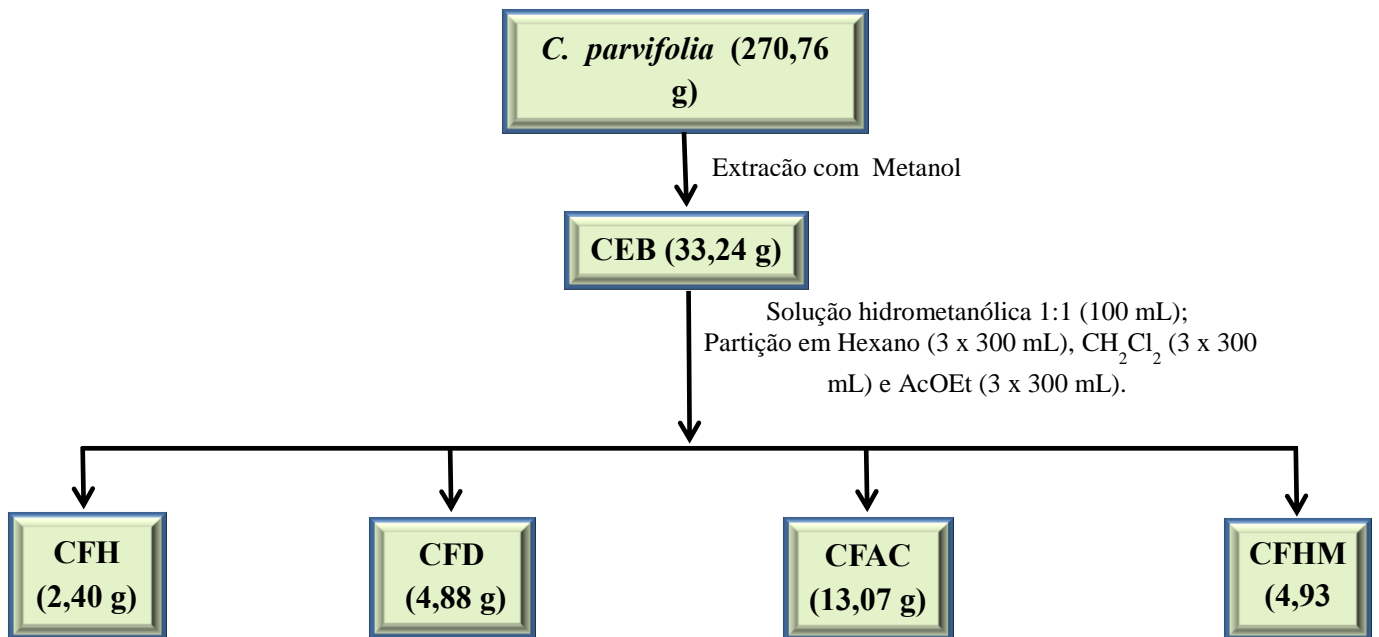
As partes aéreas da espécie vegetal *Calea parvifolia* foram coletadas em março de 2012 e identificada pela professora Dra. Marta Regina Barrotto do Carmo, do Departamento de Biologia Geral da Universidade Estadual de Ponta Grossa. As folhas coletadas não apresentavam manchas nem indicativos de herbivorismo.

3.2.2. Preparação e Fracionamento do Extrato Bruto

As partes aéreas da espécie vegetal *Calea parvifolia* foram secas em estufa com circulação de ar a 30 °C, e moídas em moinho de facas, obtendo-se 270,76 g, de material moído. A extração com metanol, a frio, por maceração forneceu, após evaporação do solvente em evaporador rotativo, o extrato bruto CEB (33,24 g). Parte do extrato bruto da espécie *C. parvifolia* (CEB; 25,28 g) foi dissolvido em solução hidrometanólica 1:1 (100 mL) e fracionados por partição em hexano (3 x 300 mL), diclorometano (3 x 300 mL) e acetato de etila (3 x 300 mL).

Após remoção do solvente sob vácuo em evaporador rotatório, obteve a frações: hexânica (CFH; 2,40g), diclorometano (CFD; 4,88g), acetado de etila (CFAC; 13,07g) e hidrometanólica (CFHM; 4,93g) referente à espécie *C. parvifolia* (Esquema 1).

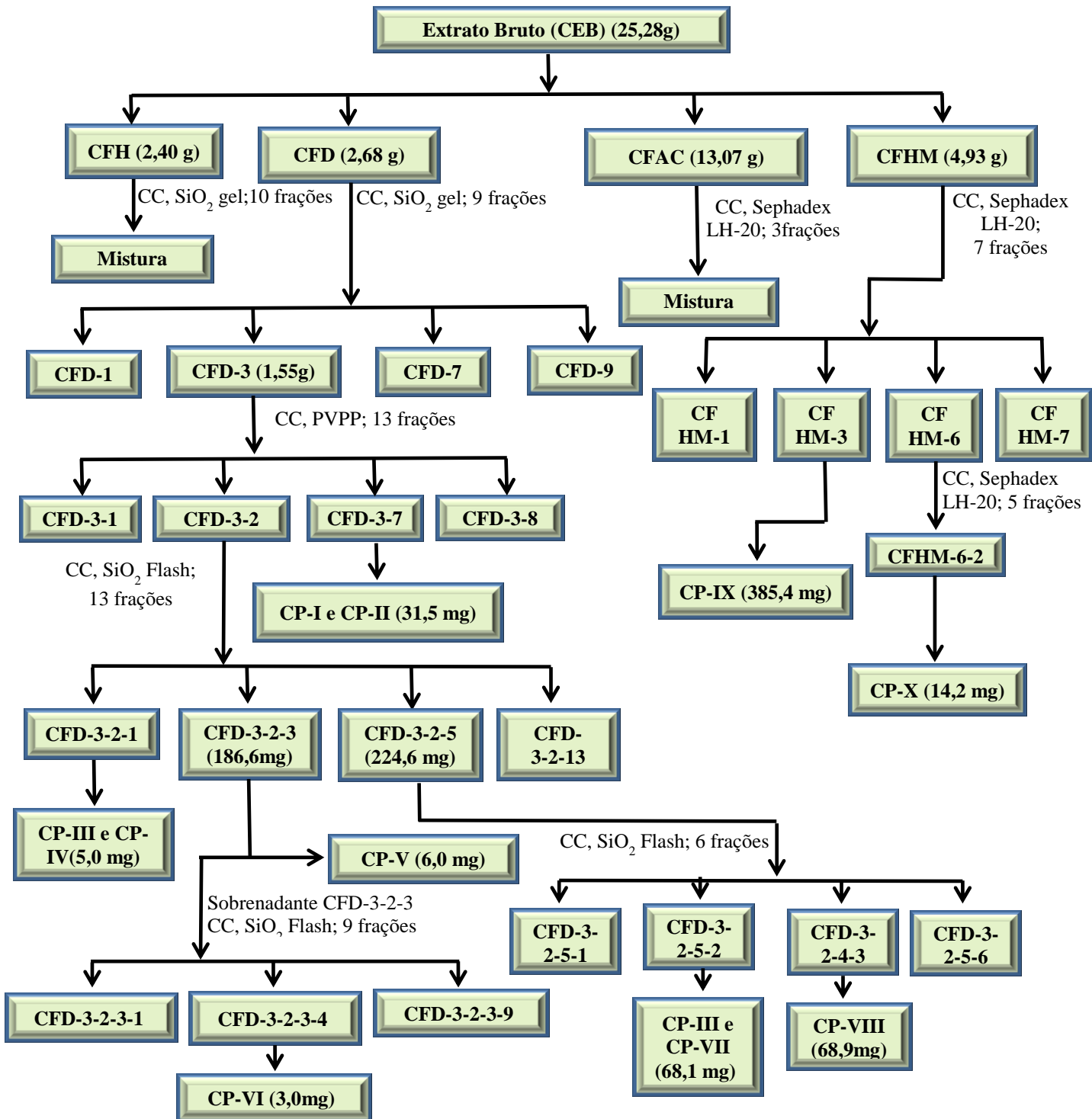
Esquema 1: Fracionamento do Extrato bruto da espécie *C. parvifolia*.



3.2.3. Estudo das frações obtidas do fracionamento do CEB de *C. parvifolia*

No Esquema 2, está apresentado o fracionamento do CEB de *C. parvifolia* com os compostos isolados nesse estudo.

Esquema 2: Fracionamento das frações CFH, CFD, CFAC e CFHM da espécie *C. parvifolia*.



3.2.3.1. Fração CFH

A CFH (0,80g) foi submetida à cromatografia em coluna de sílica gel 60 ($\varnothing = 1,25$ cm; 30 g), empacotada com hexano e eluída com misturas de hexano/ CH_2Cl_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ e metanol combinados em ordem crescente de polaridade. As frações coletadas foram analisadas em CCD e reunidas conforme o perfil cromatográfico, resultando em dez frações (CFH-1 a CFH-10) (Tabela 1). Todas as frações foram estudadas em CCD e não apresentaram separação satisfatória.

Tabela 5: Dados de massa e códigos das sub-frações da CC da fração CFH.

Código	Frações reunidas	Eluentes	Massa (mg)
FH-1	1-3	hexano 100%	26,50
FH-2	4-6	hexano/ CH_2Cl_2 50%	39,90
FH-3	7-8	hexano/ CH_2Cl_2 50%	10,60
FH-5	9-11	CH_2Cl_2 100%	100,60
FH-6	12	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ 50%	41,20
FH-7	13-17	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ 50%	22,10
FH-8	18	$\text{CHCl}_3/\text{EtOAc}$ 50%	172,90
FH-9	19-20	EtOAc 100%	14,20
FH-10	21	EtOAc/MeOH 50%	3,40
FH-11	23-25	MeOH	69,10

3.2.3.2. Fração CFD

Parte da CFD (2,68g) (Esquema 2) foi submetida à cromatografia em coluna de sílica gel 60 ($\varnothing = 2,50$ cm; 60,00g), empacotada com hexano e eluída com misturas de hexano/diclorometano, diclorometano/acetato de etila, acetato de etila/acetona e metanol, combinados em ordem crescente de polaridade. As frações obtidas foram analisadas em CCD e reunidas conforme o perfil cromatográfico resultando em nove frações (CFD-1 a CFD-2) (Tabela 2).

Tabela 6: Dados de massa e códigos das sub-frações da CC da fração CFD.

Código	Frações reunidas	Solvente	Massa (mg)
CFD-1	1-4	hexano 100%	2,60
CFD-2	5	hexano/CH ₂ Cl ₂ 50 %	3,80
CFD-3	6	CH ₂ Cl ₂ /AcOEt 50 %	1550,00
CFD-4	7	CH ₂ Cl ₂ /AcOEt 50 %	163,20
CFD-5	8-9	CHCl ₃ / AcOEt 50 %	180,8
CFD-6	10	CH ₂ Cl ₂ /AcOEt 50 %	142,3
CFD-7	11	AcOEt /acetona 50 %	25,10
CFD-8	12	acetona 100%	6,80
CFD-9	13	MeOH 100%	30,50

A fração CFD-3 (1,55g) foi submetida à cromatografia em coluna em PVPP (\emptyset = 2,50 cm; 8,00g) para remoção e separação de fenólicos, empacotada e eluída em metanol. Foram coletadas 85 frações as quais foram analisadas em CCD e reunidas conforme o perfil cromatográfico resultando em oito novas frações (CFD-3-1 a CFD-3-8) (Tabela 3). A fração CFD-3-7 forneceu a mistura dos compostos CP-I e CP-II (31,5 mg).

Tabela 7: Dados de massa e códigos das sub-frações da CC da fração CFD-3.

Código	Frações reunidas	Solventes	Massa (mg)
CFD-3-1	1-4	MeOH 100 %	7,70
CFD-3-2	5-15	MeOH 100 %	996,80
CFD-3-3	16-19	MeOH 100 %	7,40
CFD-3-4	20-22	MeOH 100 %	14,10
CFD-3-5	23-31	MeOH 100 %	18,00
CFD-3-6	32-40	MeOH 100 %	3,40
CFD-3-7	41-45	MeOH 100 %	31,20
CFD-3-8	46-53	MeOH 100 %	10,70

A fração CFD-3-2 (996,80 mg) foi submetida à cromatografia em uma coluna de sílica flash (\emptyset = 1,00 cm; 12,00g), empacotada com hexano e eluída como misturas de hexano/acetato de etila e metanol, combinados em ordem crescente de polaridade. Foram coletadas 45 frações que foram analisadas em CCD e reunidas conforme o perfil cromatográfico resultando em treze frações (CFD-3-2-1 a CFD-3-2-13) (Tabela 4).

A fração CFD-3-2-1 forneceu uma mistura dos compostos CP-III e CP-IV (5,0mg). A fração CFD-3-2-4 apresentou um resíduo sólido que foi solubilizado em clorofórmio e precipitado com metanol fornecendo o composto CP-V (6,0 mg).

Tabela 8: Dados de massa e códigos das sub-frações da CC da fração CFD-3-2.

Código	Frações reunidas	Solventes	Massa (mg)
FD-3-2-1	1-3	hexano/acetona 50 %	5,00
FD-3-2-2	4	hexano/acetona 50 %	55,00
FD-3-2-3	5-Sob	hexano/acetona 50 %	186,60
FD-3-2-5	6-8	hexano/acetona 50 %	224,60
FD-3-2-6	9-13	hexano/acetona 50 %	45,40
FD-3-2-7	14-17	hexano/acetona 60 %	20,30
FD-3-2-8	18-28	hexano/acetona 60 %	2,70
FD-3-2-9	29-30	Acetona 100 %	10,40
FD-3-2-10	31-35	EtOAc 100 %	12,40
FD-3-2-11	36-38	AcOEt /MeOH 50 %	7,00
FD-3-2-12	39-41	AcOEt /MeOH 50 %	3,40
FD-3-2-13	42	AcOEt /MeOH 50 %	91,20
FD-3-2-14	43-45	MeOH 100 %	8,00

O sobrenadante da fração CFD-3-2-3 (180,60 mg) foi submetido a um fracionamento em uma coluna de sílica flash ($\varnothing = 1,00$ cm; 12,00g), empacotada com hexano e eluída com uma mistura de hexano/acetona e de acetona metanol 1:1, sendo coletadas 45 frações, as quais foram reunidas em nove frações (CFD-3-2-3-1 a CFD-3-2-3-9) (Tabela 5). O composto CP-VI (3,00 mg) foi isolado da fração fração CFD-3-2-3-4.

Tabela 9: Dados de massa e códigos das sub-frações da CC da fração CFD-3-2-3.

Código	Frações reunidas	Solvente	Massa (mg)
FD-3-2-3-1	1-15	Hexano/Acetona 50 %	5,00
FD-3-2-3-2	16	Hexano/Acetona 50 %	29,5
FD-3-2-3-3	17-24	Hexano/Acetona 50 %	5,20
FD-3-2-3-4	25-26	Hexano/Acetona 50 %	3,00
FD-3-2-3-5	27-32	Hexano/Acetona 50 %	48,40
FD-3-2-3-6	33-34	Hexano/Acetona 50 %	32,10
FD-3-2-3-7	35-36	Hexano/Acetona 50 %	38,90
FD-3-2-3-8	37-41	Acetona 100 %	10,30
FD-3-2-3-9	43-45	MeOH 100 %	8,00

A fração CFD-3-2-5 (224,60 mg), foi fracionada em coluna de sílica flash ($\varnothing = 1,00$ cm; 6,56 g), empacotada com hexano e eluída como misturas de hexano/acetona em um gradiente de polaridade crescente. Foram coletadas 21 frações, as quais foram analisadas em CCD e reunidas conforme o perfil cromatográfico resultando em seis frações (CFD-3-2-5-1 a CFD-3-2-5-6) (Tabela 6). As frações CFD-3-2-5-2 e CFD-3-2-5-3 forneceram a mistura de compostos CP-III e CP-VII (68,10mg) e o composto puro CP-VIII (68,90 mg), respectivamente. As frações CFD-4 e CFD-6 foram submetidas a fracionamento em CC, mas não foi possível o isolamento de compostos puros.

Tabela 6: Dados de massa e códigos das sub-frações da CC da fração CFD-3-2-5.

Código	Frações reunidas	Solventes	Massa (mg)
FD-3-2-5-1	1-4	Hexano 100 %	10,70
FD-3-2-5-2	5-7	Hexano/Acetona 90 %	68,10
FD-3-2-5-3	8-12	Hexano/Acetona 85 %	68,90
FD-3-2-5-4	13-16	Hexano/Acetona 75 %	18,30
FD-3-2-5-5	17-19	Hexano/Acetona 60 %	9,90
FD-3-2-5-6	20-21	Acetona 100 %	7,30

3.2.3.3. Fração CFAC

Parte da fração CFAC (7,0g) foi submetida a filtração em coluna de Sephadex LH – 20 ($\varnothing = 2,5$ cm; 2,5g), empacotada com metanol e eluída com água, e água/metanol em gradiente decrescente de polaridade. Foram obtidas vinte e três frações que foram reunidas em três novas frações CFAC-1 (5,47g), CFAC-2 (477,40 mg) e CFAC-3 (15,40 mg). A fração CFAC-2 foi submetida à cromatografia em coluna em PVPP ($\varnothing = 2,50$ cm; 6,00g), que foi empacotada e eluída com metanol. Foram

coletadas 18 frações, as quais foram analisadas e reunidas em oito novas que se apresentaram como uma mistura complexa de compostos em CCD e não foram estudadas.

3.2.3.4. Fração CFHM

Parte da fração CFHM (2,28 g) foi submetida a filtração em coluna de Sephadex LH-20 ($\varnothing = 2,5$ cm; 2,5g), empacotada com metanol e eluída com água, e água/metanol em gradiente decrescente de polaridade. Foram obtidas dezesseis frações que foram reunidas em sete frações (CFHM-1 a CFHM-16) (Tabela 7). A fração CFHM-3 (385,40 mg) forneceu o composto **CP-IX**.

Tabela 7: Dados de massa e códigos das sub-frações da CC da fração **CFHM**.

Código	Frações reunidas	Solventes	Massa (mg)
CFHM-1	1	H ₂ O	71,90
CFHM-2	2	H ₂ O/MeOH 90 %	628,60
CFHM-3	3-5	H ₂ O/MeOH 70 %	385,40
CFHM-4	6-7	H ₂ O/MeOH 50 %	445,00
CFHM-5	8-9	MeOH	160,1
CFHM-6	10	MeOH	304,3
CFHM-7	11-16	MeOH	590,00

A fração CFHM-6 (304,30 mg) foi submetida a um fracionamento por meio de filtração em Sephadex LH-20, empacotada com metanol e eluída MeOH/CHCl₃ 1:1, obtendo vinte frações que foram reunidas resultando em cinco novas frações (CFHM-6-1 a CFHM-6-5) (Tabela 8). A fração CFHM-6-2 (14,20 mg) forneceu o composto CP-X. As demais frações foram analisadas, não foi possível a obtenção de composto suficientemente puros para análises espectroscópicas.

Tabela 8: Dados de massa e códigos das sub-frações da CC da fração CFHM-6.

Código	Frações reunidas	Solvente	Massa (mg)
CFHM-6-1	1-2	MeOH/CHCl ₃ 50 %	89,00
CFHM-6-2	3	MeOH/CHCl ₃ 50 %	14,20
CFHM-6-3	4	MeOH/CHCl ₃ 50 %	79,50
CFHM-6-4	5	MeOH/CHCl ₃ 50 %	79,10
CFHM-6-5	6-7	MeOH/CHCl ₃ 50 %	81,50

3.3. Estudos dos metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos de *Calea parvifolia*

3.3.1. Isolamento dos fungos endofíticos

O isolamento dos fungos endofíticos da planta *Calea parvifolia* foi realizado utilizando a metodologia descrita por PAMPHILE et al. (2002), modificada. Esta parte do trabalho foi desenvolvida sob a responsabilidade do professor doutor João Alencar Pamphile, do Departamento de Biotecnologia da Universidade Estadual de Maringá.

As folhas selecionadas não apresentaram marcas visíveis de ataque por insetos, ou manchas. O número de folhas selecionado foi de cento e quinze folhas. A desinfecção superficial consistiu na lavagem das folhas em água corrente, seguida de lavagem em NaOCl 5%, álcool 70% durante 30 segundos, sendo que a última lavagem foi realizada utilizando água destilada autoclavada. Para comprovação da desinfecção superficial, uma alíquota de 100 uL da última lavagem foi depositada e homogeneizada com alça de Drigalski em placa de Petri, contendo meio BDA (batata-Dextrose-Ágar).

Posteriormente a desinfecção superficial, as folhas foram cortadas assepticamente no fluxo laminar em fragmentos de aproximadamente 0,5 cm². Em seguida, quatro fragmentos foliares foram inseridos em cada placa de Petri contendo meio BDA, acrescidos de 50 µg.ml⁻¹ de tetraciclina, para inibir o crescimento bacteriano.

Vinte placas foram incubadas em estufa B.O.D. a 28° C, durante sete dias. Os fungos crescidos foram transferidos para novas placas contendo BDA (Batata-Dextrose-Ágar) para início do processo de purificação. Para a determinação da frequência de colonização (FC), foi avaliado o número de fragmentos que apresentaram crescimento fúngico em relação ao número total de fragmentos amostrados, de acordo com a seguinte fórmula:

$$FC = \frac{\text{n}^\circ \text{ de fragmentos foliares com crescimento fúngico}}{\text{n}^\circ \text{ total de fragmentos amostrados}} * 100.$$

3.3.2. Agrupamento, caracterização e identificação dos fungos endofíticos baseados na morfologia.

As linhagens isoladas foram transferidas para meio (BDA) e incubadas em estufa B.O.D à temperatura de 28°C. Posteriormente ao crescimento de sete dias, as linhagens foram agrupadas de acordo com o aspecto: cor da colônia e também formato do micélio. Para a identificação dos fungos, foi utilizado sequenciamento de DNA, utilizando metodologia descrita por Rhoden et al., 2012.

3.3.3. Obtenção da frequência de colonização (FC)

A frequência de colonização depende de vários fatores, entre eles, fatores climáticos, fisiologia da planta e estágio de desenvolvimento e condições nutricionais da planta. Garcia et al., 2012 isolando fungos endofíticos foliares de *Sapindus saponaria* obtiveram FC=100% , da mesma maneira, Rhoden et al., 2012 em folhas de *Trichilia elegans* a FC=100%. Os fungos purificados foram agrupados de acordo com as características do micélio. Nas análises macroscópicas foi possível criar 10 morfogrupos distintos para iniciar as atividades de obtenção de metabólitos secundários.

3.3.4. Obtenção dos extratos metabólitos secundários dos fungos endofíticos isolados

Para obtenção de metabólitos secundários foi utilizada a metodologia de Li et al. (2005), modificada. Os fungos isolados e purificados (num total de 16 fungos endofíticos) foram incubados em Erlenmeyers, contendo caldo BD (250 mL), posteriormente dispostos na B.O.D. a 28°C, durante 15 dias. Em seguida, o caldo fermentado foi centrifugado a 3.600 rpm, durante 15 minutos. O sobrenadante (500 mL) foi transferido para funil de separação, fracionado em acetato de etila P.A. (3x de 100 mL). O acetato de etila resultante da extração foi concentrado em evaporador rotativo R-3000 Buchi, a 40°C. As massas para os extratos obtidos (FE-1 a FE-16) estão especificadas na Tabela 12. Também foi utilizada a extração metabólica diretamente do micélio produzido. O micélio depois de filtrado foi mantido por 24 horas em metanol.

Após este período foi centrifugado e o sobrenadante coletado e concentrado em evaporador rotativo.

Tabela 9: Dados de massa para os fungos endofíticos isolados da espécie vegetal *Calea parvifolia*.

Código	Número do Fungo endofítico	Massa (mg)
CF-1	ICAL-6	5,70
CF-2	ICAL-12	27,10
CF-3	ICAL-15	22,40
CF-4	ICAL-19	11,20
CF-5	ICAL-22	20,80
CF-6	ICAL-25	11,60
CF-7	ICAL-31	51,00
CF-8	ICAL-36	36,40
CF-9	ICAL-38	13,10
CF-10	ICAL-48	7,30
CF-11	ICAL-54	43,90
CF-12	ICAL-59	41,50
CF-13	ICAL-65	29,30
CF-14	ICAL-74	14,40
CF-15	ICAL-76	8,60
CF-16	ICAL-83	17,40

3.3.5. Estudo Químico dos estratos brutos dos fungos endofíticos

As análises realizadas em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa foram realizadas em um cromatógrafo de marca Shimadzu (Mod. Prominence) com duas bombas LC-20AR, degaseificador DGU-20ASR, detector UV-VIS modelo SPD-M20A e sistema de injeção automático SIL-10AF. Para a observação inicial do composto presente e estabelecimento de condições cromatográficas iniciais, empregou-se uma coluna analítica C18 – Shim-pack prep.-ODS 250 x 46 mm id (Shimadzu). Para a quantificação do 3-NPA no extrato (ICAL-83) via CLAE, o extrato bruto foi ressuspenso em solução de ácido ortofosfórico 0,1% (pH 2,0), sendo posteriormente injetada as amostras no sistema cromatográfico. A absorbância foi analisada em 210nm (Muir e Majak, 1984; Majak e McDiarmid, 1990). Foi utilizada a fase móvel constituída de 0,1% de ácido ortofosfórico (pH 2.0) com vazão de 0.9mL/min. A coluna foi lavada com metanol 30% entre as injeções de amostra. O 3-NPA ($\geq 97\%$, Sigma) foi usado como padrão para quantificação.

O extrato CF-16 (*Diaporthe infecunda*) apresentou como constituinte majoritário o composto CF-I; o extrato CF-12 (*Alternaria eichhoniae*) forneceu o composto CF-II e o extrato CF-6 (*Diaporthe ssp*) (11,60 mg) foi submetido a filtração em coluna de Sephadex LH – 20 ($\varnothing = 2,5$ cm; 2,5g), empacotada com metanol e aluída com metanol. Foram obtidas seis frações que foram reunidas em duas frações CF-6-1 e CF-6-2. A fração CF-6-2 forneceu a mistura de compostos CF-III e CF-IV.

4. ENSAIOS BIOLÓGICOS

4.1. Atividade antioxidante

Os testes de atividade antioxidante foram realizados para todos os extratos brutos e frações das plantas estudadas. Os potenciais de atividade antioxidante serão determinados com base na atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) (EL-MASSRY et al., 2002). As amostras (20,0 mg) e o padrão em metanol (10,0 ml) serão adicionados em diferentes volumes à 2,0 ml de uma solução de DPPH (4,7 mg) em metanol (75,0 ml) preparado em frasco escuro.

Após 30 minutos a absorbância foi determinada em espectrofotômetro UV-visível (Varian, modelo Carey 50), em 515,5 nm empregando metanol como branco. Todos os testes foram realizados em triplicata. Como solução controle foi utilizada a solução de DPPH sem adição das amostras. O BHT foi utilizado como padrão.

A porcentagem de inibição do radical livre DPPH, foi calculada da seguinte forma: $(\% = (A_0 - A_1) \times 100 / A_0)$ onde A_0 foi à absorbância da reação controle e A_1 foi a absorbância na presença das amostras. O tempo de duração do experimento é de 30 minutos para cada experimento. A porcentagem de inibição contra a concentração ($\mu\text{g/ml}$) da amostra foi plotada para se obter a quantidade de antioxidante necessária para um decréscimo de 50% da concentração inicial (IC_{50}). O IC_{50} foi obtido pela aplicação do método de regressão linear.

4.2. Atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana das frações CFH, CFD, CFAC, CFHM e o extrato bruto (CEB), para a espécie vegetal *C. parvifolia* e LFH, LFCD, LFAC, LFHM e extrato bruto (LEB), referente à espécie vegetal *Lucilia linearifolia* Baker, foram testadas, frente quatro cepas de bactérias: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Shigella flexneri* (ATCC 12022). Sob a responsabilidade do professor doutor João Alencar Pamphile, do departamento de biotecnologia da Universidade Estadual de Maringá.

As bactérias foram crescidas durante 24 h em caldo LB (Luria-Bertani), e a concentração bacteriana foi posteriormente ajustada em solução salina 0,85% a uma concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹ utilizando a escala de McFarland 0.5. As bactérias foram semeadas (100 µL) sobre as placas de Petri contendo o meio LB sólido, realizando-se o espalhamento com alça de Drigalsky.

Posteriormente foram inseridos cinco discos de papel filtro Whatman nº 4, autoclavados (Ø 6mm), em cada placa, embebidos com 10 µL dos extratos previamente diluídos em metanol (MeOH), em diferentes concentrações (0, 10, 20, 30 e 50 mg.mL⁻¹ de MeOH). Para o controle positivo foi inoculado tetraciclina na concentração de 2 mg.mL⁻¹ em MeOH. As placas foram incubadas em B.O.D. a 37°C durante 24 horas. Foi avaliada a atividade pela formação de halo de inibição, aferindo a distância dos halos a partir da borda dos discos de papel filtro até a borda dos halos formados e comparado ao controle com tetraciclina.

O tamanho dos halos foi avaliado estatisticamente com o teste de Scott-Knott ($p < 0,05$), sendo comparados todos os tratamentos quanto à efetividade dos compostos testados, além de análise de regressão linear simples para as frações que se mostraram efetivas.

4.3. Atividade antitumoral

A avaliação da atividade antitumoral das frações da *C. parvifolia* foi realizada no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da UNICAMP sob-responsabilidade dos professores Dr. João Ernesto de Carvalho e Dra. Mary Ann Foglio. As linhagens de células utilizadas foram cedidas pelo National Cancer Institute (NCI) dos Estados Unidos da América (EUA). Todos os procedimentos foram realizados segundo metodologia descrita por Monks et al. (1991).

No procedimento, foram plaqueados 100µL/compartimento de células, em meio de cultura RPMI-1640 suplementando com 5% de soro fetal bovino inativo (SFB) e penicilina:estreptomicina (meio RPMI/SFB/pen:strep), nas suas respectivas densidades de inoculação, em placas de 96 compartimentos. Estas foram incubadas por 24 horas, a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e 100% de umidade. Para cada linhagem foi utilizadas um número estipulado de placas, além da placa T₀ (placa controle), dependendo da quantidade de células obtidas na contagem. 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 100µL/compartimento do composto a ser testado nas placas de 96 compartimentos, exceto na T₀, nas doses de 0,25; 2,5; 25; 250 mg/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 da Sulforrodamina B (SRB).

As placas de 96 compartimentos foram fixadas com 50 µL/compartimento de ácido tricloroacético a 50% (TCA). Para completar a fixação celular, as placas foram incubadas por 1 hora a 4⁰C. 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 a temperatura ambiente até a secagem completa.

Em seguida, as placas foram coradas pela adição de 50µL/compartimento de SRB a 0,4% (peso/volume), dissolvido em ácido acético a 1%. Estas foram incubadas a 4⁰C, 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 10µL e pH 10,5, por 5 minutos em ultra-som. A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em 560nm em um leitor de microplacas.

A análise estatística dos ensaios para determinar o crescimento das células, foi baseada nas médias das absorbâncias descontadas de seus respectivos brancos e através das fórmulas seguintes, foi determinado o crescimento celular.

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;

T₀ é o controle das células no dia da adição das substâncias.

Foram gerados gráficos de crescimento (em porcentagem) em função da concentração da amostra testada, para cada uma das linhagens testadas.

4.4. Atividade Antileishmania

4.4.1. Parasita

Formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (cepa WHOM/BR/75/JOSEFA) foram cultivadas em meio Warren (Infusão de Cérebro e Coração “Difco[®]”, hemina (Sigma) e ácido fólico (Sigma) pH 7,0 suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB – Gibco) e incubadas a 25 °C.

4.4.2. Ensaio antiproliferativo

Formas promastigotas (1×10^6 parasitos/mL) com cultivo de 48 h serão adicionadas em placa de 24 poços estéril, na presença e ausência de diferentes concentrações do extrato e frações diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) a 1%, em seguida incubadas por 72 h a 25 °C. Os tratamentos foram realizados nas concentrações finais de 1, 5, 10, 50, 100 e 500 µg/mL e a contagem realizada em câmara de Neubauer para determinar a concentração inibitória de 50% dos protozoários (CI₅₀) (VENDRAMETTO, et. al., 2010).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

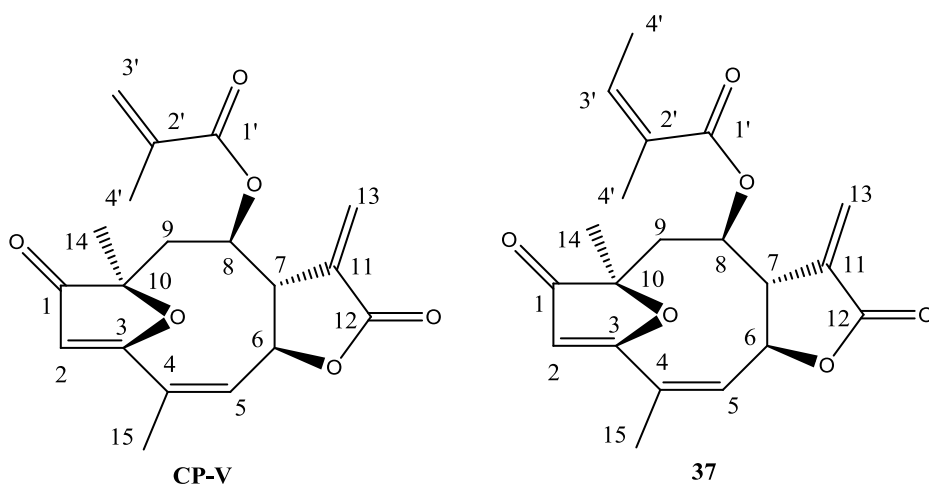
5.1. Estudo da Espécie Vegetal *Calea parvifolia*

5.1.2. Identificação dos compostos isolados de *Calea parvifolia*

A discussão relativa à identificação dos compostos isolados *C. parvifolia* está dividida por classes de metabólitos, na seguinte sequência: lactonas sesquiterpênicas, flavonoides e ácidos clorogênicos.

5.1.3. Lactonas sesquiterpênicas (compostos CP-III a CP-VIII)

COMPOSTO CP-V



O composto CP-V foi isolado da fração CFD-3-2-2, na forma de sólido escuro e, sua estrutura foi elucidada como sendo a do 15-deoxioiazensolideo utilizando análise dos dados de RMN de ^1H , ^{13}C , COSY, DEPT, HMBC e HSQC e comparação com os da literatura.

No espectro de RMN de ^1H (Figuras 20 e 21) foi observada a presença dos hidrogênios H-6 e H-7 em δ_{H} 5,28 (m) e δ_{H} 3,71(m), respectivamente, que evidenciam a junção da unidade α -metileno- γ -lactona ao anel de dez membros característica do esqueleto tipo goiazensolídeo. Ainda como parte do anel, observou-se sinais para os hidrogênios olefínicos H-2 e H-5 em δ_{H} 5,61(s) e 5,95(m), para o hidrogênio oximetínico H-8 em δ_{H} 5,19 (m) e para os hidrogênios metilênicos H-9 em δ_{H} 2,32 dd ($J = 15,1; 3,4$ Hz) e 2,55 ($J = 15,1; 3,4$ Hz).

Os sinais para os hidrogênios vinílicos H-13a e H-13b da unidade α -metileno- γ -lactona aparecem em δ_{H} 5,68 d ($J = 2,9$ Hz) e 6,35 d ($J = 2,9$ Hz), respectivamente. O grupo metacrilóxi ligado ao C-8 foi evidenciado pelos sinais de hidrogênio H-3a' e H-3b' em δ_{H} 5,61(sl) e 6,03 t ($J = 1,0$), um sinal para o grupo metila em δ_{H} 1,87 t ($J = 1,2$ Hz).

No espectro de RMN de ^{13}C (Figuras 22 e 23) foi observados sinais para o grupo diidro-furanolactônico em δ_{C} 205,5 (C-1), 103,4 (C-2), 185,2 (C-3) e 87,8 (C-10). A unidade α -metileno- γ -lactona foi confirmada pelos sinais da carbonila α,β -insaturada em δ_{C} 168,9, dos carbonos vinílicos em δ_{C} 123,7 e 135,9 e o carbono oximetínico em δ_{C} 75,4 e o carbono metilênico em δ_{C} 48,5. A ligação dupla entre os carbonos C-4 e C-5 do anel macrocíclico foi evidenciada pelos sinais em δ_{C} em 131,9 (C-4) e 134,2 (C-5). Os sinais do grupo ester α,β -insaturado ligado ao carbono C-8 foram observados em δ_{C} 165,9 (C-1'), δ_{C} 139,1 e 127,1 relativos aos carbonos vinílicos C-3' e C-2', e em δ_{C} 18,3 para o grupo metila (Tabelas 10 e 11).

Figura 20: Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) para o composto CP-V.

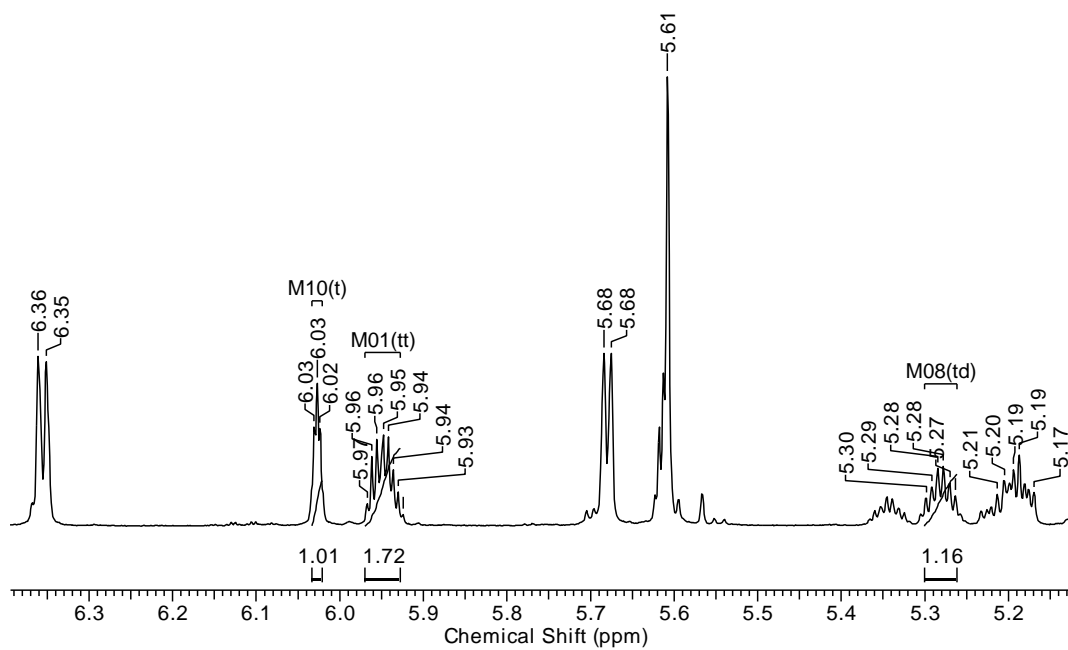
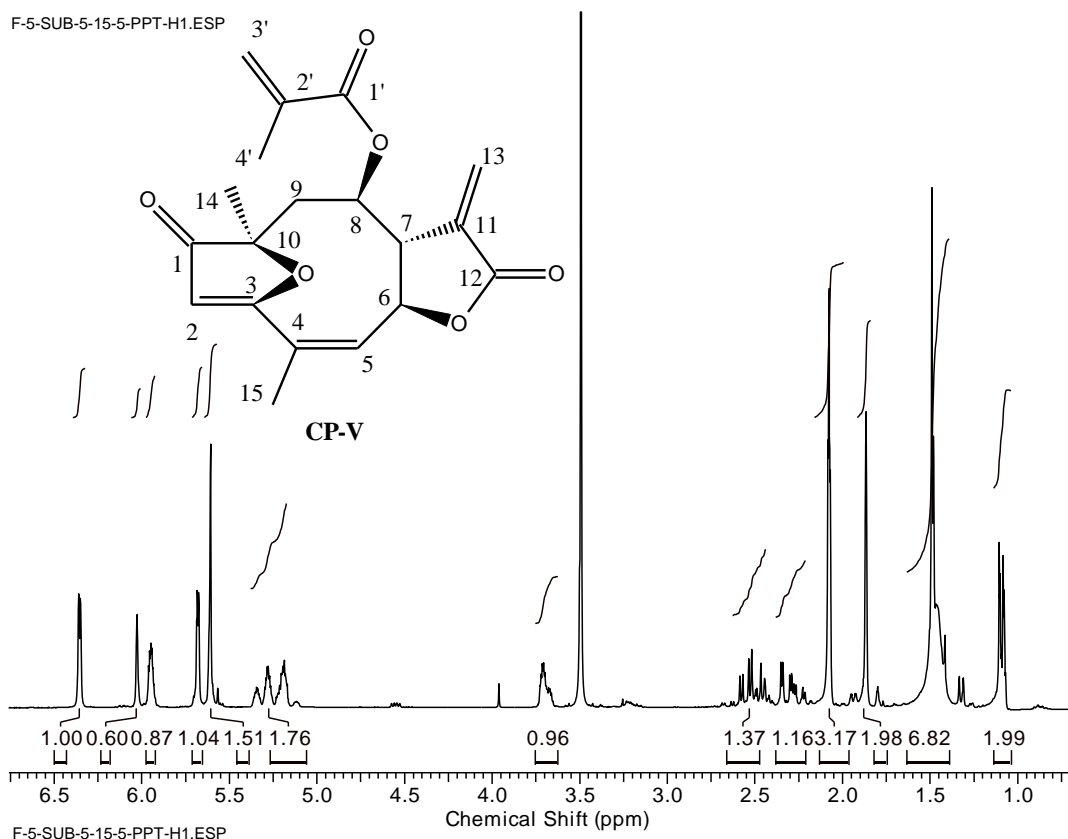


Figura 21: Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) para o composto CP-V.

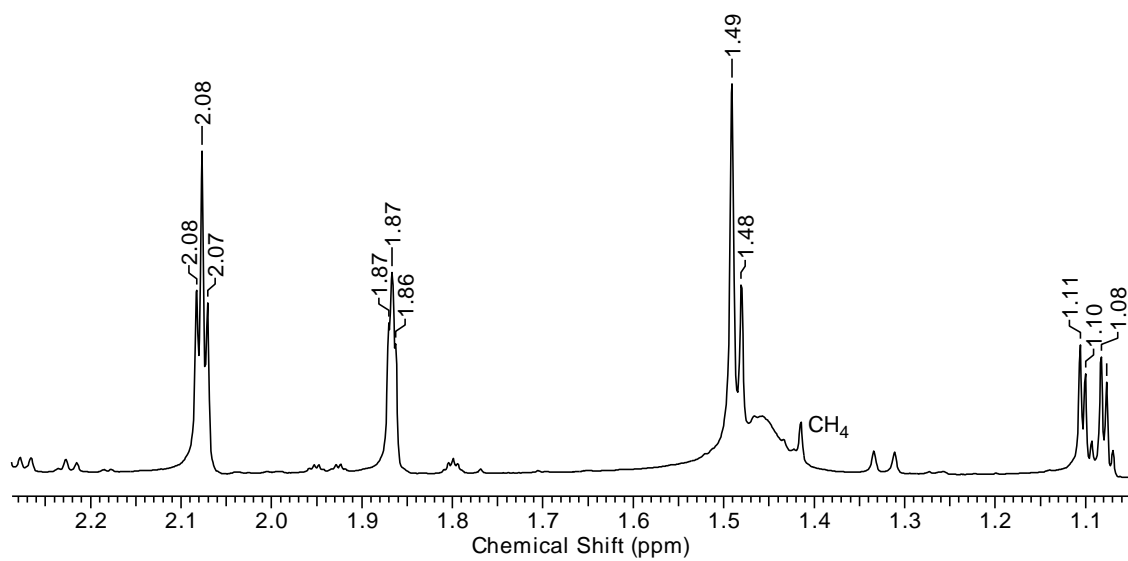
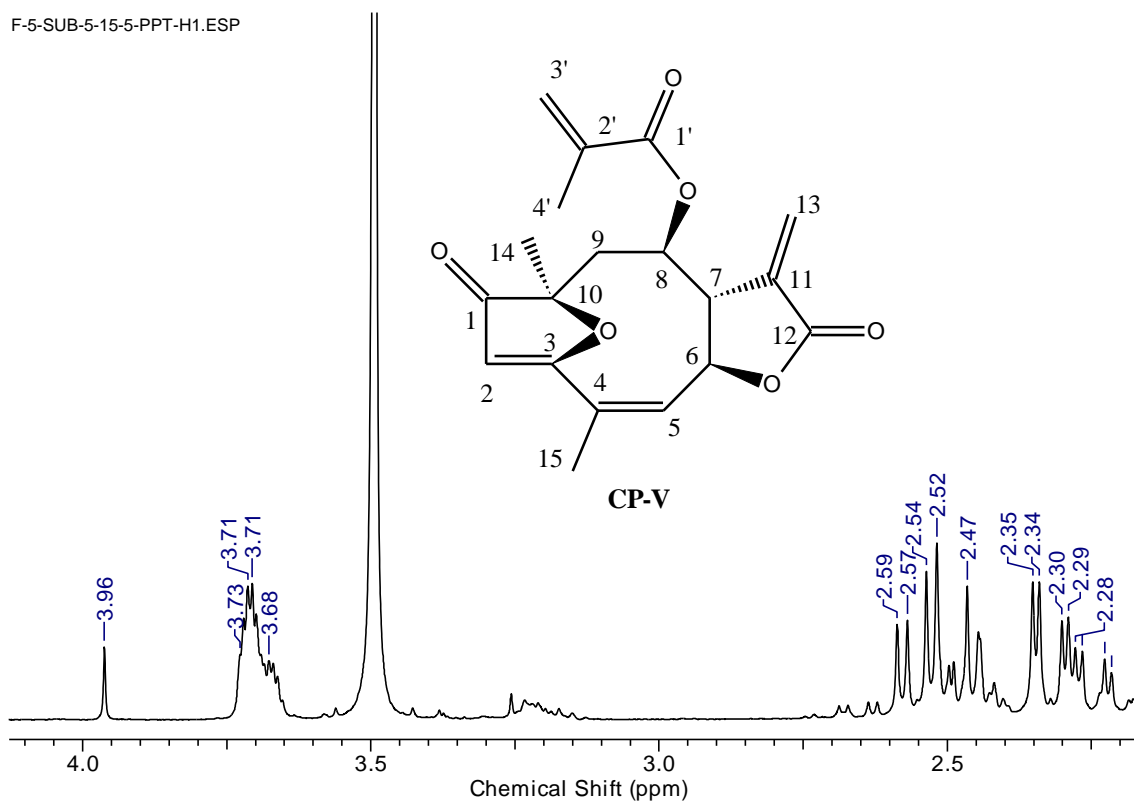
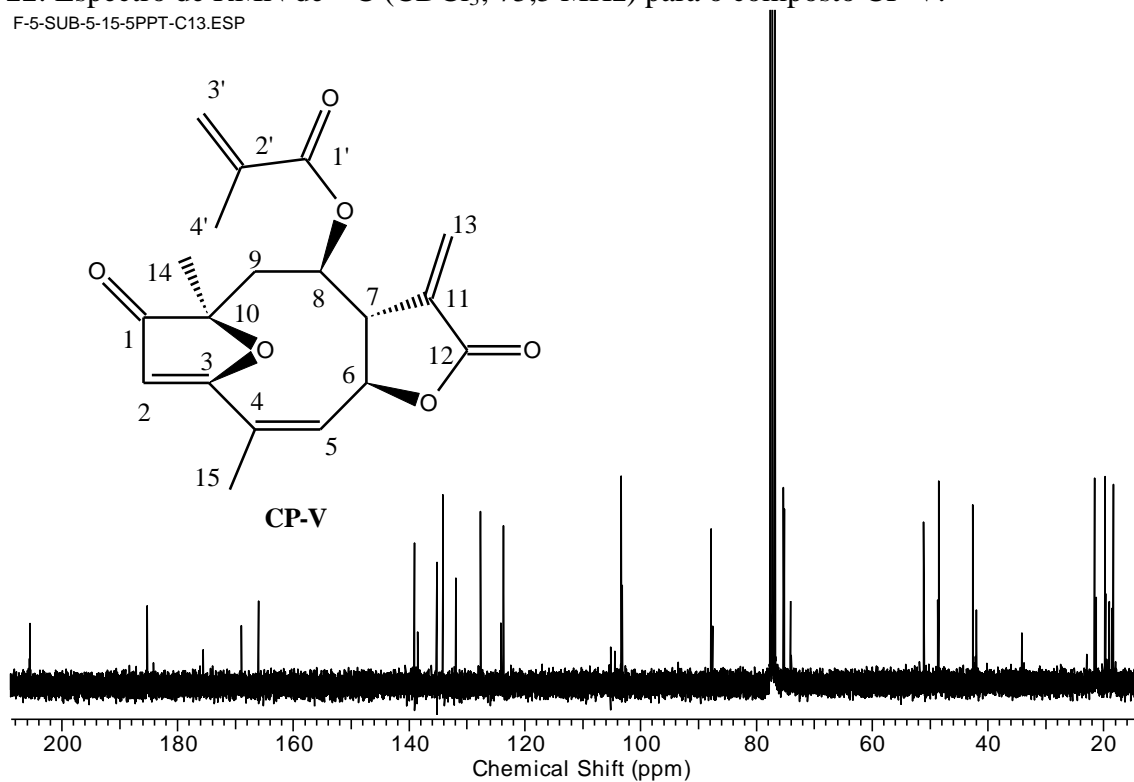


Figura 22: Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 75,5 MHz) para o composto CP-V.

F-5-SUB-5-15-5PPT-C13.ESP



F-5-SUB-5-15-5PPT-C13.ESP

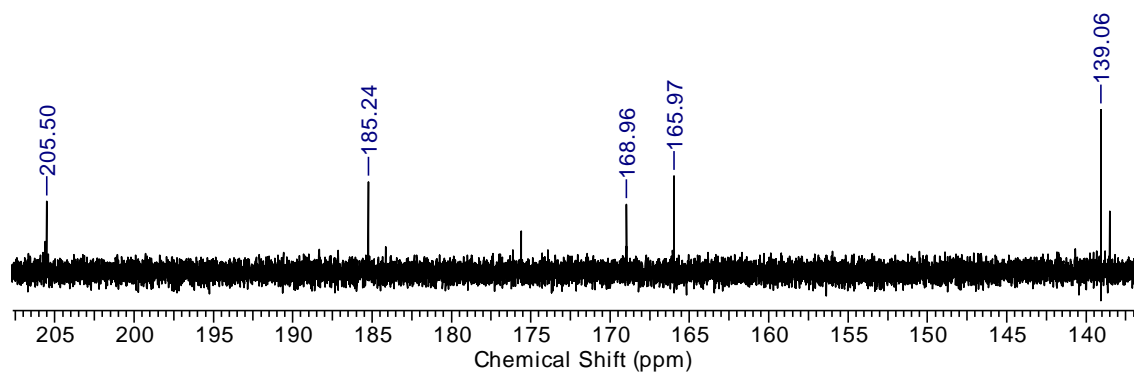
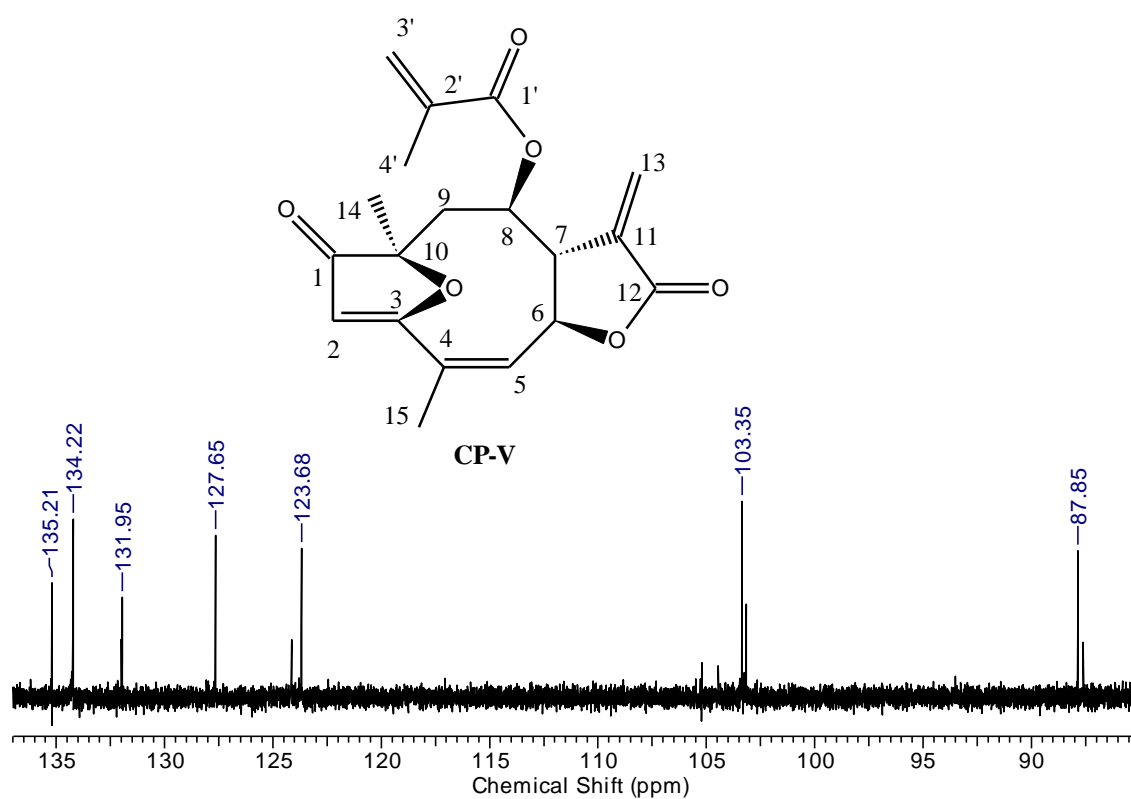
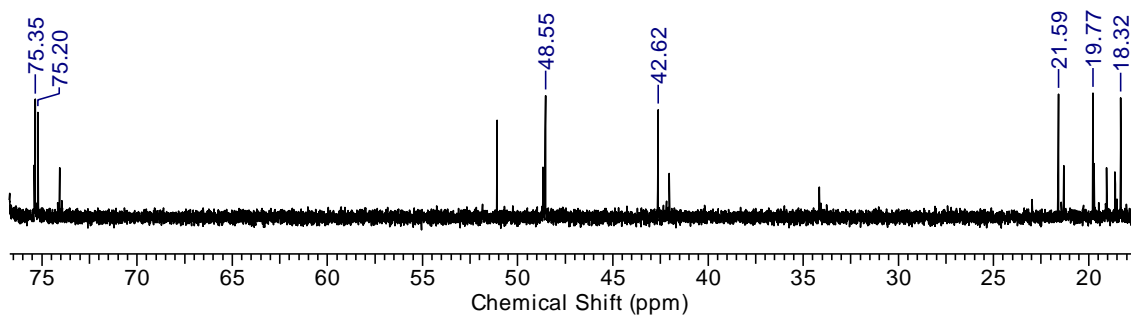


Figura 23: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 300 MHz) para o composto CP-V.

F-5-SUB-5-15-5PPT-C13.ESP



F-5-SUB-5-15-5PPT-C13.ESP



O espectro de HSQC (Figuras 24 e 25) mostrou a correlação entre os hidrogênios vinílicos em δ_H 5,61 e 5,95 com os carbonos C-2 e C-5, respectivamente, bem como a correlação entre os hidrogênios olefínicos em δ_H 6,03 e 5,61 com o carbono C-3'. Para unidade α -metileno- γ -lactona foi observado às correlações entre os hidrogênios em δ_H 6,35 e 5,68 com o carbono C-13, H-6 com o carbono em δ_C 75,4 e a correlação entre o hidrogênio em δ_H 3,71 com o carbono C-7. Ainda, a análise das demais correlações observadas no espectro de HSQC permitiu a atribuição dos deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos para o composto **CP-V**.

O espectro de COSY (Figuras 26 e 27) mostrou as correlações entre o H-3' com o hidrogênio em δ_H 1,85 (4'-CH₃) e entre os hidrogênios da ligação dupla terminal em δ_H 6,02 e 5,61, para o grupo metacrilóxi. As correlações entre os sinais de H-5 (δ_H 5,95) com H-6 (δ_H 5,28), deste com H-7 (δ_H 3,71) e de H-7 com H-8 (δ_H 5,19) permitiram confirmar a conectividade entre os respectivos carbonos desta porção da molécula. A correlação entre o hidrogênio em δ_H 5,19 (H-8) com os hidrogênios H-9a e H-9b complementa esta informação.

Figura 24: Espectro de HSQC (CDCl₃; 300 MHz) para o composto CP-V.

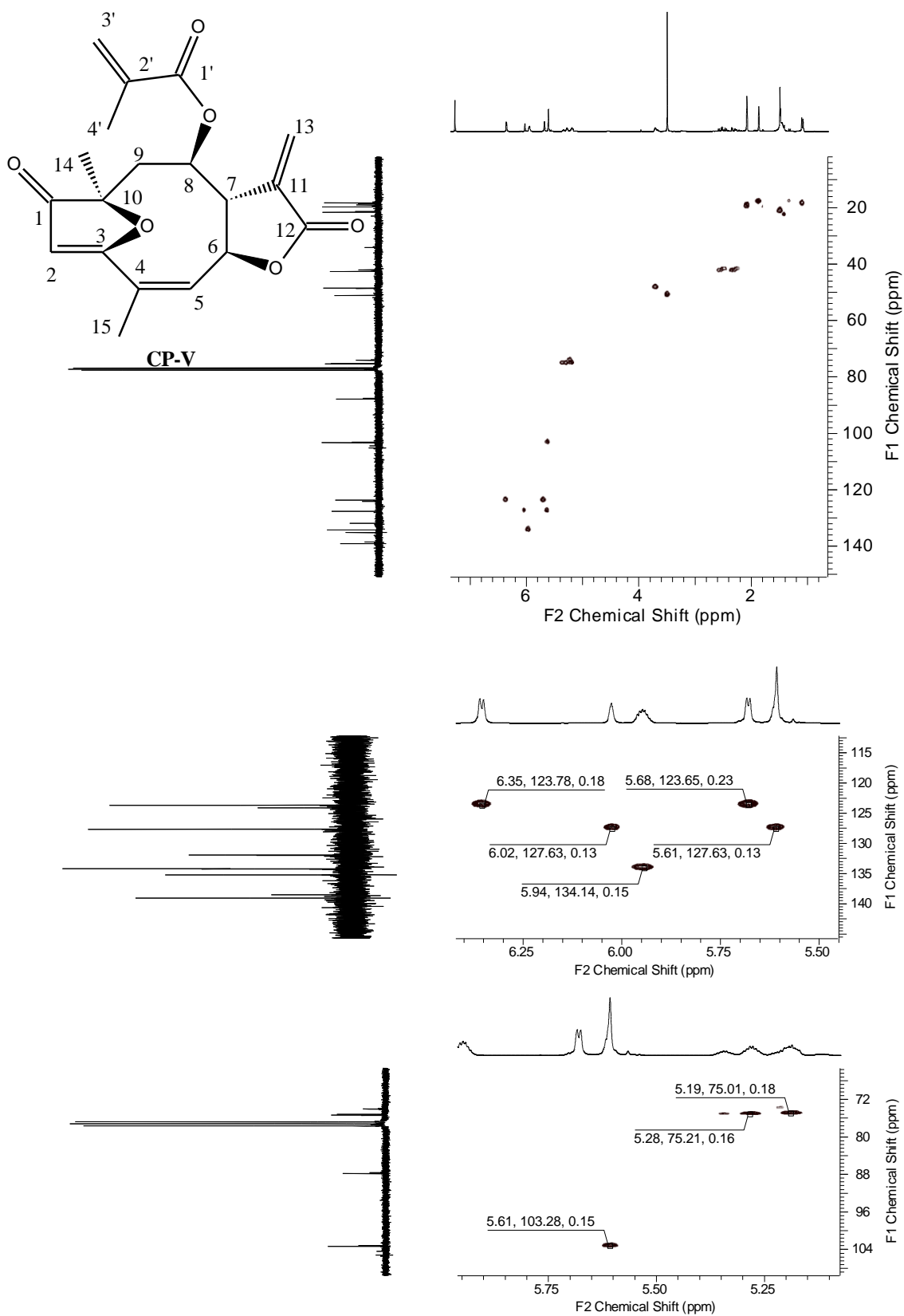


Figura 25: Expansão do Espectro de HSQC (CDCl₃; 300 MHz) para o composto CP-V.

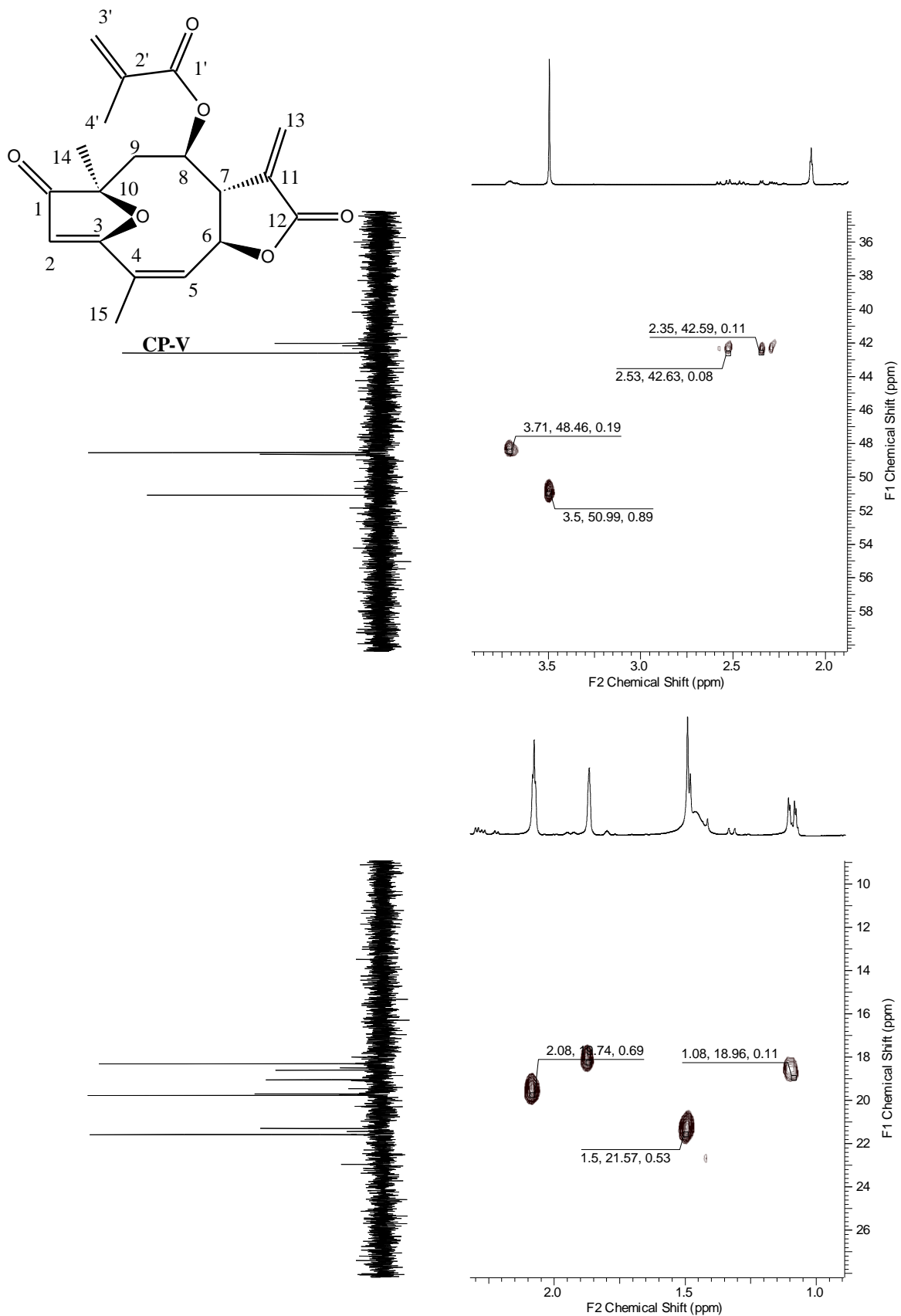


Figura 26: Espectro de COSY (CDCl₃; 300 MHz) para o composto CP-V.

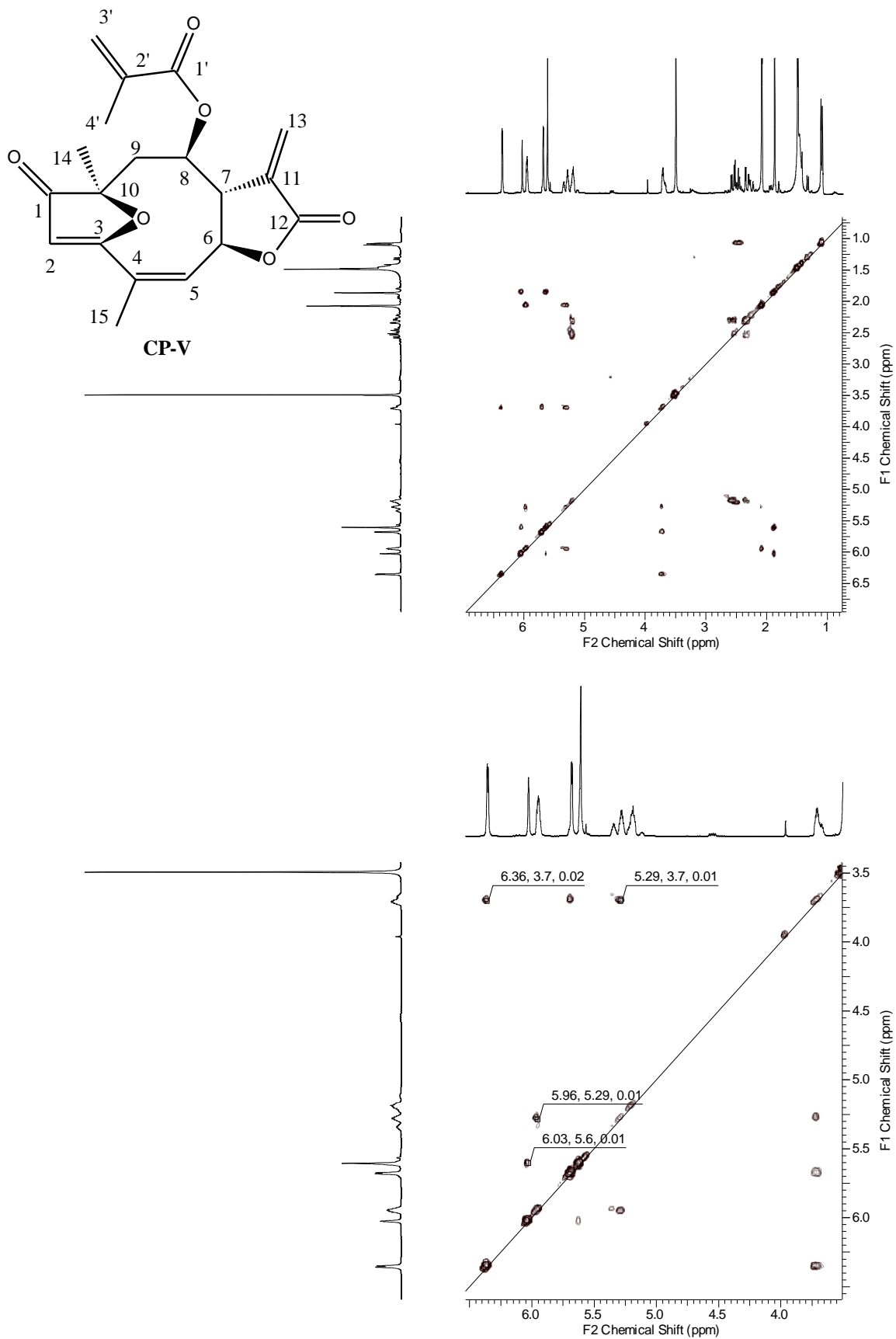
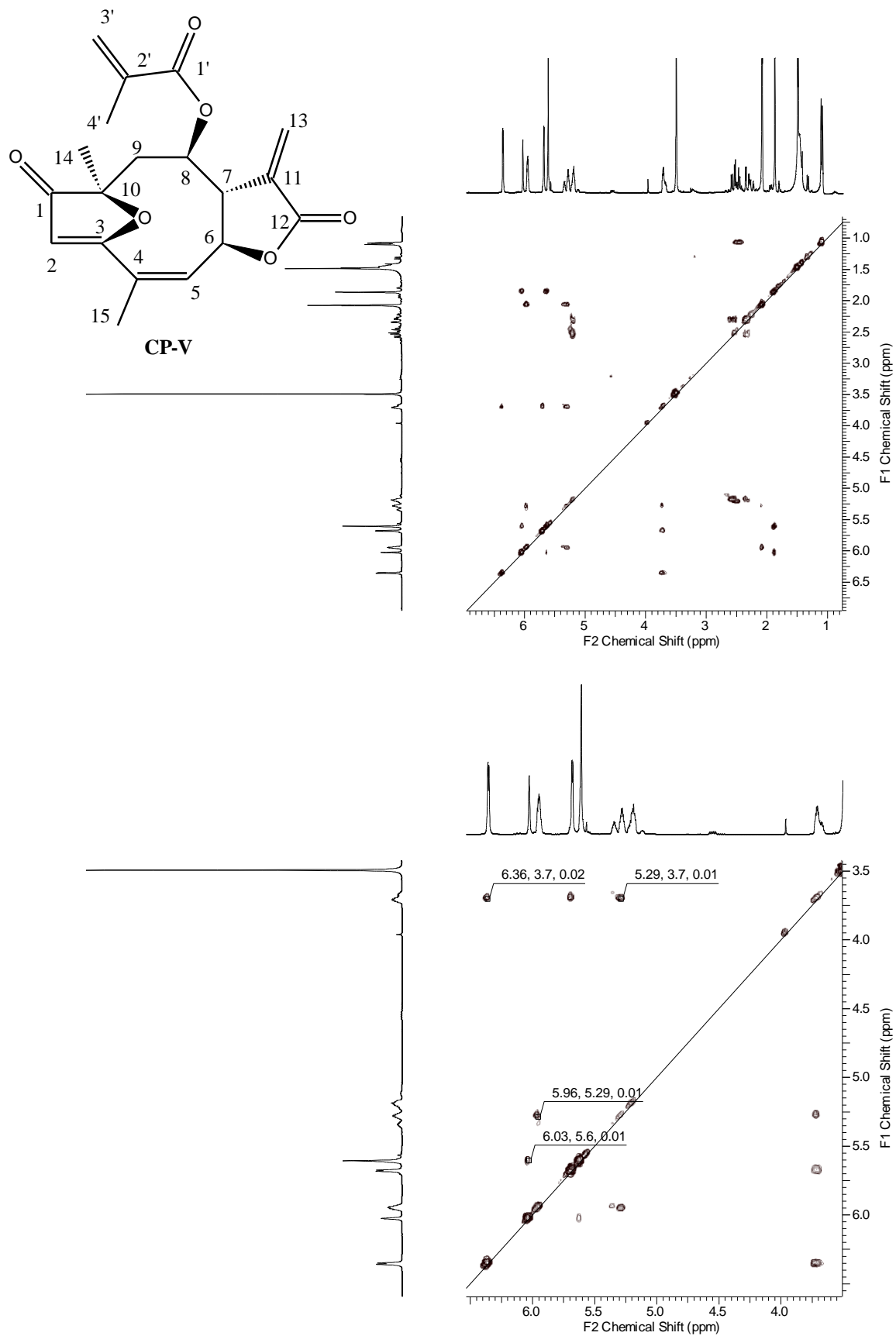


Figura 27: Espectro de COSY (CDCl_3 ; 300 MHz) para o composto CP-V.



A análise do espectro de HMBC (Figura 28, 29 e 30) possibilitou confirmar a atribuição dos sinais para a unidade α -metileno- γ -lactona por meio de correlações dos hidrogênios H-13a e H-13b com os carbonos C-12 e C-7, em δ_C 168,9 e 48,5 respectivamente. Para o grupo éster ligado ao C-8 foi observada a correlação entre o hidrogênio em δ_H 6,03 com os carbonos C-1' e C-4', e a correlação do H-4' com os carbonos em δ_C 165,9 (C-1'), 127,7 (C-3') e 135,9 (C-2'). O posicionamento do grupo CH_3 -14 no C-10 foi confirmado pelas correlações do H-14 com os carbonos em δ_C 87,8 (C-10), 185,2 (C-3) e 205,5 (C-1).

A posição- β para o grupo metacrilóxi do C-8 em CP-V foi definida principalmente por comparação com dados do epímero C-8 α , onde a principal diferença foi observada para o carbono C-6 (δ_C 81,5 para C-8 α e 75,4 para o C-8 β) (HELENO et al., 2004). O composto 15-deoxigoiazensolideo já foi relatado no gênero, isolado da espécie *Calea pilosa* (BOHLMANN et al., 1981).

Figura 28: Espectro de HMBC (CDCl_3 , 300 MHz) para o composto CP-V.

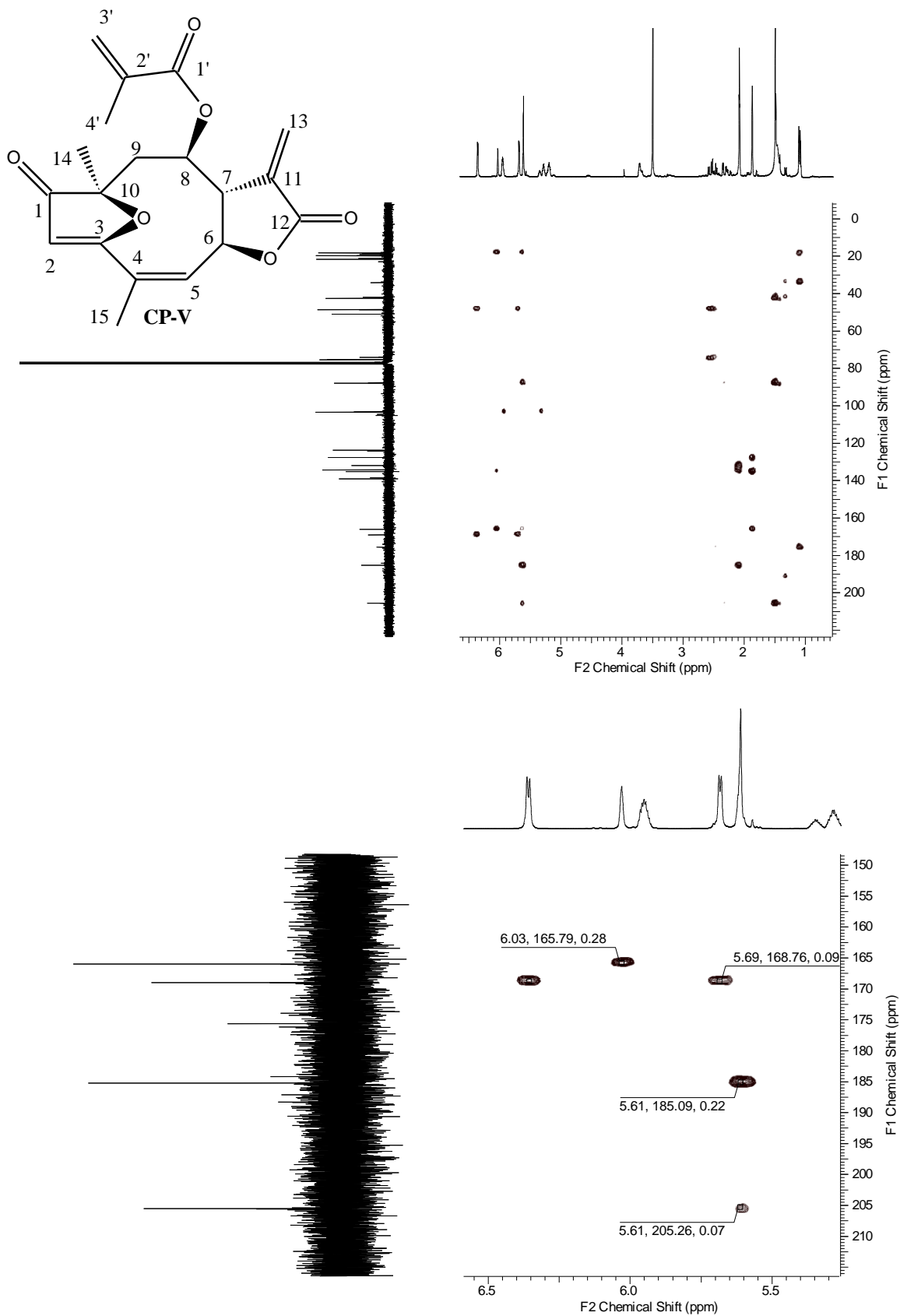


Figura 29: Expansão do espectro de HMBC (CDCl₃, 300 MHz) para o composto CP-V.

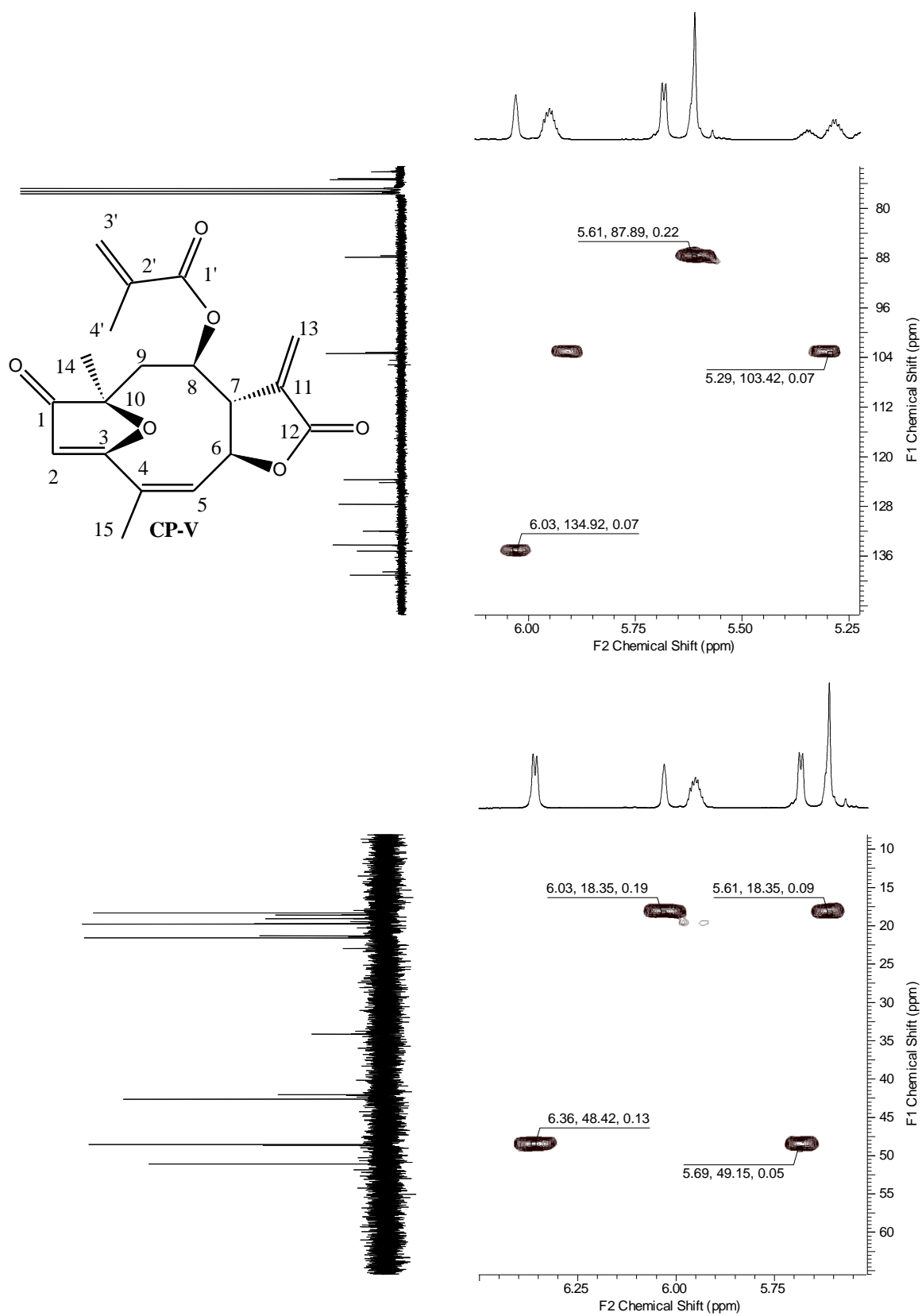
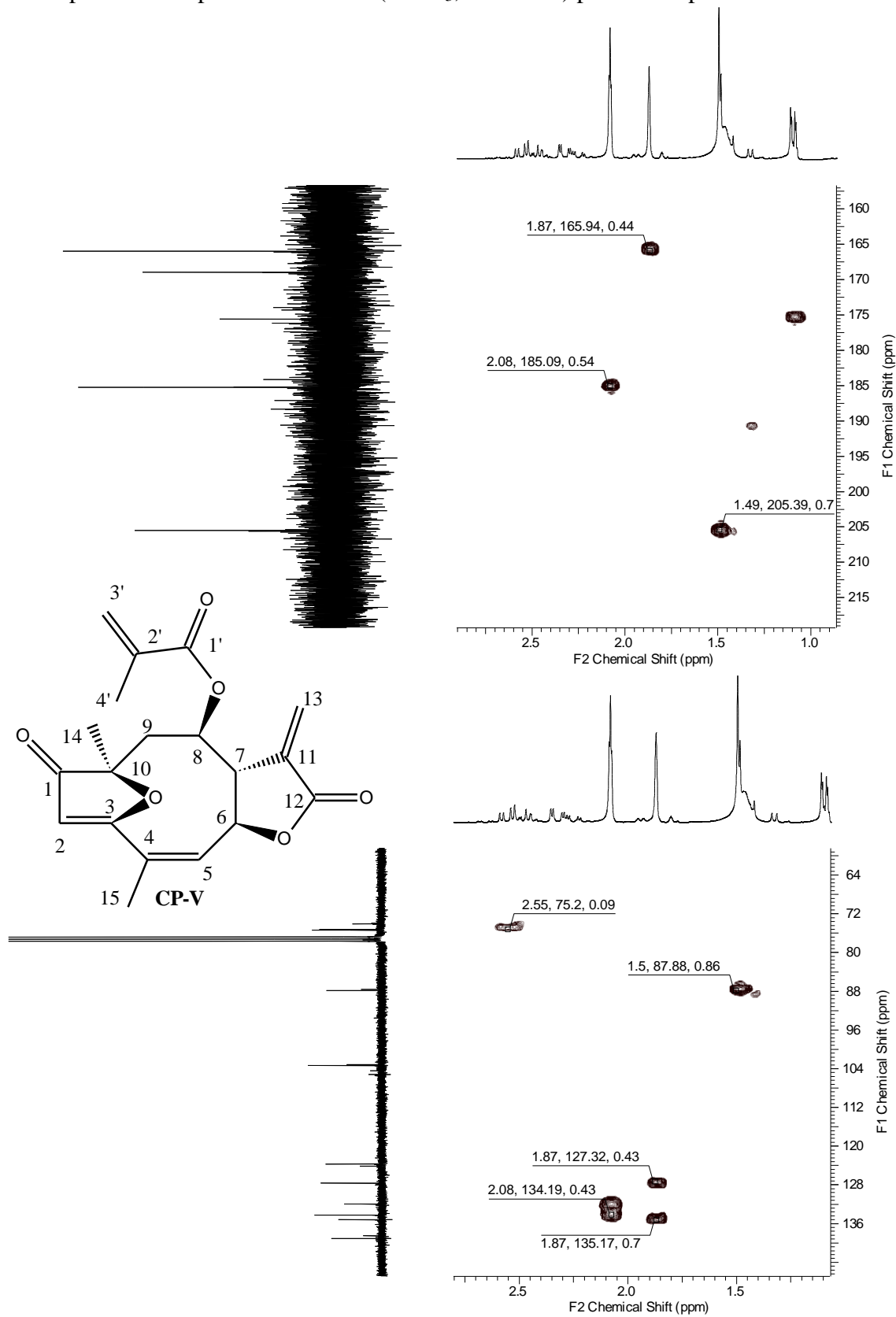


Figura 30: Expansão do espectro de HMBC (CDCl₃, 300 MHz) para o composto CP-V.



Os dados de RMN ^1H e ^{13}C foram comparados com os da literatura para o composto contendo o grupo angelóxi no C-8, a 15-deoxibudleina A (**37**) (VICHNEWSK, et al., 1982) (Tabela 13), e para o seu epímero contendo o grupo metacrilóxi na posição- α denominado 15-deoxigoiazensolídeo (HELENO et al., 2004). (Tabela 10 e 11). E os dados comparados foram concordantes com os da literatura para o epímero do composto 15-deoxibudleina A.

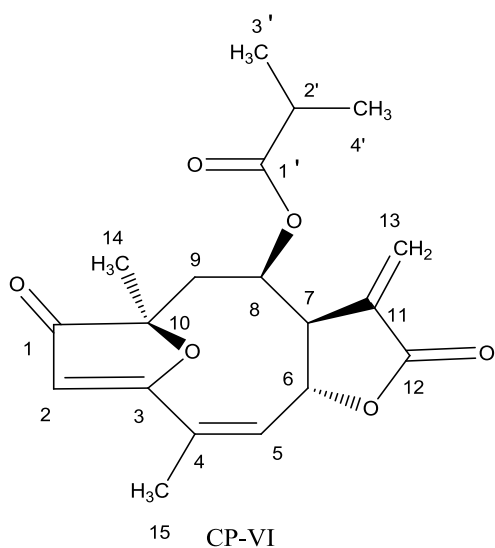
Tabela 10: Dados espectroscópicos de RMN de ^1H e ^{13}C (CDCl_3 , 300 MHz) do composto CP-V e do 15-deoxibudleina A.

Nº	15-deoxibudleina A		Composto CP-V		HMBC
	$\delta_{\text{H mult.}}$ (J em Hz)	δ_{C}	$\delta_{\text{H mult.}}$ (J em Hz)	δ_{C}	
1		204,9		205,5	
2	5,59 s	103,0	5,61 s	103,1	205,5; 185,2; 87,8
3		184,8		185,2	
4		131,8		131,7	
5	5,93 dq (4,0; 1,5)	134,1	5,95 m	134,0	
6	5,30 tq (4,0; 1,5)	75,4	5,28 m	75,1	
7	3,70 m	48,5	3,71 m	48,3	
8	5,25 ddd (5,5; 4,2)	74,1	5,19 m	74,9	
9	2,53 dd (15,0; 5,5) 2,29 dd (15,0; 4,0)	41,9	2,55 dd (15,1; 3,4) 2,32 dd (15,1; 3,4)	42,4	75,2
10		87,5		87,8	
11		138,7		138,8	
		2			
12		168,7		168,9	
13	5,69 qd (3,0) 6,36 d (3,0)	123,5	5,68 d (2,9) 6,35 d (2,9)	123,7	48,5; 168,8
14	1,48 s	21,2	1,49 sl	21,3	42,6; 87,8; 205,5
15	1,80 quint (1,5)	20,0	2,08 t (3,0)	19,5	185,2; 131,9; 134,2
	Angelóxi		Metacrilóxi		
1'		165,7		165,9	
2'		126,4		134,9	
		8			
3'	5,11 qq (7,0; 1,5)	140,9	6,03 t (1,0)	127,1	135,5; 166,7
		15,7	5,61 sl		
4'	1,93 dq (7,0; 1,5)	15,7	1,87 t (1,2).	18,1	127,1; 139,1; 165,9
5'	1,80 quint (1,5)	19,4			

Tabela 11: Dados espectroscópicos de RMN de ^1H e ^{13}C (CDCl_3 , 300 MHz) do composto CP-V e do 15-deoxigaiazensolídeo.

15-deoxigaiazensolídeo			Composto CP-V		
Nº	$\delta_{\text{H mult.}}$ (J em Hz)	$^b\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H mult.}}$ (J em Hz)	δ_{C}	HMBC
1		204,8		205,5	
2	5,71 s	104,7	5,61 s	103,1	205,5; 185,2; 87,8
3		186,8		185,2	
4		130,4		131,7	
5	6,00 dq (3,0; 1,7)	135,0	5,95 m	134,0	
6	5,26 dddq (5,0; 3,0; 2,2)	81,5	5,28 m	75,1	
7	3,72 dddddd (5,0; 3,1; 2,9; 2,8)	51,1	3,71 m	48,3	
8	4,55 dddd (11,5; 2,9; 2,0)	73,4	5,19 m	74,9	
9	2,48 ddd (13,8; 11,5) 2,31 ddd (13,8; 2,0)	43,8	2,55 dd (15,1; 3,4) 2,32 dd (15,1; 3,4)	42,4	75,2
10		89,6		87,8	
11		133,5		138,8	
12		168,8		168,9	
13	5,46 dd (2,8) 6,22 dd (3,1)	124,4	5,68 d (2,9) 6,35 d (2,9)	123,7	48,5; 168,8
14	1,53 s	20,6	1,49 sl	21,3	42,6; 87,8; 205,5
15	2,08 t (2,2; 1,8)	20,3	2,08 t (3,0)	19,5	185,2; 131,9; 134,2
	Metacrilóxi		Metacrilóxi		
1'		166,7		165,9	
2'		135,5		134,9	
3'	6,01 dq (1,6; 1,0) 5,54 quint (1,6)	126,4	6,03 t (1,0) 5,61 sl	127,1	135,5; 166,7
4'	1,83 dd (1,6; 1,0)	18,0	1, 87 t (1, 2).	18,1	127,1; 139,1; 165,9

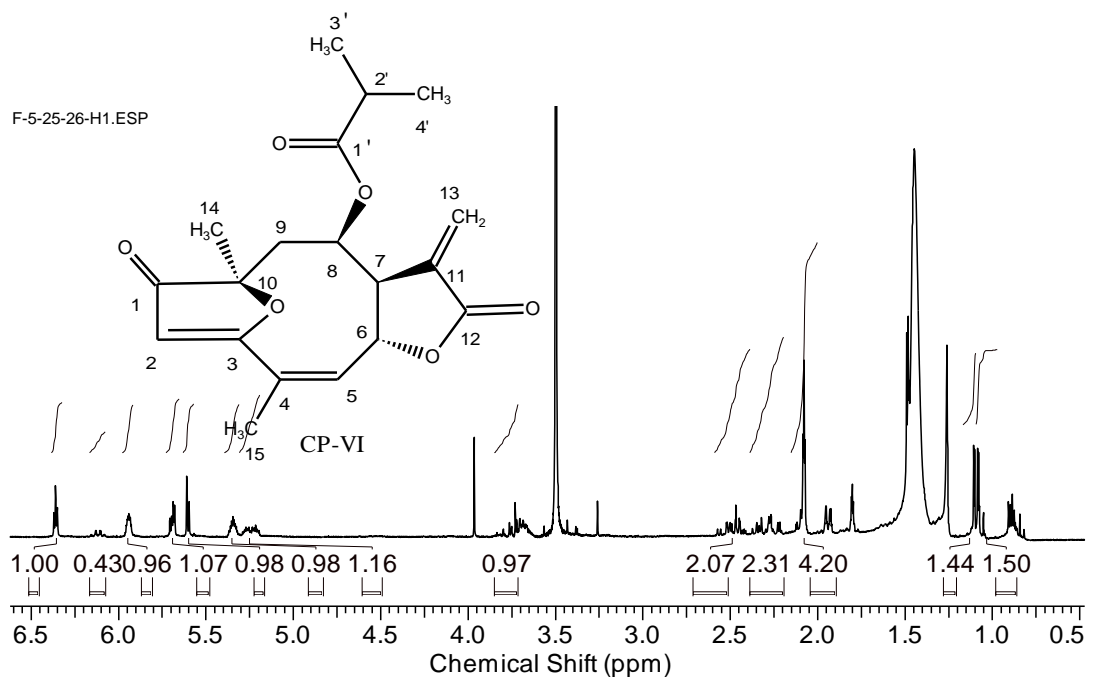
COMPOSTO CP-VI



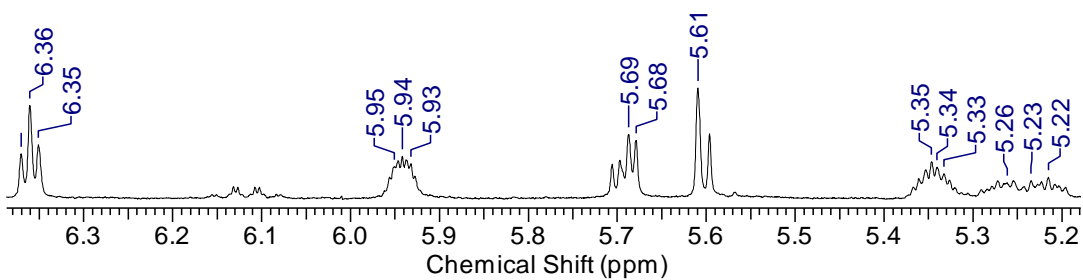
Os espectros de RMN ^1H (Figura 31) e ^{13}C (Figura 33) apresentaram sinais em regiões similares aos do composto CP-V, característicos para as unidades α -metileno- γ -lactona, diidro-furano lactônica e para o anel macrocíclico, que constituem o esqueleto básico do goiazensolídeos.

As diferenças observadas no espectro de RMN ^1H para CP-VI referem-se à ausência dos sinais em δ_{H} 5,61 (s) e 6,03 (s), relativos aos hidrogênios olefínicos do grupo metacrilato e a presença de sinais em δ_{H} 2,46 (m) (H-2') para um hidrogênio metínico e, em δ_{H} 1,08 (d; $J = 1,8$ Hz; H-3') e 1,09 (d; $J = 1,8$ Hz; H-4'), para hidrogênios metílicos. Isto sugere que composto CP-VI, em relação à lactona sesquiterpênica CP-V, apresenta um grupo iso-butirolóxi, ao invés do grupo metacrilato ligado ao C-8 do esqueleto goiazensolídeo. O espectro de COSY (Figura 32) confirmou a correlação entre os hidrogênios H-3' e H-4' com o hidrogênio H-2'.

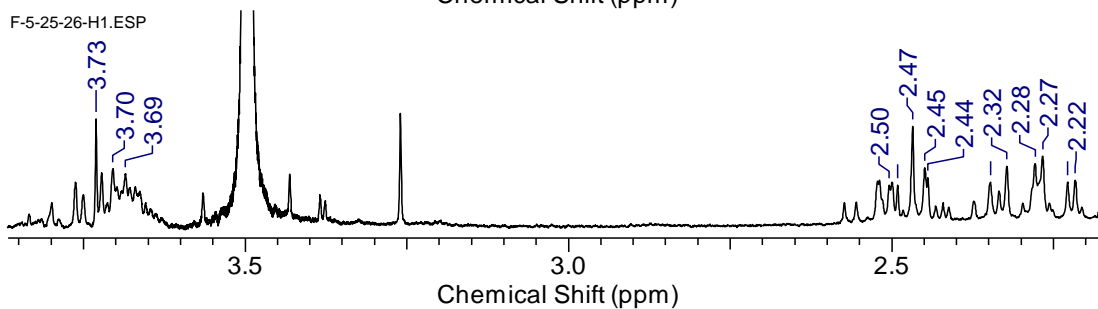
Figura 31: Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) para o composto CP-VI.



F-5-25-26-H1.ESP



F-5-25-26-H1.ESP



F-5-25-26-H1.ESP

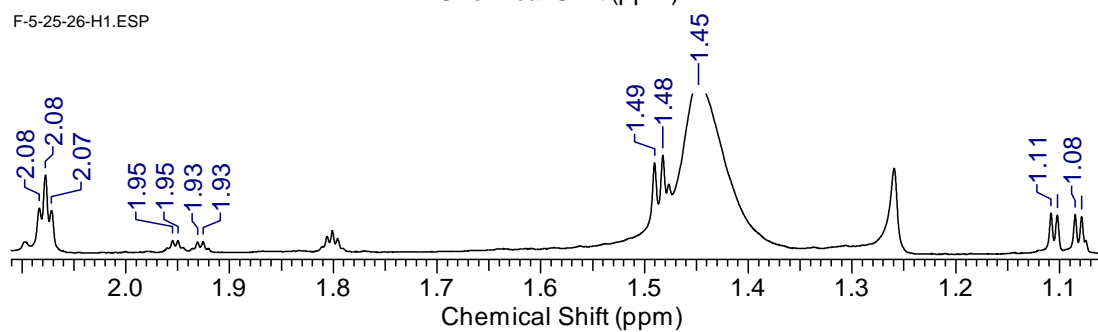
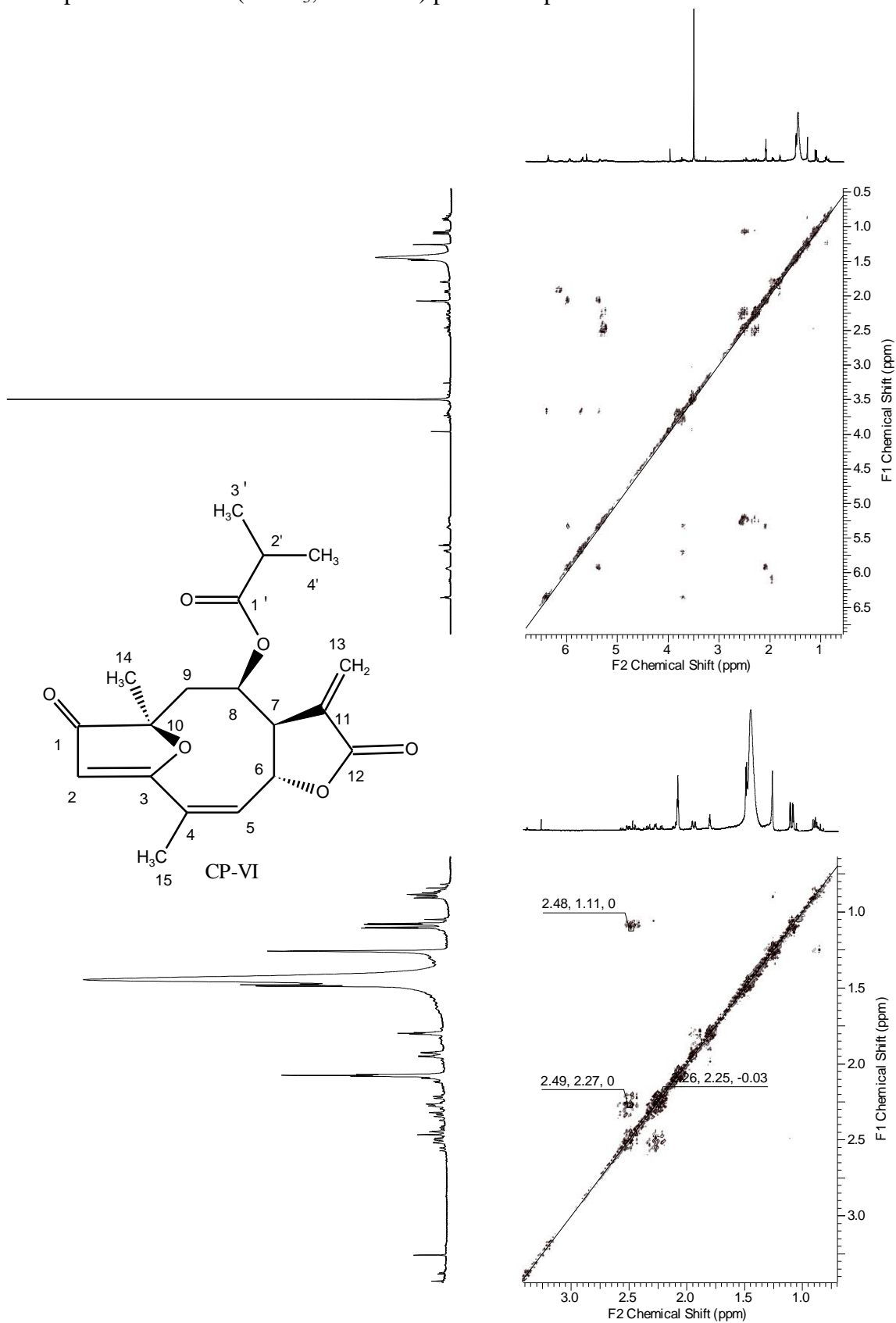


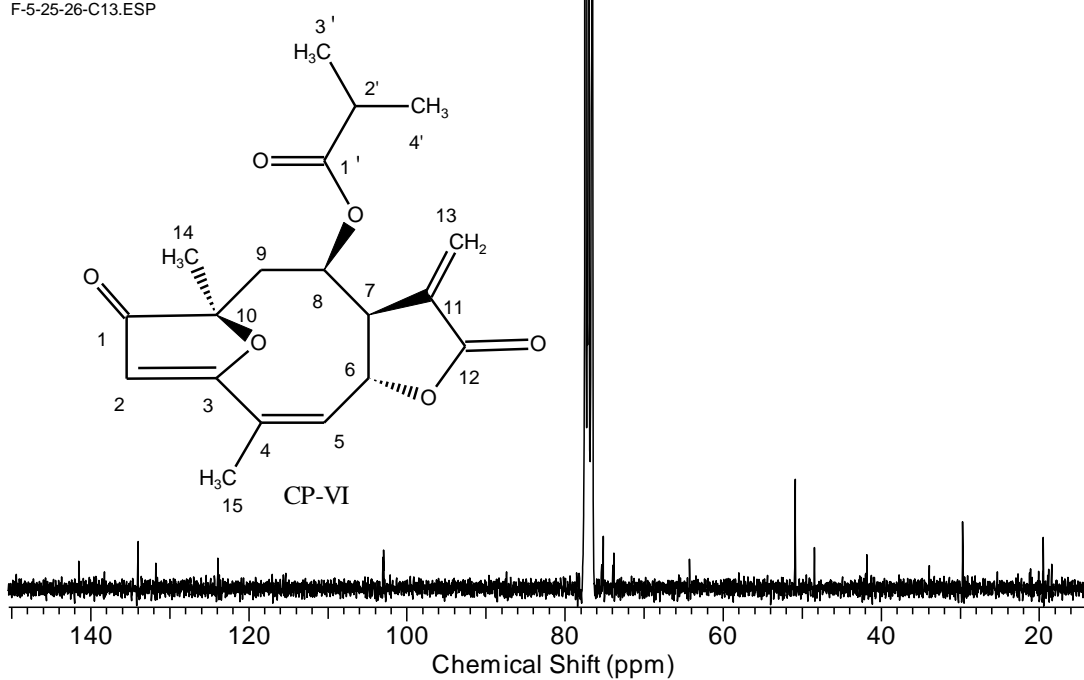
Figura 32: Espectro de COSY (CDCl₃, 300 MHz) para o composto CP-VI.



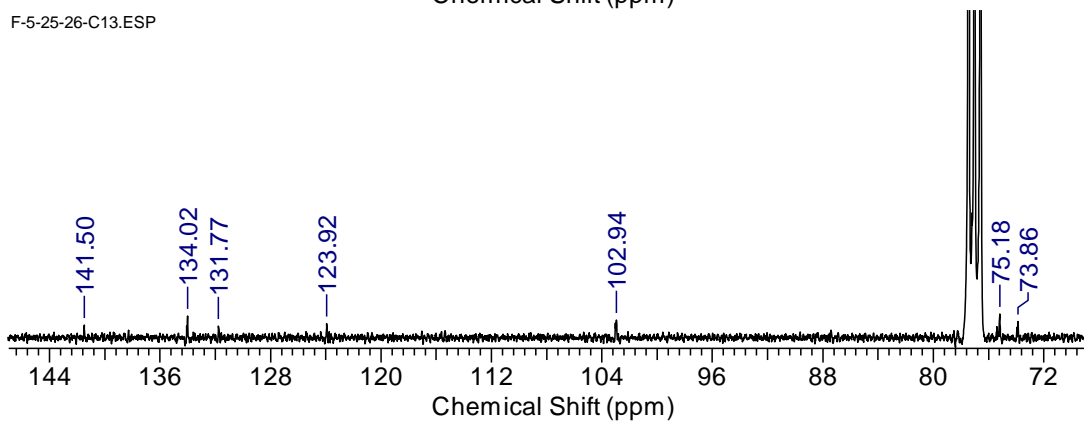
O espectro de RMN ^{13}C (Figura 33) apresenta sinais para dois grupos metilas em δ_{C} 18,8 e 18,4 referentes aos carbonos C-3' e C-4', respectivamente, além de um sinal em δ_{C} 33,9, referente ao carbono C-2', este último correlacionado com o hidrogênio em δ_{H} 2,46 (m) no espectro de HSQC (Figura 34). Nesse espectro não se observou o sinal do carbono C-1', sendo esta informação obtida pela análise do espectro de HMBC (Figura 35), pelas correlações entre os hidrogênios em δ_{H} 1,09 (d; J = 1,8 Hz) (H-4') e em δ_{H} 6,36 (t; J = 3,0 e 6,0 Hz) (H-13) com os carbonos em δ_{C} 175,9 (C-1) e δ_{C} 168,9 (C-12). A estereoquímica do grupo iso-butirolóxi foi definida como C-8 β por analogia a do composto CP-V. O composto 2,3-di-hidro-15-deoxygoyazensolideo já foi relatado para o gênero, sendo isolado da espécie *C. rupícola* (SCHMEDA-HIRSCHMANN, et al., 1986).

Figura 33: Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75,5 MHz) para o composto CP-VI.

F-5-25-26-C13.ESP



F-5-25-26-C13.ESP



F-5-25-26-C13.ESP

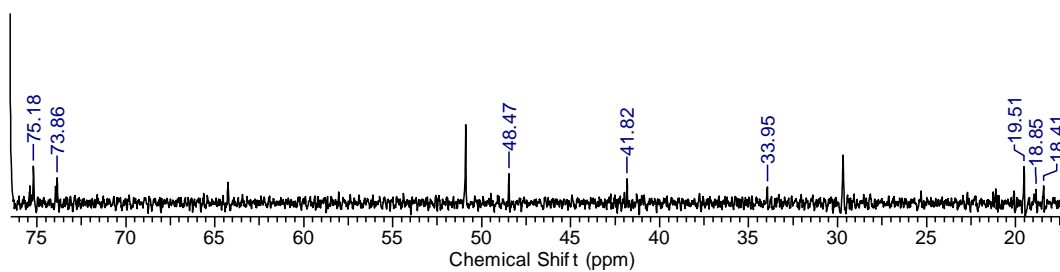


Figura 34: Espectro HSQC (CDCl_3 , 300 MHz) para o composto CP-VI.

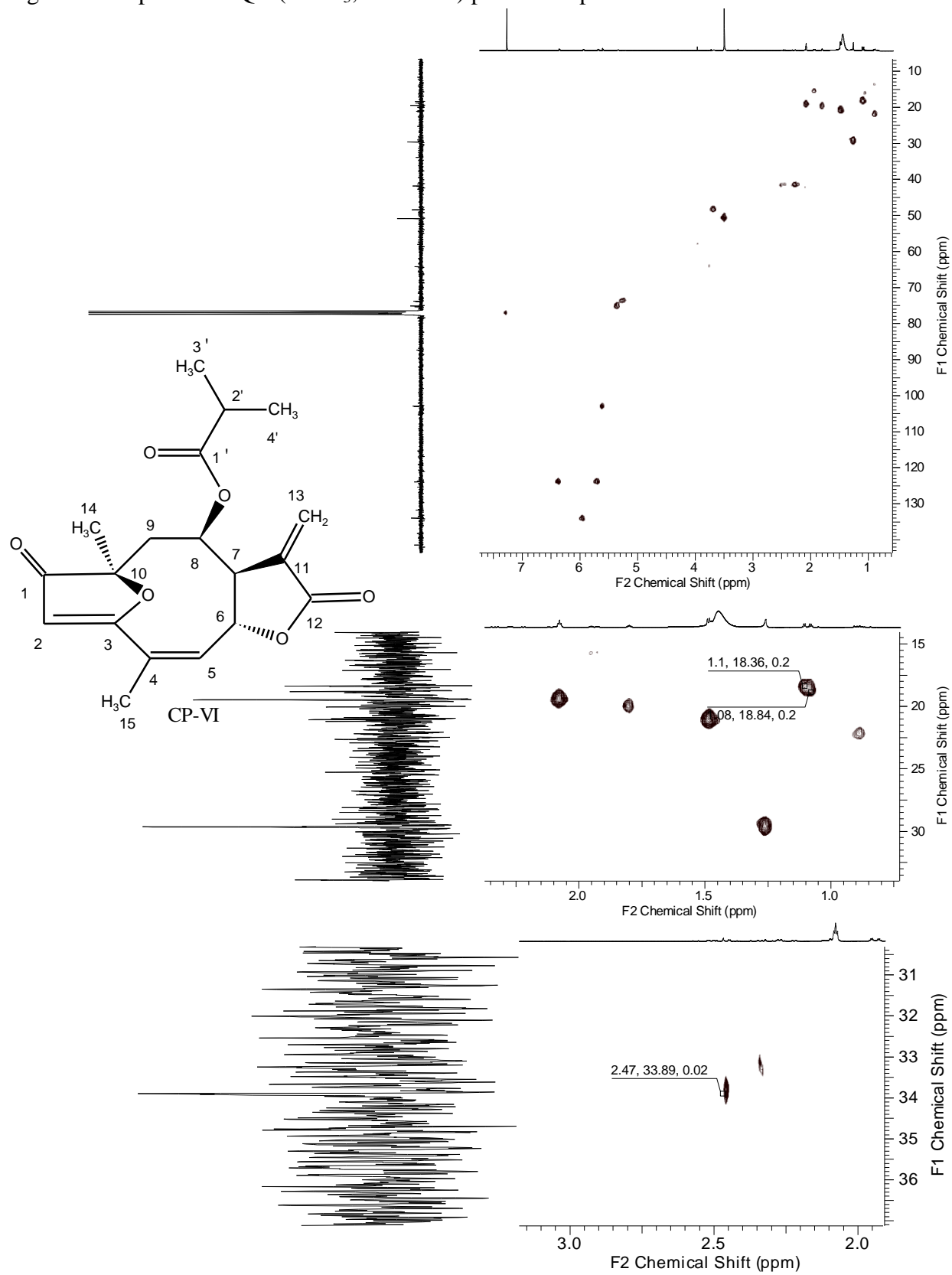
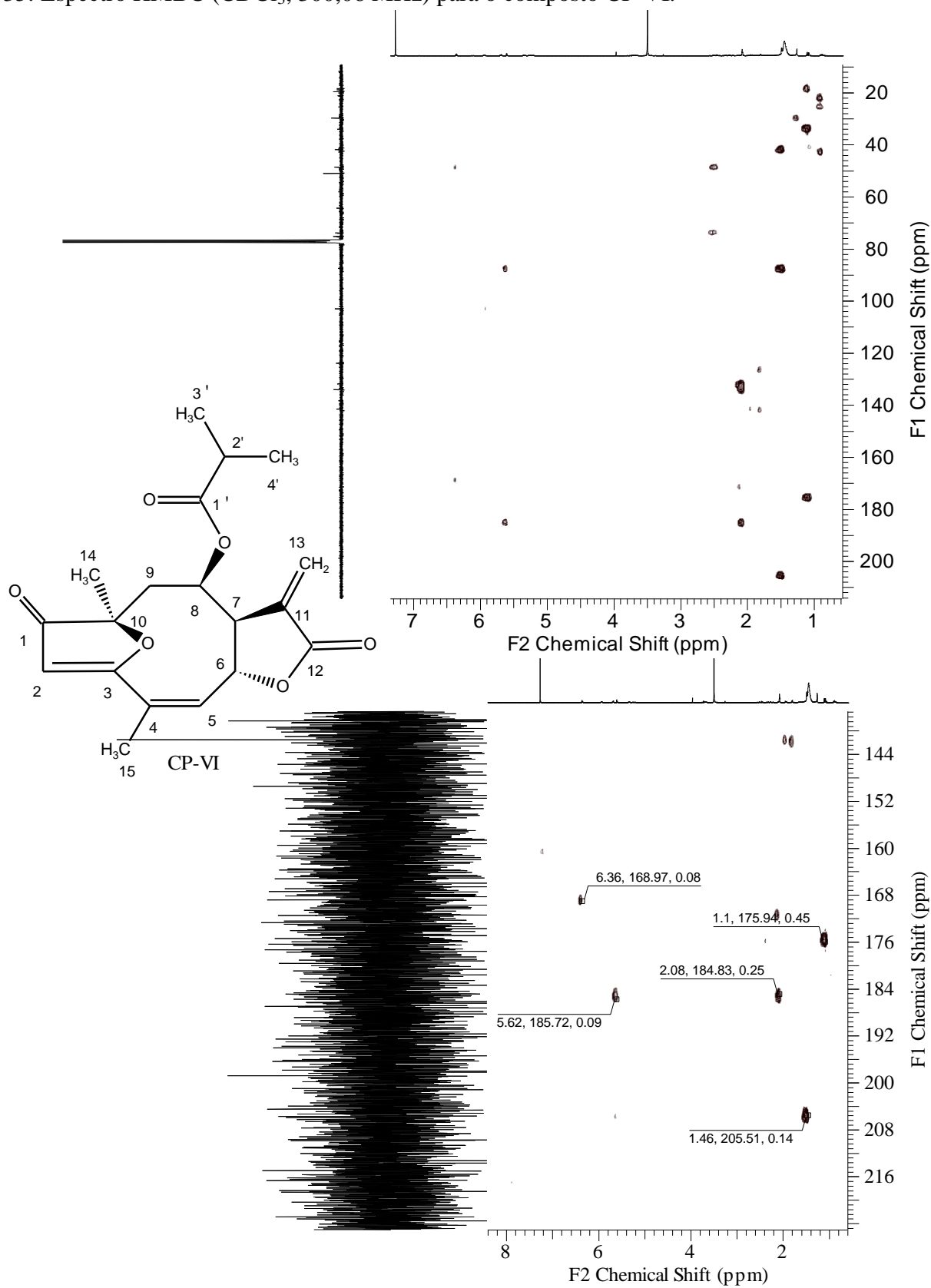


Figura 35: Espectro HMBC (CDCl_3 , 300,06 MHz) para o composto CP-VI.



Os dados espectroscópicos de RMN ^1H e ^{13}C do composto CP-VI foram comparado com os da literatura para o composto contendo o grupo angelóxi no C-8 (**37**) (VICHNEWSK et al.; 1982) (Tabela 12) e para o seu epímero C-8 α , 2,3-di-hidro-15-deoxigoiazensolídeo (REN, et al.; 2012) (Tabela 13). E foram concordantes para o epímero do composto 2,3-di-hidro-15-deoxygoyazensolideo.

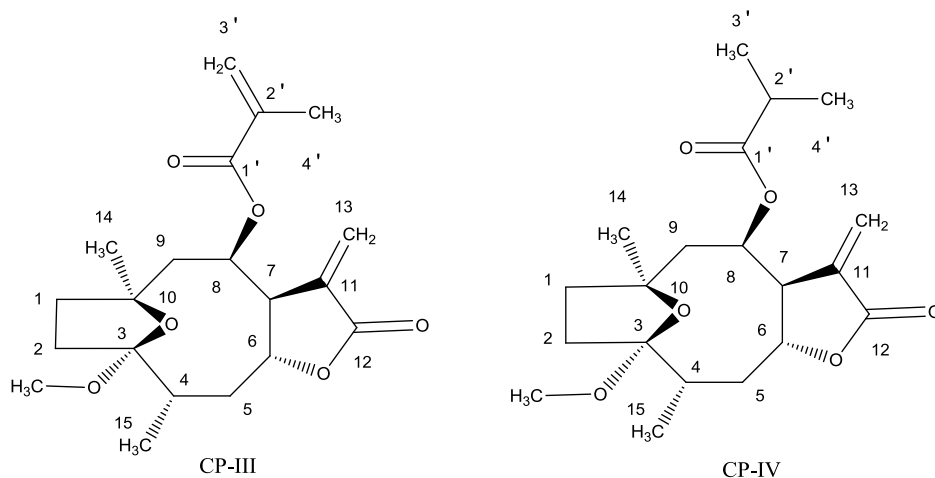
Tabela 12: Dados espectroscópicos de RMN de ^1H e ^{13}C (CDCl_3 , 300 MHz) do composto CP-VI e 15-deoxibudleina A.

Nº	15-deoxibudleina A		Composto CP-VI		
	$\delta_{\text{H mult.}}$ (J em Hz)	δ_{C}	$\delta_{\text{H mult.}}$ (J em Hz)	δ_{C}	HMBC
1	5,59 s	205,5		205,5	
2		103,4	5,61 s	102,9	184,7
3		185,2		184,7	
4	5,93 dq (4,0; 1,5)	131,9	5,94 m	131,8	
5	5,30 tq (4,0; 1,5)	134,2	5,35 m	134,1	
6	3,70 m	75,4	3,68 m	75,2	
7	5,25 ddd (5,5; 4,2)	48,5	5,25 m	48,5	
8	2,53 dd (15,0; 5,5)	75,2	2,24 dd (3,0 e 15,0)	73,8	
9	2,29 dd (15,0; 4,0)	42,6	2,49 m	41,8	
10		87,8		87,4	
11		139,1		134,0	
12	5,69 qd (3,0)	168,9		168,9	
13	6,36 d (3,0)	123,7	5,69 d (3,0) 6,36 t (3,0 e 6,0)	123,9	
14	1,48 s	21,6	1,49 s	20,6	205,5
15	1,80 quint (1,5)	19,8	2,08 t	19,5	184,7
	Angelóxi		Iso-butiroilóxi		
1'		176,6		175,3	
2'	5,11 qq (7,0; 1,5)	33,6	2,46 m	34,0	
3'		18,7	1,08 d (1,8)	18,8	
4'	1,93 dq (7,0; 1,5)	18,5	1,09 d (1,8)	18,4	
5'	1,80 quint (1,5)				

Tabela 13: Dados espectroscópicos de RMN de ^1H e ^{13}C (δ CDCl_3 , 300 MHz), do composto CP-VI e 2,3-di-hidro-15-deoxygoyazensolideo.

2,3-di-hidro-15-deoxygoyazensolideo			Composto CP-VI		
Nº	$\delta_{\text{H mult.}}$ (J em Hz)	δ_{C}	$\delta_{\text{H mult.}}$ (J em Hz)	δ_{C}	HMBC (δ_{C})
1		204,9		205,5	
2	5,68 s	104,7	5,61 s	102,9	184,7; 87,4
3		186,9		184,7	
4		130,3	5,94 m	131,8	
5	5,97 m	135,0	5,35 m	134,1	
6	5,20 m	81,7	3,68 m	75,2	
7	3,69 m	51,1	5,25 m	48,5	
8	4,40	72,7	2,24 dd (3,0 e 15,0)	73,8	
9	2,25 m 2,40 m	43,9	2,49 m	41,8	73,8; 48,5
10		89,7		87,4	
11		133,1		134,0	
12		168,8		168,9	
13	5,44 d (2,5) 6,24 d (3,0)	124,3	5,69 d (3,0) 6,36 t (3,0 e 6,0)	123,9	168,8; 87,6; 48,5
14	1,50 s	20,7	1,49 s	20,6	205,5; 184,7; 41,8
15	2,04 s	20,4	2,08 t	19,5	184,7; 134,0
	Iso-butirolóxi		Iso-butirolóxi		
1'		176,6		175,3	
2'	2,40 m	33,6	2,46 m	34,0	
3'	1,02 d (7,0)	18,7	1,08 d (1,8)	18,8	176,6
4'	1,06 d (7,0)	18,7	1,09 d (1,8)	18,4	176,6

COMPOSTOS CP-III E CP-IV



As determinações estruturais da mistura dos compostos CP-III e CP-IV foram realizadas a partir de análises de RMN de ¹H, ¹³C, COSY, DEPT, HMBC e HSQC e comparação de seus dados espectroscópicos com os das lactonas sesquiterpênicas discutidas anteriormente e com os da literatura (BOHLMANN, et. al.; 1978; HELENO, et al., 2004; HERZ e KUMAR, 1980).

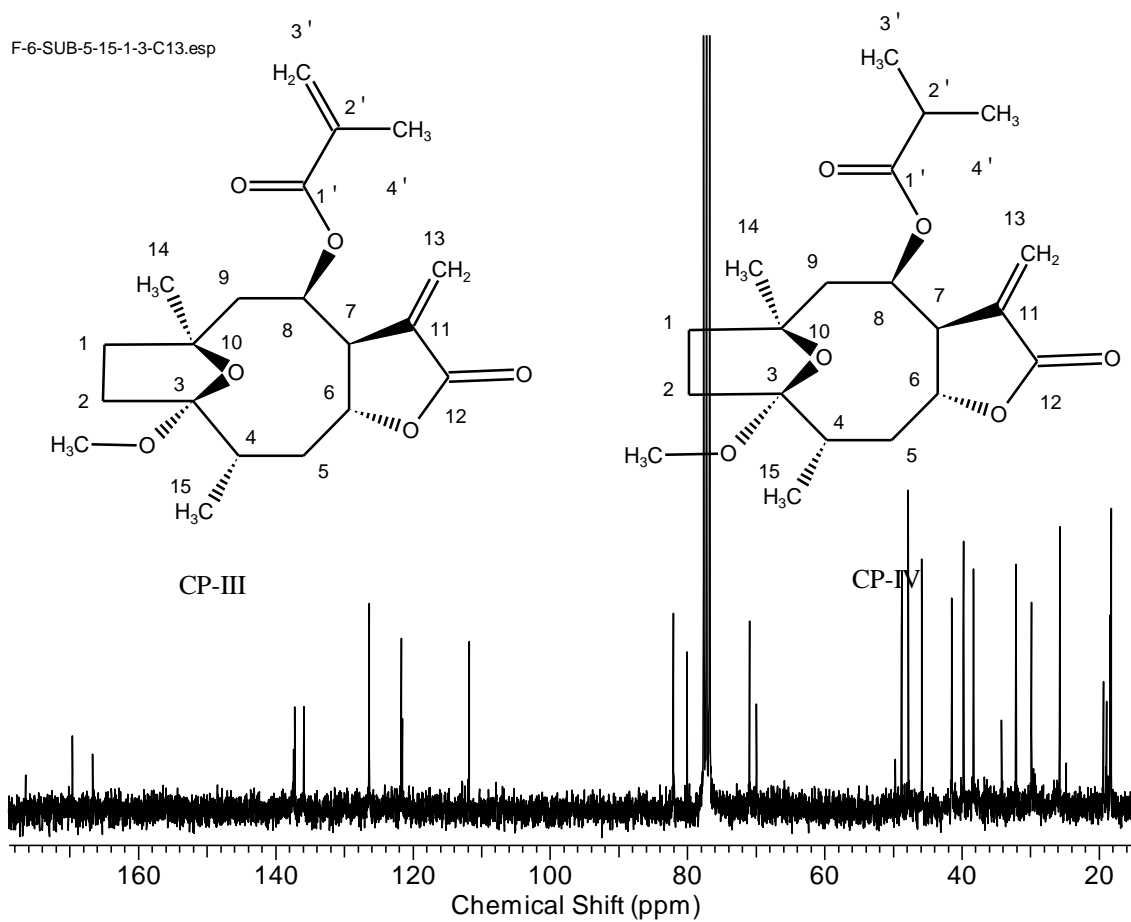
A diferença entre a mistura dos compostos CP-III e CP-IV observadas no experimento de RMN ¹³C (Figuras 36, 37 e 38), em relação aos já discutidos, foi à presença dos carbonos metilênicos C-1 e C-2 em δ_C 39,1 e 41,5, respectivamente, para os dois compostos. Outra particularidade nesses compostos foi à presença dos sinais em δ_C 111,8 e em δ_C 48,8 e 48,8, referentes ao C-3 e aos grupos metoxilas ligados a este carbono para as duas substâncias. A partir do espectro de RMN ¹³C foi evidenciado que se tratava de uma mistura de compostos com o mesmo esqueleto básico devido à duplicidade de sinais.

Pela análise do espectro de HSQC (Figura 39) para o composto CP-IV identificaram-se as correlações dos hidrogênios em δ_H 1,84 (H-1) e 1,90 (H-2) com os carbonos em δ_C 39,1(C-1) e 32,1 (C-2), respectivamente.

O espectro de HMBC (Figura 40 e 41) mostrou a correlação entre o hidrogênio em δ_H 1,46 (s) (H-14) com o carbono em δ_C 39,7 (C-1). A posição do grupo OMe em C-3 foi evidenciada com a correlação com os hidrogênios em δ_H 3,20 (s) (OMe), 1,05 (m) (H-15) e 1,90 (m) (H-2) com o carbono em δ_C 111,8 (C-8). Esse composto não foi

relatado para o gênero, mas para família foi relatado para a espécie *Tithonia diversifolia* (KURODA et al., 2007).

Figura 36: Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 300 MHz) para os compostos CP-III e CP-IV.



F-6-SUB-5-15-1-3-C13.esp

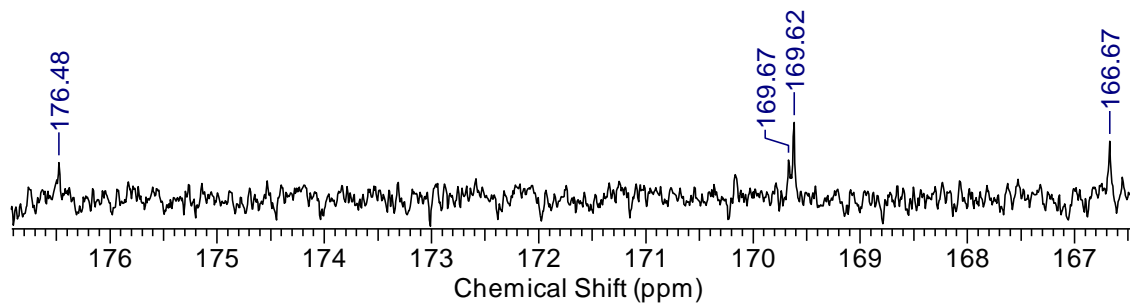
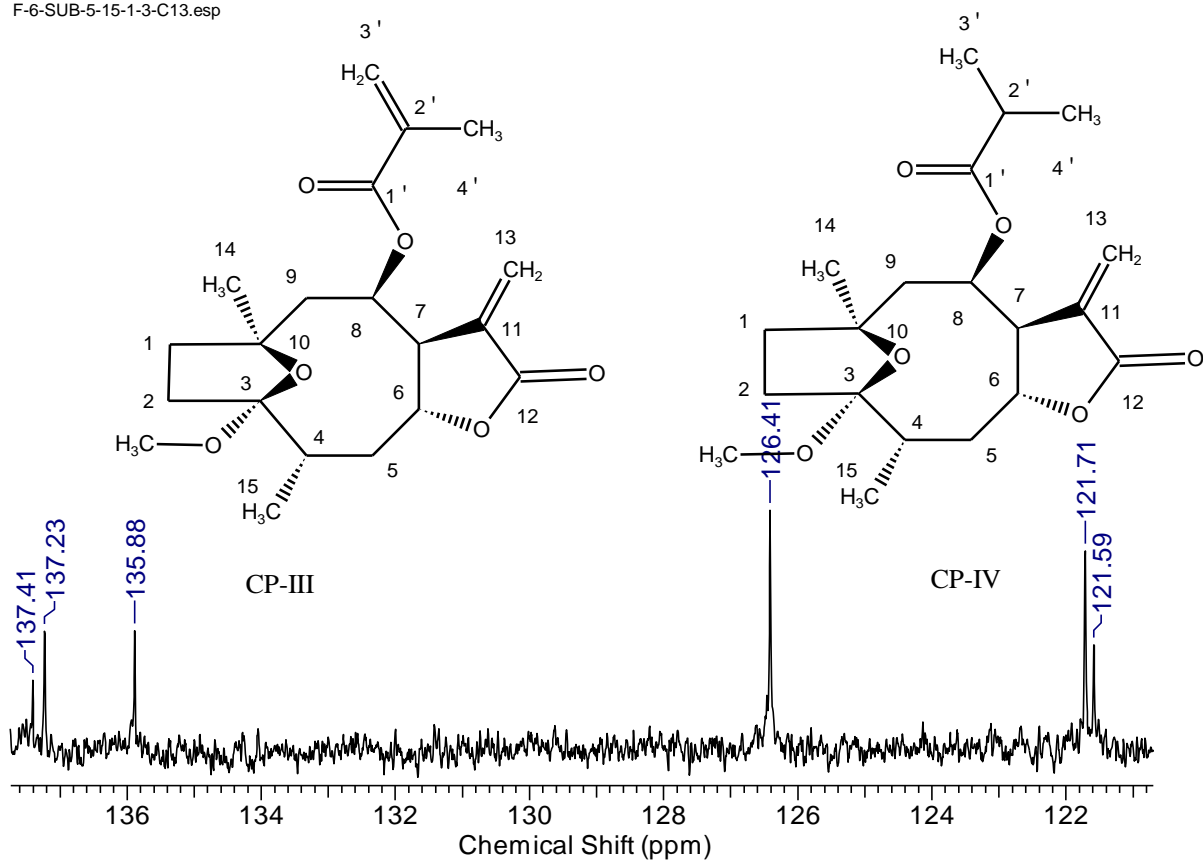


Figura 37: Expansão do espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 300 MHz) para os compostos CP-III e CP-IV.

F-6-SUB-5-15-1-3-C13.esp



F-6-SUB-5-15-1-3-C13.esp

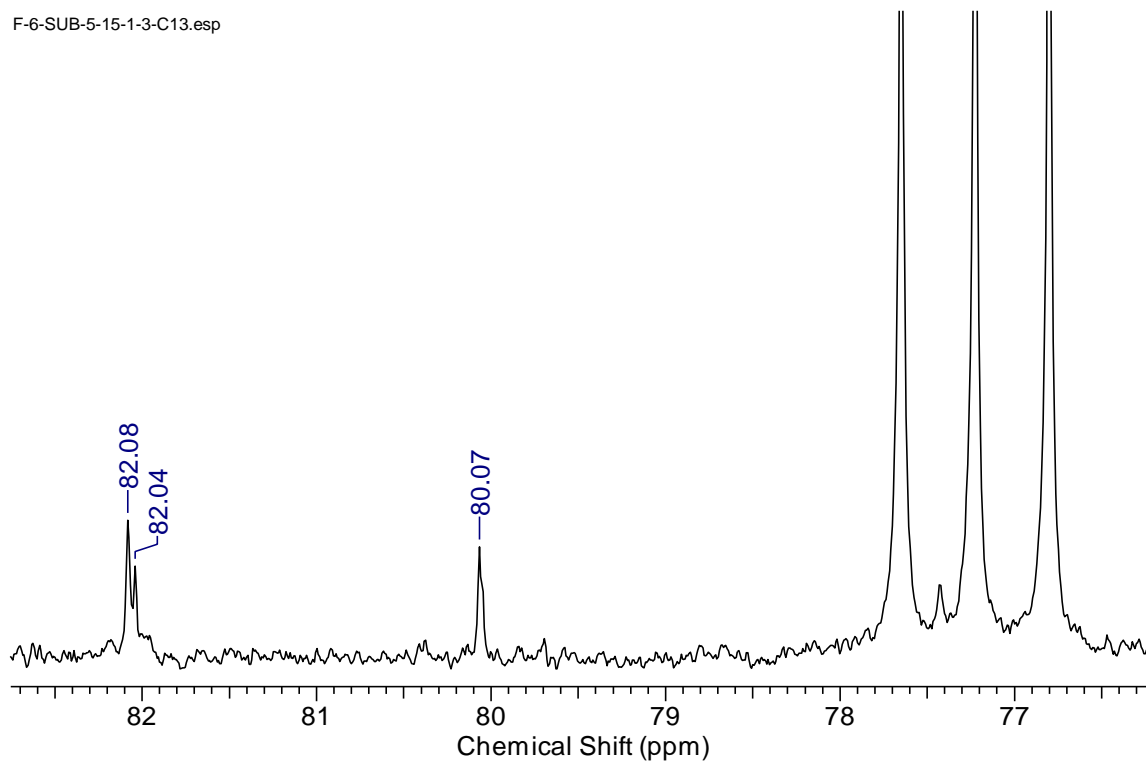
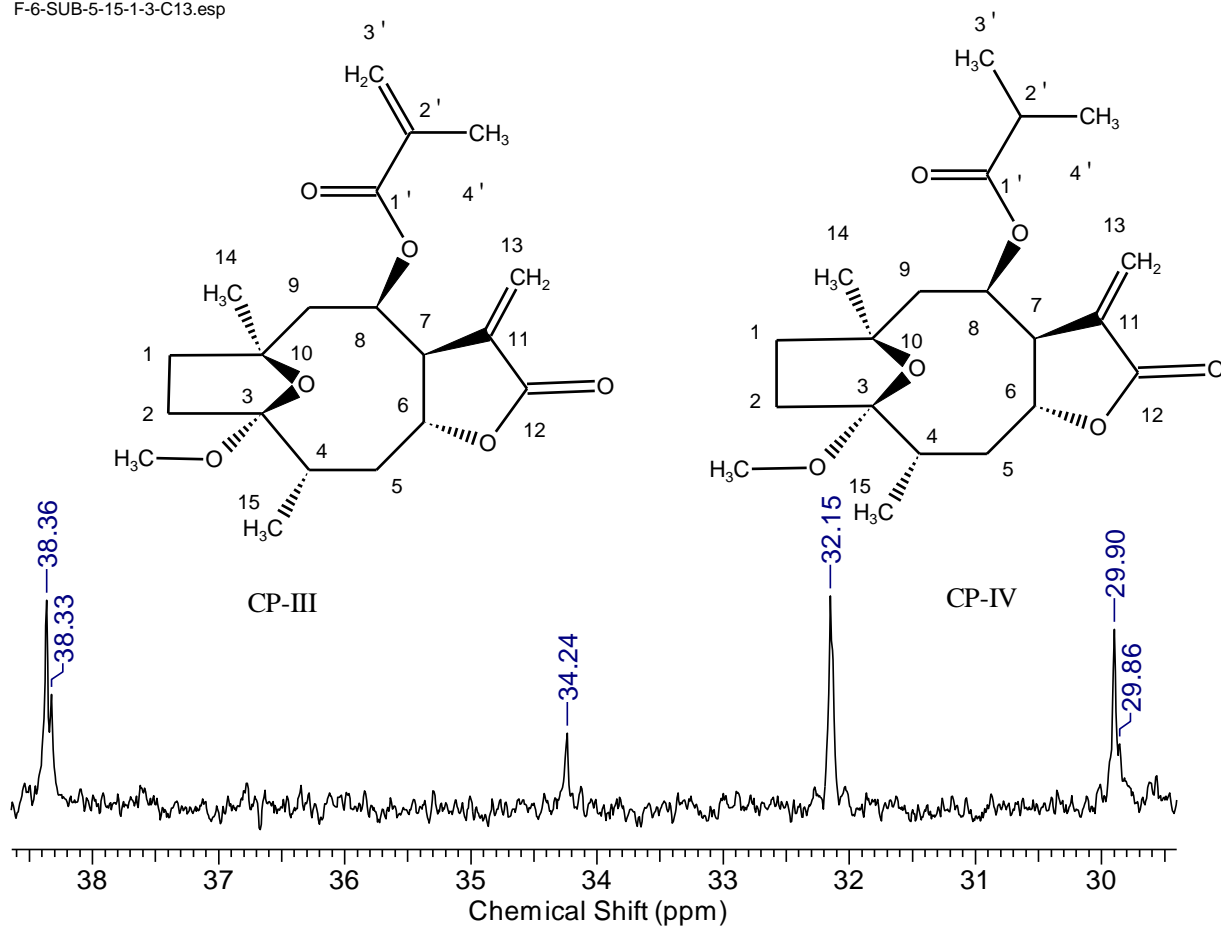


Figura 38: Expansão do espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 300 MHz) para os compostos CP-III e CP-IV.

F-6-SUB-5-15-1-3-C13.esp



F-6-SUB-5-15-1-3-C13.ESP

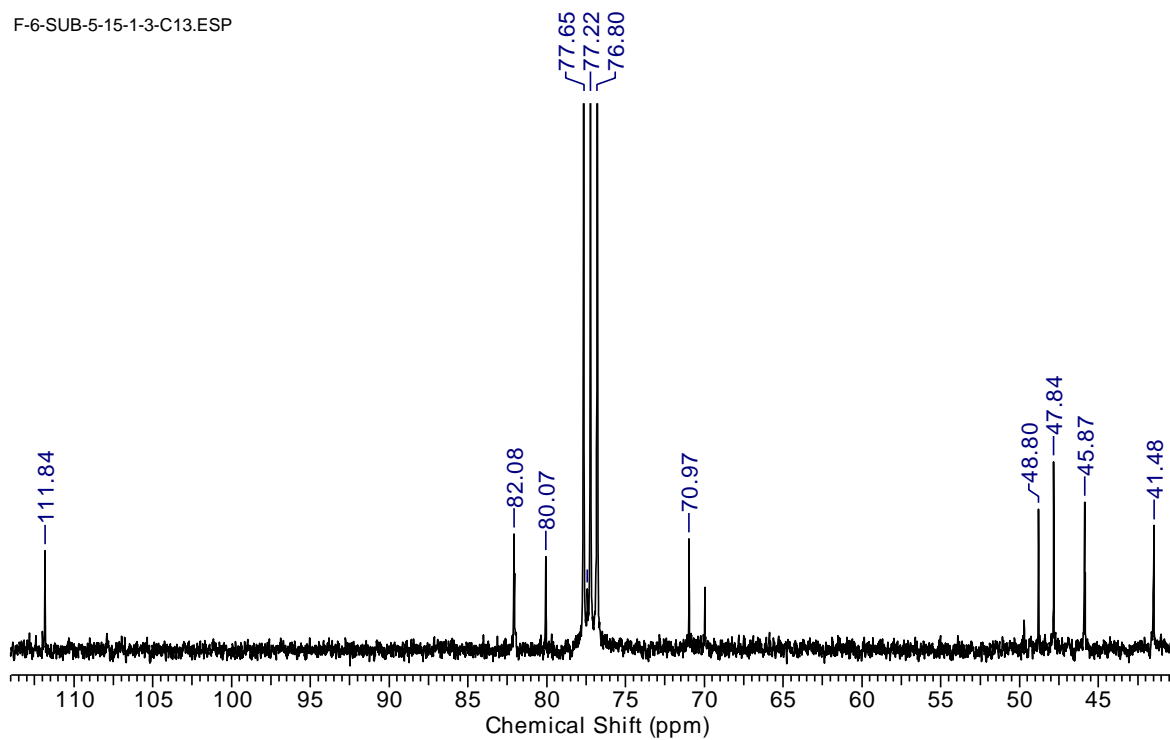


Figura 39: Espectro de HSQC (CDCl_3 , 300MHz) para os compostos CP-III e CP-IV.

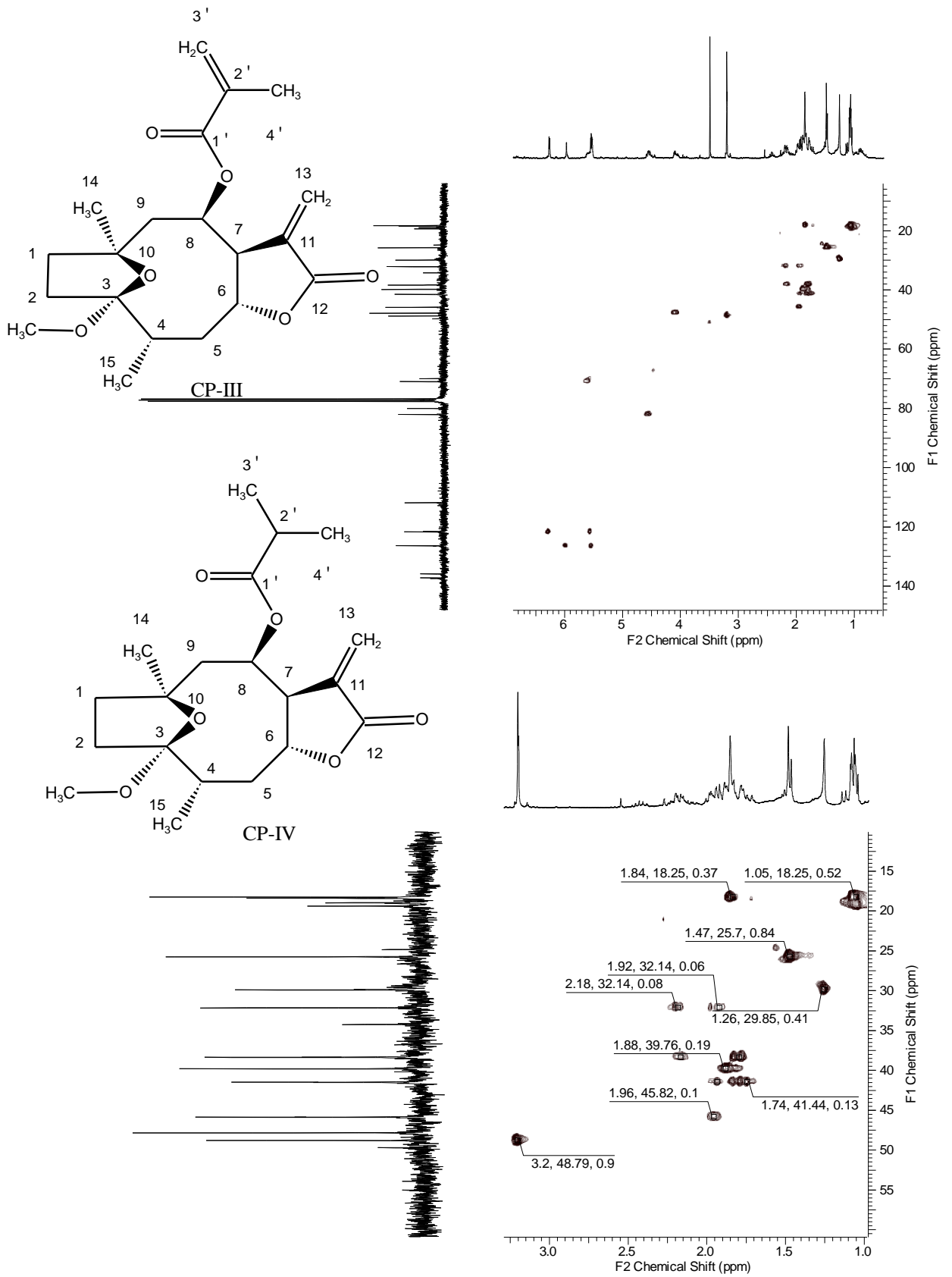


Figura 40: Espectro de HMBC (CDCl_3 , 300 MHz) para os compostos CP-III e CP-IV.

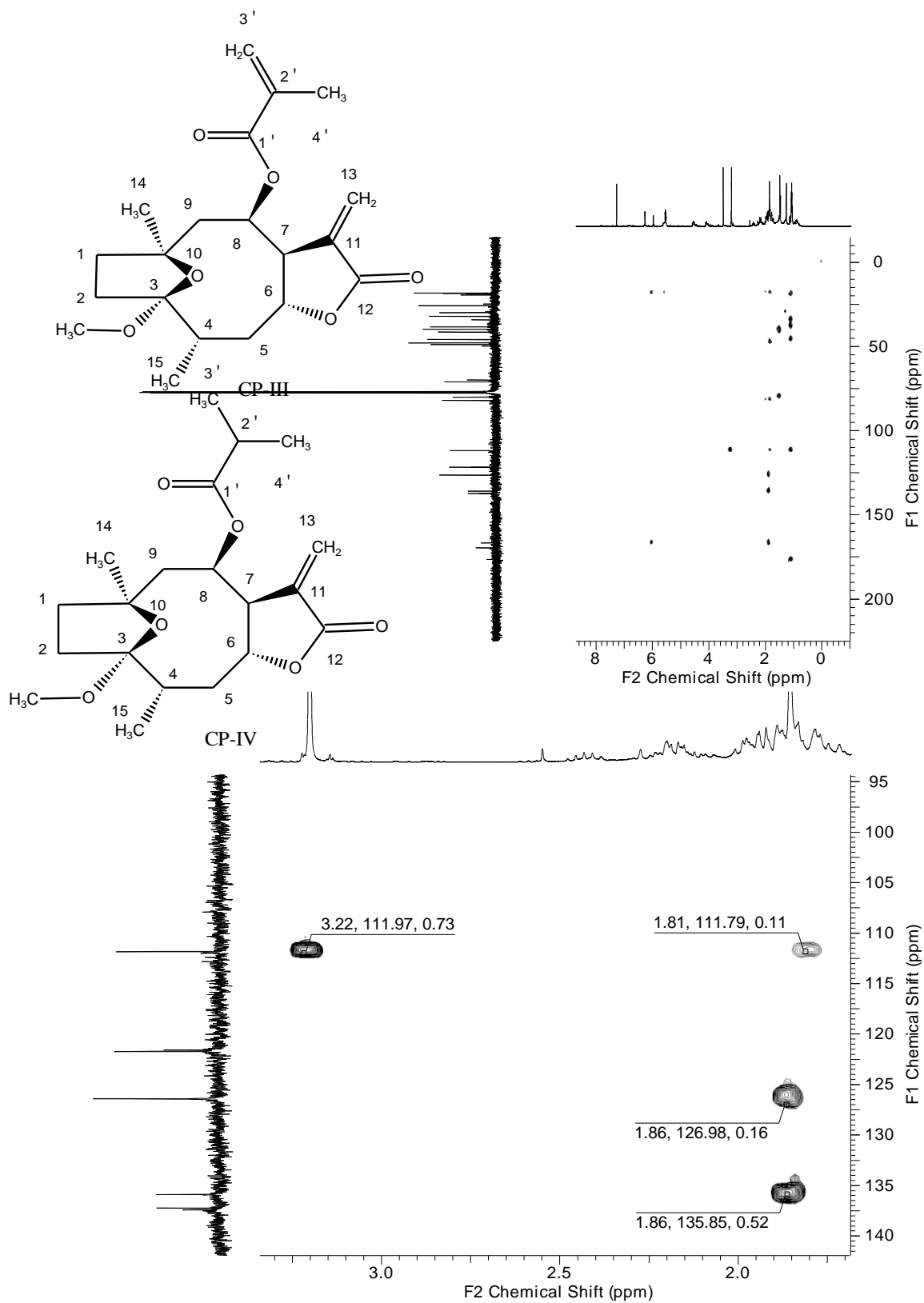
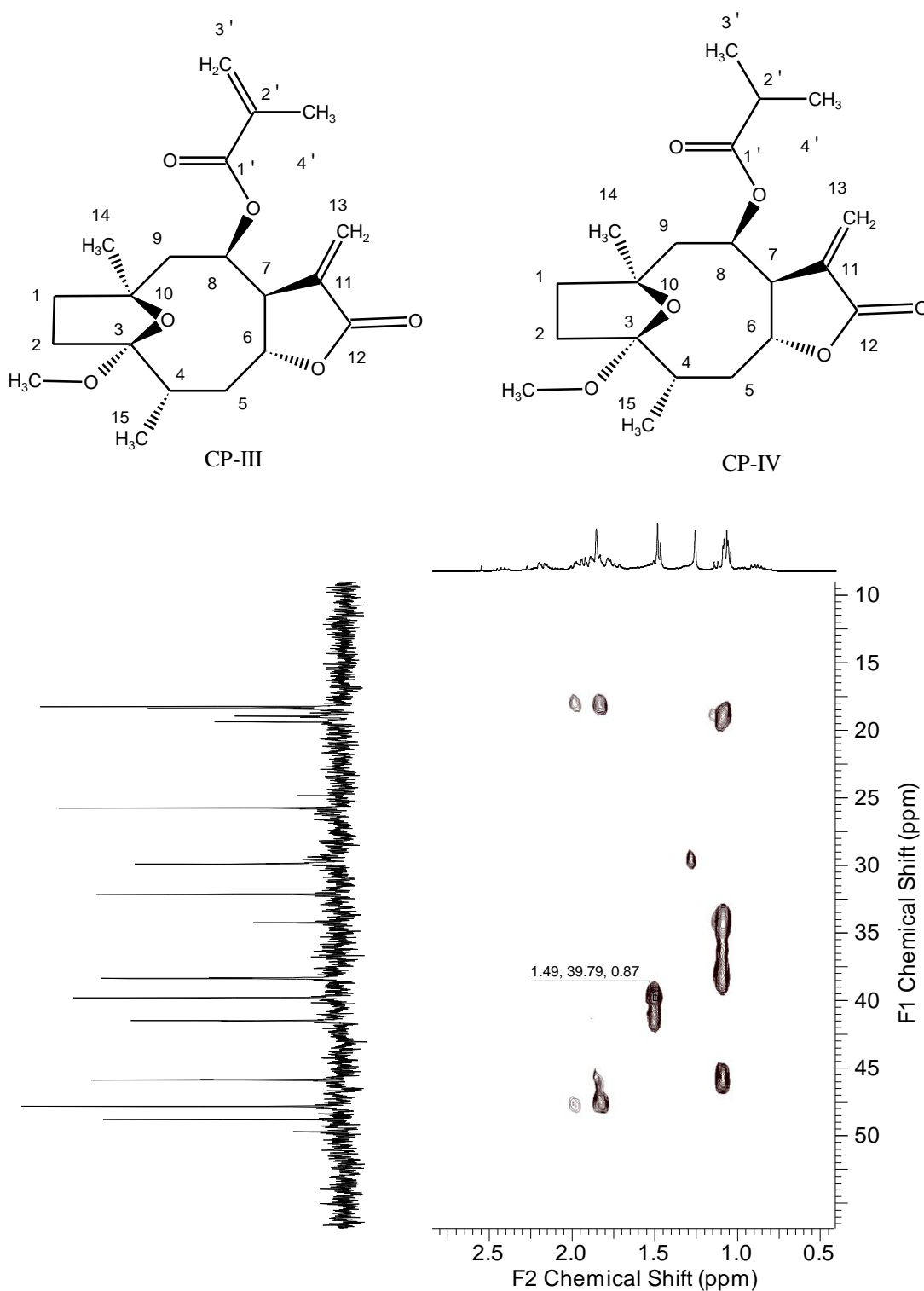


Figura 41: Expansão do espectro de HMBC (CDCl_3 , 300 MHz) para o composto CP-III e CP-IV.



A análise dos dados obtidos e comparação com os da literatura evidenciou que o composto **CP-IV** é a tirotundina-3-*O*-metil éter (SCHUSTER, et al., 1992) (Tabela 14).

Tabela 14: Dados espectroscópicos de ^1H e ^{13}C (CDCl_3 , 300 MHz) do composto CP-IV e Tirotundina-3-*O*-metil éter.

Tirotundina-3- <i>O</i> -metil éter			Composto CP-IV		
Nº	$\delta_{\text{H mult.}}$ (J em Hz)	δ_{C}	$\delta_{\text{H mult.}}$ (J em Hz)	δ_{C}	HMBC
1	2,18 m 2,00	39,6	1,84 m	39,1	111,8
2	1,80 m	31,9	1,90 m	32,1	
3		111,6		111,8	
4	1,93 m	45,6	1,91 m	45,9	82,1; 18,0
5	2,14 m 1,75 m	38,1	2,18dd (10,3; 4,4) 1,79 m	38,3	82,1; 47,8
6	4,51 ddd (4,15; 11; 2)	81,8	4,53 m	82,1	
7	4,04 dddd (3; 3,5)	47,6	4,07 m	47,8	
8	5,55 ddd (5; 11)	69,8	5,52 m	69,9	47,8
9	1,83 dd (14) 1,73 ddl (14)	41,3	1,91 m 1,76 m	41,5	69,9
10		79,8		80,1	
11		137,2		137,4	
12		169,4		169,6	
13	6,25 d 5,52 d	121,3	6,26 d (3,2) 5,52 m	121,6	47,8; 169,6
14	1,45 s	25,5	1,46 s	25,7	80,1; 41,5
15	1,05 d(7,0)	18,7	1,05 m	18,9	111,8; 45,9
	Isobutiroilóxi		Isobutiroilóxi		
1'		176,3		176,5	
2'	2,42 qq (7,0)	34,0	2,43 dd (6,0; 12,0)	34,2	
3'	1,06 d	19,1	1,08 d (1,9)	19,4	176,5; 18,9
4'	1,04 d	18,0	1,06 d (1,9)	18,9	176,5; 19,1
OMe	3,18 s	48,6	3,20 s	48,8	111,8

O composto CP-III, isolado em mistura com o composto CP-IV, não foi descrito na literatura, sendo que a única diferença estrutural em relação ao composto CP-IV é a presença de um grupo metacrilóxi no C-8 (Tabela 15) ao invés do grupo iso-butirolóxi. Analisando o espectro de RMN de ^1H (Figura 42) verificou-se a presença de um simpleto largo em δ_{H} 5,97 (sl) (H-3a') e um dubleto em δ_{H} 5,54 (m) (H-3b'), além do simpleto em δ_{H} 1,85 (sl), correspondente ao hidrogênio H-4'.

O espectro RMN de ^{13}C (Figura 43) mostrou sinais de duas carbonilas, sendo uma de grupo α -metileno- γ -lactona em δ_{C} 169,6 e a outra de grupo metacrilóxi em δ_{C} 166,7. Os sinais para dois carbonos quaternários em δ_{C} 137,2 (C-11) e 135,9 (C-2'), além de dois carbonos vinílicos em δ_{C} 126,4 (C-13) e 121,7 (C-3') evidenciaram esses grupos.

No espectro de COSY (Figura 44) foi observada a correlação entre os hidrogênios em δ_{H} 5,54 (d; $J = 3,2$ Hz) e 5,96 (sl) com o hidrogênio em δ_{H} 1,84 (sl) (H-4'). Com o auxílio do espectro de HSQC (Figura 45) foram confirmadas as atribuições dos deslocamentos químicos para os carbonos e hidrogênios das ligações duplas terminais pelas correlações entre os hidrogênios em δ_{H} 6,26 (d; $J = 3,2$ Hz) (H-13a) e 5,53 (m) (H-13b) com o C-13, entre os hidrogênios em δ_{H} 5,96 (H-3a') e 5,52 (H-3b') com o C-3' e a correlação entre o carbono C-4' com o hidrogênio em δ_{H} 1,84 (sl).

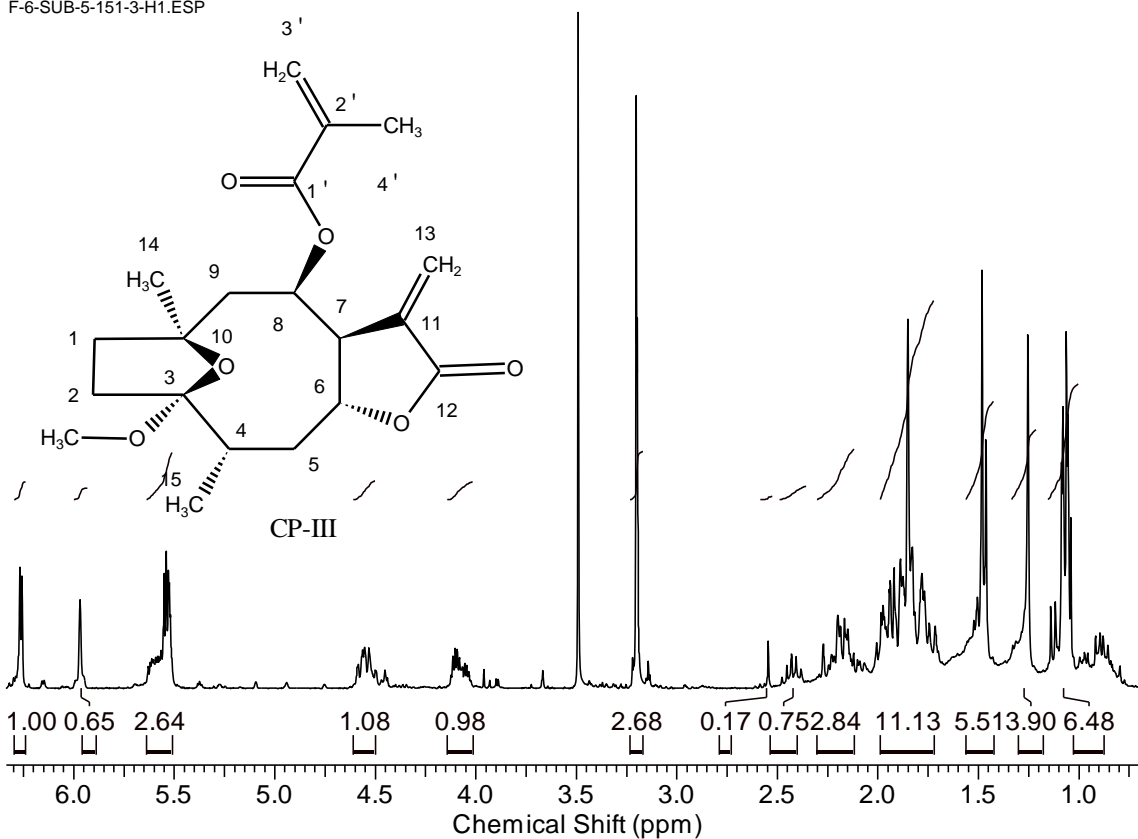
O posicionamento do grupo metacrilóxi foi confirmado pelo espectro de HMBC (Figura 46 e 47), onde foi possível identificar a correlação entre o hidrogênio em δ_{H} 5,96 (sl) (H-3a') com os carbonos C-1', C-2' e C-4' e a correlação entre o H-8 em δ_{H} 5,60 (m) com o carbono C-1'.

Tabela 15: Dados espectroscópicos de ^1H e ^{13}C (CDCl_3 , 300 MHz) dos compostos CP-III e CP-IV.

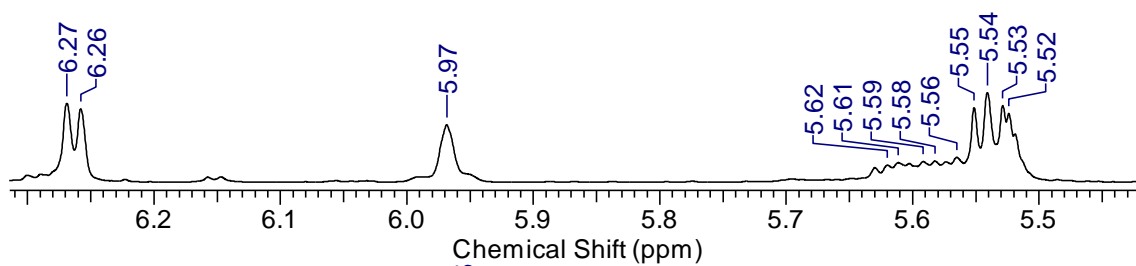
Composto CP-IV			Composto CP-III			
Nº	$\delta_{\text{H mult.}}$ (J em Hz)	δ_{C}	$\delta_{\text{H mult.}}$ (J em Hz)	δ_{C}	COSY	HMBC
1	1,84 m	39,1	1,87 m	39,8		
2	1,90 m	32,1	1,90 m	32,1		
3		111,8		111,8		
4	1,91 m	45,9	1,96 m	45,9		82,1
5	2,18 dd (10,3; 4,4) 1,79 m	38,3	2,18 dd (10,3; 4,4) 1,79 m	38,4	1,79	
6	4,53 m	82,1	4,53 m	82,1	4,11	
7	4,07 m	47,8	4,07 m	47,8		
8	5,52 m	69,9	5,60 m	70,9		
9	1,91 m 1,76 m	41,5	1,91 m 1,76 m	41,5		
10		80,1		80,1		
11		137,4		137,2		
12		169,6		169,6		
13	6,26 d (3,2) 5,52 m	121,6	6,26 d (3,2) 5,53 m	121,7		169,6
14	1,46 s	25,7	1,48 s	25,7		80,1
15	1,05 m	18,9	1,04 m	19,4		111,8; 45,9; 38,4
	Isobutiroilóxi		Metacrilóxi			
1'		176,5		166,7		
2'	2,43 t (6,0; 12,0)	34,2		135,9		
3'	1,08 d (1,9)	19,4	5,97 sl 5,55 d (3,2)	126,4	1,84	166,7; 135,9; 18,2
4'	1,06 d (1,9)	18,9	1,85 sl	18,2		126,4; 135,9
OMe	3,20 s	45,8	3,20 s	48,8		111,8

Figura 42: Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) para o composto CP-III.

F-6-SUB-5-151-3-H1.ESP



F-6-SUB-5-151-3-H1.ESP



F-6-SUB-5-151-3-H1.ESP

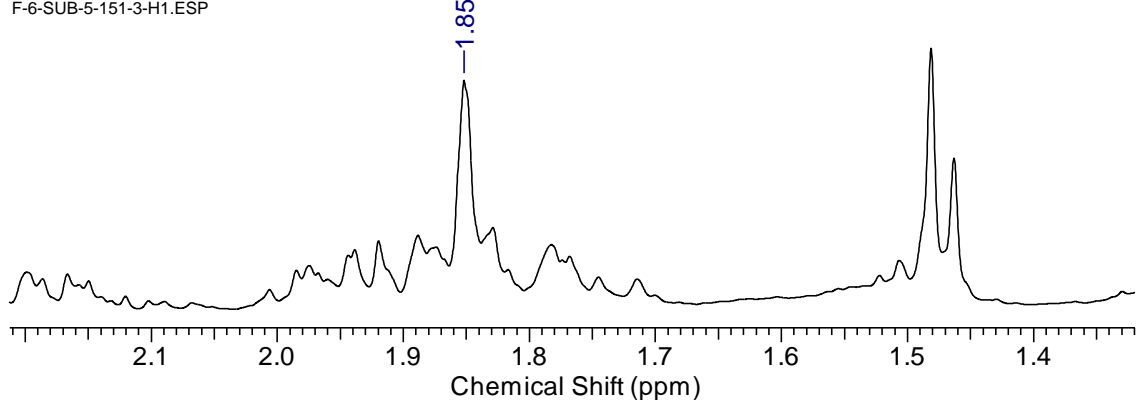
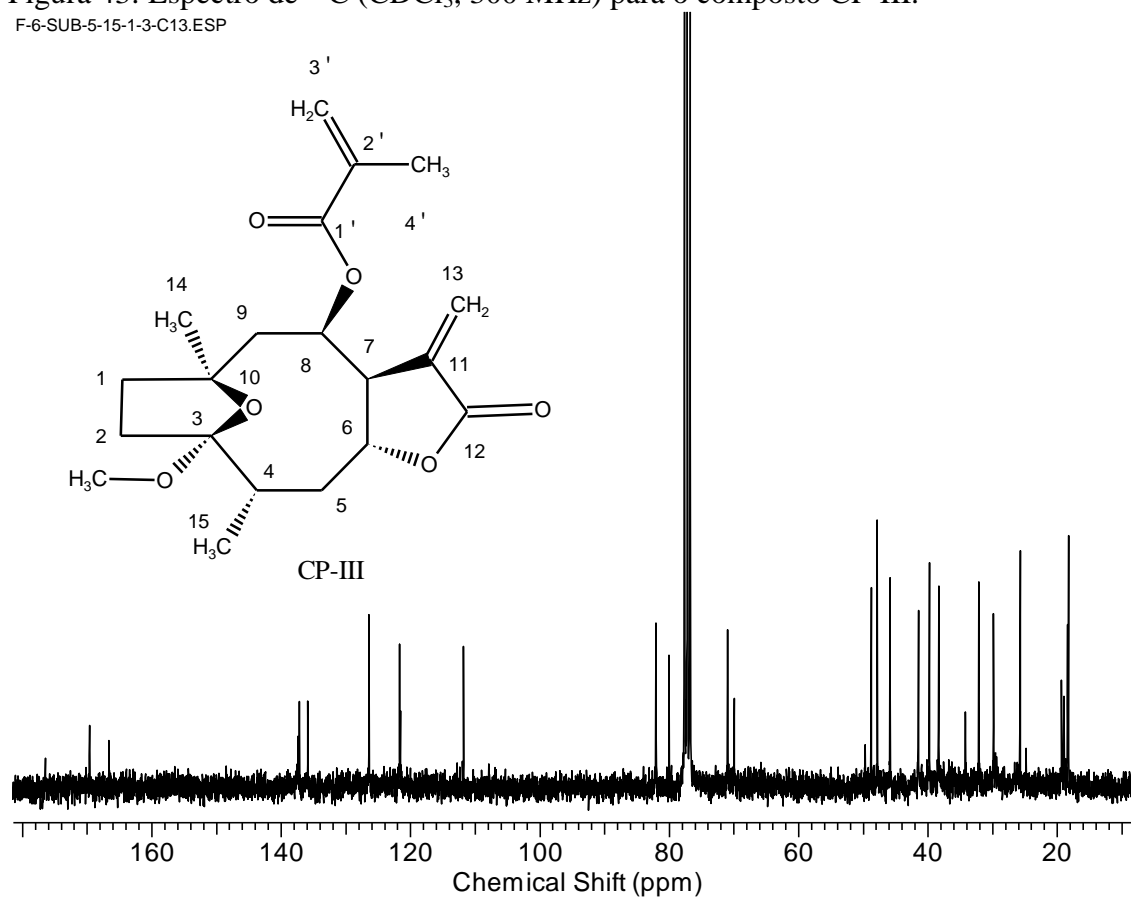


Figura 43: Espectro de ^{13}C (CDCl_3 , 300 MHz) para o composto CP-III.

F-6-SUB-5-15-1-3-C13.ESP



F-6-SUB-5-15-1-3-C13.ESP

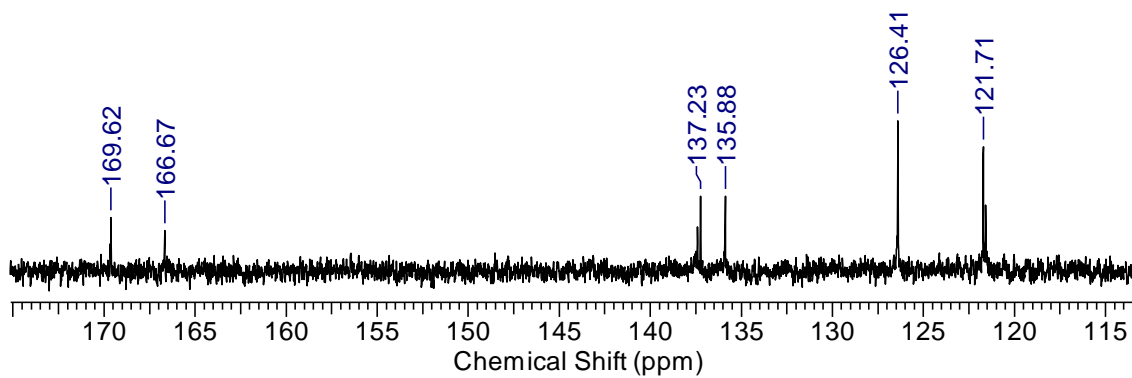


Figura 44: Espectro de COSY (CDCl₃, 300 MHz) para o composto CP-III.

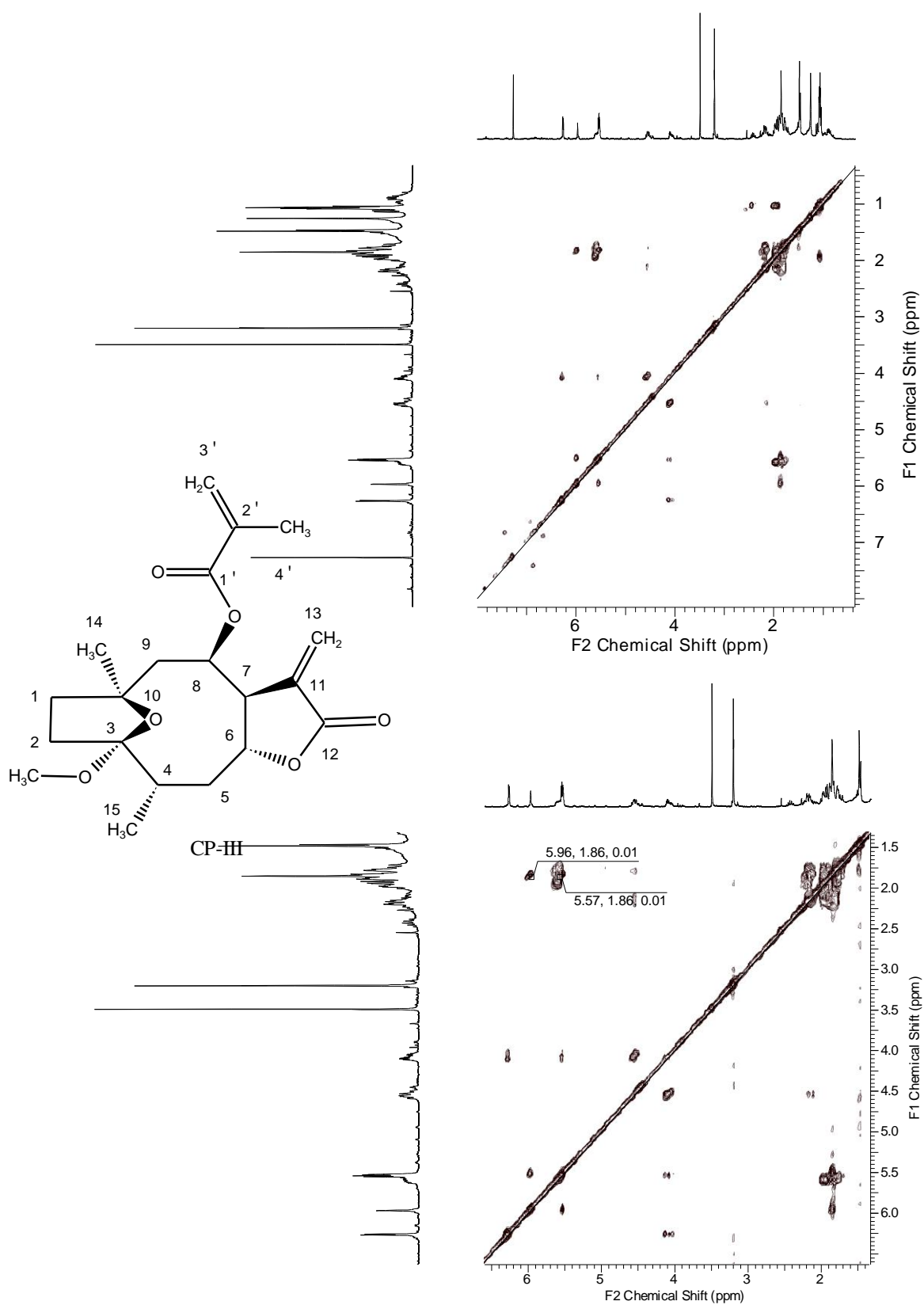


Figura 45: Espectro de HMQC (CDCl_3 , 300 MHz) para o composto CP-III.

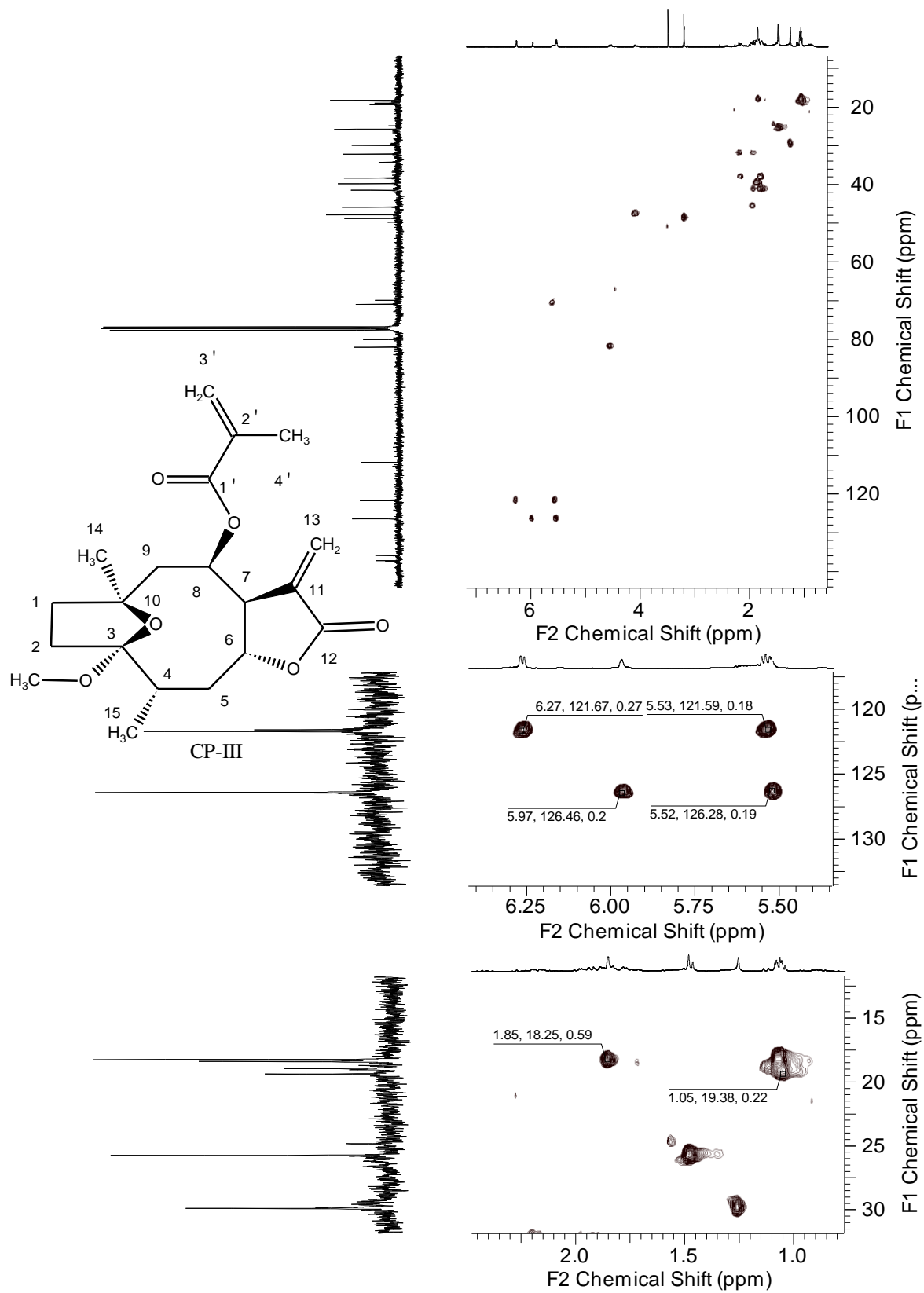


Figura 46: Espectro de HMBC e expansão (CDCl₃, 300,06 MHz) para o composto CP-III.

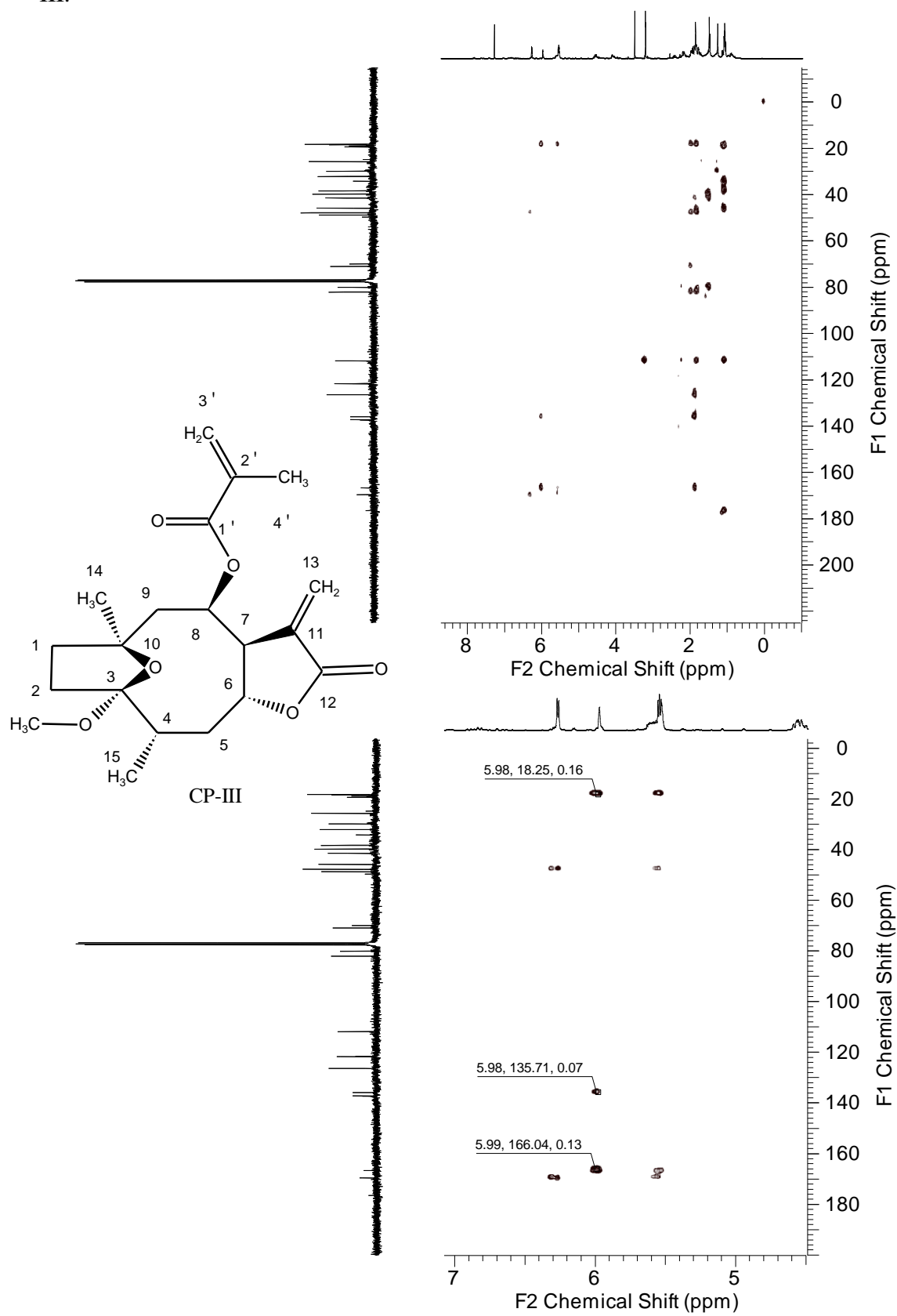
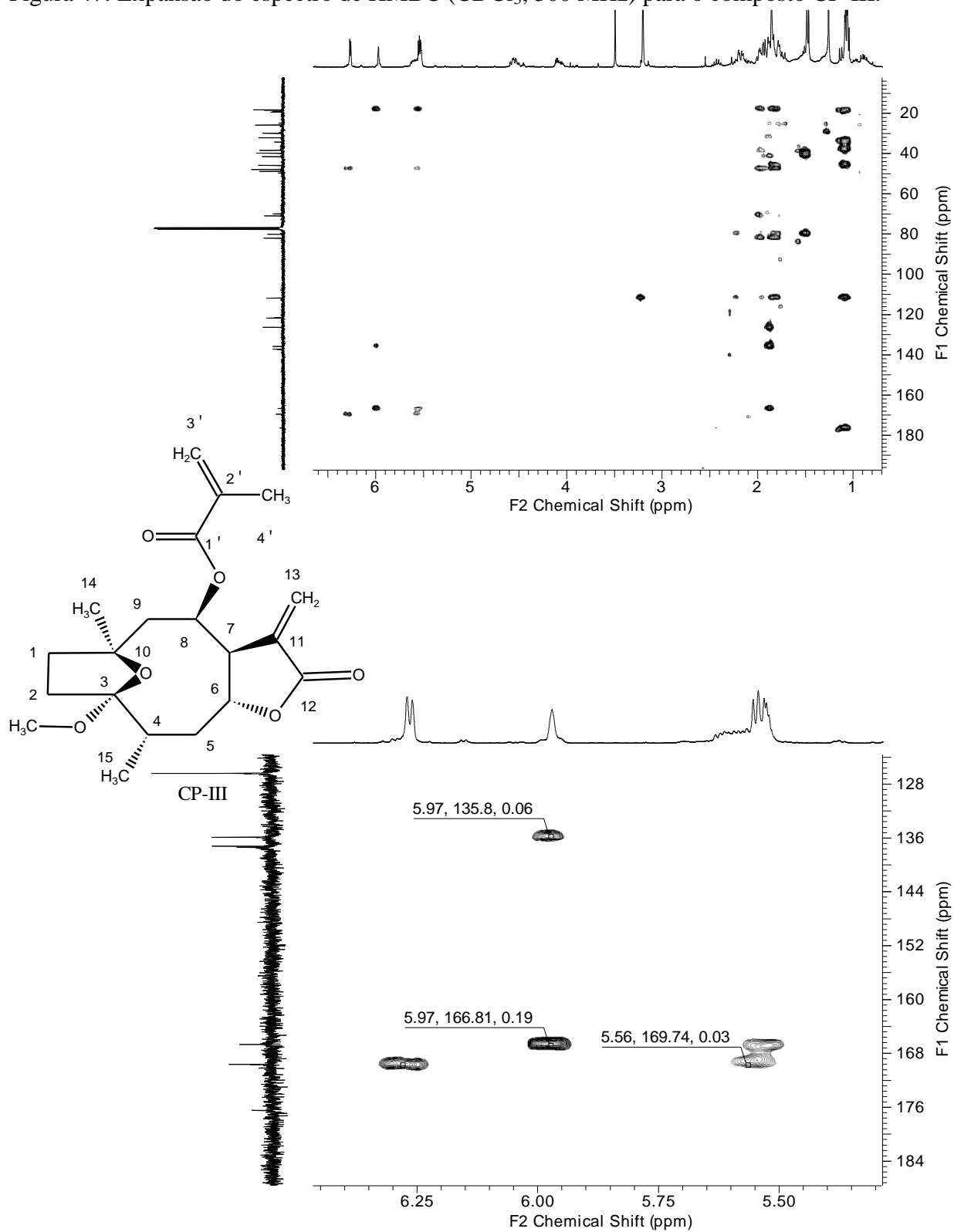
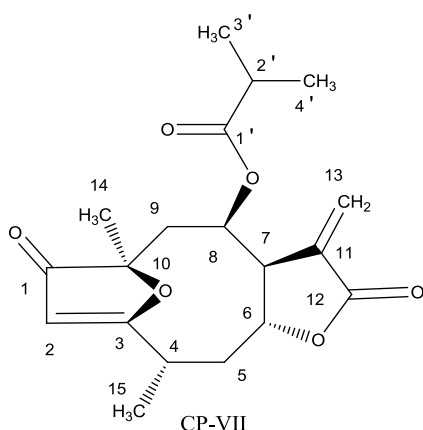


Figura 47: Expansão do espectro de HMBC (CDCl₃, 300 MHz) para o composto CP-III.



COMPOSTO CP-VII



A determinação da estrutura do composto CP-VII foi realizada a partir da análise dos dados espectroscópicos de RMN ^1H , ^{13}C , COSY e HSQC. Esse composto foi isolado como mistura com o composto CP-V.

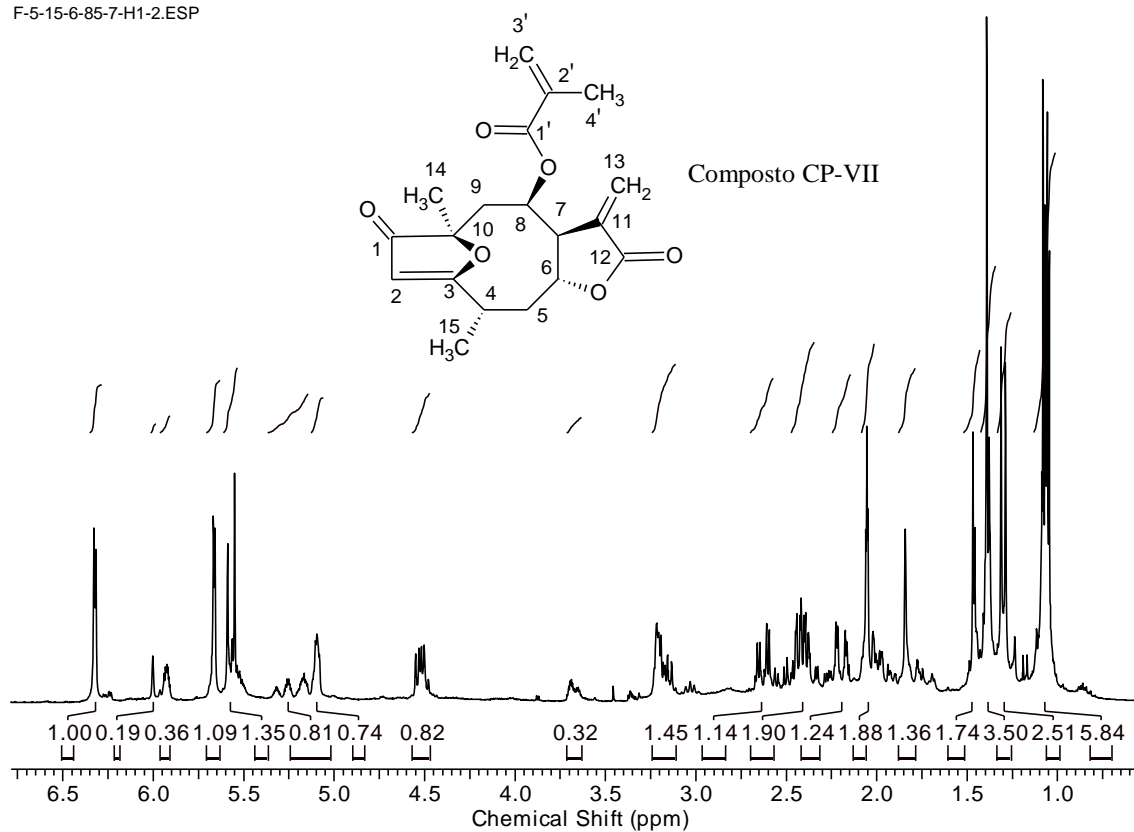
A comparação entre os dados de CP-VII com os de CP-VI mostrou que a única diferença é a ausência de uma dupla ligação entre os carbonos C-4 e C-5, que está presente em CP-VI. Essa confirmação foi suportada com análise do espectro de RMN de ^1H de CP-VII (Figura 48), o qual mostrou a presença de um hidrogênio metínico em δ_{H} 2,38 (H-4), de hidrogênios metilênicos em δ_{H} 2,43 e 1,99 (H-5) e de hidrogênios de um grupo metila em δ_{H} 1,30 (H-15).

Isto foi confirmado pela análise do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 49), onde foram observados sinais em δ_{C} 33,8 e 41,8 referentes ao carbono metínico C-4 e metilênico C-5, além do sinal em δ_{C} 17,7, correspondente aos hidrogênios H-15 do grupo metila.

No espectro de HMBC (Figura 50, 51 e 52) observaram-se as correlações entre os hidrogênios em δ_{H} 5,55 (s) (H-2) com os carbonos C-1, C-3, C-4 e C-10, e do hidrogênio em δ_{H} 1,39 (sl) (H-14) com o carbono C-1, confirmando a unidade diidro-furanolactona. Foi observada a correlação entre o H-4 com os carbonos em δ_{C} 190,8 (C-3) e 76,4 (C-6). A posição do grupo iso-bultiroilóxi ligado ao C-8 foi confirmada pela correlação entre o hidrogênio em δ_{H} 5,10 (H-8) com o carbono C-1'. Assim confirmou-se a estrutura de CP-VII como um derivado zexbrevina (VIVAR, et. al.; 1970; BARUAH et. al.; 1978; CHOWDHURY, et. al.; 1980) (Tabela 16). Esse composto não foi relatado para esse gênero.

Figura 48: Espectro de RMN de ^1H e expansão (CDCl_3 , 300 MHz) para o composto **CP-VII**.

F-5-15-6-85-7-H1-2.ESP



F-5-15-6-85-7-H1-2.ESP

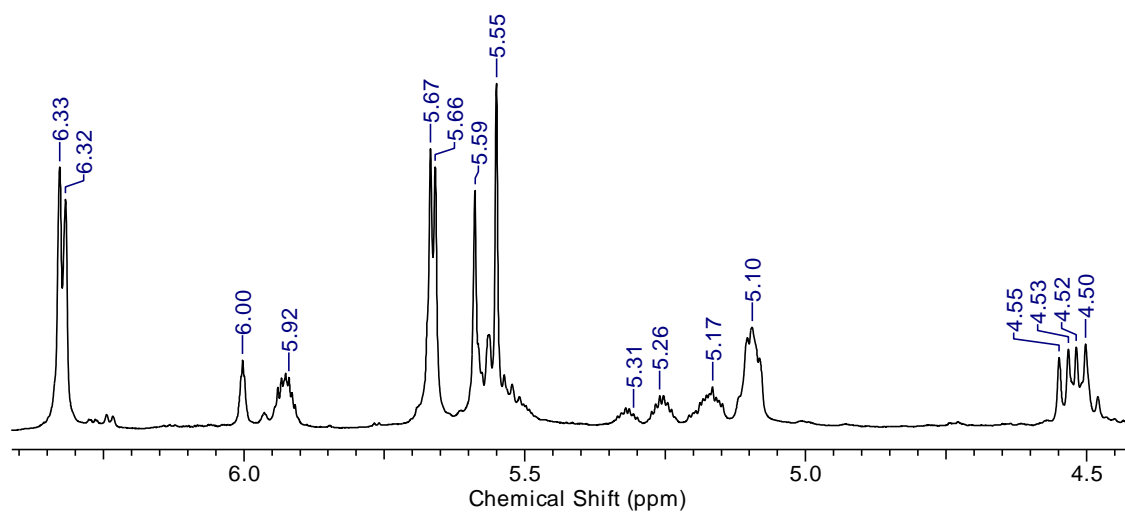
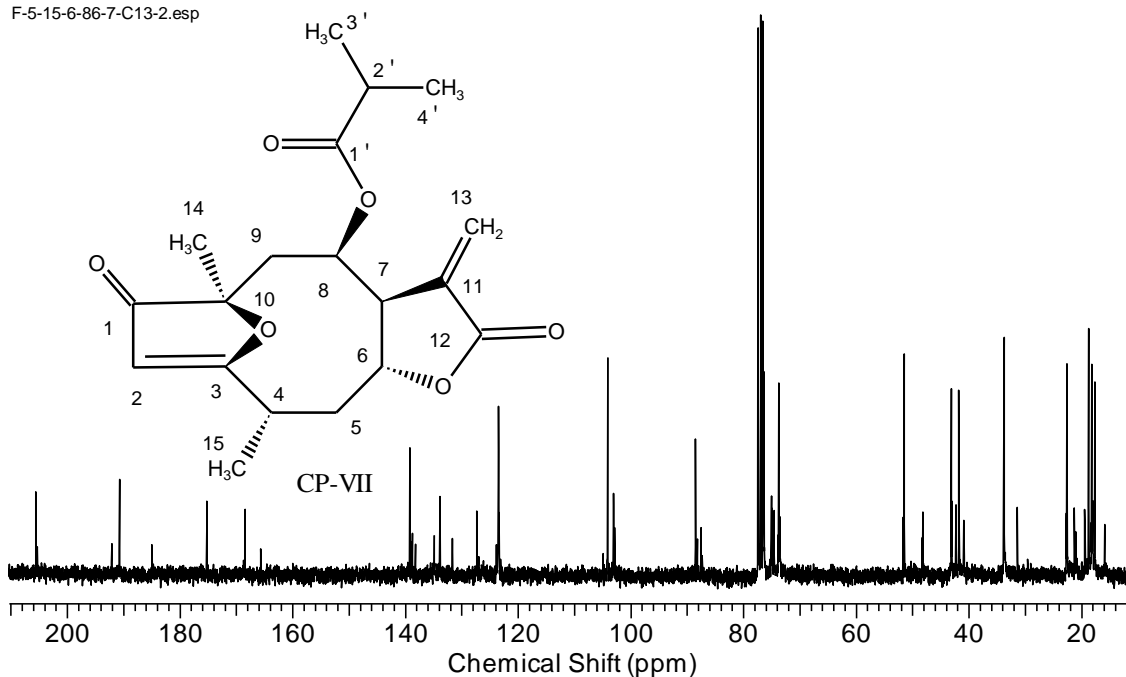
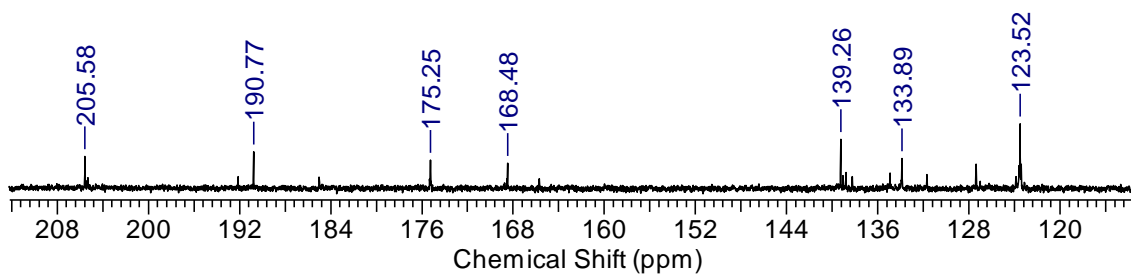


Figura 49: Espectro de RMN ^{13}C do (CDCl_3 , 75,5 MHz) para o composto CP-VII.

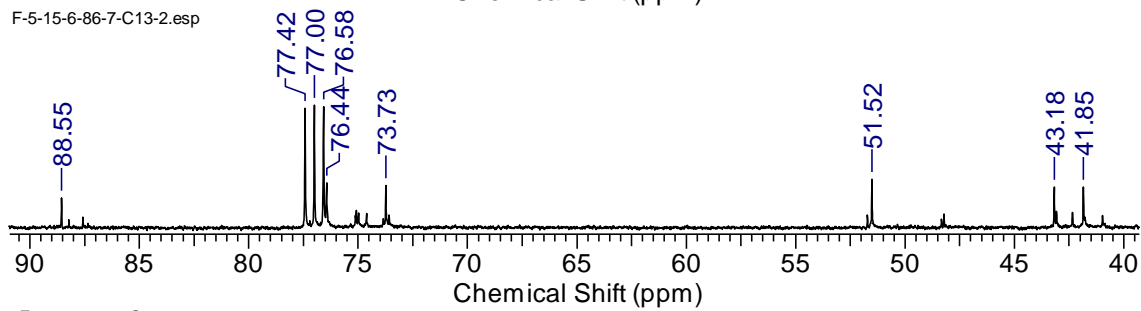
F-5-15-6-86-7-C13-2.esp



F-5-15-6-86-7-C13-2.esp



F-5-15-6-86-7-C13-2.esp



F-5-15-6-86-7-C13-2.esp

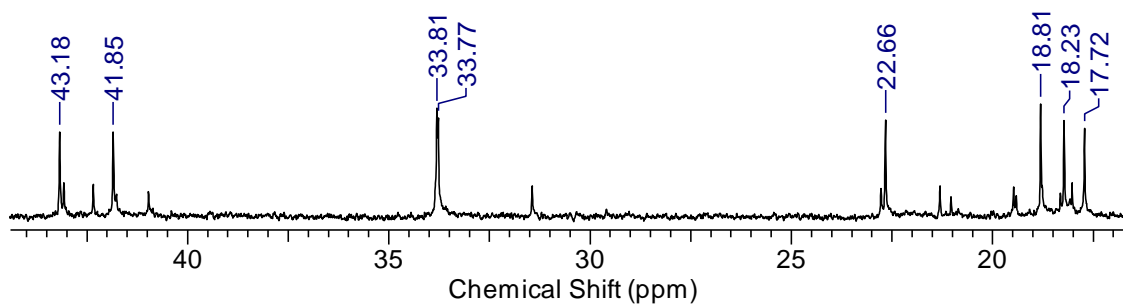


Figura 50: Espectro de HMBC (CDCl₃, 300 MHz) para o composto CP-VII.

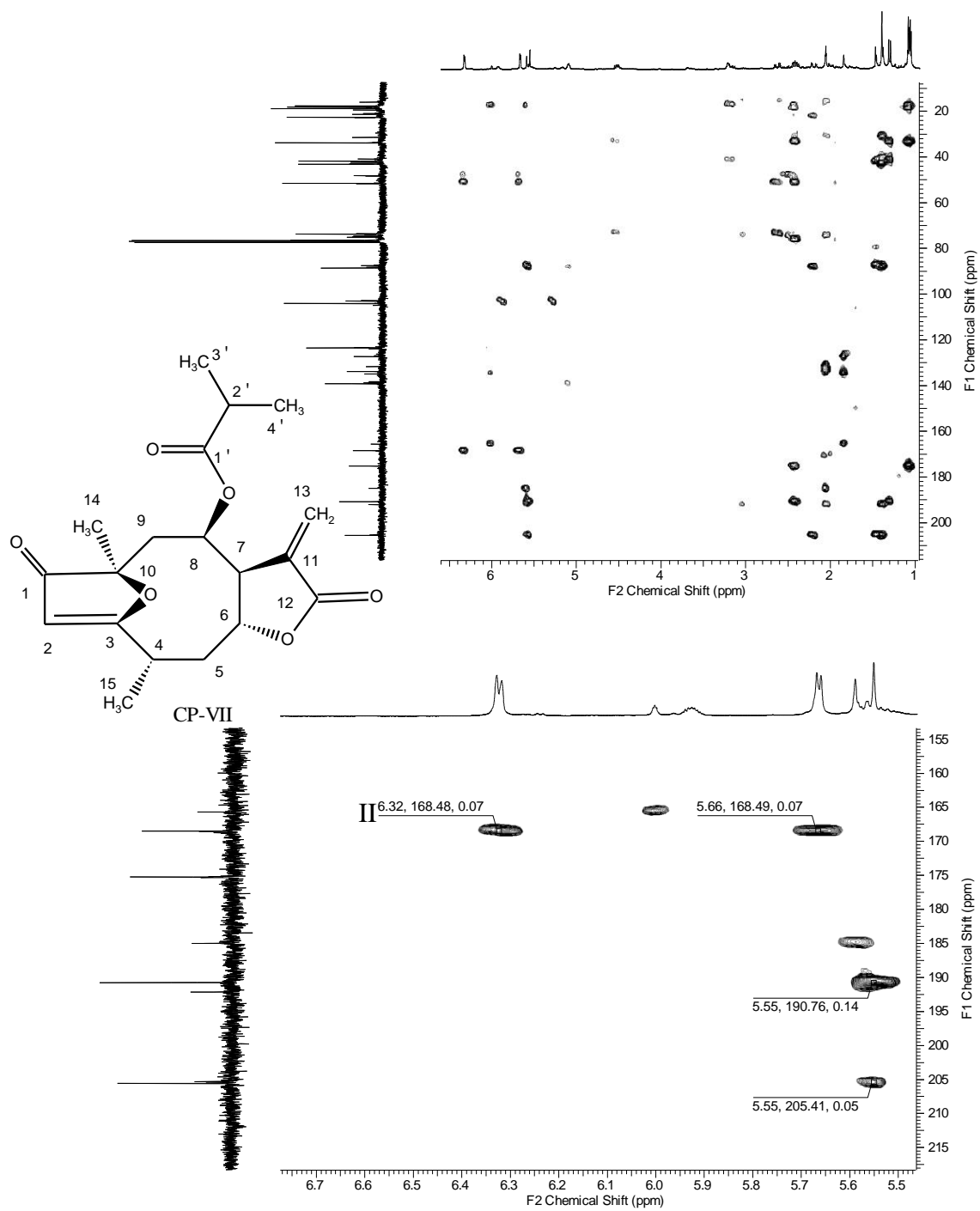


Figura 51: Expansão do espectro de HMBC (CDCl_3 , 300 MHz) para o composto CP-VII.

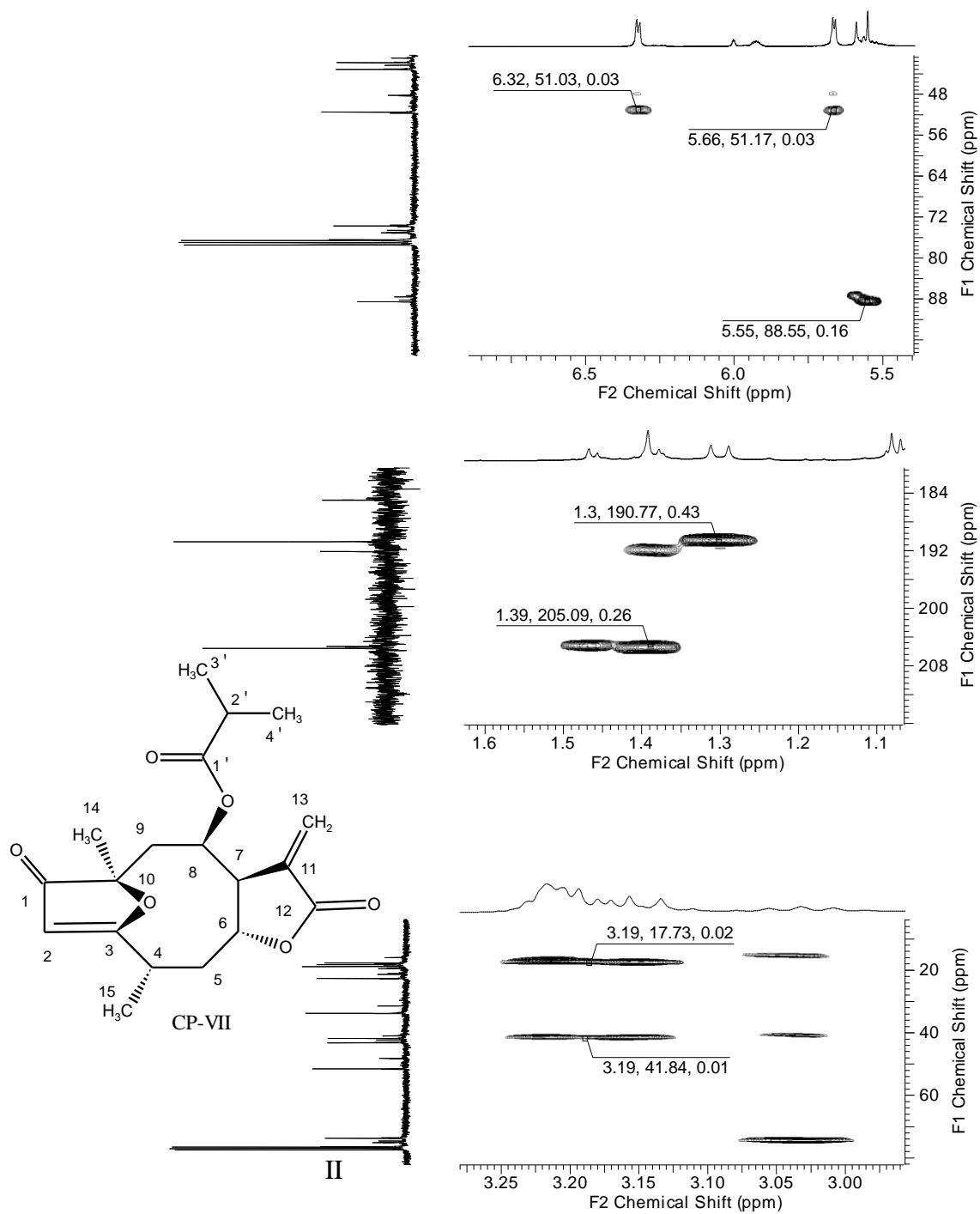


Figura 52: Expansão do espectro de HMBC (CDCl_3 , 300,06 MHz) para o composto CP-V.

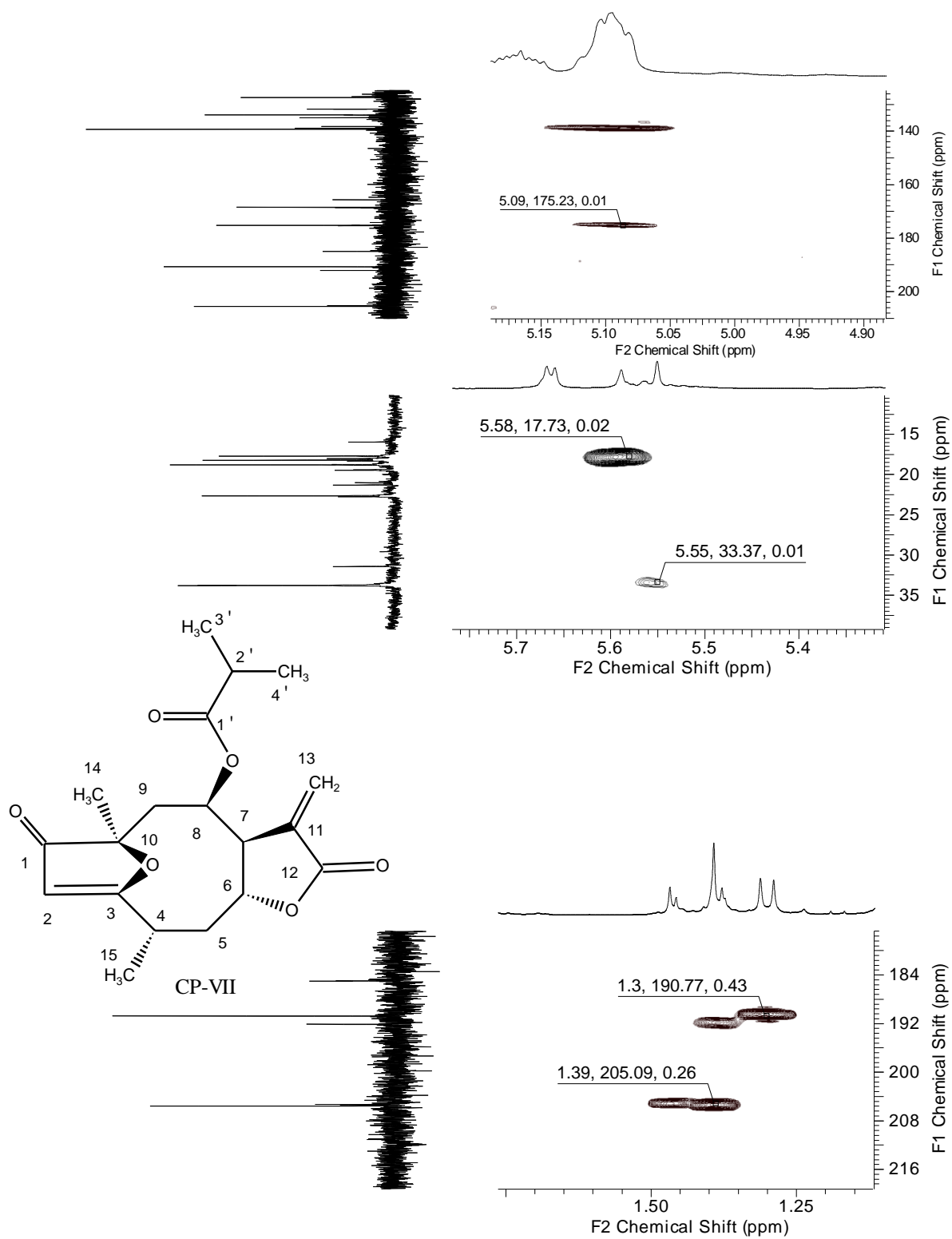
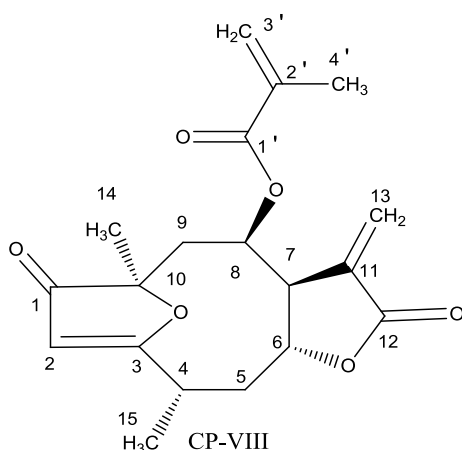


Tabela 16: Dados espectroscópicos de ^1H e ^{13}C (δ CDCl_3 , 300 MHz) do composto CP-V e o derivado Zexbrevina.

Nº	Derivado Zexbrevina		Composto CP-VII		
	$\delta_{\text{H mult.}}$ (J em Hz)	$\delta_{\text{H mult.}}$ (J em Hz)	δ_{C}	COSY	HMBC
1			205,6		
2	5,45s	5,55 s	104,2		205,6; 190,8; 88,5; 33,7
3			190,8		
4	3,90 m	3,15 m	33,8	2,38	41,8
5	2,40 m	2,43 dd (3,0; 9,0)	41,8		76,4; 51,5; 33,8
	2,03 m	1,99 m			
6	4,34 ddl (1,0; 5,0)	4,52 dd	76,4	3,21; 1,99	
7	3,16 m	3,21 m	51,5	6,32; 5,10 e 4,52	
8	5,13 ddl (2; 5)	5,10 m	73,7	3,21	
9	2,67 dd (15,2)	2,66 dd (3,0; 15,0)	43,2	2,19	205,6; 88,5; 73,7
	2,22 d (15,2)	2,19 dd (15,0)		2,66	
10			88,5		
11			139,3		
12			168,5		
13	6,35 d (3,5)	6,32 d (3,0)	123,	3,21	168,5; 51,5
	5,55 d (2,5)	5,66 d (3,0)			
14	1,39 s	1,39 sl	22,3		205,6; 88,5; 43,2
15	1,27 d (7,0)	1,30 d (3,0)	17,7		190,8; 41,8; 33,8
1'			175,2		
2'	2,47 m	2,41 d (3,0)	33,7	1,06	175,2; 18,7
3'	1,16 d (7,0)	1,08 d (3,0)	18,7		175,2; 18,7
4'	1,10 d (7,0)	1,06 d (3,0)	18,2		

COMPOSTO CP-VIII



A determinação da estrutura do composto CP-VIII foi realizada a partir de análises de RMN de ^1H , ^{13}C , COSY, DEPT, HMBC e HSQC.

Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C (Tabela 17) do composto CP-VIII diferem aos do composto CP-V, pela ausência dos sinais da ligação dupla entre C-4 e C-5. O espectro de RMN de ^1H (Figura 53 e 54) mostrou a presença de um sinal em δ_{H} 3,18 (m)(H-4) com multiplicidade duplete de tripleto devido ao acoplamento com os hidrogênios metilênicos H-5, além do sinal em δ_{H} 1,29 correspondente ao grupo metila ligado ao C-4, na forma de um dublete ($J= 6,8$ Hz).

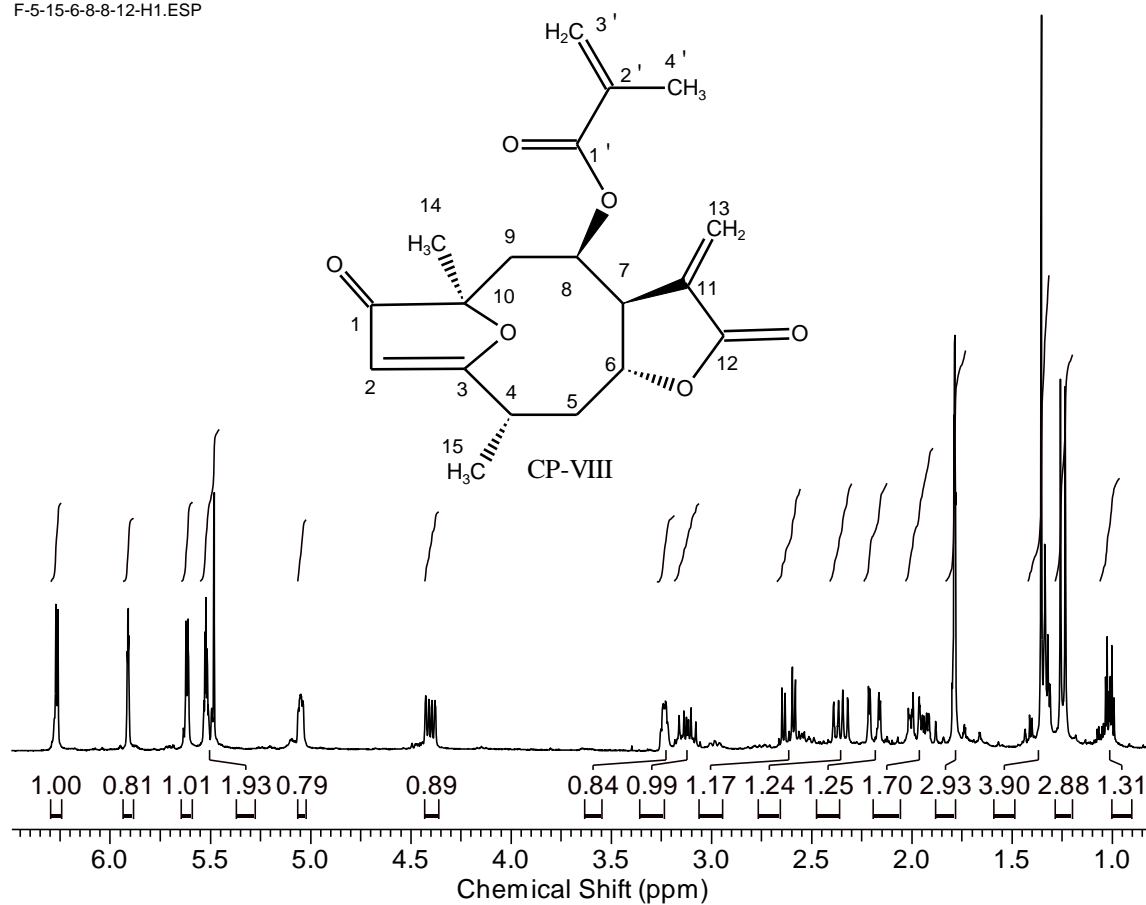
A análise dos espectros de RMN ^{13}C (Figura 55) e de HSQC (Figura 56) confirmou a ligação e presença dos carbonos metínico em δ_{C} 33,7 (C-4) e o carbono metilênico em δ_{C} em 41,8 (C-5). A presença do grupo metacrilóxi em CP-VIII foi confirmada pelo sinal do carbono em δ_{C} 126,9 (C-3'), correlacionado com os hidrogênios em δ_{H} 5,57 (m) e 5,96 (m), além dos sinais dos carbonos em δ_{C} 134,9 (C-2') e 18,0 (C-4'). A partir do espectro de COSY (Figuras 57) foi possível confirmar a correlação entre o hidrogênio em δ_{H} 5,57 com os hidrogênios em δ_{H} 1,85 (dd; $J= 1,6$ e 1,5 Hz) (H-4'), para o metacrilóxi.

A análise do espectro de HMBC (Figuras 58, 59 e 60) mostrou a correlação entre o H-4 os carbonos em δ_{C} 17,8 (C-15) e 41,8 (C-5), a correlação entre o hidrogênio em δ_{H} 2,40 (dd; $J = 13,6$ e 7,2 Hz) com os carbonos C-4 e C-7, bem como as correlações entre os hidrogênios em δ_{H} 5,96 e 5,57 com o carbono em δ_{C} 165,6 (C-1') e o H-4' com o carbono C-3', confirmando o grupo metacrilóxi.

Outra informação dada pelo espectro de HMBC foi à correlação do H-15 com os carbonos em δ_C 190,8 (C-3) e 41,8 (C-5), confirmando o posicionamento deste grupo metila no C-4. Esse composto foi anteriormente relatado para o gênero *Calea*, isolado na espécie *C. zacatechichi* (HERZ e KUMAR, 1980).

Figura 53: Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 300,06 MHz) para o composto CP-VIII.

F-5-15-6-8-8-12-H1.ESP



F-5-15-6-8-8-12-H1.esp

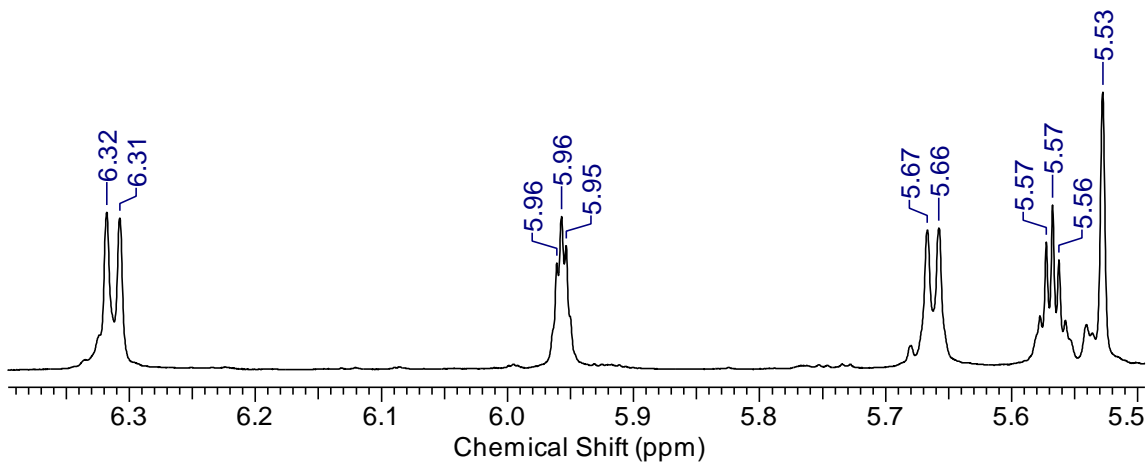


Figura 54: Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) para o composto CP-VIII.

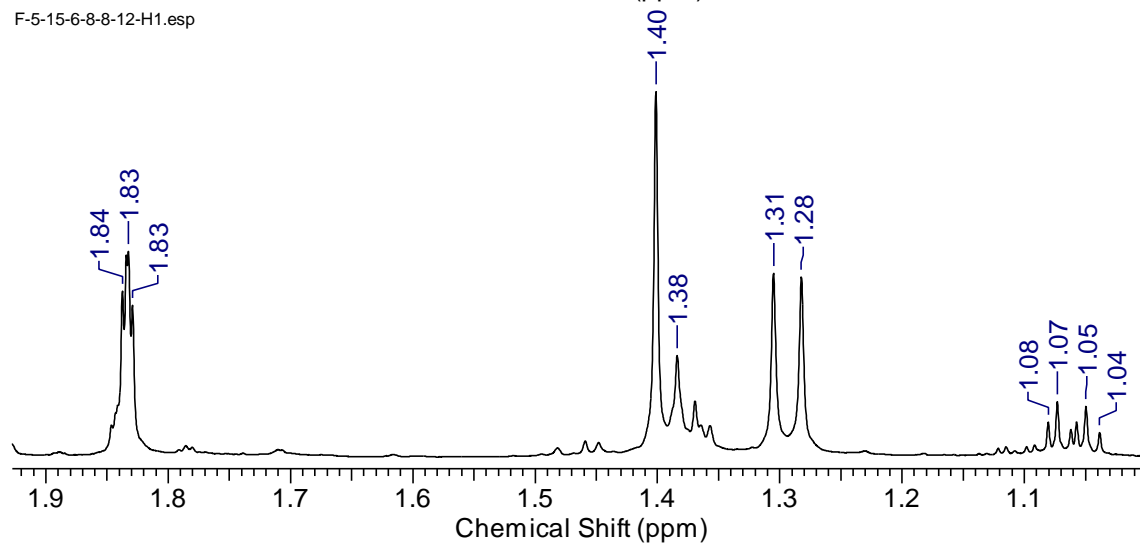
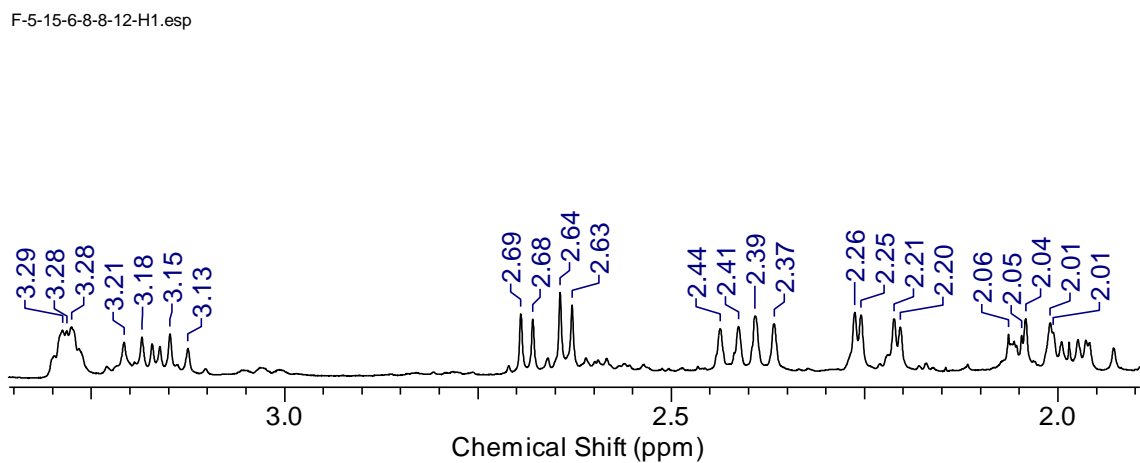
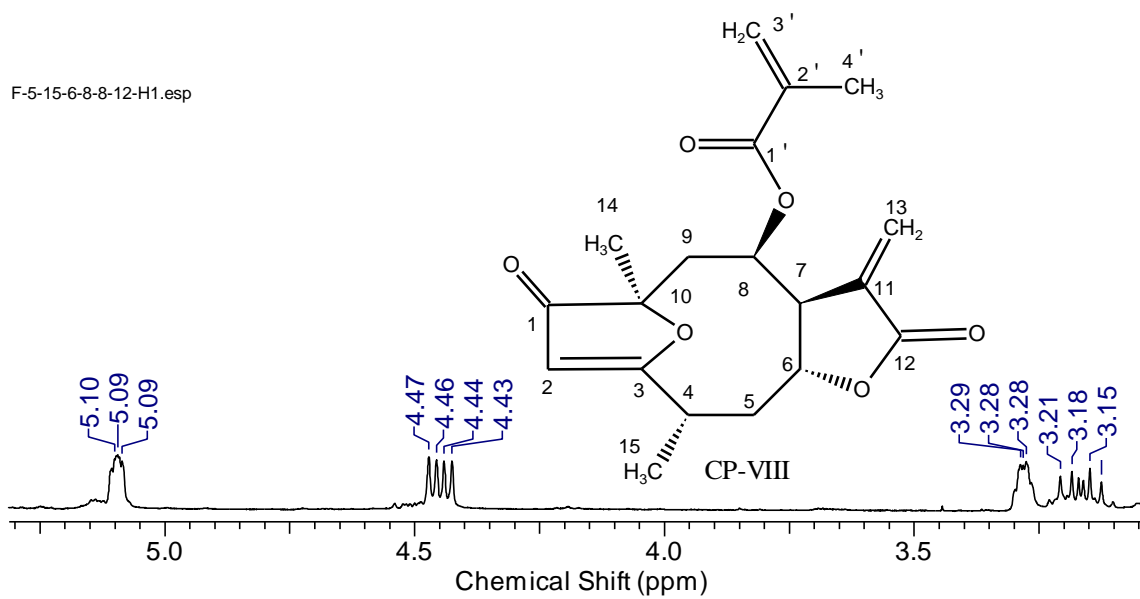


Figura 55: Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75,5 MHz) para o composto CP-VIII.

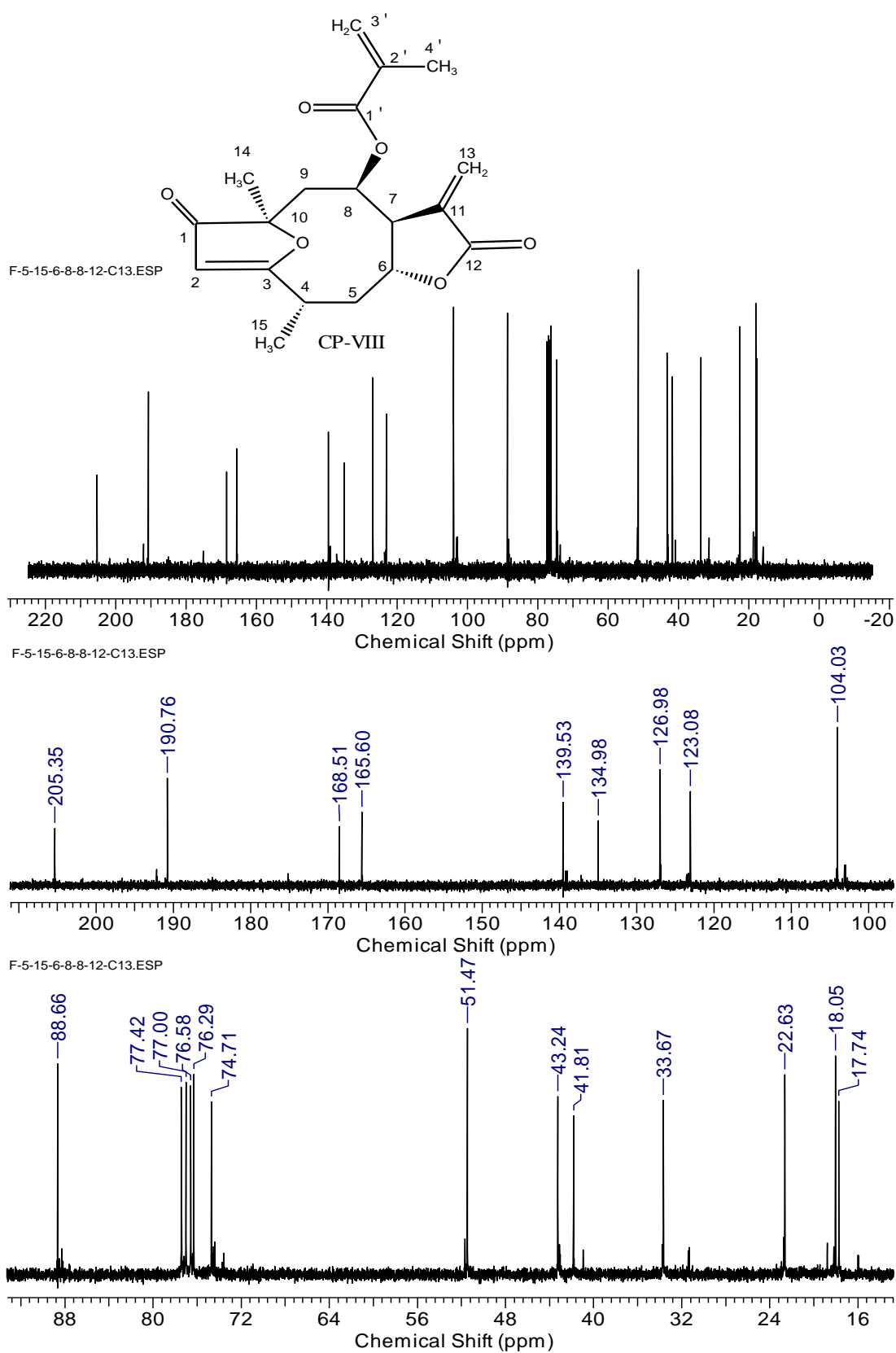


Figura 56: Espectro de HSQC (CDCl_3 , 300 MHz) para o composto CP-VIII.

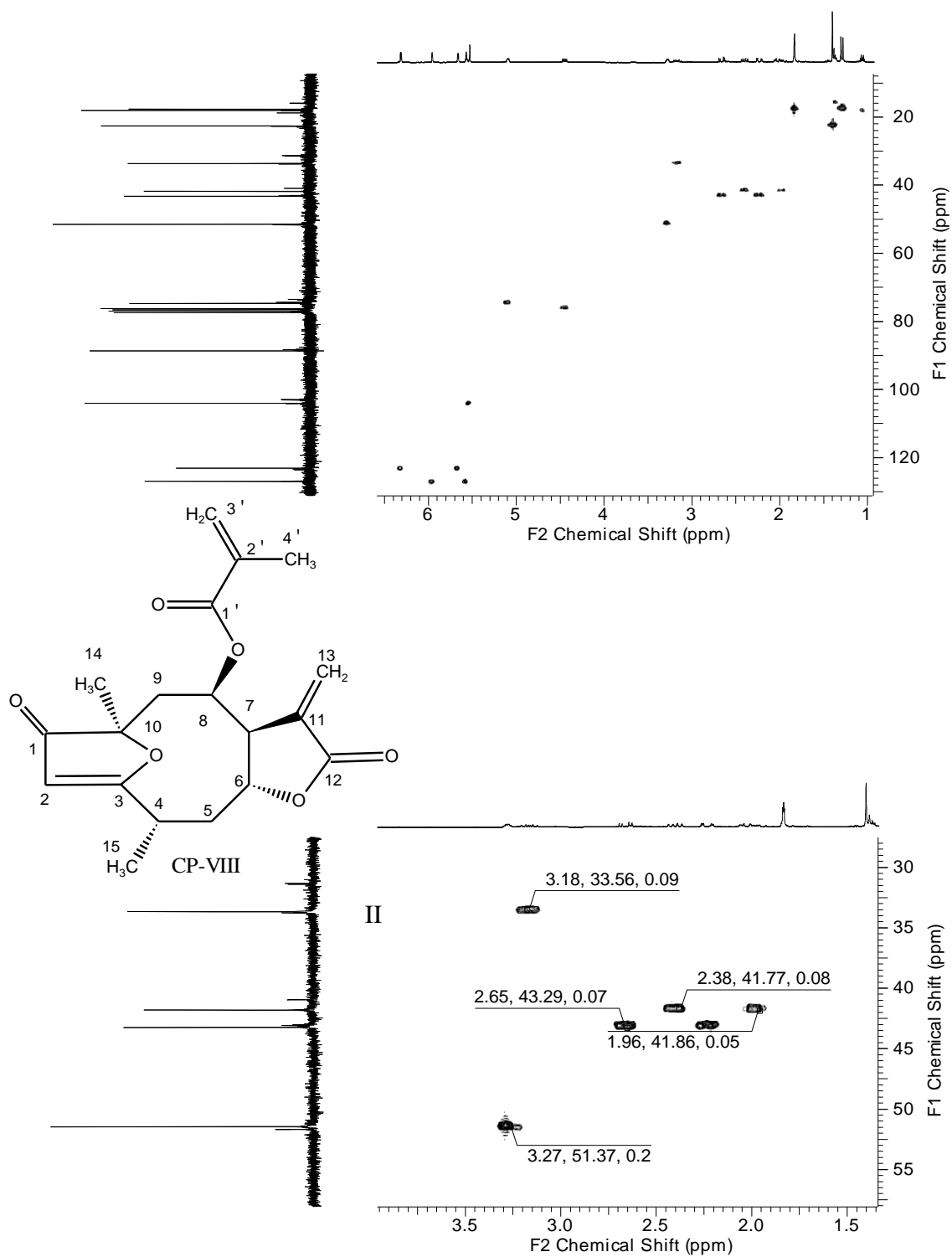


Figura 57: Espectro de COSY (CDCl_3 , 300 MHz) para o compostos CP-VIII.

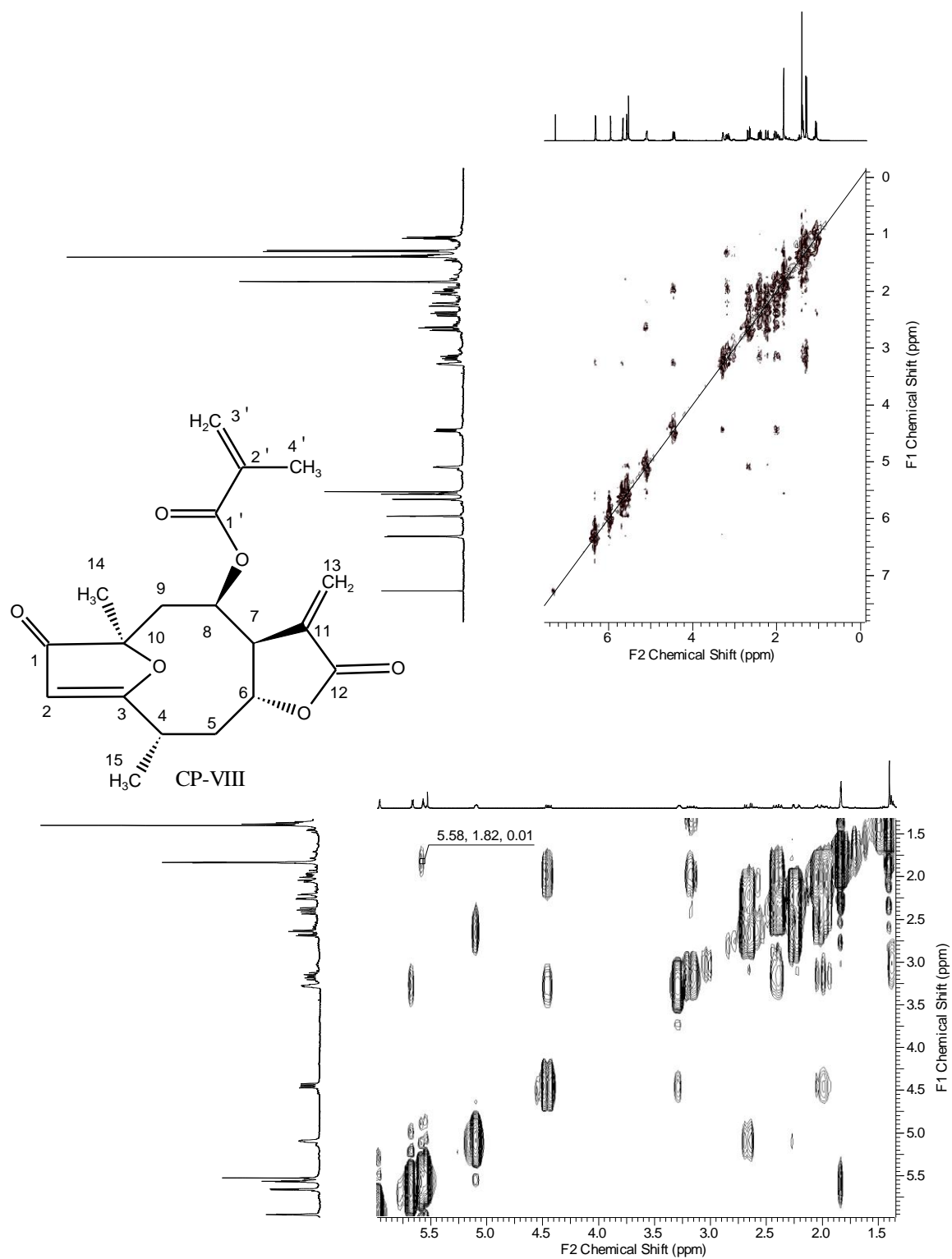


Figura 58: Espectro de HMBC (CDCl_3 , 300 MHz) para o composto CP-VIII.

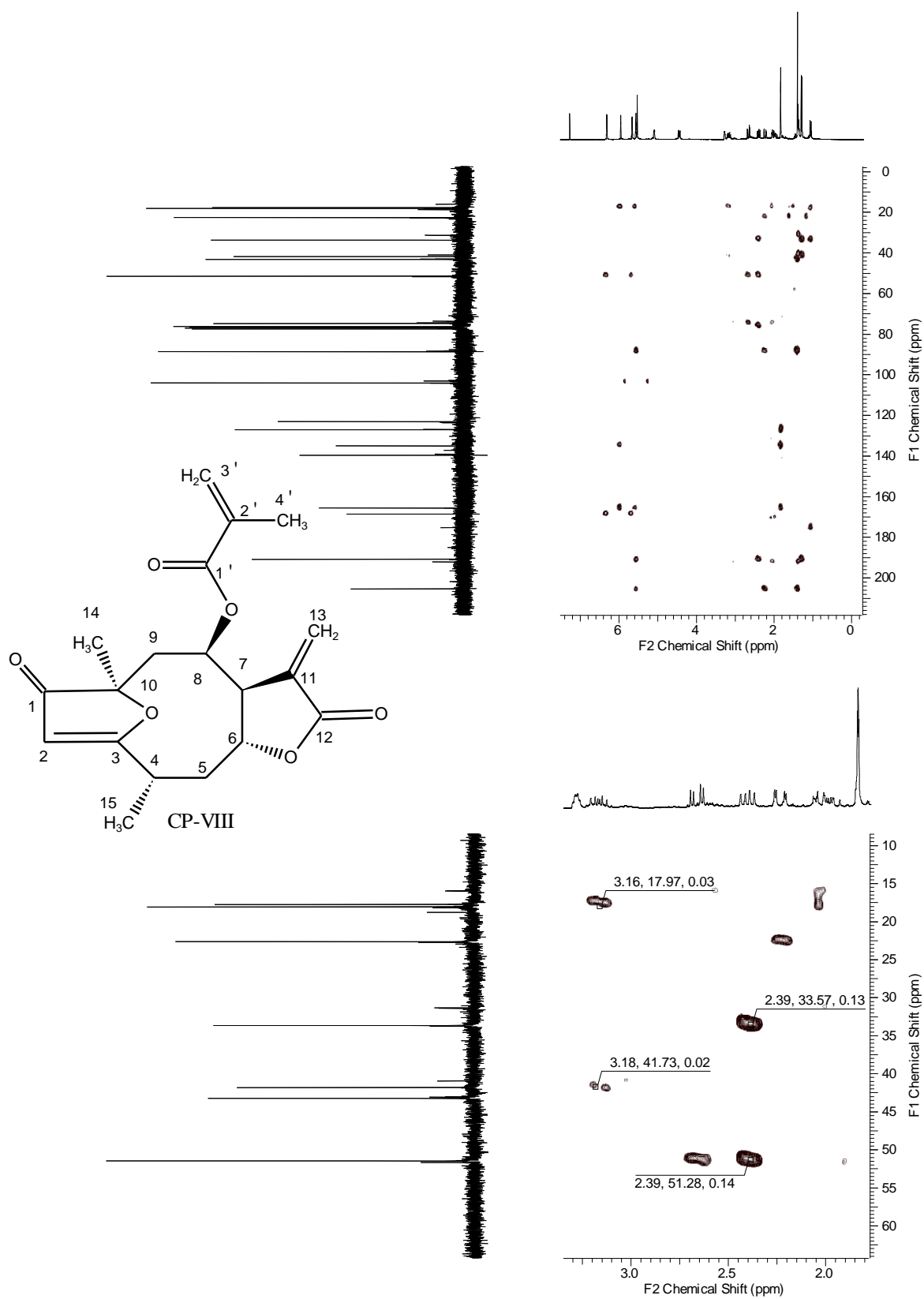


Figura 59: Expansão do espectro de HMBC (CDCl_3 , 300 MHz) para o composto CP-VIII.

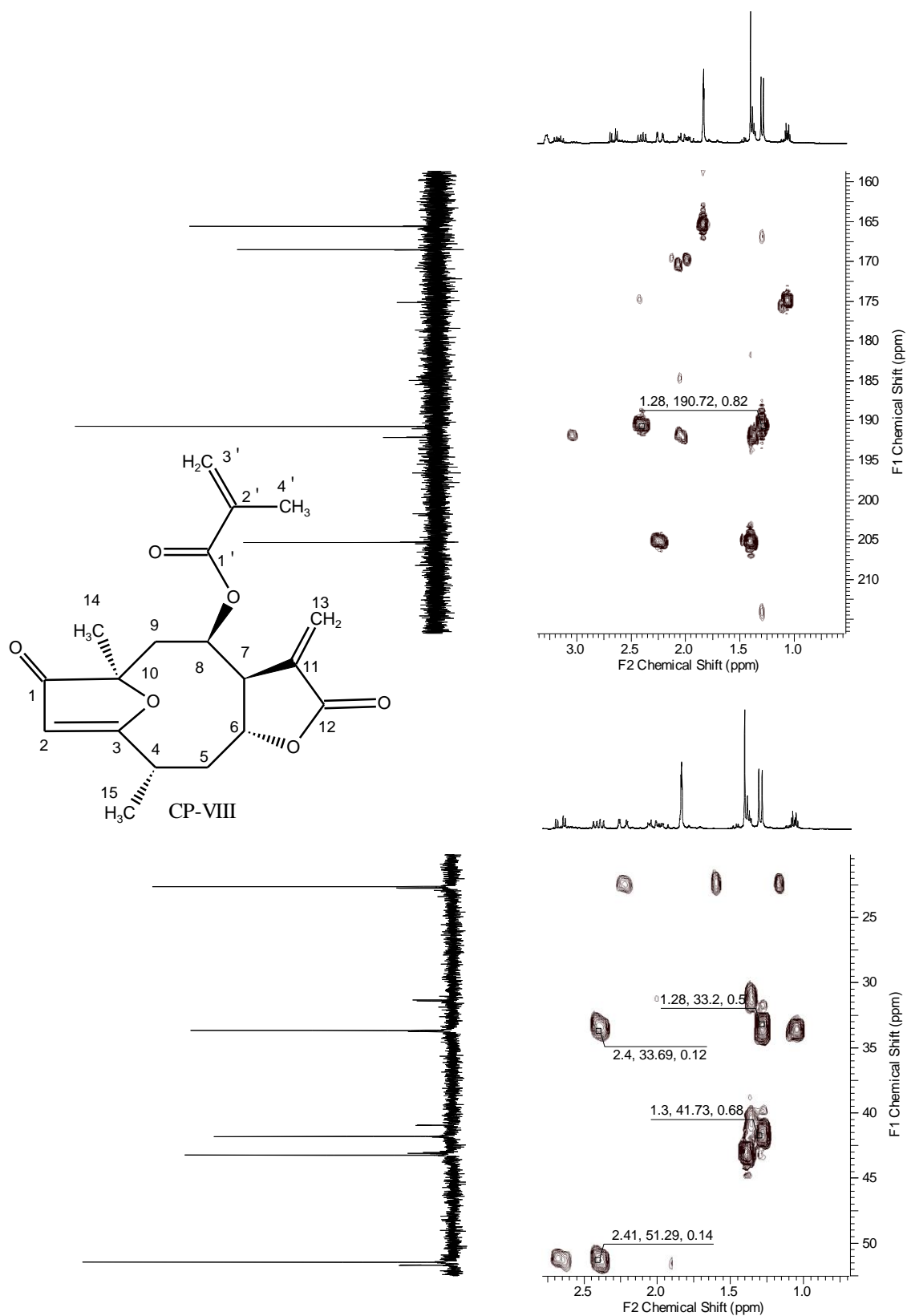
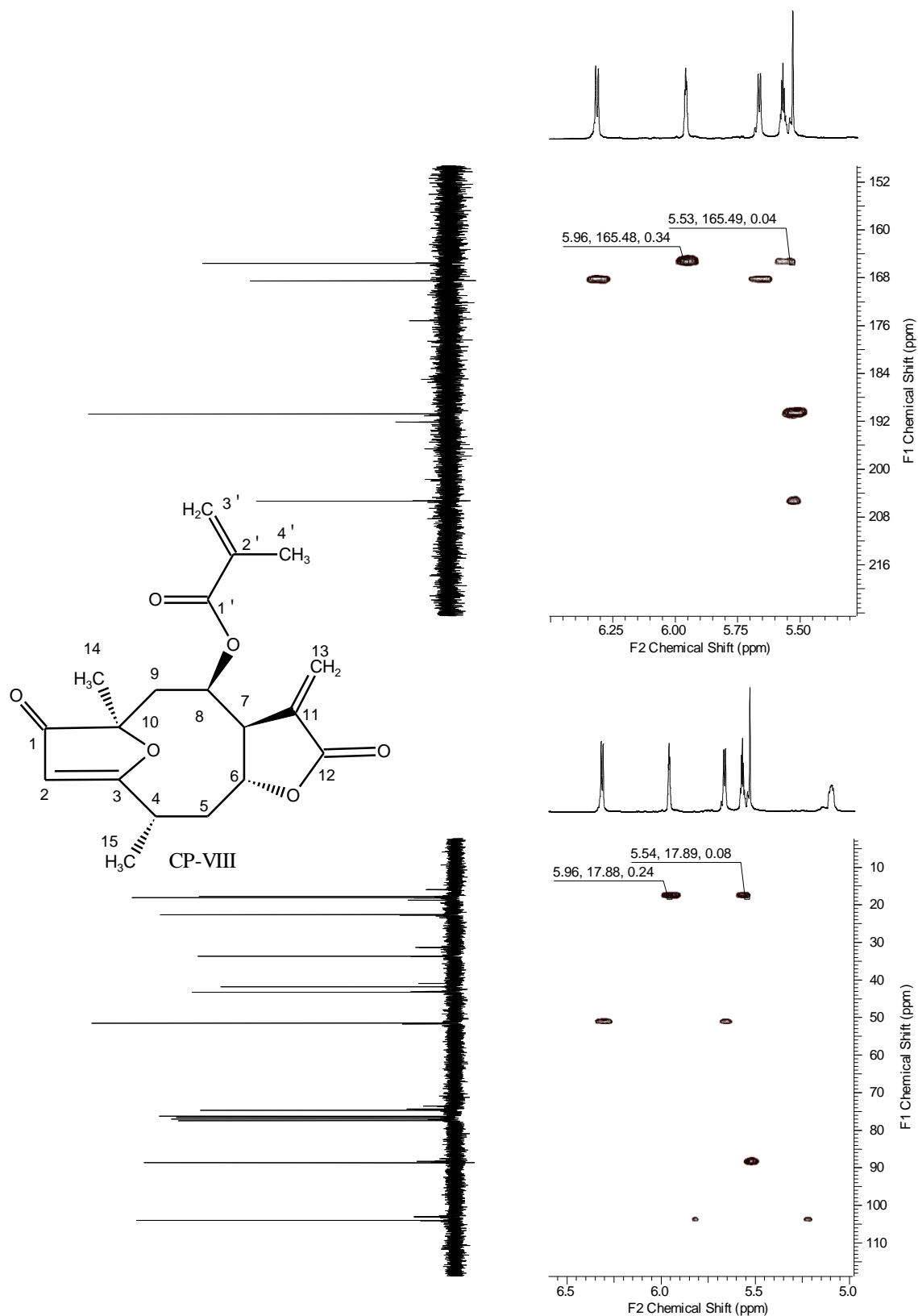


Figura 60: Expansão do espectro de HMBC (CDCl₃, 300MHz) para o composto CP-VIII.

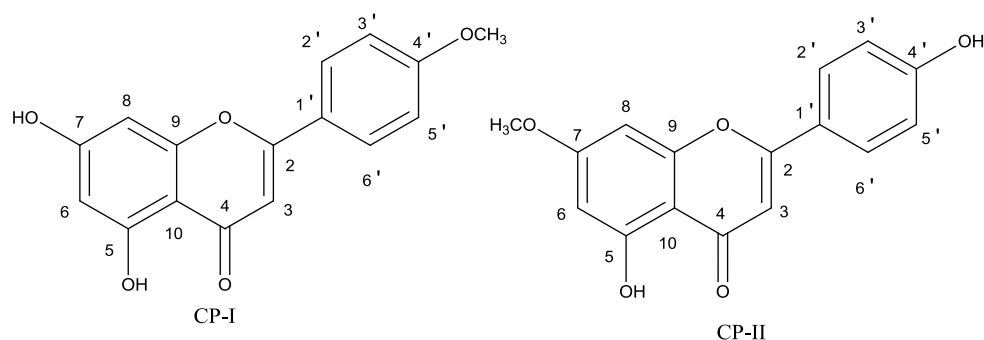


Os dados espectroscópicos do composto CP-VI foram consistentes com os da literatura para o composto 4,5-di-hidro-15-deoxigoiázensolídeo (HERZ e KUMAR, 1980) (Tabela 17).

Tabela 17: Dados espectroscópicos de RMN de ^1H e ^{13}C (300 MHz) do composto CP-VIII e 4,5-dihidro-15-deoxygoyazensolide.

4,5-dihidro-15-deoxygoyazensolide			CP-VIII		
Nº	$\delta_{\text{H mult.}}$ (J em Hz)	δ_{C}	$\delta_{\text{H mult.}}$ (J em Hz)	δ_{C}	HMBC
1		205,18		205,3	
2	5,54 sl	102,95	5,53 sl	104,0	88,6; 190,8; 205,3
3		192,13		190,8	
4	3,03 quisl (7,0; 1,0)	31,37	3,18 m	33,7	17,8; 41,8
5	2,59 ddd (15,0; 9,0 e 7,0)	40,96	2,40 dd (13,6; 7,2)	41,8	33,7; 51,4
	2,05 dds		2,00 m		
6	4,48 dds (9,0; 5,0)	74,73	4,45 dd (9,1; 4,8)	76,3	33,7; 74,1; 168,5
7	3,30 m	51,61	3,29 m	51,4	Nd
8	5,13 ddd (5,0; 2,5; 1,0)	74,25	5,11 dd (4,1; 2,1)	74,1	51,4; 88,6; 139,5; 165,6
9	2,70 dd (15,0; 5,5)	43,06	2,68 dd (15,2; 4,6)	43,2	51,4; 74,1
	2,23 dd (15,5; 2,5)		2,23 dd (15,3; 2,4)		
10		88,29		88,6	
11		139,53		139,5	
12		168,46		168,1	
13	6,34 d (3,5)	123,05	6,31 d (3,1)	123,1	51,4; 168,5
	5,68 d (3,0)		5,66 d (2,8)		
14	1,40 s	22,74	1,40 s	22,6	43,2; 88,9; 190,8; 205,3
15	1,39 d (7,0)	16,04	1,29 d (6,8)	17,8	41,8
1'		165,4		165,6	
2'		135,12		134,9	
3'	5,59 dq (2,0; 1,5)	126,70	5,57 m	126,9	18,0; 134,9; 165,6
	5,97 dq (2,0; 1,0)		5,96 m		
4'	1,87 dd (1,5 e 1,0)	18,05	1,84 dd (1,5; 1,6)	18,0	126,9; 134,9; 165,6

5.2. Flavonoides (COMPOSTOS CP-I E CP-II)



Os compostos CP-I e CP-II foram isolados da fração CFD-3-7 como mistura das flavonas acacetina e genkwanina, respectivamente. O composto majoritário CP-I apresentou no espectro de RMN ^1H (Figura 61), dois dupletos centrados em δ_{H} 8,04 *d* ($J = 8,3$ Hz) e δ_{H} 7,11 *d* ($J = 8,4$ Hz) com integração para dois hidrogênios cada, referentes aos hidrogênios H-2', H-6' e H-3', H-5', respectivamente, confirmando a *para*-substituição do anel B. Os simpletos largos em δ_{H} 6,21, 6,51 e 6,87, foram atribuídos aos hidrogênios H-6, H-8 e H-3 respectivamente. Além destes sinais, observou-se um simpleto em 3,85 que foi atribuído ao grupo metoxila localizado no C-4'.

Para o composto minoritário CP-II foi observado os dupletos em δ_{H} 7,96 *d* ($J = 8,2$ Hz) e 6,94 *d* ($J = 8,4$ Hz) referentes aos hidrogênios H-2', H-6' e H-3', H-5', respectivamente. Observaram também os simpletos largos em δ_{H} 6,38, 6,77 e 6,85, referentes aos hidrogênios H-6, H-8 e H-3, respectivamente. Outra informação confirmada foi um simpleto em δ_{H} 3,86 referente ao grupo metoxila ligado ao carbono C-7.

Com o auxílio do espectro de COSY (Figura 62) foi possível constatar a correlação entre os hidrogênios H-2'/H-3' com H-5'/H-6' para os compostos CP-I, CP-II e também a correlação entre o H-6 e H-8 para o composto CP-I.

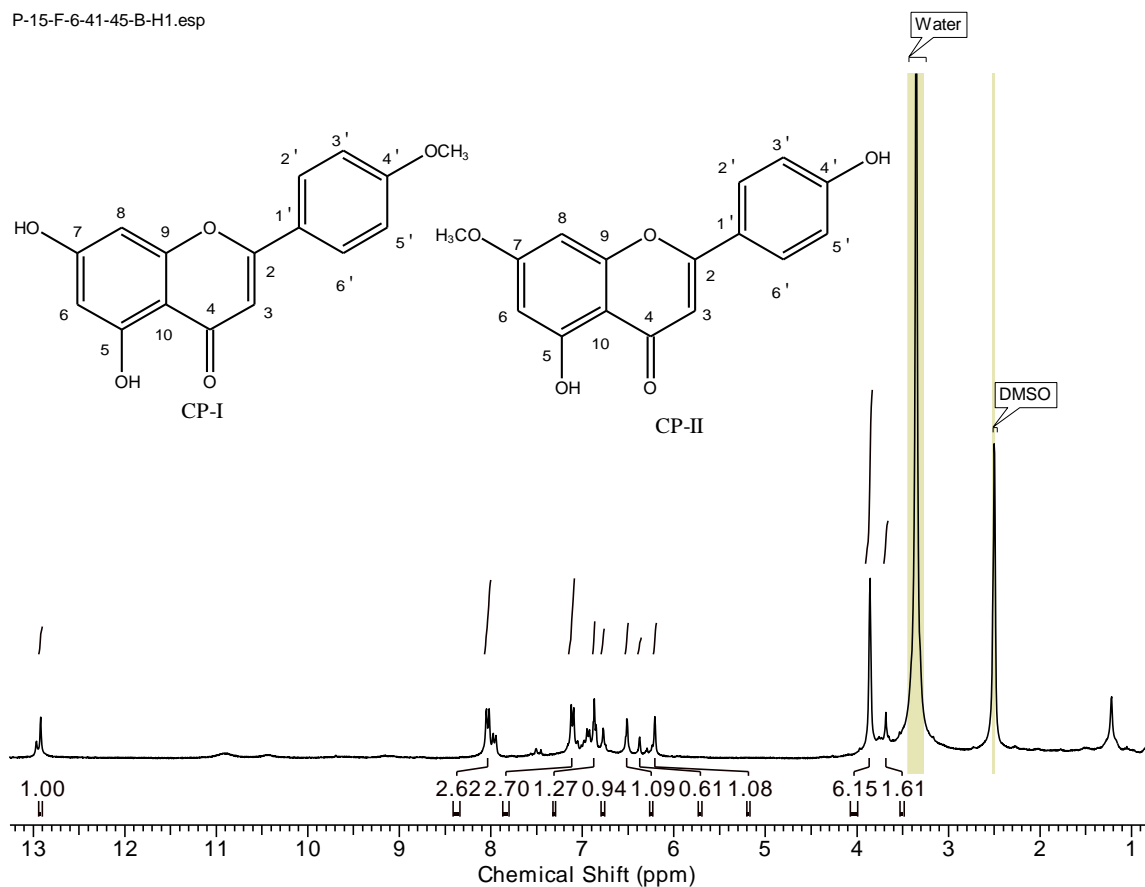
A análise conjunta dos espectros de RMN ^{13}C (Figura 63 e 64) e do HSQC (Figura 65) confirmou o esqueleto de flavona para CP-VII pelos sinais em δ_{C} 181,9, referente aos carbonos C-4, sinais para carbonos quaternários ligados diretamente a um átomo de oxigênio em δ_{C} 157,3, 161,2, 161,3, 163,3 e 165,1, referente aos carbonos C-5, C-4', C-9, C-2 e C-7, respectivamente. Outra informação nesse

experimento foi os deslocamentos químicos para os carbonos em δ_C 97,9, 92,9, 128,5, 115,9, e 128,3, referentes aos carbonos C-6, C-8, C-2', C-6', C-3' e C-5', respectivamente. A sobreposição de sinais para os compostos CP-I e CP-II nos carbonos C-2', C-6' e para carbono olefínico em δ_C 103,5 e a presença do grupo metoxila em δ_C 56,1.

A posição dos grupos metoxilas foi confirmada com a análise do espectro de NOESY (Figura 66), onde foi possível observar a correlação entre o hidrogênio em δ_H 7,11 (H-3'/H-5' do composto CP-I) com os hidrogênios em δ_H 3,86 (OCH₃), e a correlação entre os hidrogênios em δ_H 6,77 e 6,38 (H-8 e H-6 de CP-II) com o singlete em δ_H 3,86.

Figura 61: Espectro de RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz,) dos compostos CP-I e CP-II.

P-15-F-6-41-45-B-H1.esp



P-15-F-6-41-45-B-H1.esp

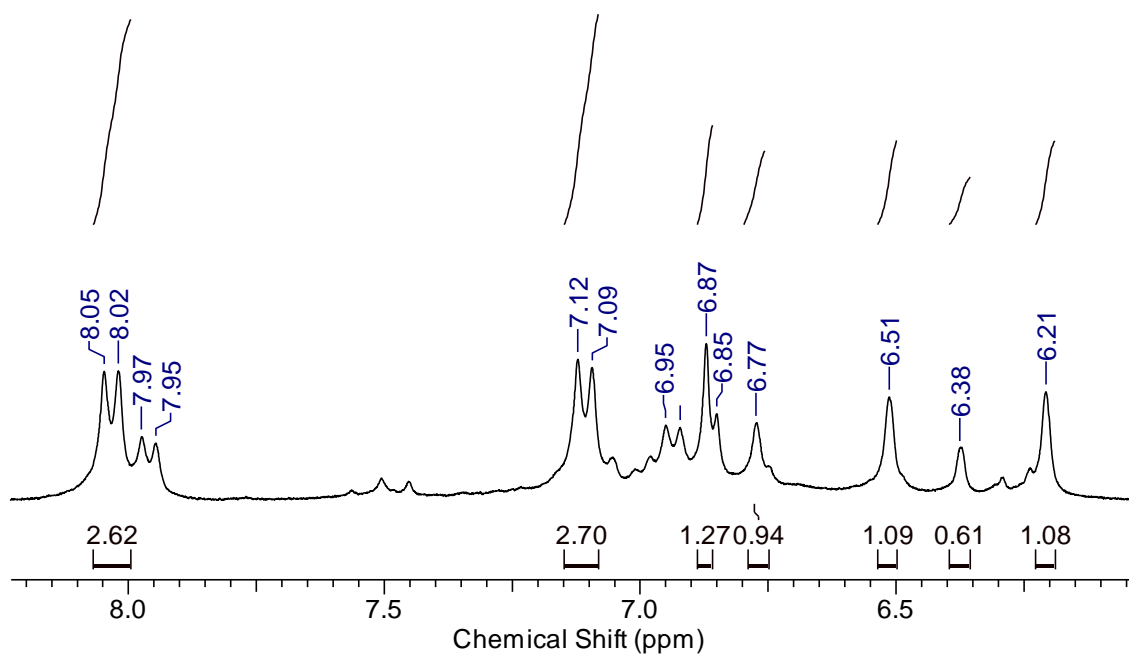


Figura 62: Espectro de COSY (DMSO-d₆, 300,06 MHz) dos compostos CP-I e CP-II.

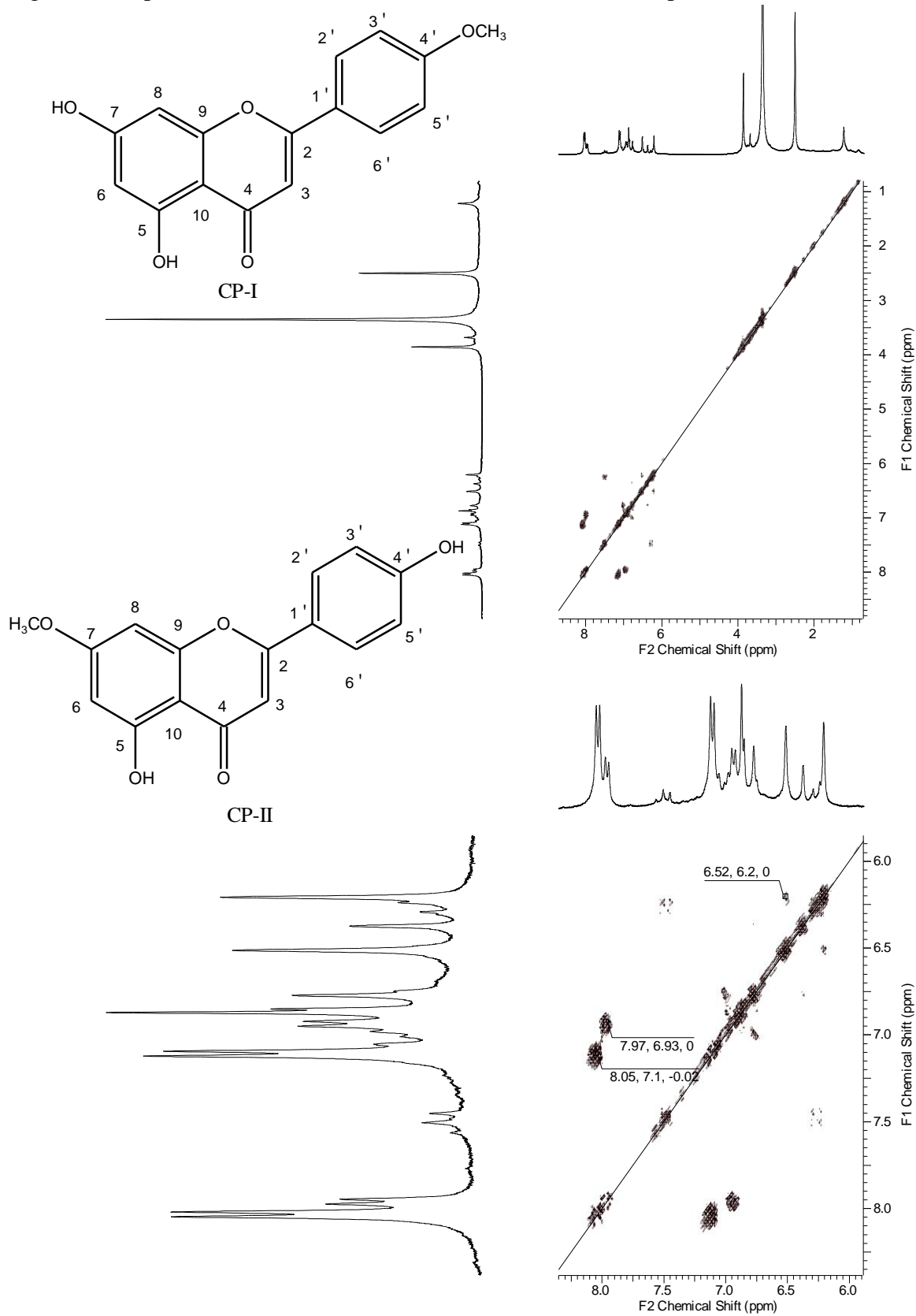
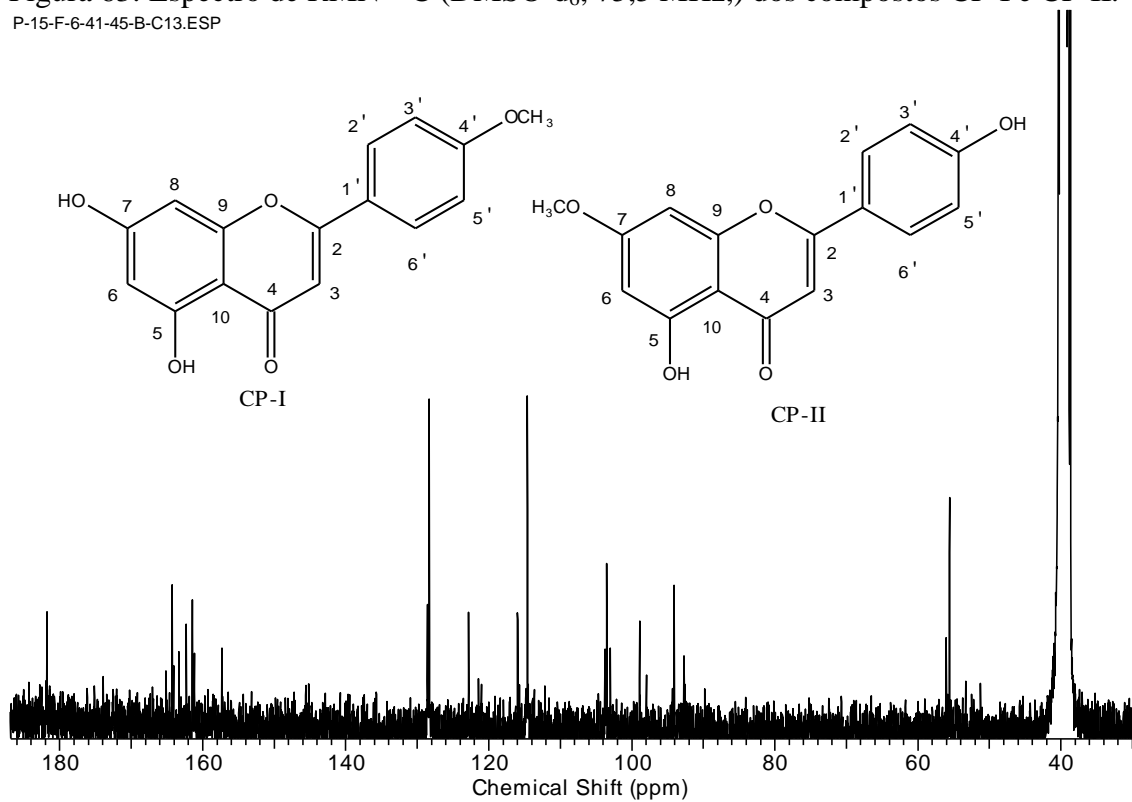


Figura 63: Espectro de RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 75,5 MHz,) dos compostos CP-I e CP-II.
P-15-F-6-41-45-B-C13.ESP



P-15-F-6-41-45-B-C13.ESP

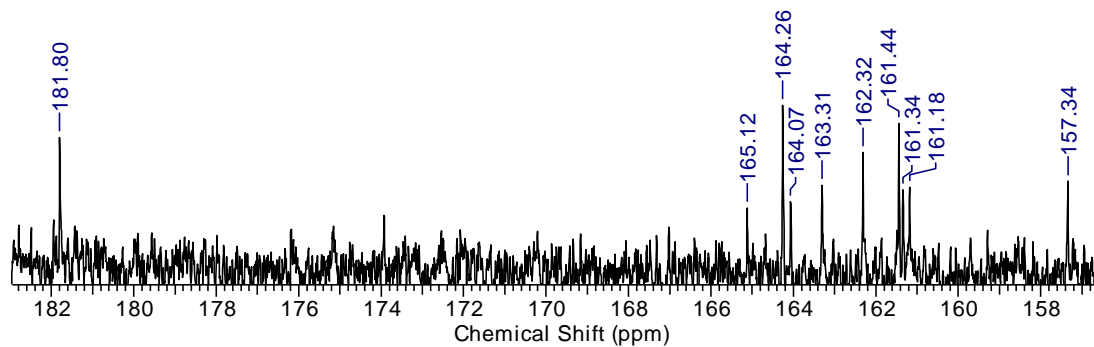
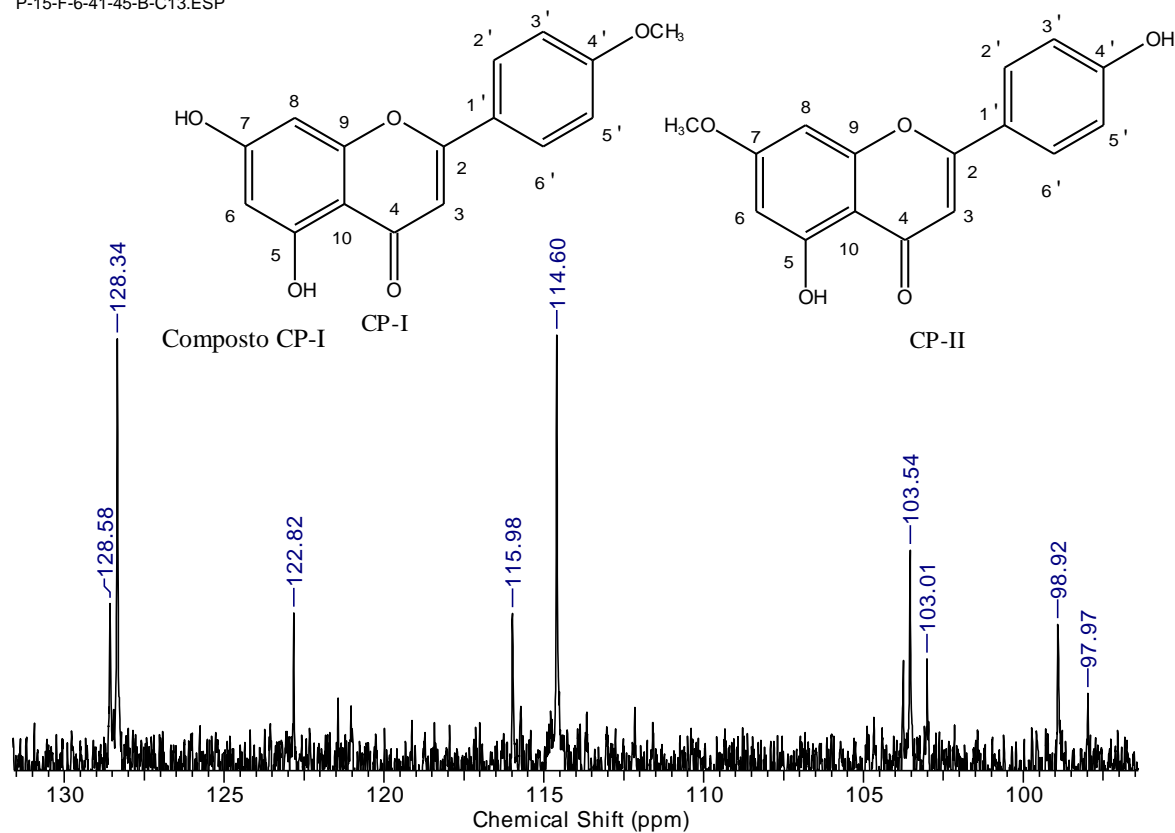


Figura 64: Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 300,06 MHz,) dos compostos CP-I e CP-II.

P-15-F-6-41-45-B-C13.ESP



P-15-F-6-41-45-B-C13.ESP

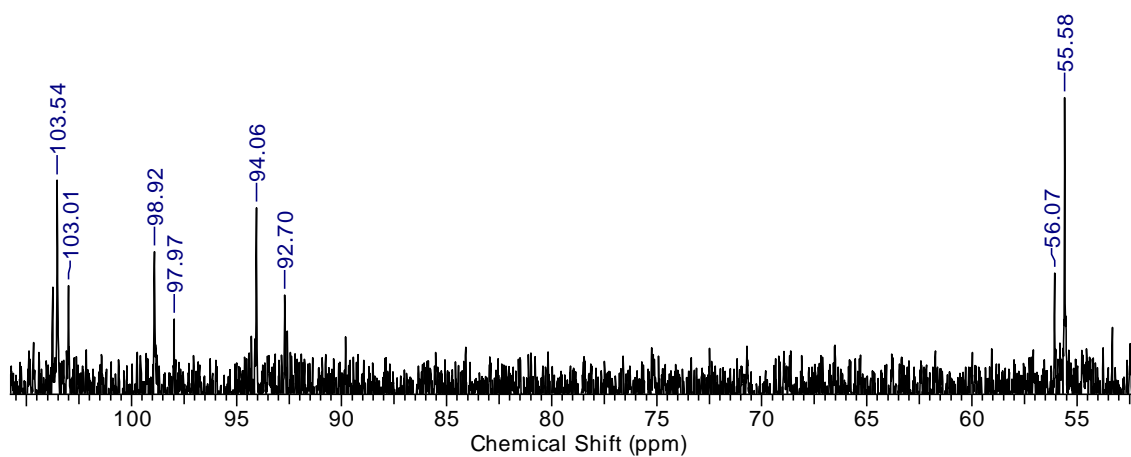


Figura 65: Espectro HSQC e expansão (DMSO-d₆, 300,0 MHz) dos compostos CP- I e CP- II.

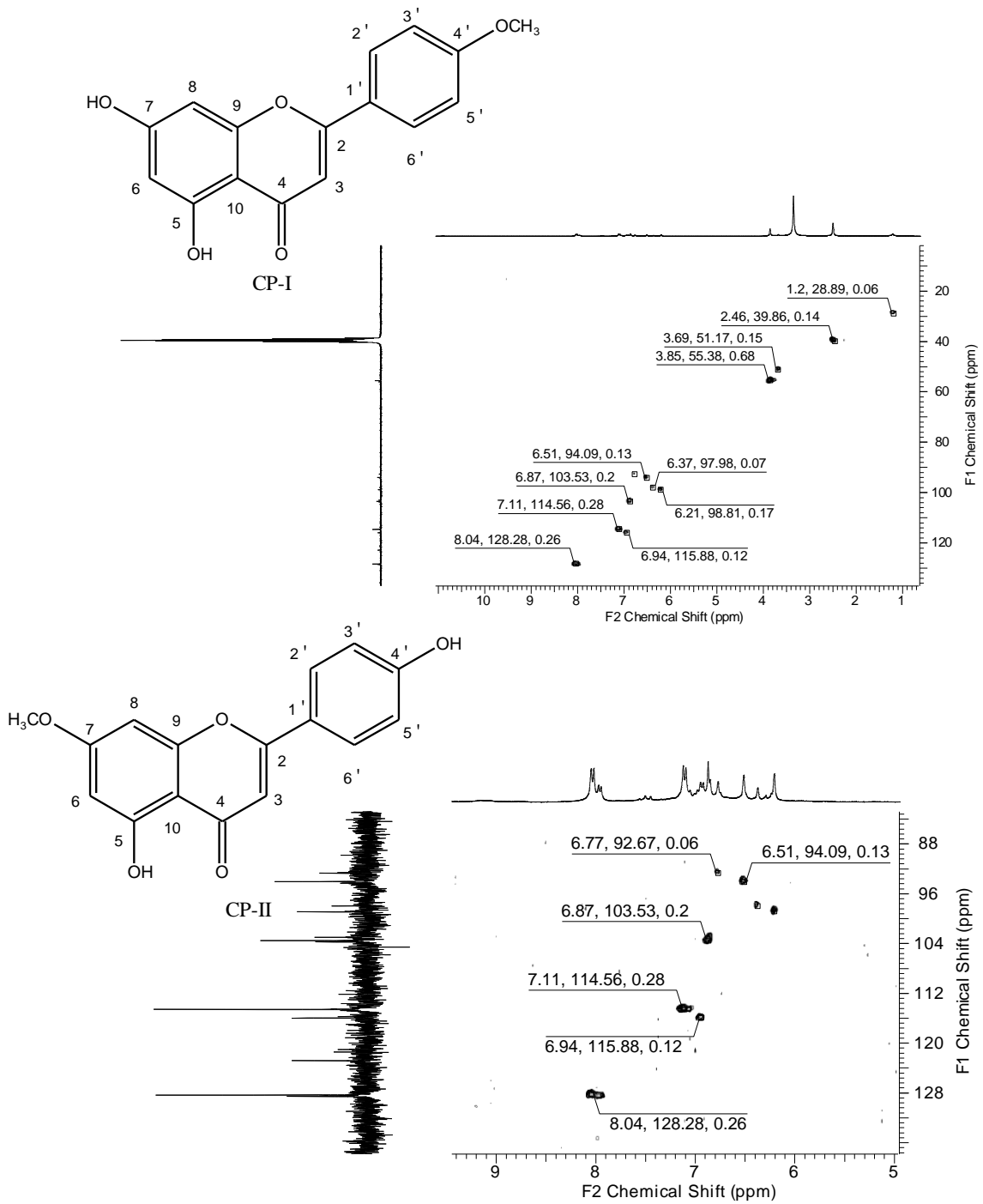
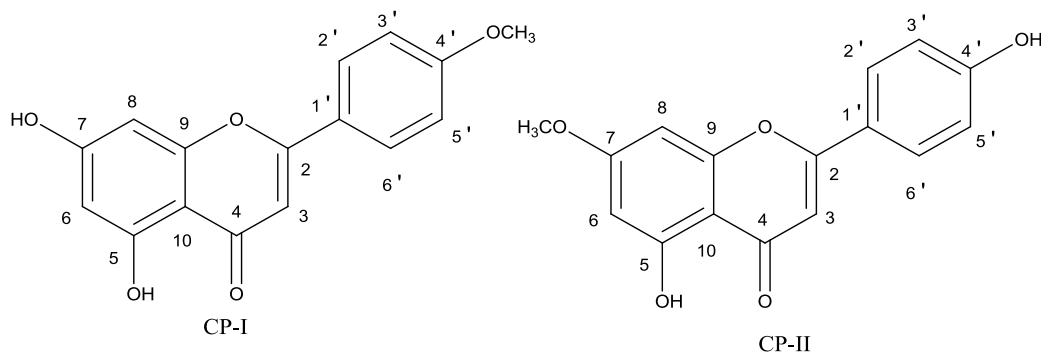
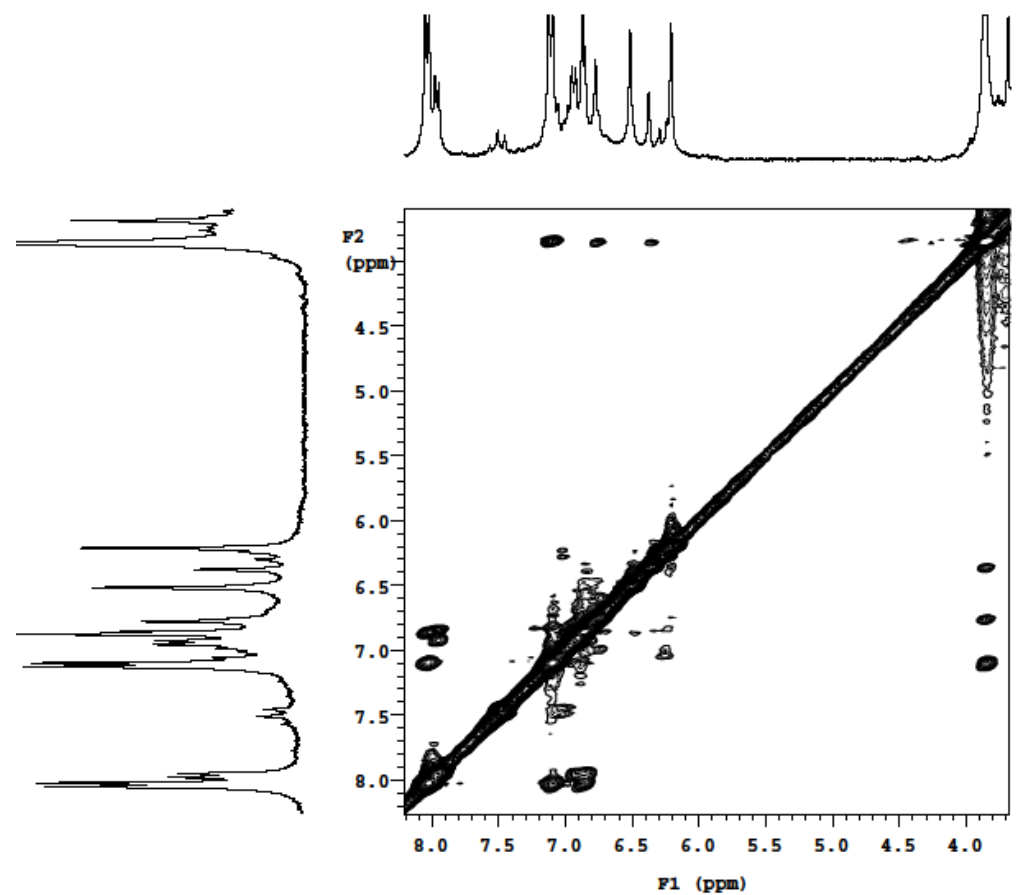


Figura 66: Espectro de NOESY (DMSO-d₆, 300,0 MHz) dos compostos CP-I e CP-II.



A determinação da estrutura destes compostos foi realizada a partir da análise dos dados espectroscópicos de RMN ¹H, ¹³C e por comparação com dados da literatura

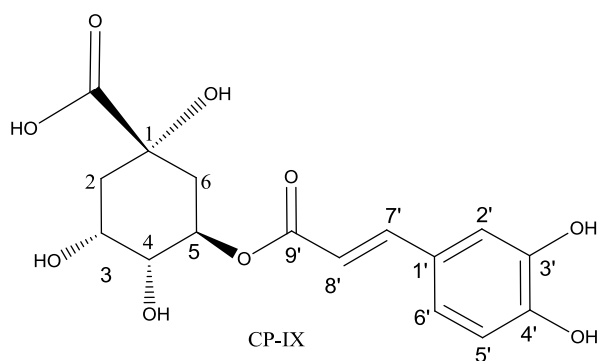
(Tabela 16). Esses dados foram concordantes possibilitou confirmar a elucidação dos compostos CP-I e CP-II como acetina (WAGNER e CHARI, 1976; BEI-BEI, et al., 2011) e genkwanina (WAGNER e CHARI, 1976; AYATOLLAHI et al., 2009), respectivamente. Esses compostos já foram relatados para o gênero sendo isolados da espécie *C. berteriana* e *C. platylepis*, respectivamente (NASCIMENTO et al., 2002; OBER et al., 1985; OBER et al., 1986).

Tabela 18: Dados espectroscópicos de ^1H e ^{13}C (δ DMSO- d_6 , 300 MHz) para os compostos CP-I, CP-II, acetina e Genkwanina.

Posição	Composto CP-I		Acetina		Composto CP-II		Genkwanina	
	$\delta_{\text{H mult.}}$ (J em Hz)	δ_{C}	$\delta_{\text{H; m.}}$ (J em Hz)	δ_{C}	$\delta_{\text{H; mult.}}$ (J em Hz)	δ_{C}	$\delta_{\text{H; m.}}$ (J em Hz)	δ_{C}
2		164,1		163,3		163,3		167,8
3	6,87 s	103,0	6,87 s	103,5	6,51 s	103,5	6,53 s	103,4
4		182,9		181,8		181,9		183,8
5		157,3		157,3		157,3		157,7
6	6,21 s	92,7	6,20 d (2,1)	94,0	6,38 s	97,9	6,31 d (2,0)	99,1
7		163,9		164,2		165,1		167,2
8	6,51 s	97,9	6,50 d (2,1)	98,8	6,77 s	92,9	6,63 d (2,0)	93,3
9		161,3		162,3		161,3		159,2
10		104,4		103,7		103,0		105,9
1'		123,5		122,8		121,4		118,8
2'	8,04 d (8,3)	128,5	8,05 dd (7,0, 2,0)	128,3	7,96 d (8,2)	128,5	7,78 d (8,8)	129,2
3'	7,11 d (8,4)	114,8	7,12 dd (7,0, 2,0)	114,5	6,94 d (8,4)	115,9	6,78 d (8,8)	116,3
4'		162,8		161,4		161,2		161,8
5'	7,11 d (8,4)	114,8	7,12 dd (7,0, 2,0)	114,5	6,94 d (8,4)	115,9	6,78 d (8,8)	116,3
6'	8,04 d (8,3)	128,4	8,05 dd (7,0, 2,0)	128,3	7,96 d (8,2)	128,5	7,78 d (8,8)	129,2
OCH ₃	3,85 s	55,1	3,86 s	56,1	3,86 s	56,1	3,88 s	55,8

5.3. Ácidos clorogênicos (compostos CP-IX a CP-X)

COMPOSTO CP-IX



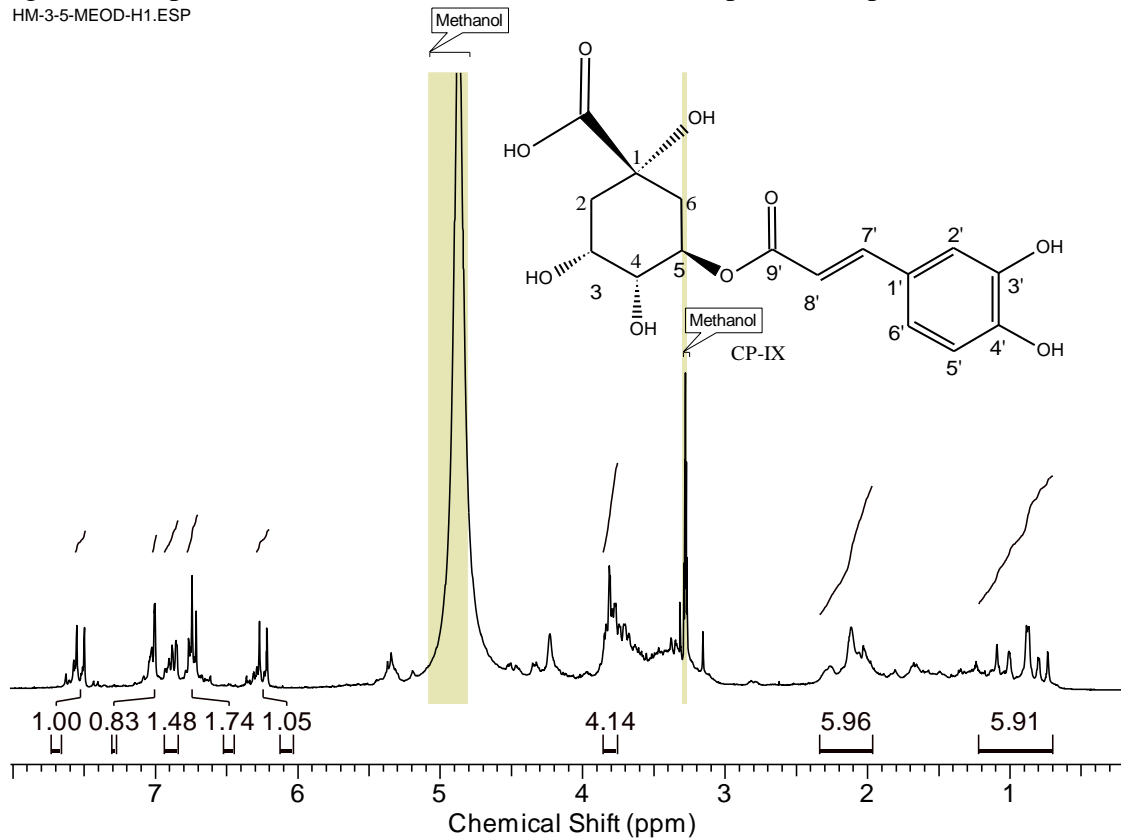
A determinação da estrutura do composto CP-IX foi realizada a partir da análise dos dados espectroscópicos de RMN ^1H , ^{13}C , COSY e HSQC. No espectro de RMN de ^1H (Figura 67 e 68) foram observados sinais na região de δ_{H} 2,11-2,27, referente aos hidrogênios H-2 e H-6, e sinais para os hidrogênios H-3, H-4 e H-5 em δ_{H} 5,36 (m), 3,72 (m) e 4,22 (m), respectivamente, característicos do esqueleto básico do ácido quínico.

A unidade cafeoila foi caracterizada pelos dupletos em δ_{H} 7,52 e 6,24 com a constante de acoplamento de 15,9 Hz, referentes aos hidrogênios oleofínicos em configuração *trans* H-7' e H-8', respectivamente, além dos dupletos em δ_{H} 7,02 ($J = 2,1$ Hz), 6,87 ($J = 8,9$ Hz) e 6,73 ($J = 8,4$ Hz), correspondentes aos hidrogênios aromáticos H-2', H-5' e H-6', respectivamente.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 69) mostra um sinal referente ao grupo (COOH) em δ_{C} 180,4, de quatro carbonos oximetínicos em δ_{C} 72,1 (C-5), 73,2 (C-3), 74,6 (C-4) e 77,9 (C-1), além da presença de dois carbonos metilênicos em δ_{C} 38,1 (C-2) e 40,2 (C-6), característicos do esqueleto do ácido quínico.

Figura 67: Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 300 MHz) para o composto CP-IX.

HM-3-5-MEOD-H1.ESP



HM-3-5-MEOD-H1.ESP

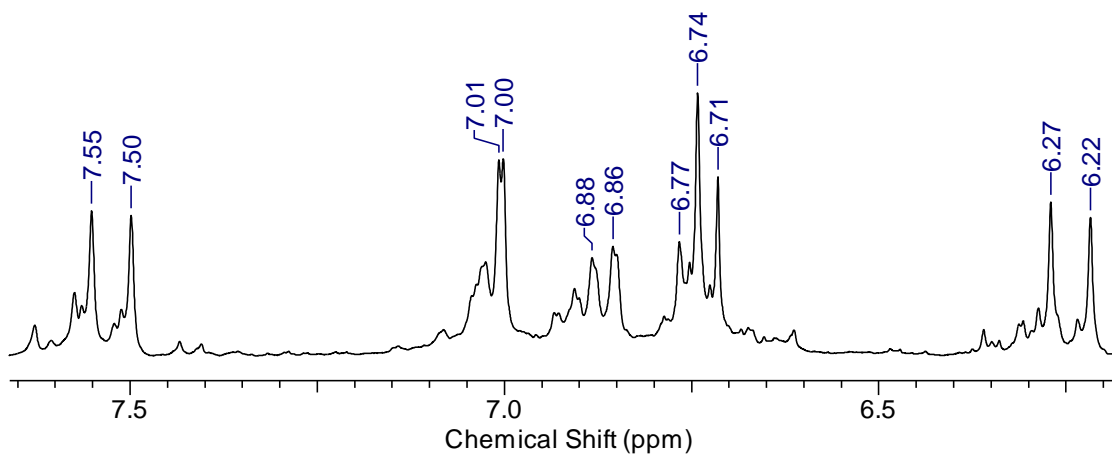
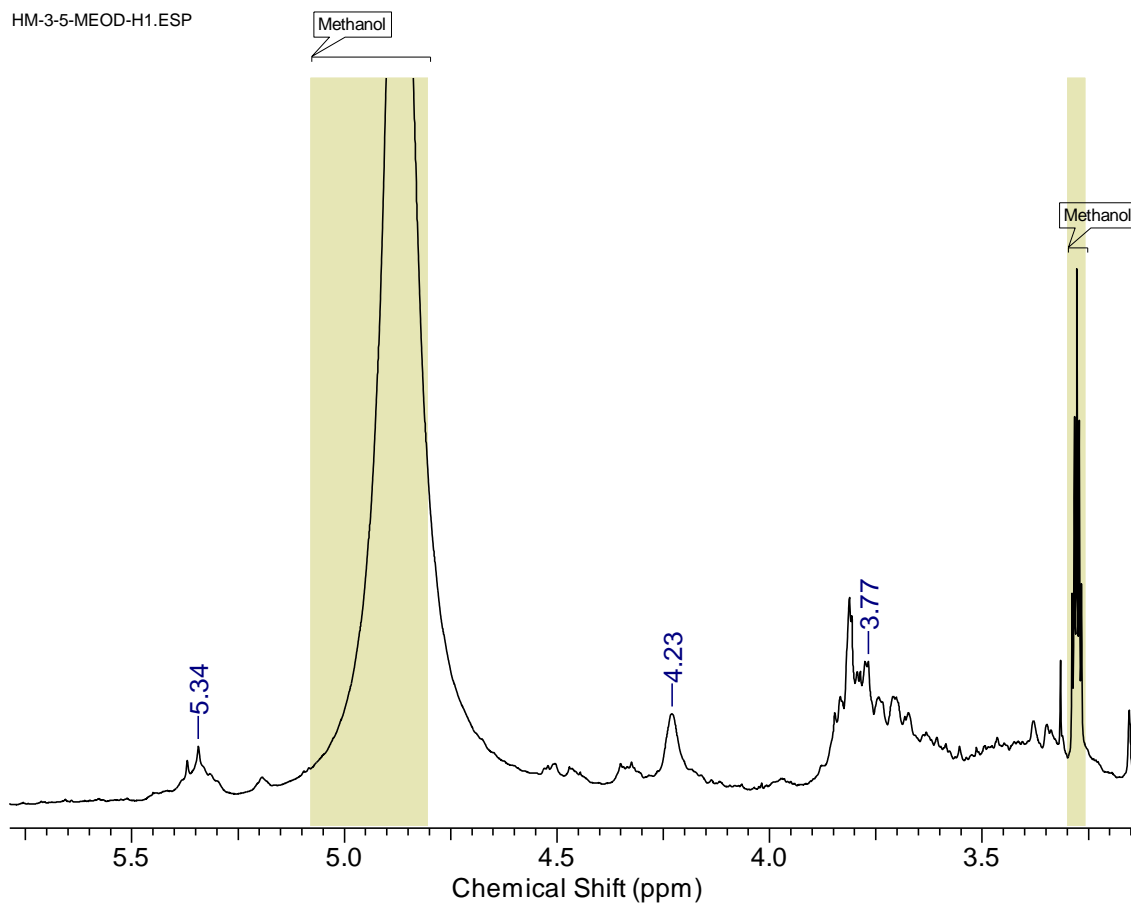


Figura 68: Expansão do espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 300 MHz) para o composto CP-IX.



HM-3-5-MEOD-H1.ESP

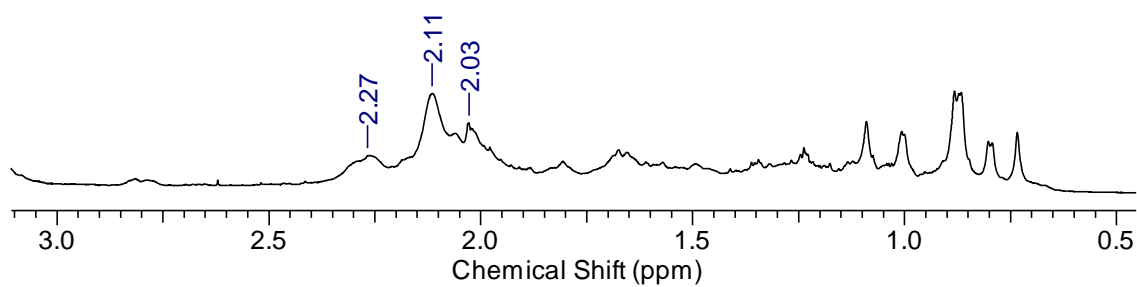
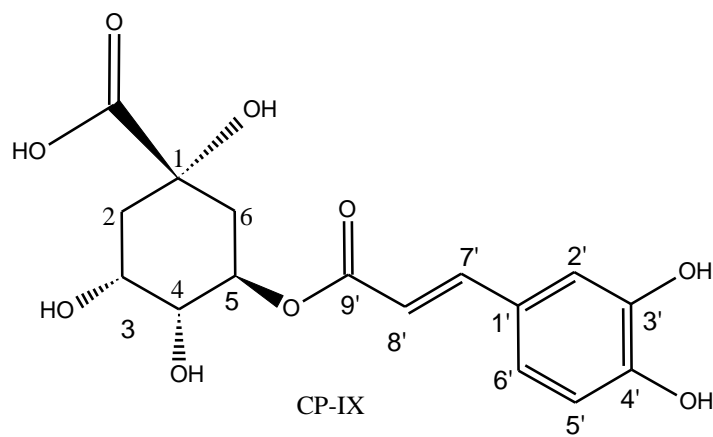
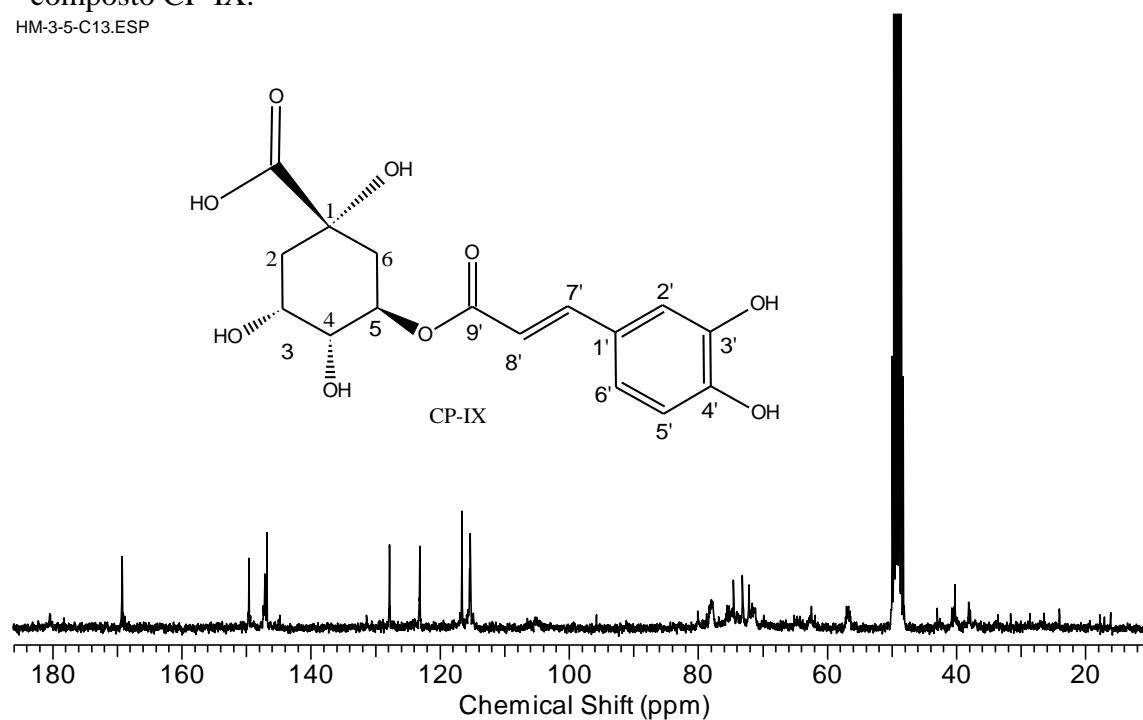
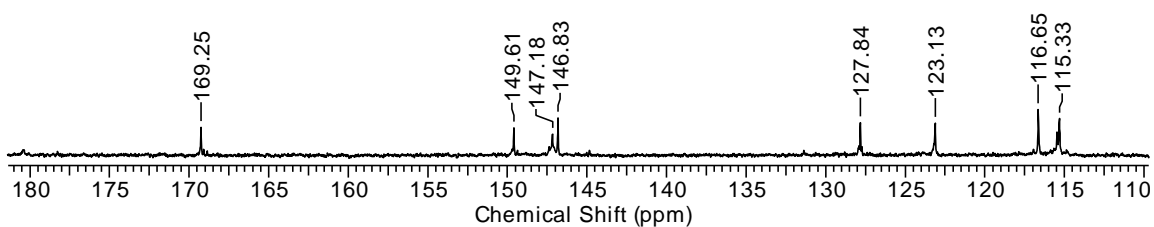


Figura 69: Espectro de RMN ^{13}C e suas expansões (CD_3OD , 75,5 MHz) para o composto CP-IX.

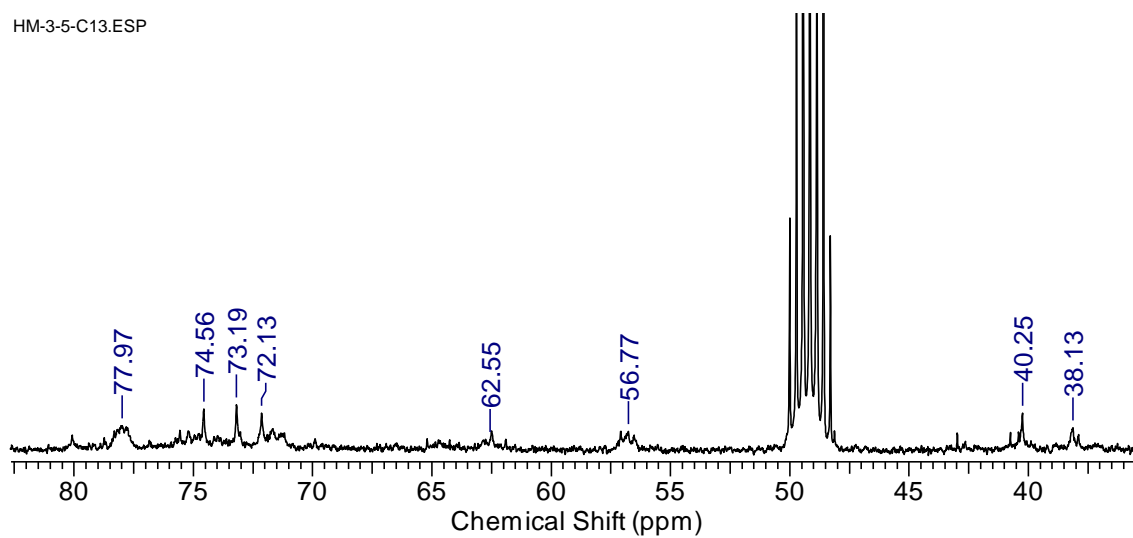
HM-3-5-C13.ESP



HM-3-5-C13.esp



HM-3-5-C13.ESP



Para a unidade cafeoila foi observado um sinal para carbonila em 169,2 (C-9'), sinais em δ_C 146,8 (C-7') e 115,5 (C-8'). A análise ainda confirma um carbono quaternário em δ_C 127,8, referente ao C-1', três carbonos pertencentes ao anel aromático em δ_C 115,3, 116,6 e 123,1, correspondentes aos C-2', C-5' e C-6', respectivamente.

O espectro de HSQC (Figura 70 e 71) mostrou a correlação entre o hidrogênio em δ_H 7,52 (d; J = 15,9 Hz) com o C-7' e H-6' com o carbono em δ_C 123,1. Além disso, a análise apresentou a correlação entre os carbonos C-2', C-5' e C-8' com os hidrogênios em δ_H 7,01 (d; J = 1,8 Hz), 6,73 (d; J = 8,1 Hz) e 6,24 (d; J = 15,9 Hz), respectivamente. Os hidrogênios metilênicos do ácido quínico na região em δ_H 2,11-2,26 foram correlacionados com os carbonos C-2 e C-6. Os hidrogênios oximetínicos H-3, H-4 e H-5 correlacionaram com os carbonos em δ_C 73,2, 74,6 e 72,1, respectivamente.

No espectro de COSY (Figura 72 e 73) observou-se a correlação entre o hidrogênio em δ_H 5,36 com o hidrogênio em 3,72, e a correlação entre o H-3 com os hidrogênios em δ_H 2,11 e 3,72.

A análise do espectro de HMBC para o composto CP-IX (Figuras 74, 75 e 76) mostrou a correlação entre os hidrogênios em δ_H 2,11(H-2) e 2,26 (H-6) com o carbono em δ_C 180,4, o qual não foi detectado no espectro de RMN de ^{13}C . Dessa forma, analisando os dados relatados na literatura (Tabela 18), foi possível propor a estrutura CP-IX como sendo a do composto denominado ácido 5-O-cafeoilquínico (LEE, et. al.; 2010) (Tabela 19). Esse composto não foi relatado para esse gênero.

Figura 70: Espectro de HSQC e sua expansão (CD₃OD, 300 MHz) para o composto CP-IX.

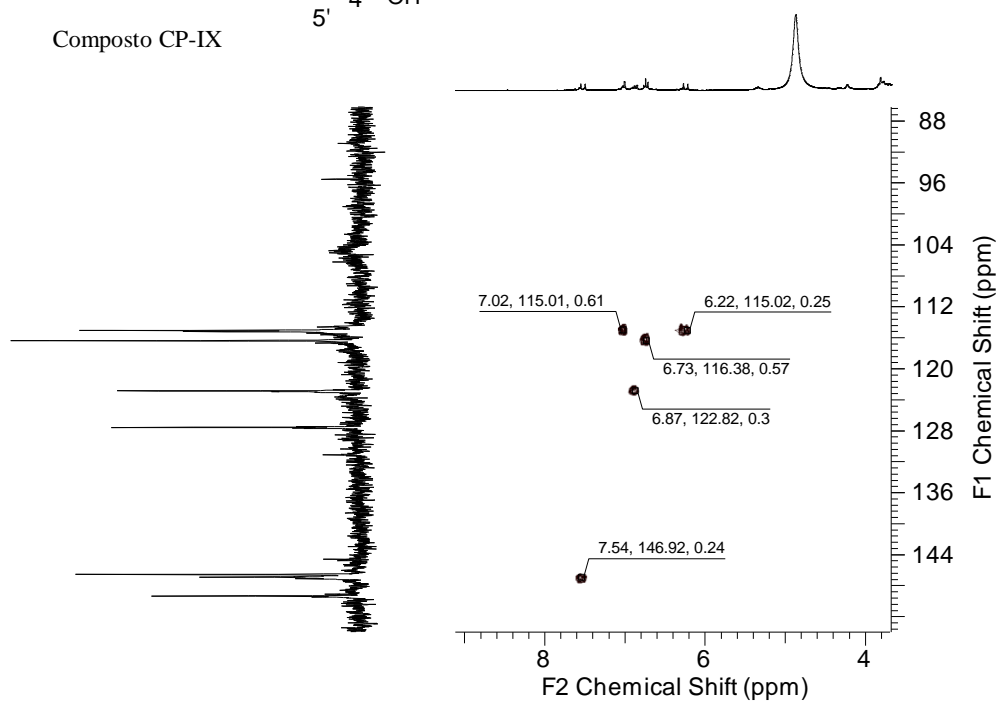
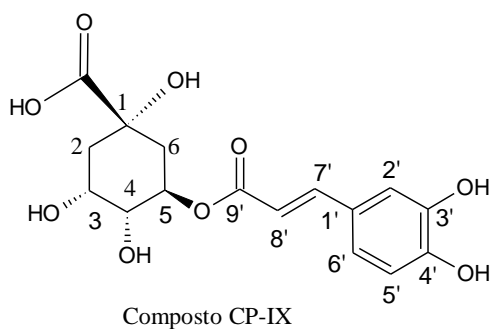
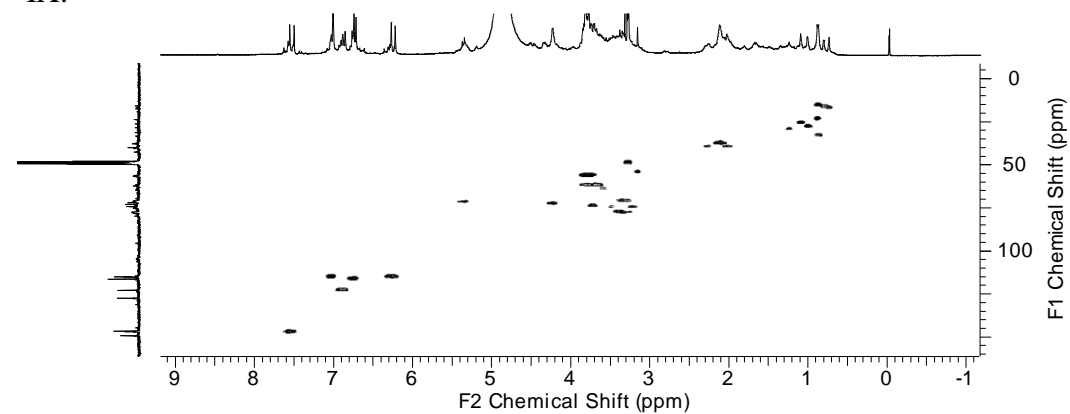


Figura 71: Expansão do espectro HSQC (CD_3OD , 300 MHz) para o composto CP-IX.

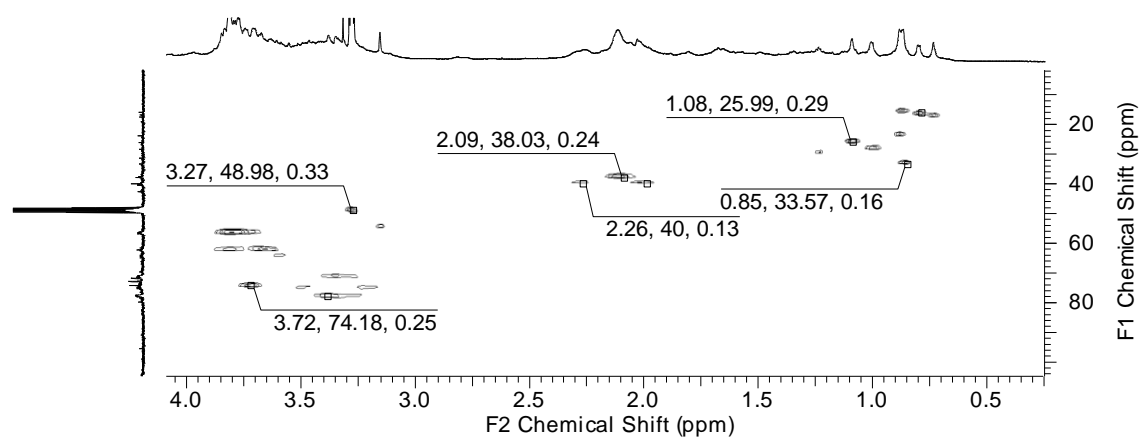
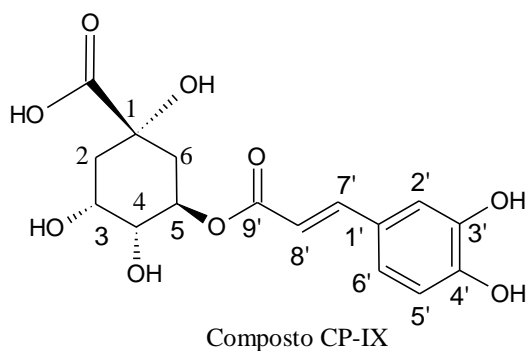
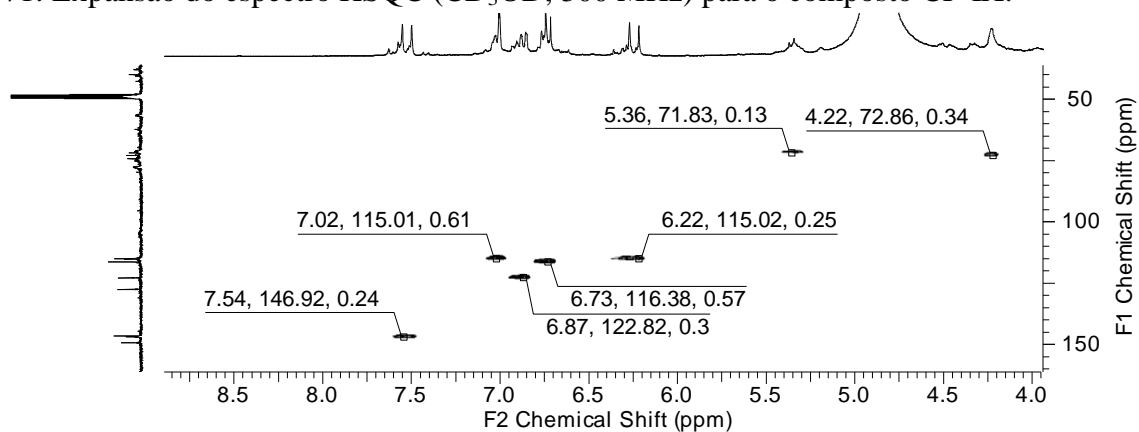


Figura 72: Espectro de COSY e expansão (CD₃OD, 300 MHz) para o composto CP-IX.

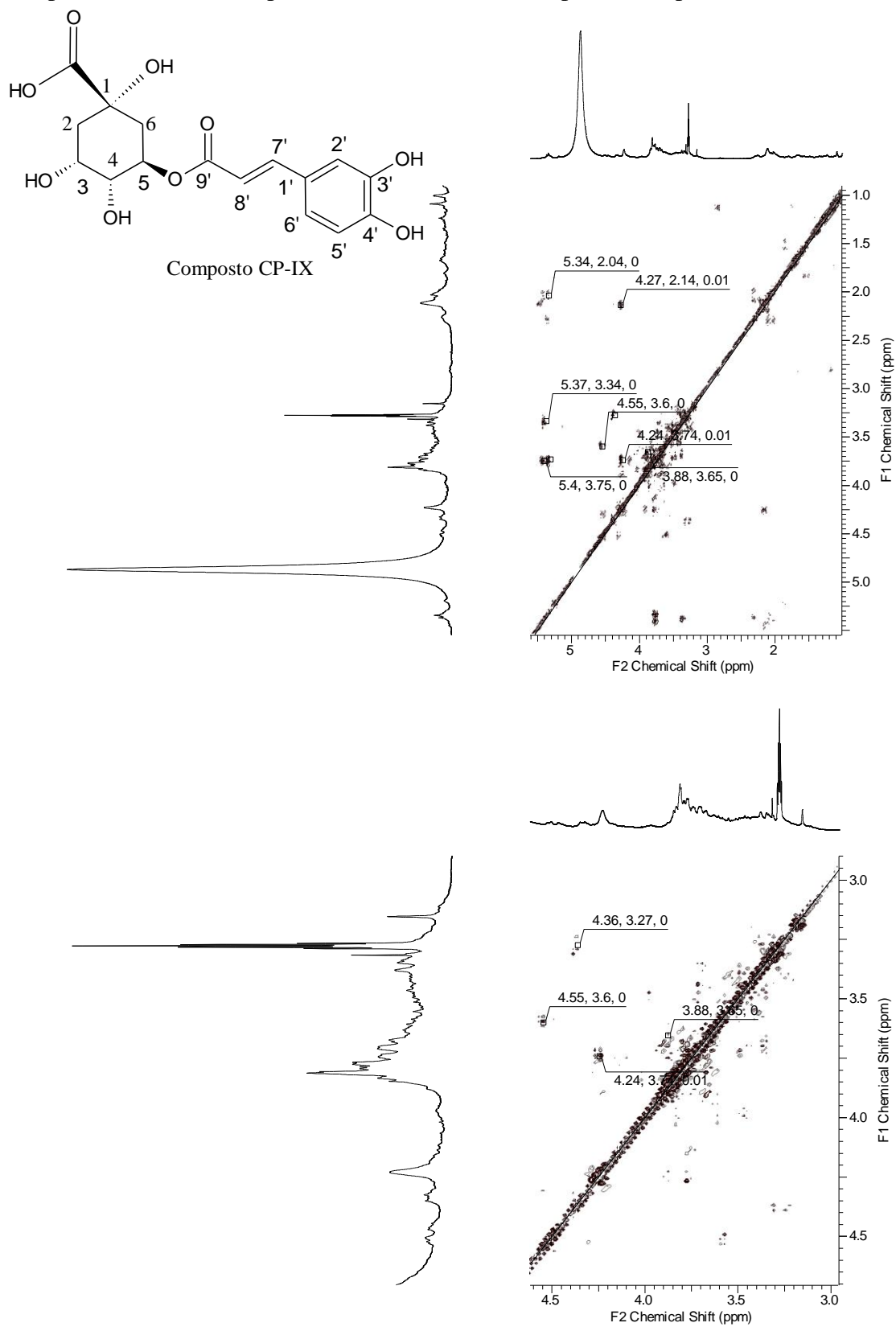


Figura 73: Expansão do espectro de COSY (CD₃OD, 300 MHz) para o composto CP-IX.

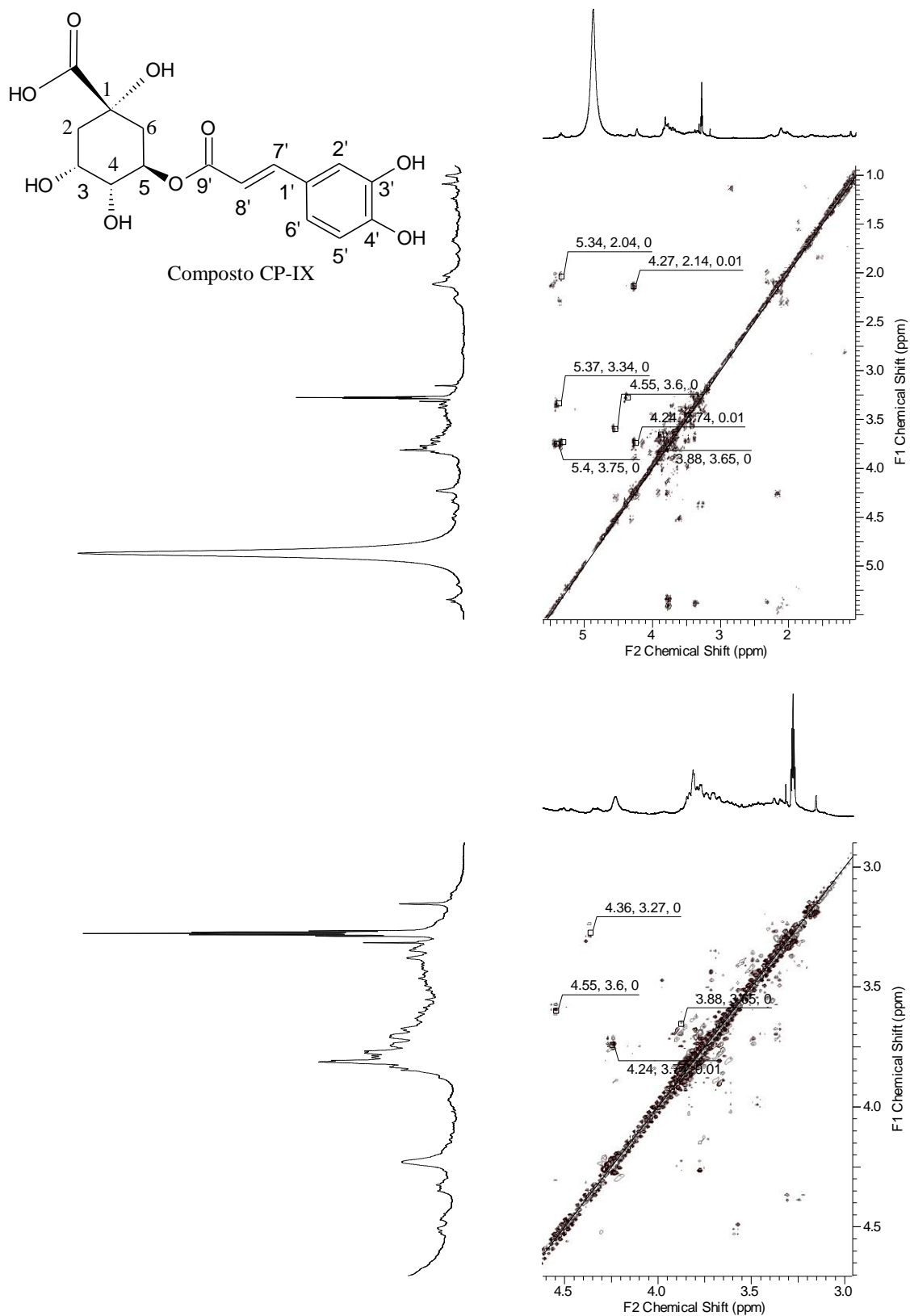


Figura 74: Espectro de HMBC e expansão (CD₃OD, 300 MHz) para o composto CP-IX.

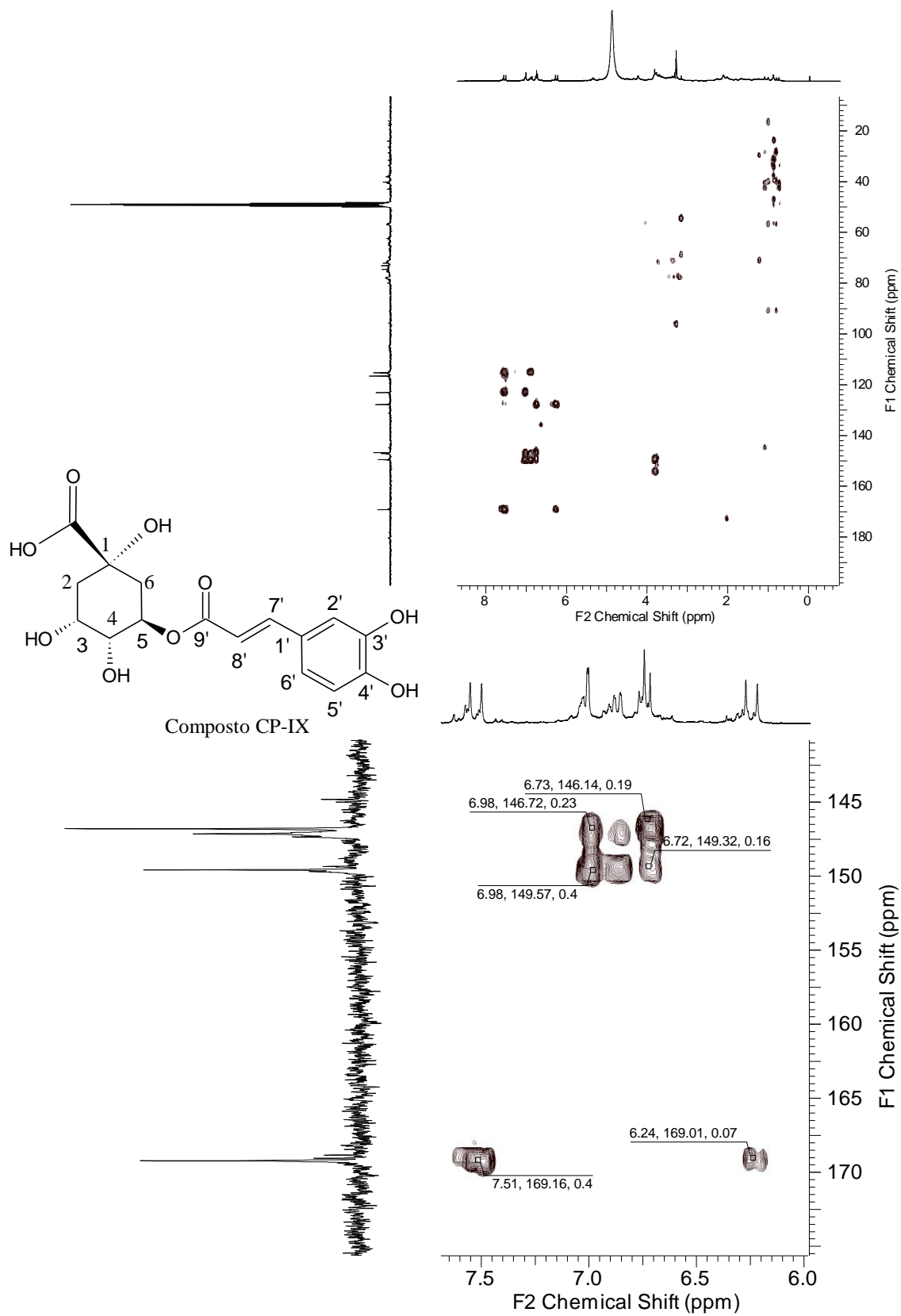


Figura 75: Expansão do espectro de HMBC (CD_3OD , 300 MHz) para o composto CP-IX.

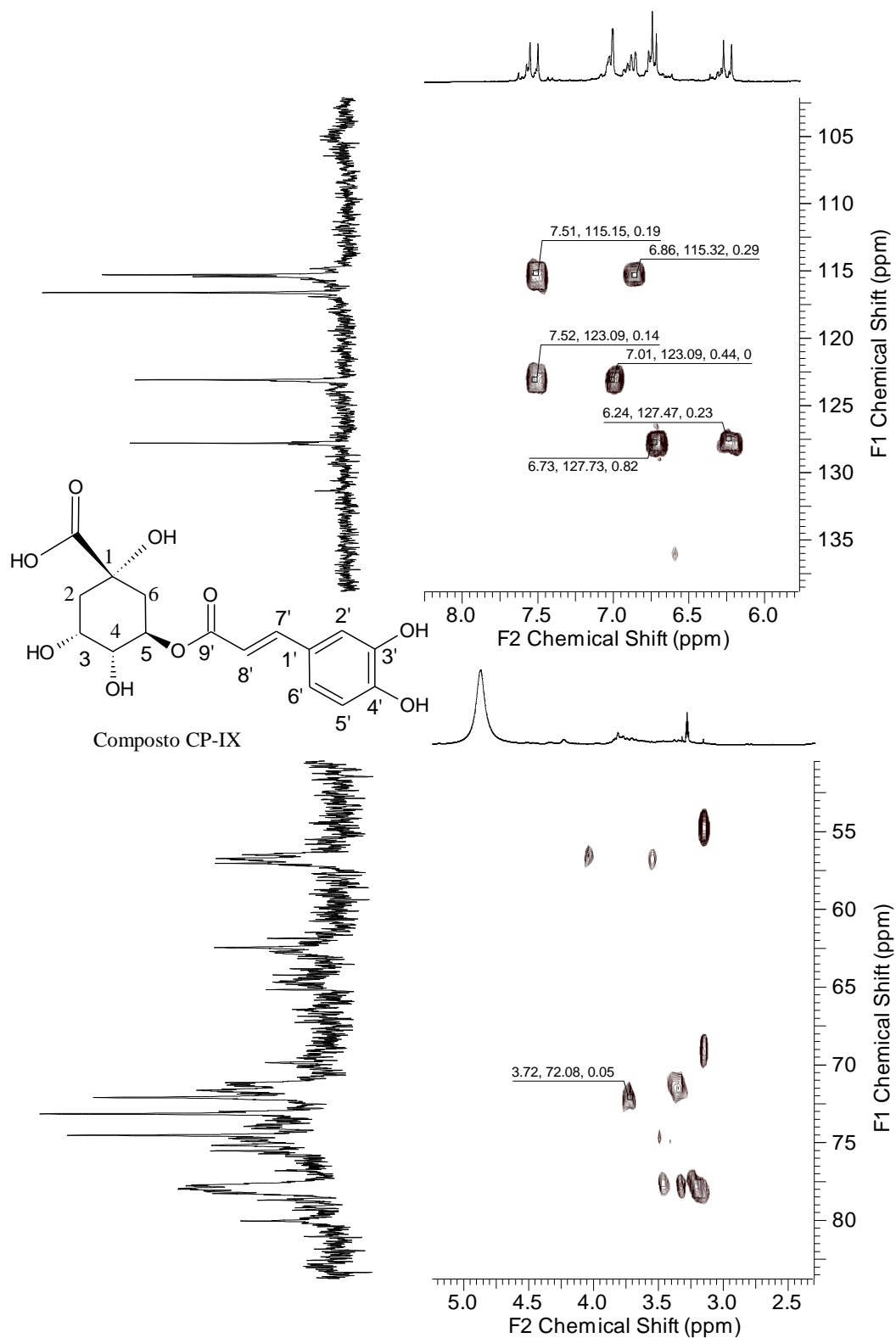


Figura 76: Expansão do espectro de HMBC (CD_3OD , 300 MHz) para o composto CP-IX.

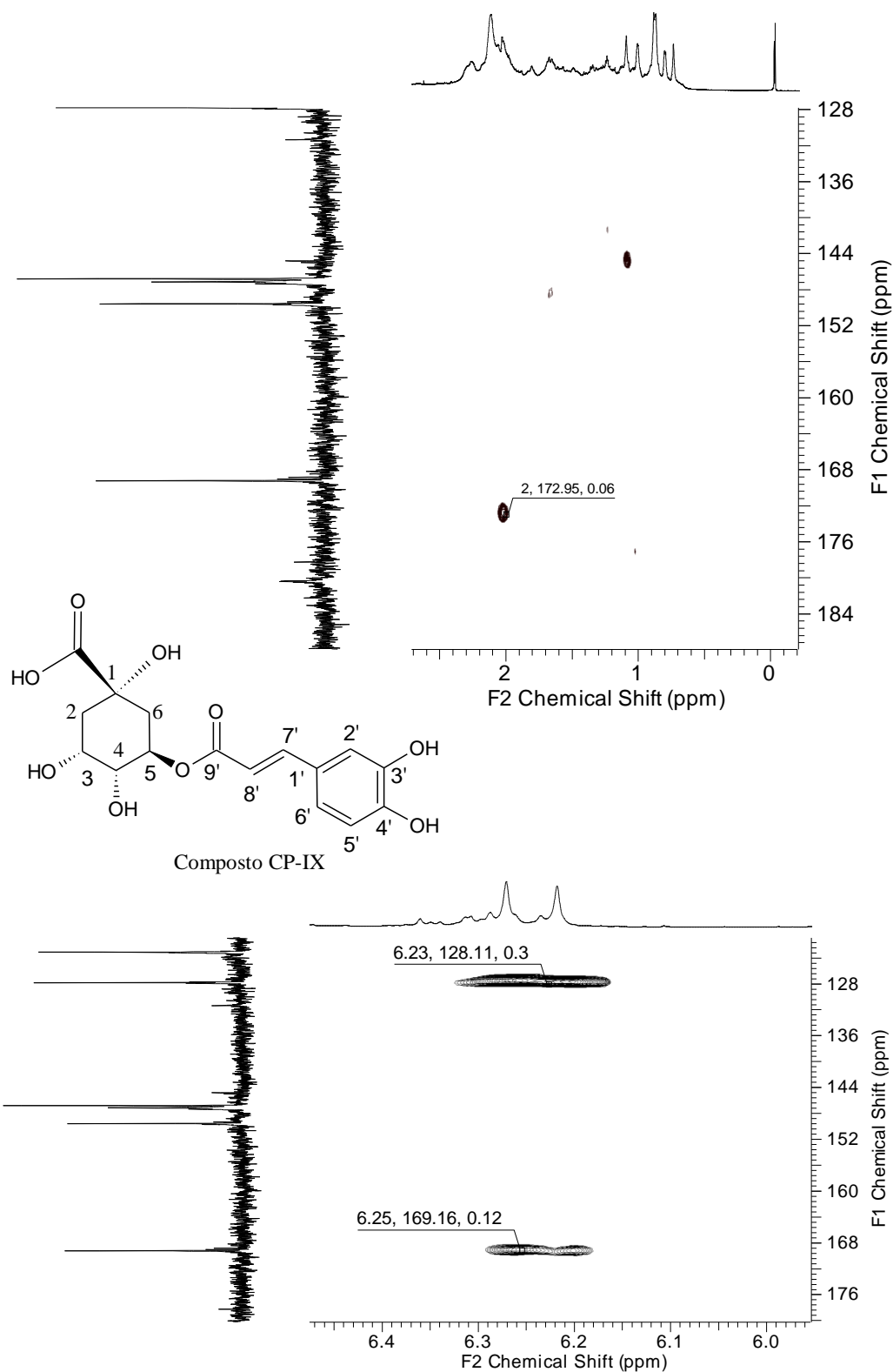


Tabela 19: Comparação de dados de deslocamento químico relatados na literatura para os compostos os ácidos 3-*O*-cafeoilquínico (3-CQN) e 5-*O*-cafeoilquínico (5-CQN) e o compostos CP-IX.

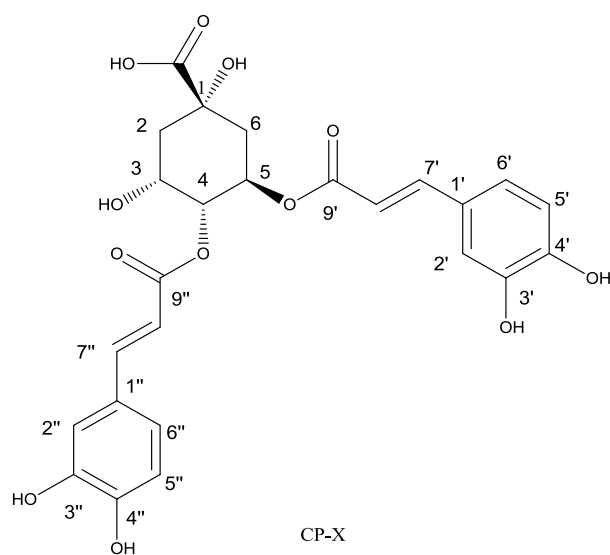
Código	CP-IX $\delta_{\text{H mult.}} (J = \text{Hz})$	CP-IX (δ_{C})	3-CQN ^a $\delta_{\text{H mult.}} (J = \text{Hz})$	3-CQN ^a (δ_{C})	3-CQN ^b $\delta_{\text{H mult.}} (J = \text{Hz})$	3-CQN ^b (δ_{C})	5-CQN ^c $\delta_{\text{H mult.}} (J = \text{Hz})$	5-CQN ^c (δ_{C})	5-CQN ^d $\delta_{\text{H mult.}} (J = \text{Hz})$	5-CQN ^d (δ_{C})
1		77,9		76,7		75,4		76,1		78,0
2	2,26 m	38,1	1,81 d (8,5)	40,0	2,13 m 2,20 dd (4,0; 15,0)	36,7	2,00-2,23 m	38,2	2,00 m 2,13 m	38,9
3	4,22 sl	72,1	5,12 dd (8,5; 9,0)	72,2	5,34 ddd (3,0; 3,0; 4,0)	73,0	4,15 dt (3,3; 5,4)	71,3	4,14 s	72,6
4	3,72 m	74,6	3,53 dd (2,8; 9,0)	73,6	3,63 dd (3,0; 9,0)	74,8	3,71 dd (3,1; 8,4)	73,5	3,63 dd (3,0; 9,0)	75,0
5	5,36 m	73,2	3,94 ddd (1,5; 2,4; 2,8)	72,0	4,14 ddd (3,0; 9,0; 9,0)	68,3	5,32 ddd (4,4; 8,9; 9,0)	72,0	5,34 m	73,1
6	2,11 m	40,2	1,95 dd (2,4; 11,9) 1,67 dd (1,5; 11,9)	38,4	1,95 dd (9,0; 14,0)	41,5	2,00-2,23 m	38,8	2,00 m 2,13m	40,6

^aANDRADE-CETTO e WIEDENFELD, 2001; ^bNAKATANI, et. al; 2000; ^cLEE, et. al.; 2010; ^dCHEN, et. al., 2007).

Tabela 20: Dados espectroscópicos de ^1H e ^{13}C (δ CD_3OD , 300 MHz) do Ácido 5-*O*-cafeoilquínico e o composto CP-IX.

N°	Ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquínico			^b CP-IX		
	$\delta_{\text{H mult.}}$ (J em Hz)	δ_{C}	$\delta_{\text{H mult.}}$ (J em Hz)	δ_{C}	COSY	HMBC
1		76,1		77,9		
2	2,00-2,23 m	38,2	2,11 m	38,1		172,7
3	4,15 dt (3,3; 5,4)	71,3	4,22 sl	73,2	2,11	
4	3,71 dd (3,1; 8,4)	73,5	3,72 m	74,6		72,1
5	5,32 ddd (4,4; 8,9; 9,0)	72,0	5,36 m	72,1	3,72;	
6	2,00-2,23 m	38,8	2,26 m	40,2		175,9
COOH		177,0		172,7		
Cafeoil						
1'		127,8		127,8		
2'	7,04 d (2,0)	115,2	7,01 d (1,8)	115,3		123,1; 146,8; 149,6
3'		146,8		147,2		
4'		149,6		149,6		
5'	6,77 d (8,2)	116,5	6,73 d (8,1)	116,6		127,8; 147,2; 149,6
6'	6,95 dd (2,1; 8,1)	123,0	6,87 d (8,4)	123,1		115,3
7'	7,55 d (15,9)	147,7	7,52 d (15,9)	146,8	6,24	115,3; 123,1; 169,2
8'	6,25 d (15,9)	115,3	6,24 d (15,9)	115,5		127,8; 169,2
9'		168,7		169,2		

COMPOSTO CP-X



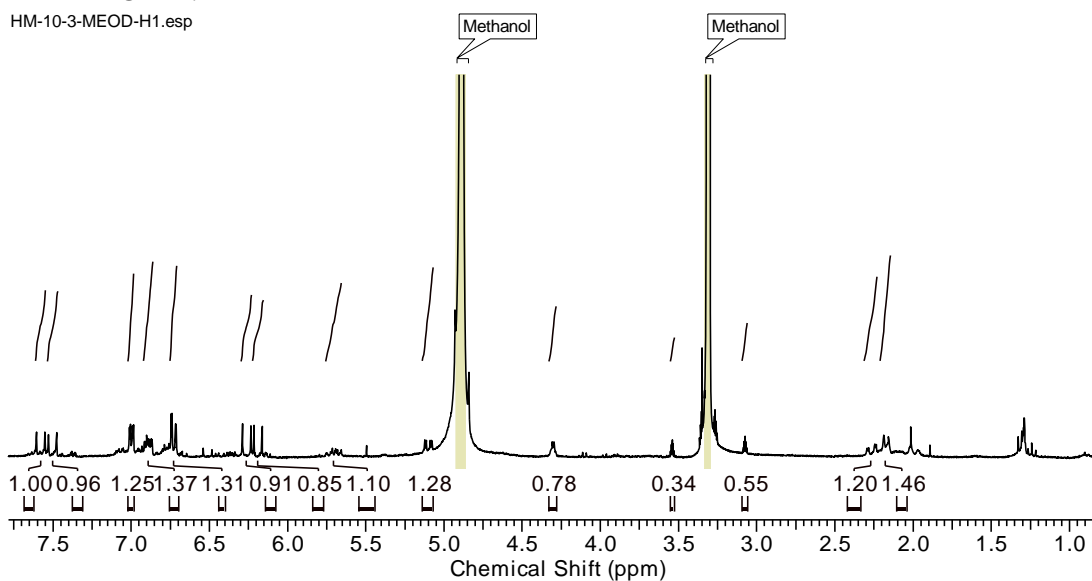
A determinação da estrutura do composto **CP-X** foi realizada a partir da análise dos dados espectroscópicos de RMN ^1H , ^{13}C , COSY e HSQC. O composto **CP-X** é um derivado do ácido clorogênico, contendo dois grupos cafeoila ligados ao C-4 e C-5.

O espectro de RMN de ^1H (Figuras 77 e 78) mostrou dois dupletos em δ_{H} 7,58 e 6,26 ($J = 15,9$ Hz) correspondentes aos hidrogênios H-7' e H-8' do grupo cafeoila ligado ao C-5 e dois dupletos em δ_{H} 7,50 e 6,19 ($J = 15,8$ Hz) referentes aos hidrogênios H-7'' e H-8'', pertencentes à outra unidade cafeoila ligada ao C-4. A correlação entre esses hidrogênios foi evidenciada pelo espectro de COSY (Figuras 79 e 80).

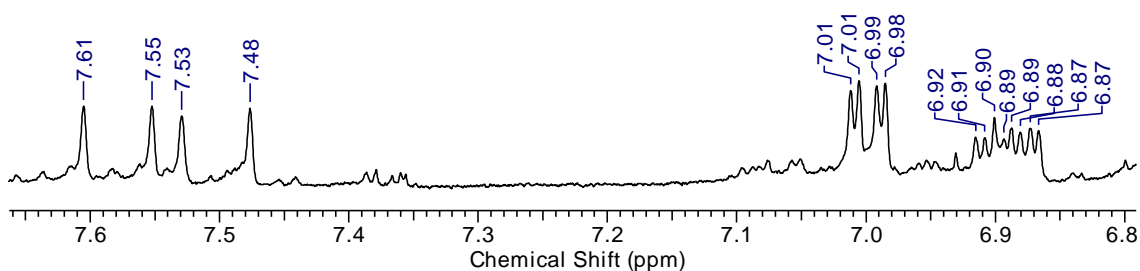
O espectro de COSY mostrou ainda a correlação do hidrogênio em δ_{H} 5,10 (dd, $J = 3,0$ e $9,0$ Hz) com o H-3 e H-5 e a correlação do H-2 e H-6 com os hidrogênios em δ_{H} 4,31 (d; $J = 2,9$) e 5,71 (m).

Figura 77: Espectro de RMN de ^1H e expansão (CD_3OD , 300 MHz) para o composto CP-X.

HM-10-3-MEOD-H1.esp



HM-10-3-MEOD-H1.esp



HM-10-3-MEOD-H1.esp

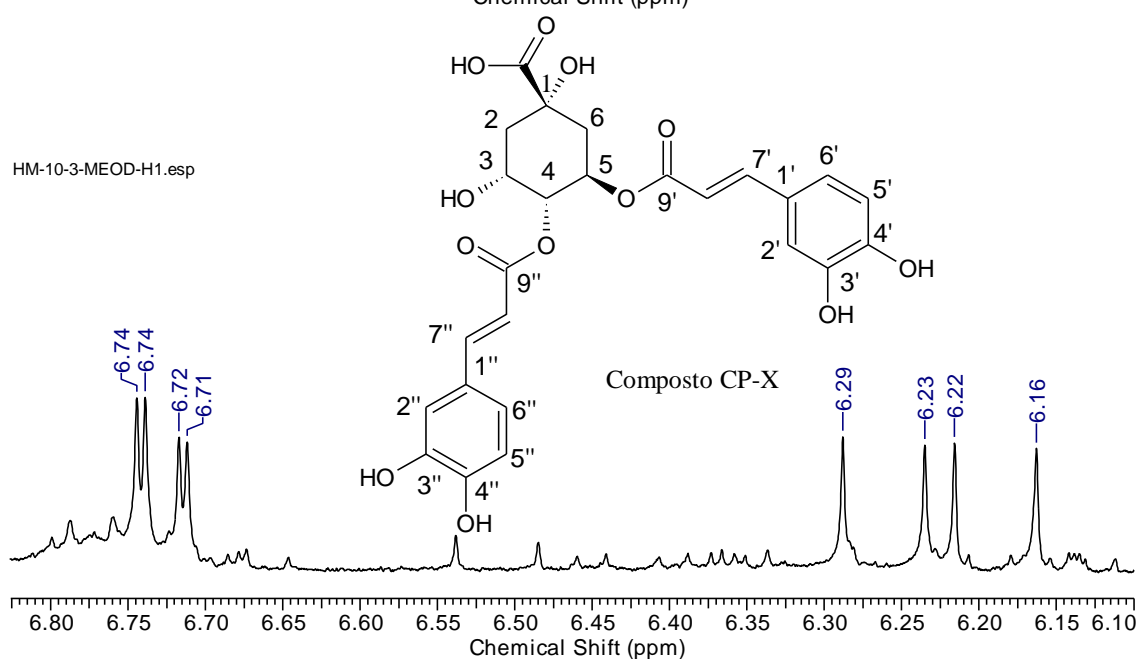


Figura 78: Expansão do espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 300 MHz) para o composto CP-X.

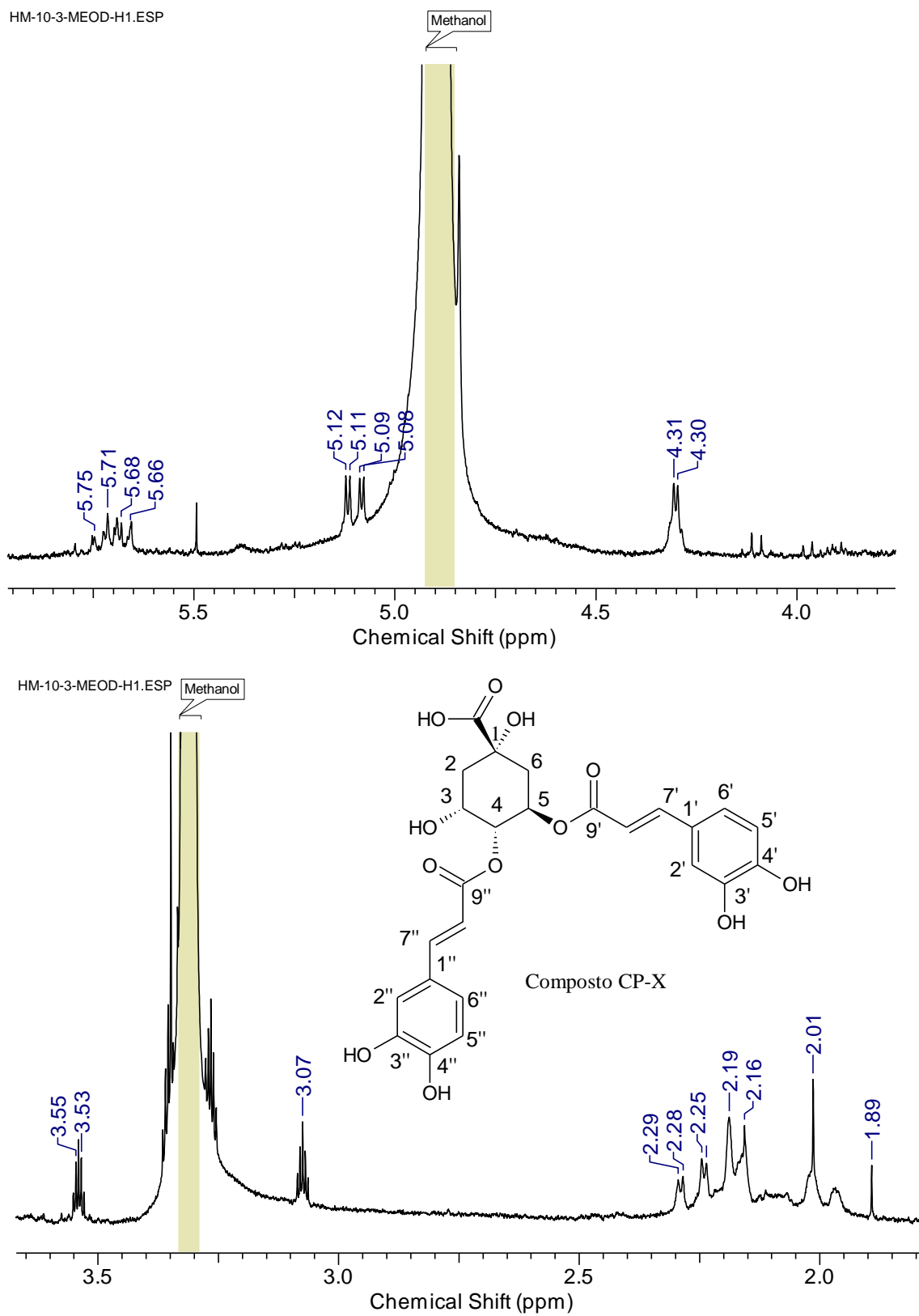


Figura 79: Espectro de COSY e expansão (CD₃OD, 300 MHz) para o composto CP-X.

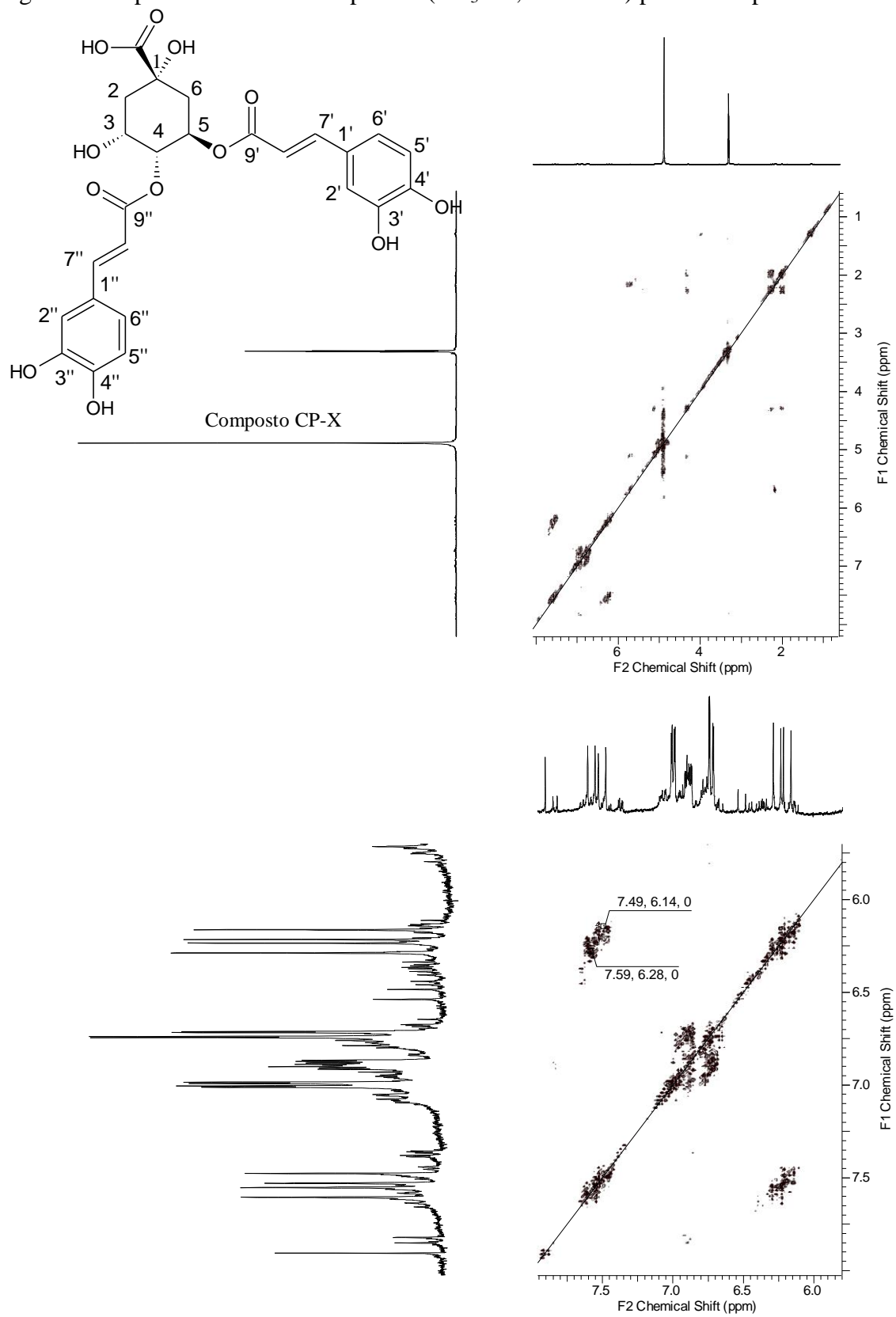
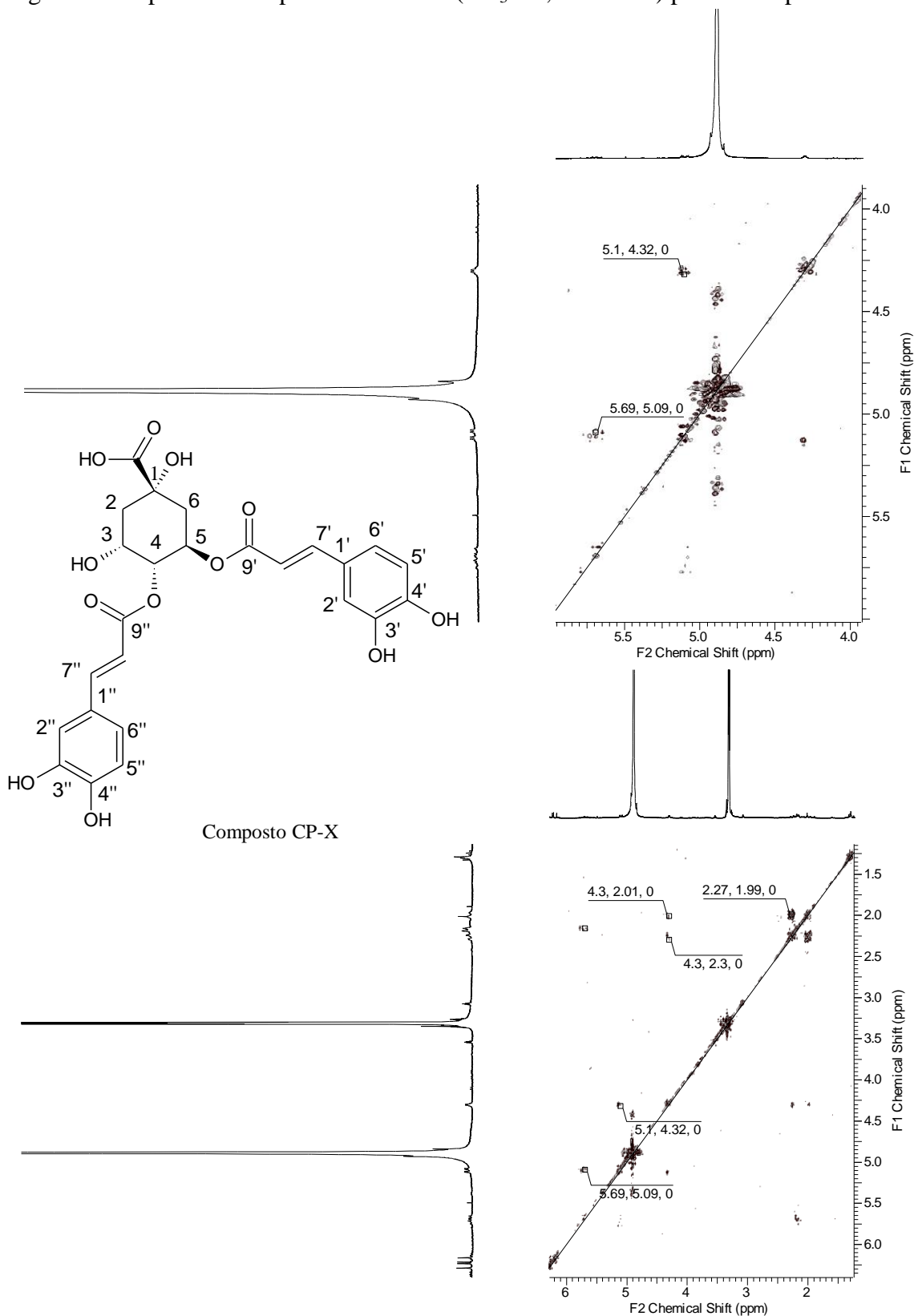


Figure 80: Expansão do espectro de COSY (CD₃OD, 300 MHz) para o composto CP-X.



Para elucidar a estrutura do composto CP-X foram analisados vários dados espectroscópicos de RMN de ¹H de vários derivados do ácido clorogênico com

substituições nos carbonos C-3, C-4 e C-5 (NOGATA et al., 2001; SHI et al., 2007; Kim et al., 2011) (Figura 81). Comparando esses dados foi possível observar que a multiplicidade e a constante de acoplamento dos hidrogênios H-3, H-4 e H-5 são dependentes da posição dos substituintes do esqueleto químico do ácido quínico. A partir dessas comparações, em conjunto com os de RMN ^{13}C e comparação com a literatura (Tabela 21), foi possível propor o composto CP-X como ácido 4,5-*O*-dicafeoilquínico (MORISHITA et. al., 1984; SHI et. al., 2007; PARK et. al., 2009). Esse composto ainda não foi relatado para esse gênero.

Figure 81: Estruturas de derivados do ácido clorogênico com substituição nos carbonos C-3, C-4 e C-5.

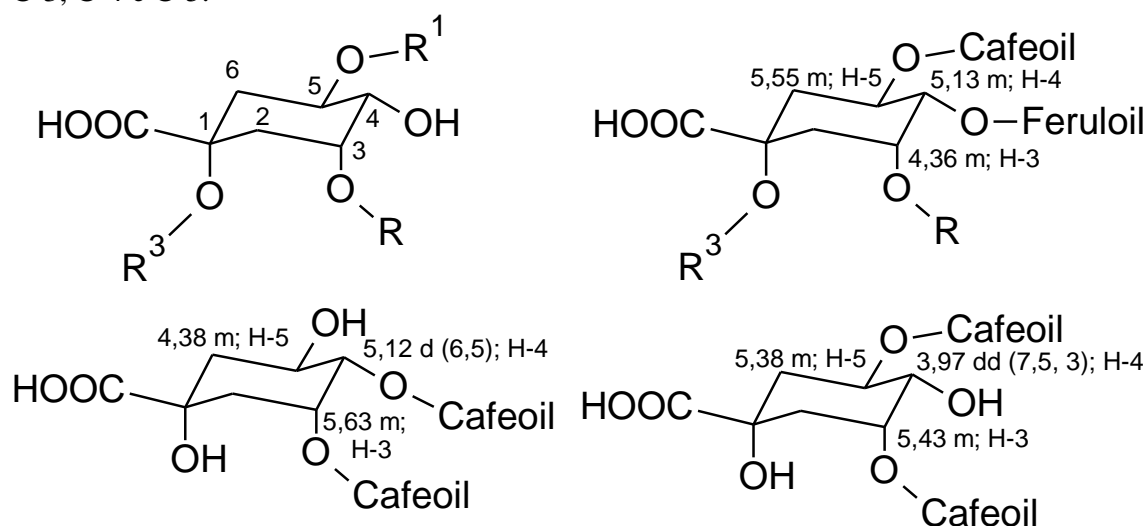


Tabela 21: Dados espectroscópicos de ^1H e ^{13}C (δ CD_3OD , 300 MHz) do ácido 4,5-O-dicafeoilquinico e o composto CP-X.

Ácido 4,5-O-dicafeoilquinico		Composto CP-X			
Nº	$\delta_{\text{H mult.}}$ (J em Hz)	δ_{C}	$\delta_{\text{H mult.}}$ (J em Hz)	δ_{C}	COSY
1		76,2		77,7	
2	2,26 m	38,5	2,01 m	39,1	
3	4,35 sl	69,8	4,31 d (2,9)	71,1	2,01
4	5,09 d (7,2)	76,1	5,10 dd (3,0; 9,0)	77,5	4,31
5	5,74 sl	69,2	5,71 m	69,6	2,18
6	2,26 m 2,10 m	39,8	2,18 m	41,1	
COOH		176,8		180,7	
Cafeoil					
1'		127,6		127,7	
2'	6,99 sl	115,2	6,99 d (2,1)	115,0	
3'		146,7		147,7	
4'		149,6		149,9	
5'	6,71 m	116,4	6,74 dd (1,6; 8,1)	116,6	
6'	6,88 d (8,0)	123,2	6,91 m	123,3	
7'	7,56 d (15,6)	147,7	7,58 d (15,8)	146,9	
8'	6,25 d (15,6)	114,7	6,26 d (15,8)	115,1	
9'		168,6		168,7	
1''		127,5		127,8	
2''	6,96 sl	115,1	7,01 d (2,0)	115,0	
3''		146,7		147,7	
4''		149,6		147,5	
5''	6,71 m	116,4	6,74 dd (1,6; 8,1)	116,6	
6''	6,85 d (8,0)	123,2	6,91 m	123,2	
7''	7,48 d (15,6)	147,5	7,50 d (15,8)	146,9	6,19
8''	6,15 d (15,6)	114,7	6,19 d (15,8)	115,1	
9''		168,3		168,9	

5.4. Análises por LC-MS dos compostos e frações da planta *Calea parvifolia*

COMPOSTOS CP-III a CP-VIII

As análises da mistura de compostos CP-III e CP-IV por infusão direta foram realizadas em modo positivo, utilizando fonte de ionização por eletrospray (IES) em espectrômetro de massas com analisador sequencial do tipo triplo-quadrupolo. As análises no modo MS para esses compostos apresentaram os íons de m/z 365 e 367 correspondentes as lactonas sesquiterpênicas protonadas tirotundina-3-*O*-metil éter (SCHUSTER, et. al., 1992) e para o seu derivado com o grupo iso-butiroilóxi na posição C-8. O estudo de fragmentação empregando espectrometria massas sequencial (EM/EM) desses íons precursores mostraram um padrão de fragmentação semelhante, apresentando íons fragmentos com diferentes intensidades. Esta variação na intensidade está relacionada com a capacidade de ionização das moléculas. Estudos que avaliaram os valores de basicidade em fase-gasosa para o esqueleto do tipo furanoeliangolídeo sugerem que a região de maior basicidade está localizada nos átomos de oxigênios, e esses cinco sítios de protonação preferenciais dirigem as reações de protonação em fase gasosa e favorecem a clivagem específica (Figura 82 e 83) (SARTORI, et. al., 2014).

Figura 82: Estruturas de lactonas tetra- e diidro-furanoeliangolídeos com seu respectivos sítios de protonação em fase gasosa.

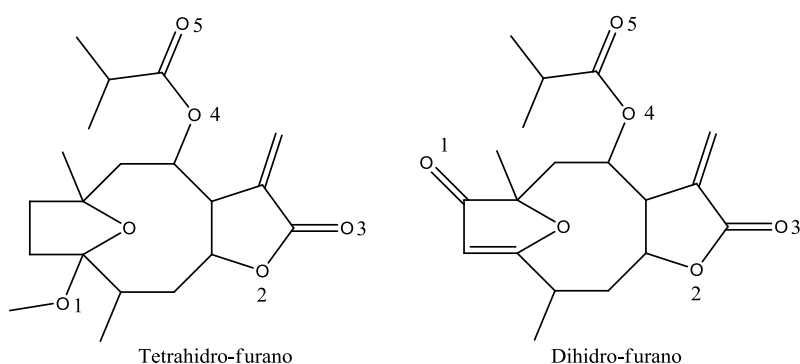
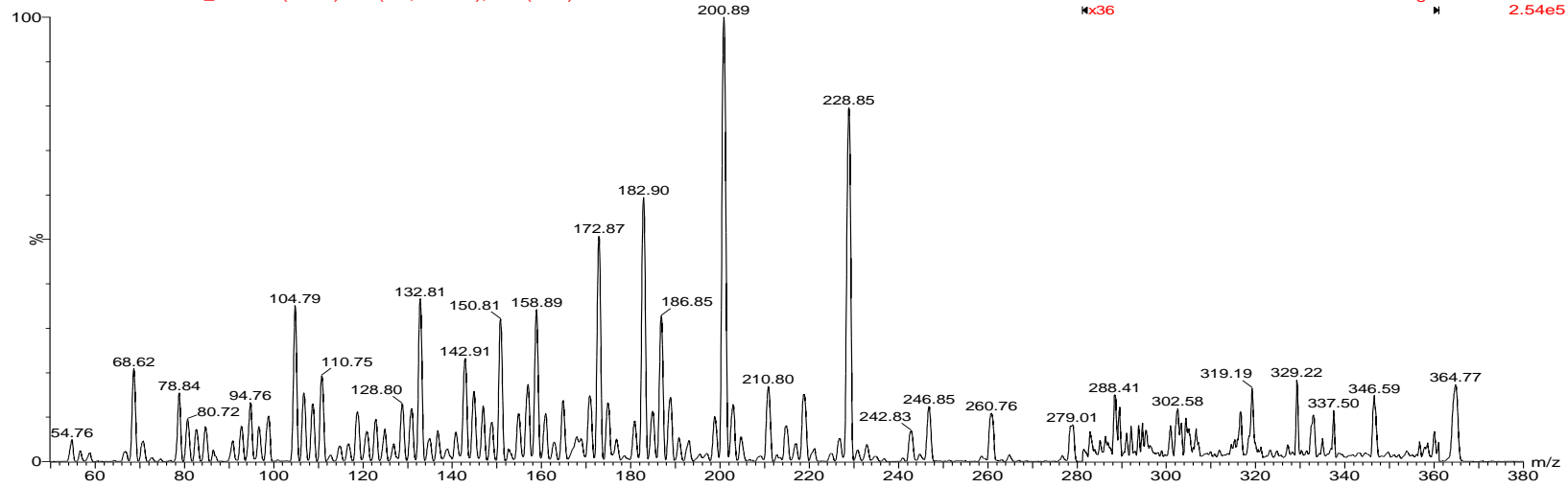


Figura 83: Espectro de ESI(+)-MS/MS para mistura de compostos CP-III e CP-IV.

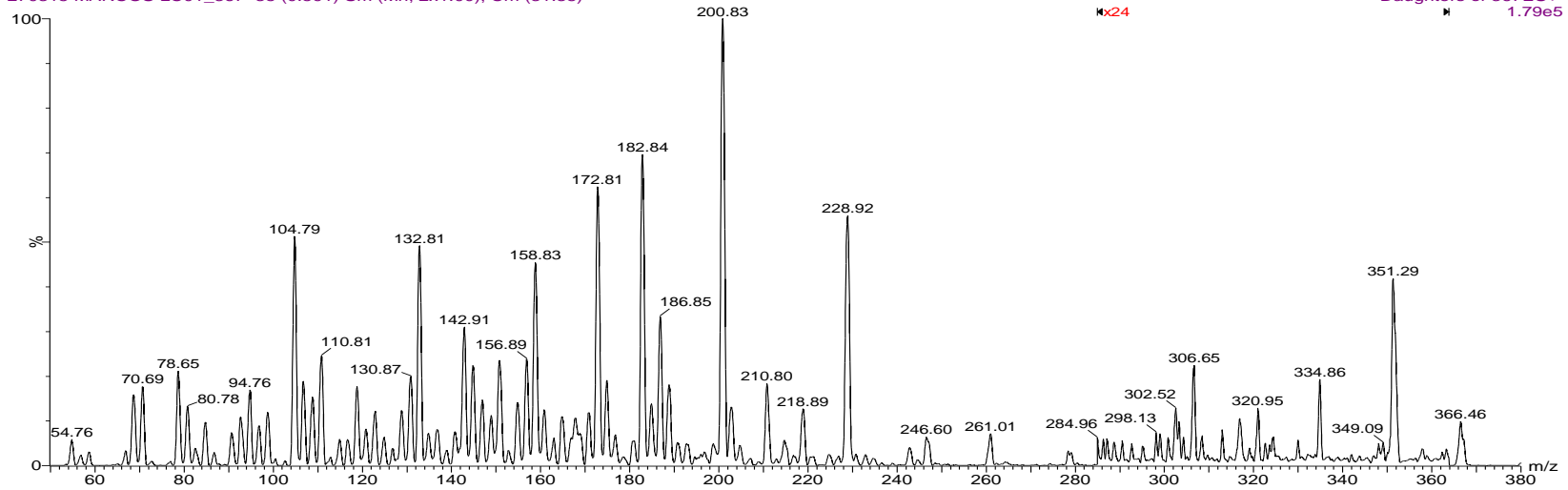
modo pos MSMS

270315 MARCOS LC01_365 12 (0.203) Sm (Mn, 2x1.00); Cm (8:15)



modo pos MSMS

270315 MARCOS LC01_367 35 (0.591) Sm (Mn, 2x1.00); Cm (31:38)



Estudos relacionados a valores de basicidade em fase-gasosa para lactonas sesquiterpênicas, utilizando o modelo de B3LYP/6-31G(d), propõe que a protonação no oxigênio na posição um (O-1) possibilita uma interação do próton com o oxigênio na posição seis (O-5) dando origem a uma coordenação intramolecular. Essa interação pode dirigir a migração de um próton depois da ativação, gerando os íons fragmentos de m/z 69 e 71 via a formação de íons acílio proveniente da clivagem do grupo éster ligado na posição C8. Esses sítios são responsáveis por direcionar a formação de agregados iônicos e descrever a estereoquímica do grupo éster ligados no carbono C8 (CROTTI, et. al., 2005, SARTORI, et. al., 2014). Analisando o perfil de fragmentação em modo positivo para mistura de compostos CP-III e CP-IV (Figura 82, Tabela 20) em 35 eV, observou-se a presença de dois íons em m/z 201 (pico base) $[C_{14}H_{17}O]^+$ e m/z 229 $[C_{15}H_{17}O_2]^+$. Esses íons não foram observados nas lactonas sesquiterpênicas com o grupo diidrofurano, como nos compostos CP-V, CP-VI, CP-VII e CP-VIII.

As Figuras 84, 85 e 86 apresentam as propostas de fragmentações para os compostos CP-III e CP-IV. A comparação dos espectros de fragmentação de massas entre os compostos CP-III e CP-IV mostrou diferenças significativas em relação às outras lactonas sesquiterpênicas isoladas. Dessa forma, podemos sugerir que os compostos com estruturas constituídas por unidades tetraidrofurano possuem tendência de fragmentação diferenciada aos compostos com unidades diidrofurano.

Para os compostos CP-V, CP-VI, CP-VII e CP-VIII, que apresentam um grupo cetona na posição C1 (Figura 82) foi observada a presença dos íons fragmentos de m/z 69 e/ou 71 e/ou 278 (Figuras 87 a 90). Esses íons são característicos de lactonas sesquiterpênicas do tipo furanoeliangolídeos (CROTTI, et. al., 2005; SARTORI, et. al., 2014). Os principais íons detectados durante o estudo de fragmentação desses compostos estão listados na Tabela 22.

Figura 84: Proposta de fragmentação para o composto CP-III.

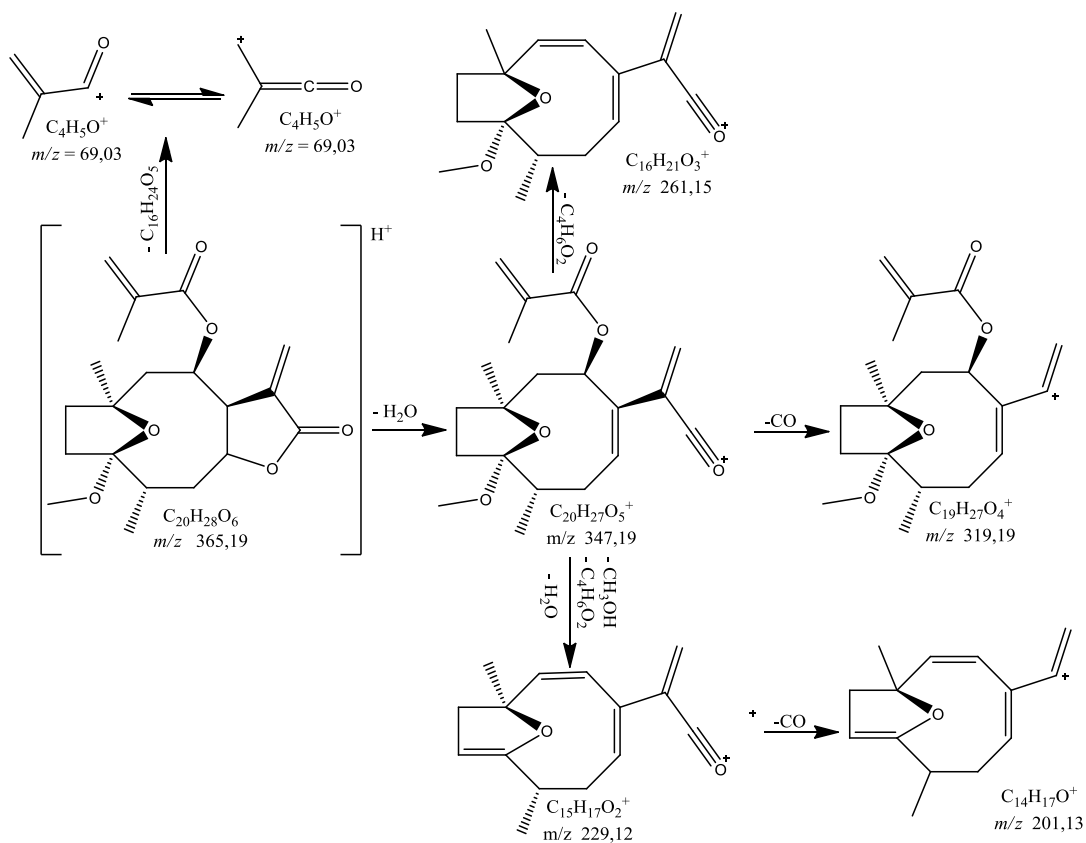


Figura 85: Proposta de fragmentação para o composto CP-IV.

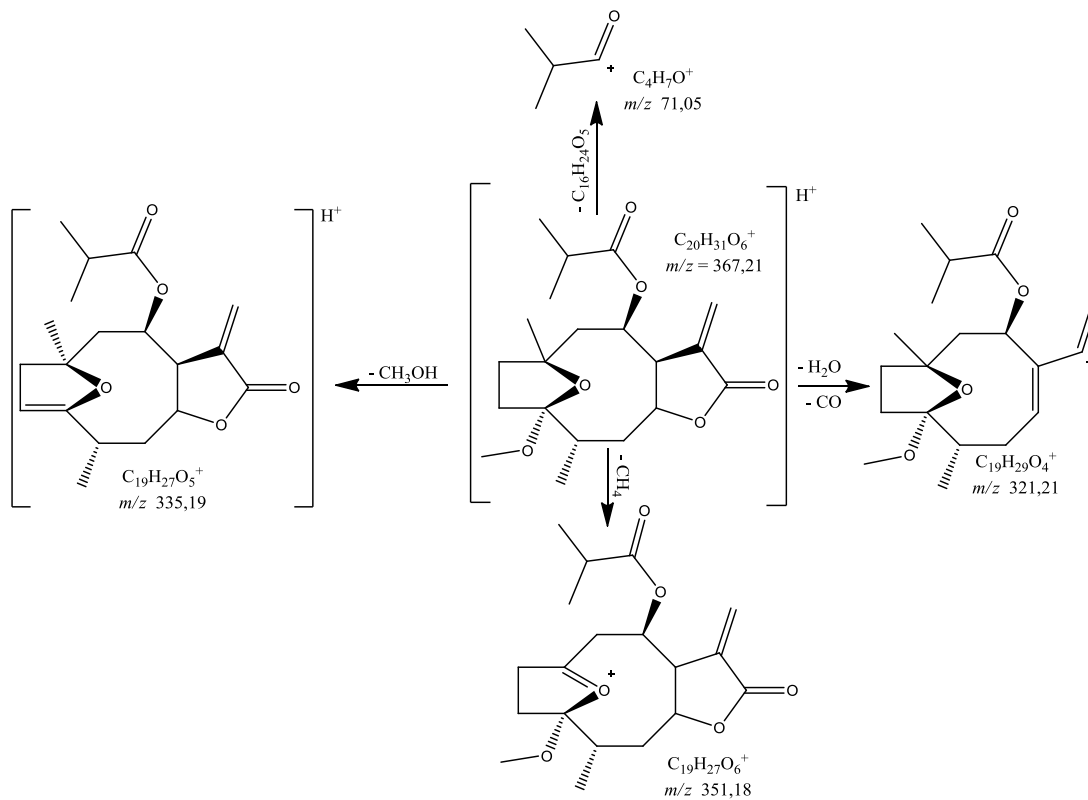


Figura 86: Proposta de fragmentação para o composto CP-IV.

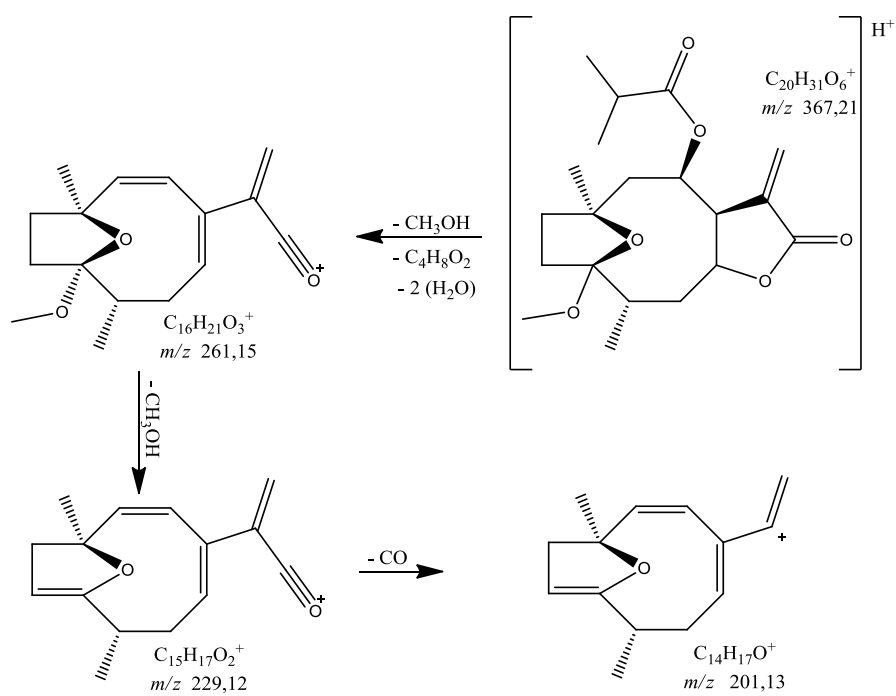


Figura 87: Espectro de ESI-(+)-MS/MS para o composto CP-V.

LC4 positivo msms 345

22072015 LC4 (MESMOS PARAMETROS) 345 17 (0.287) Sm (Mn, 1x1.00); Cm (16:45)

Daughters of 345ES+
1.09e5

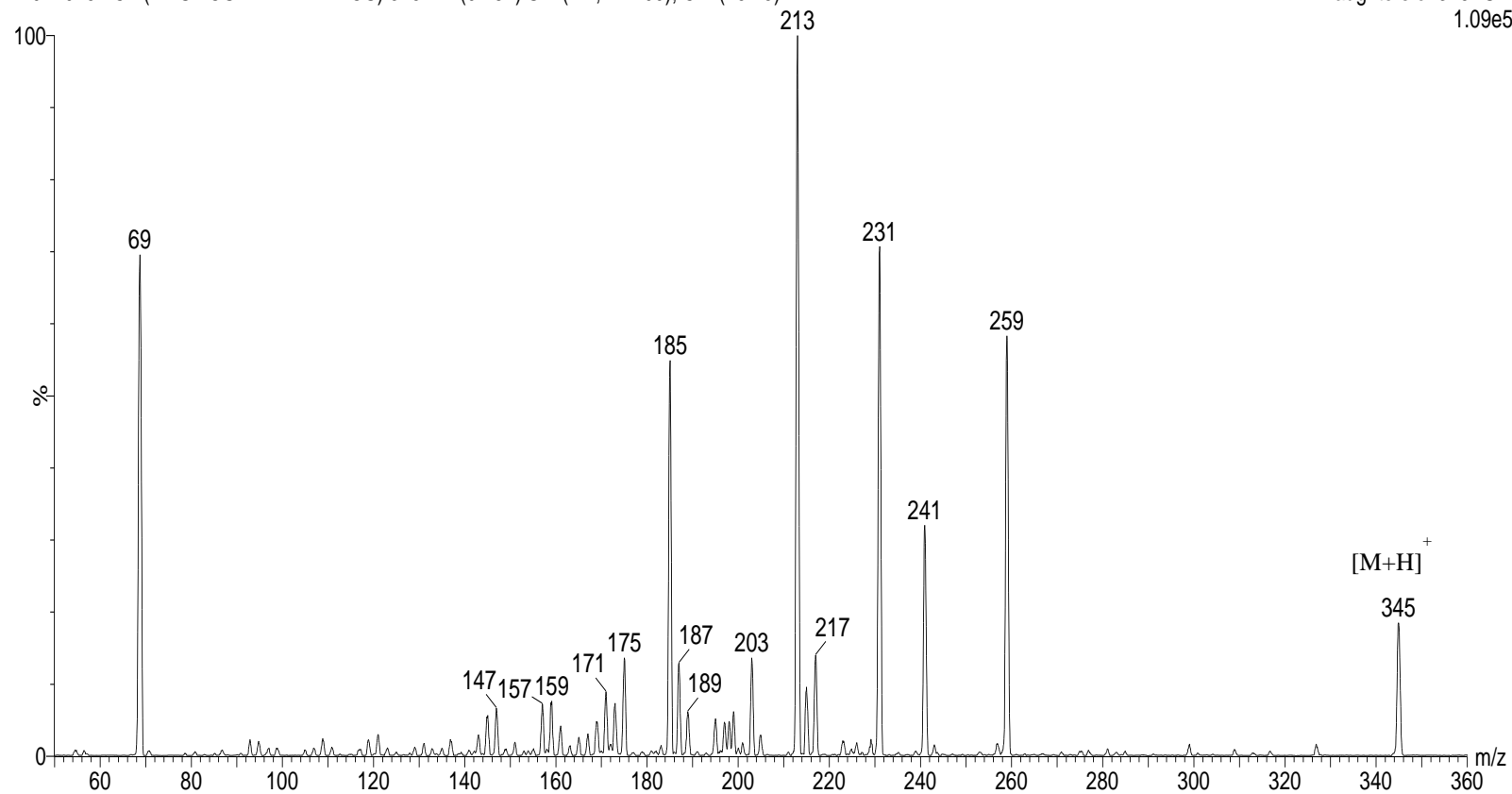


Figura 88: Espectro de ESI(+)-MS/MS para o composto CP-VI.

modo pos MSMS

270315 MARCOS LC06_347 26 (0.439) Sm (Mn, 2x1.00); Cm (20:54)

Daughters of 347ES+
3.80e5

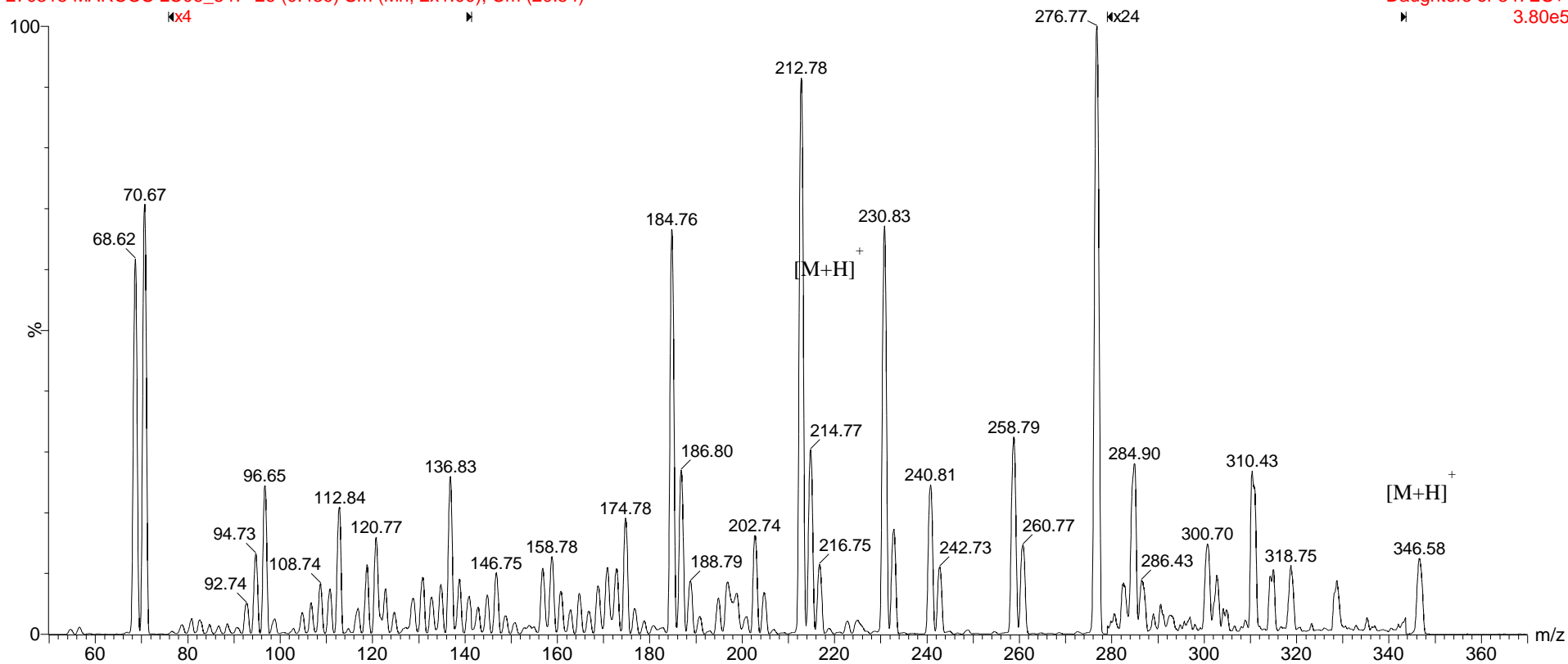


Figura 89: Espectro de ESI-(+)-MS/MS para o composto do composto CP-VII.

modo pos MSMS

270315 MARCOS LC02 349 32 (0.541) Sm (Mn, 2x1.00); Cm (7:49)

Daughters of 349ES+
3.08e6

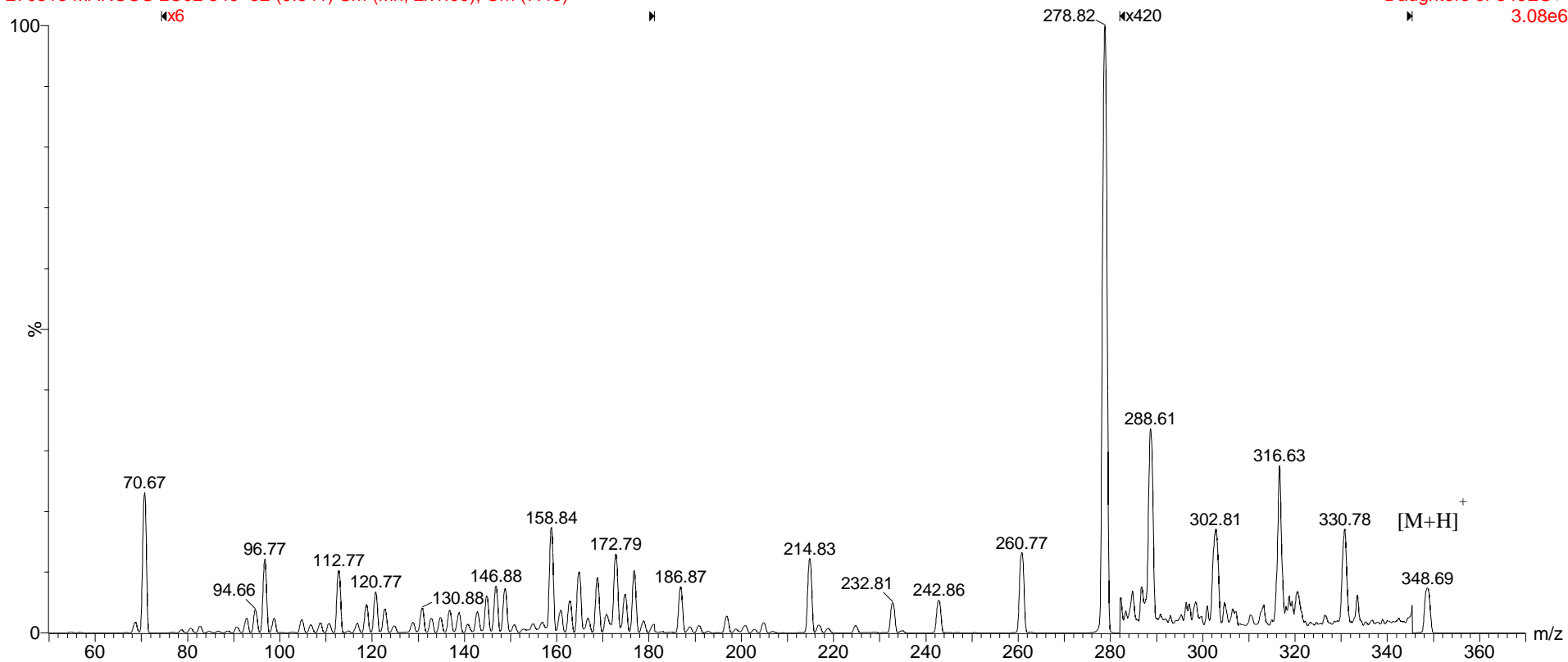


Figura 90: Espectro de ESI-(+)-MS/MS para o composto do composto CP-VIII.

modo pos MS

270315 MARCOS LC05_B 347 23 (0.389) Sm (Mn, 2x1.00); Cm (23:50)

Daughters of 347ES+
2.33e6

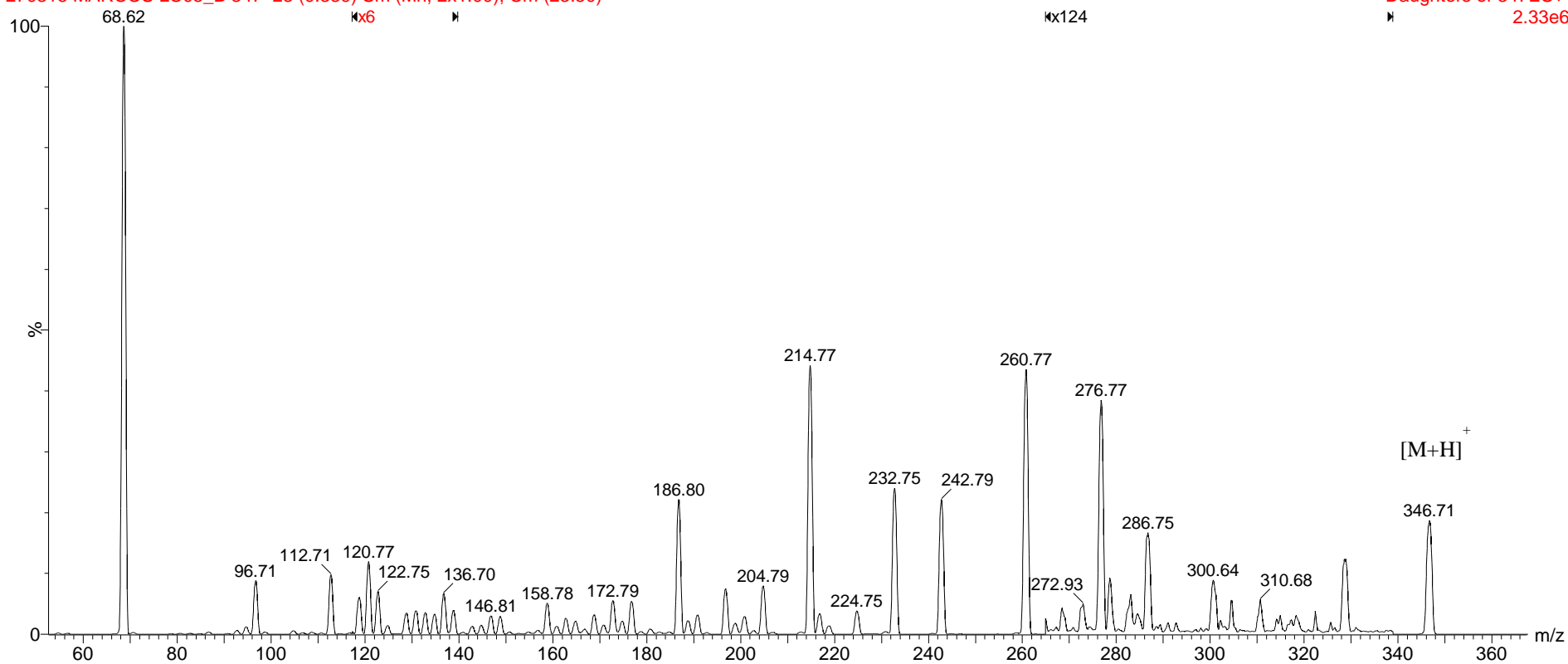


Tabela 22: Principais íons produtos observado nas análises de ESI-(+)-MS/MS para os compostos CP-III a CP-VIII com energia de colisão de 15ev.

CP-III <i>m/z</i> 365, [M+H] ⁺	CP-IV <i>m/z</i> 366, [M+H] ⁺	CP-V <i>m/z</i> 345, [M+H] ⁺	CP-V <i>m/z</i> 347, [M+H] ⁺	CP-V <i>m/z</i> 349, [M+H] ⁺	CP-VI <i>m/z</i> 347, [M+H] ⁺	CP-VII <i>m/z</i> 349, [M+H] ⁺	CP-VIII <i>m/z</i> 347, [M+H] ⁺
	351						
347							
	335						
329						331	
319	321						
					301	303	
			277	279	277	278	
261	261	259	261	261	259	261	261
247	247	241	243	243	241	243	243
			233		231		233
229	229						
		213	215	215	213	215	215
201	201						
183	183	185	187	189	185	187	187
159	159	159	159	159	159	159	159
69	71	69	71	71	69	71	69

Analisando os dados de ESI-MS/MS para CP-III a CP-VIII (Figuras 87 a 90), juntamente com a Tabela 20, observamos que todas as lactonas tetra e diidrofuranicas apresentam íons fragmentos comuns de m/z 259 e 261, os quais são formados diretamente dos íons precursores, sendo que abaixo dessa faixa de razão massa/carga, todas as lactonas estudadas apresentam um perfil de fragmentação semelhante, apresentando pequenas variações nos valores de m/z que estão associados à insaturação entre os C-4 e C-5 e/ou grupo metacrilóxi e iso-butirolóxi ligado ao C-8.

Em relação ao espectro fragmentação de massas obtido para o composto CP-VIII foi observado o íon precursor $[M+H]^+$ de m/z 347 com o pico base de m/z 69, referente ao íon produto $[M+H-(C_4H_5O)]^+$ resultando da eliminação do íon acílio produzido pela protonação da molécula. Foi observado o fragmento de m/z 261 característico para lactona sesquiterpênica correspondente a perda do ácido carboxílico na posição C-8 (CROTTI, et. al., 2005; SARTORI, et. al., 2014). Também foram observadas sucessivas eliminações de monóxido de carbono, confirmadas pela formação dos fragmentos de m/z 233 e 215 referente aos íons $[C_{14}H_{17}O_3]^+$ e $[C_4H_{15}O_2]^+$, respectivamente, além, da eliminação de água descrita pela formação do íon de m/z 243 $[C_{15}H_{15}O_3]^+$.

Analisando todos os dados espectrométricos obtidos, os perfis de fragmentação e dados relatados da literatura foram possíveis propor algumas fragmentações. Essas fragmentações auxiliam na compreensão do perfil de fragmentação de moléculas com esqueletos do tipo furanoeliangolídeo, as quais estão apresentadas nas Figuras 91 a 95. Devido à semelhança dos íons formados no estudo de espectrometria de massas, foi possível utilizar esses dados para identificar outras substâncias que apresentam o mesmo perfil de fragmentação, ou seja, moléculas com esqueleto furanoeliangolídeo.

Examinando o espectro de ESI-MS/MS para o composto CP-V foi observado três íons precursores $[M+H]^+$ de m/z 345, 347 e 349 (Tabela 20, Figura 96, 97 e 98). Quando relacionamos os dados de fragmentação desses íons precursores com os dados adquiridos dos compostos isolados (Tabela 22), podemos verificar que os íons precursores de m/z 347 e 349 apresentam os mesmos perfis de fragmentações daqueles encontrados nos compostos CP-VI e CP-VII, sugerindo que o composto CP-V é uma mistura de três compostos, não perceptível nas análises de RMN.

Figura 91: Proposta de fragmentação para o composto CP-V.

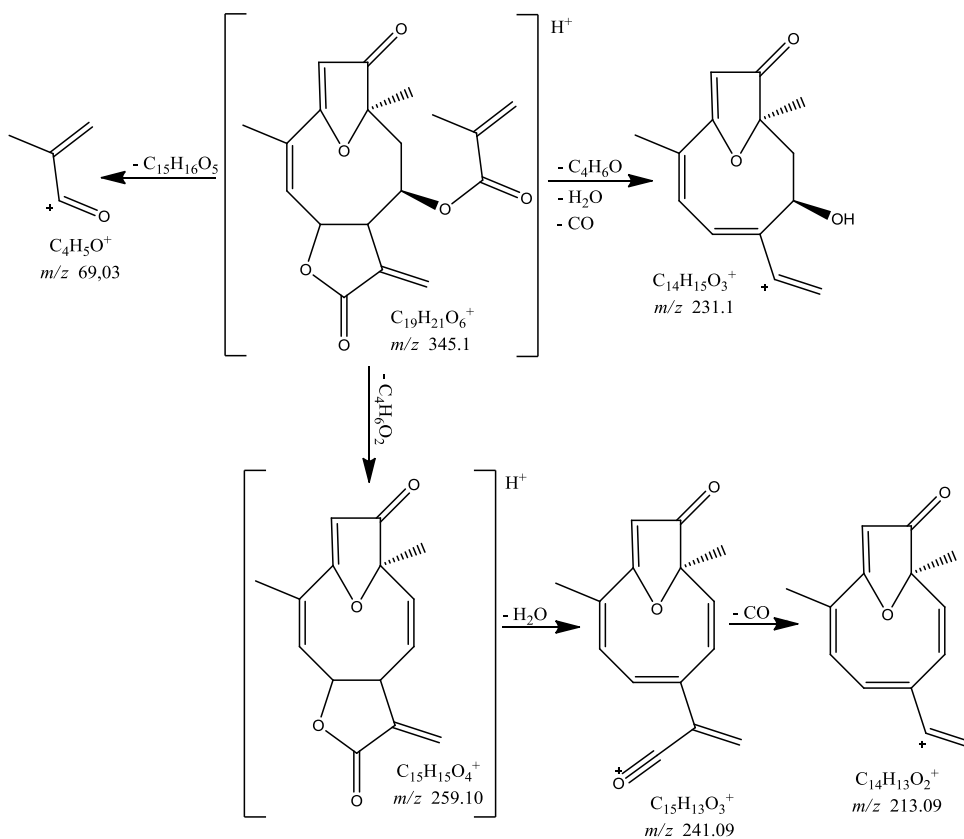


Figura 92: Proposta de fragmentação para o composto CP-VI.

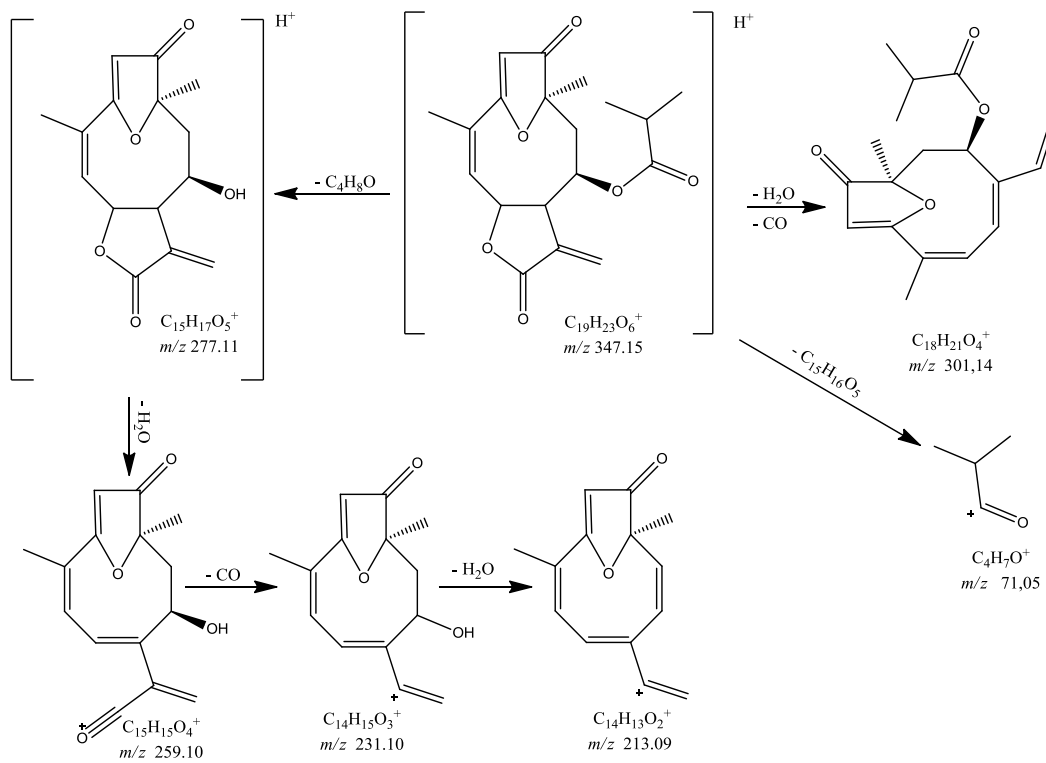


Figura 93: Proposta de fragmentação para o composto CP-VII.

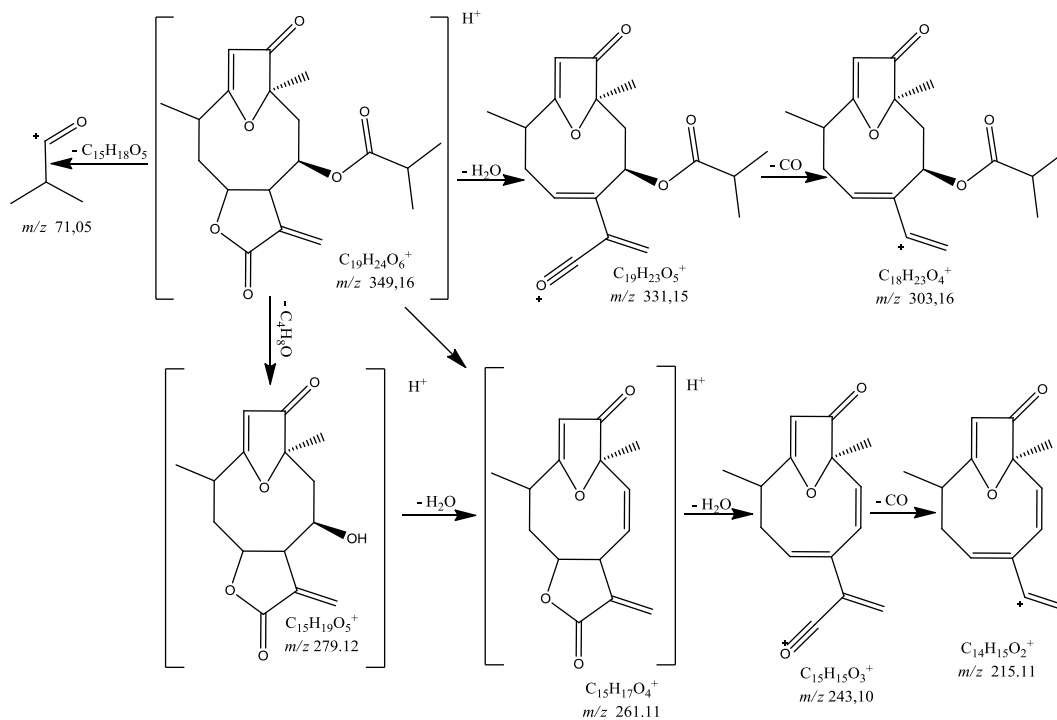


Figura 94: Proposta de fragmentação para o composto CP-VIII.

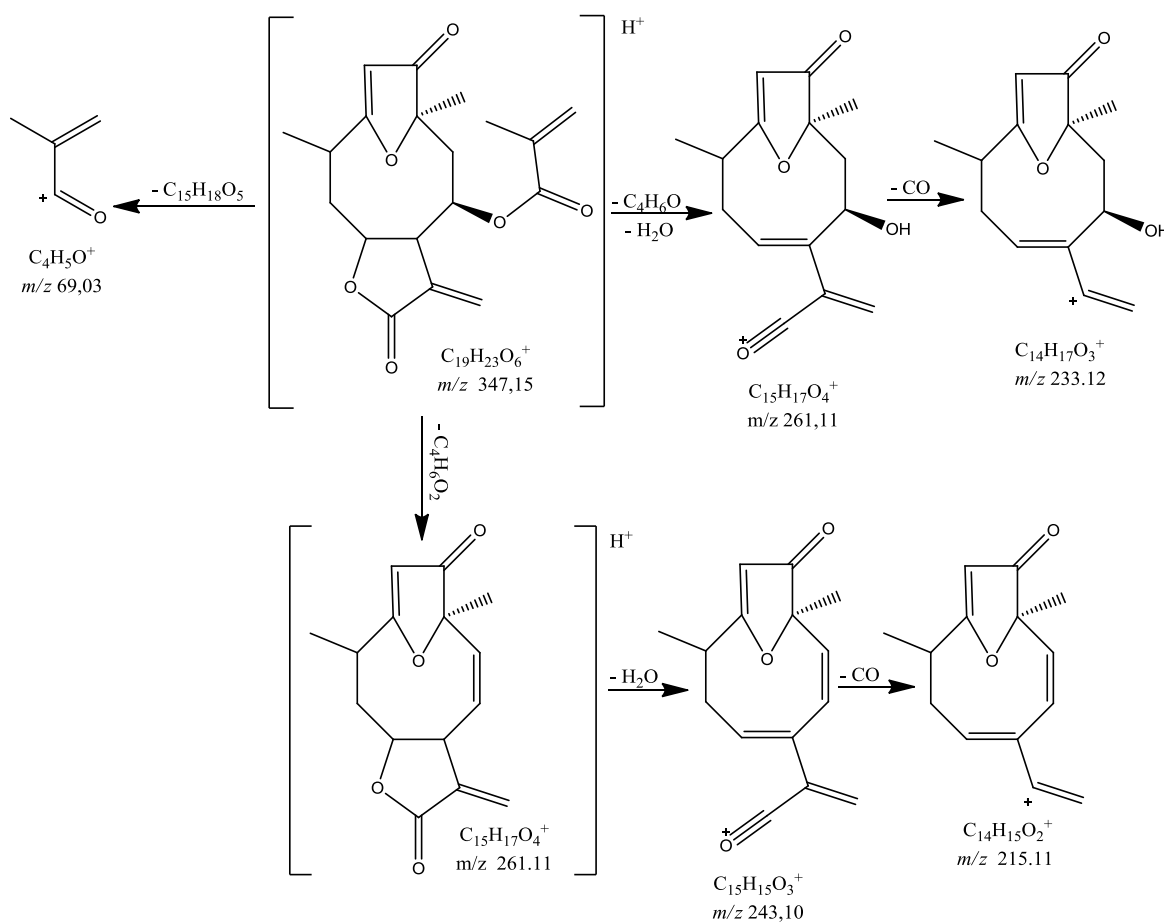


Figura 95: Proposta de fragmentação para o composto CP-VIII.

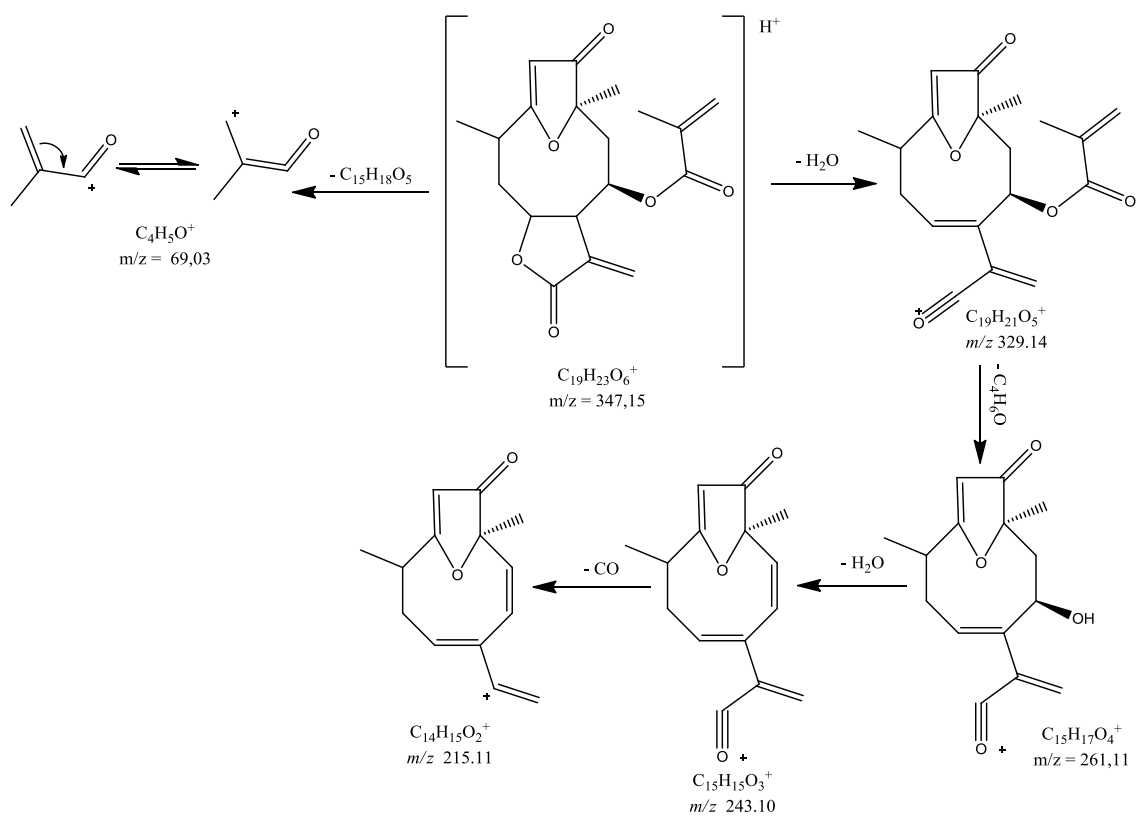


Figura 96: Espectro de ESI-(+)-MS (full scan), para o composto do composto CP-V.

LC4 positivo msms

22072015 LC4 (MESMOS PARAMETROS) 42 (0.710) Cm (28:43)

Scan ES+
9.26e6

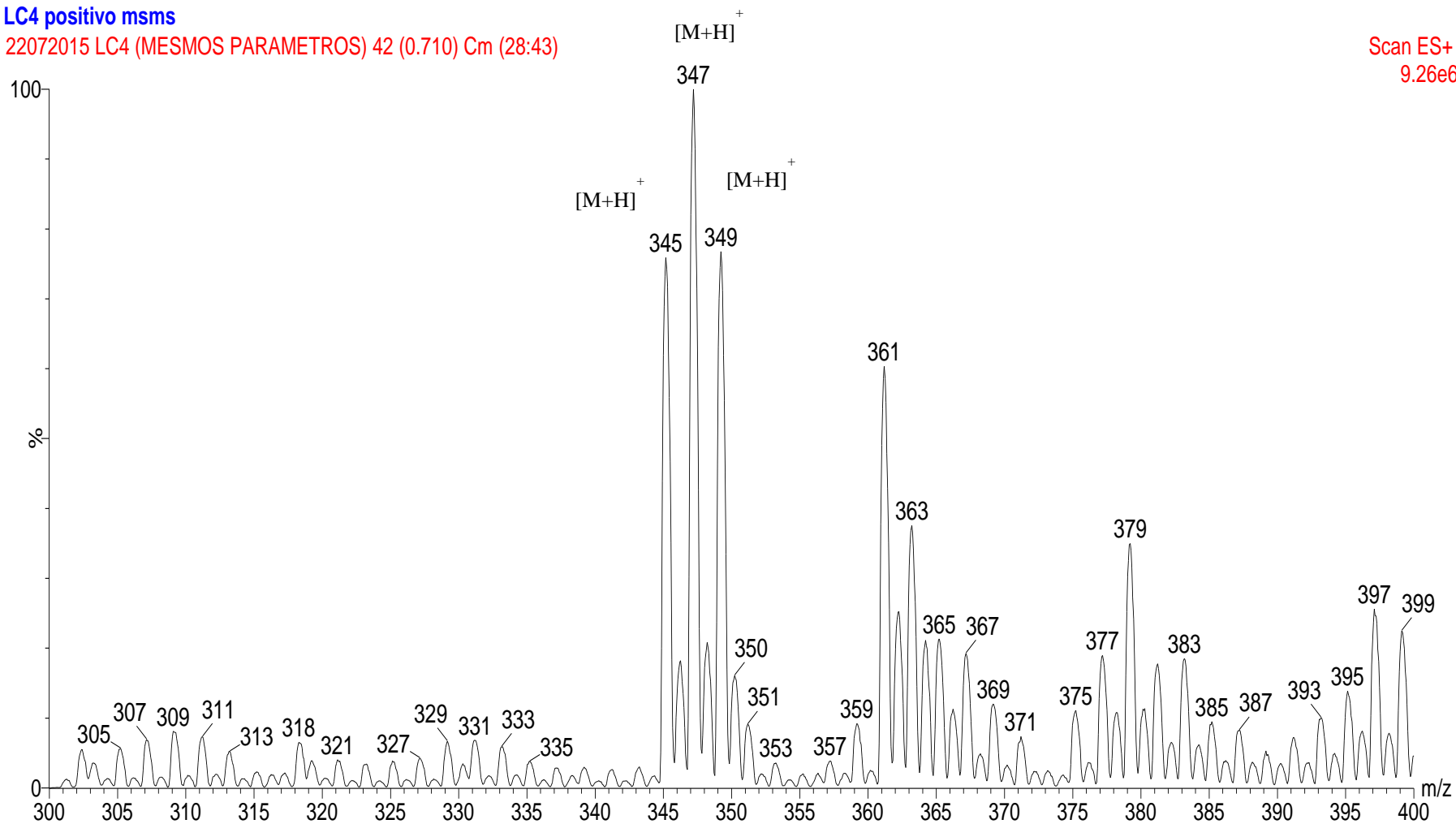


Figure 97: Espectro de ESI-(+)-MS para o íon precursor de m/z 345.

modo positivo MSMS

170315_MARCOS_DQI_LC_4_MSMS_345 79 (1.335) Sm (Mn, 3x1.00)

Daughters of 345ES+
3.58e4

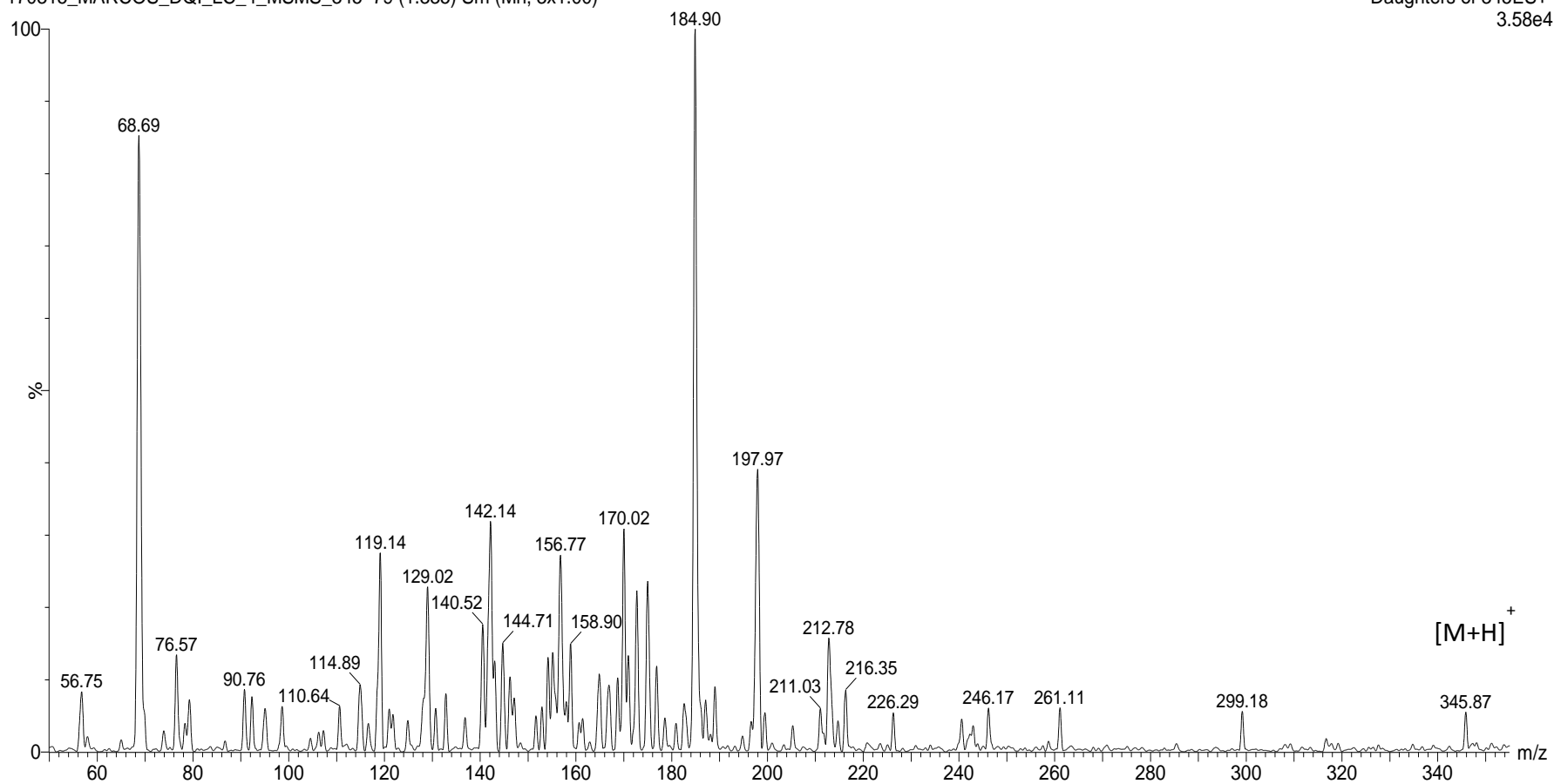
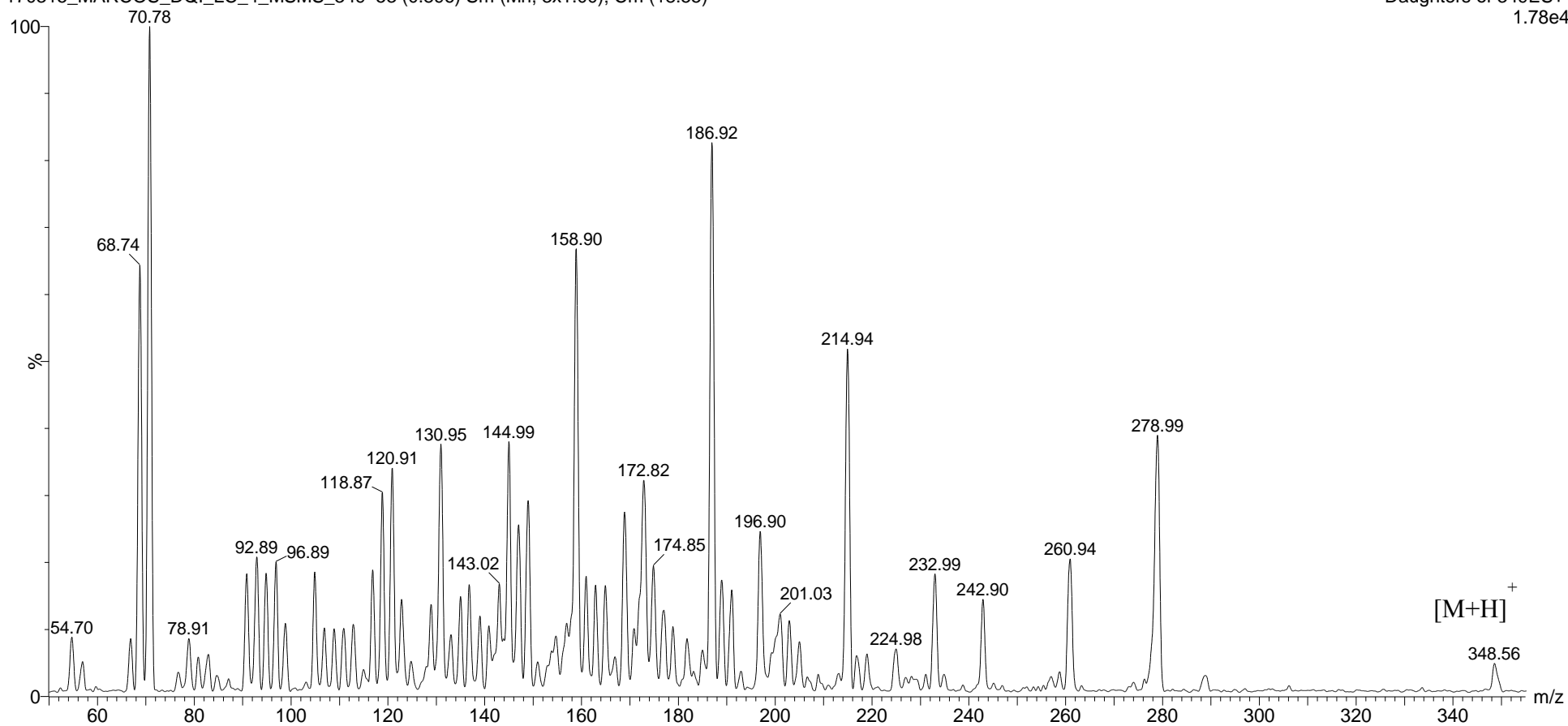


Figura 98: Espectro de ESI(+)-MS para o produto e íon de m/z 349.
modo positivo MSMS

170315_MARCOS_DQI_LC_4_MSMS_349 53 (0.896) Sm (Mn, 3x1.00); Cm (18:55)

Daughters of 349ES+
1.78e4



Utilizando o perfil de fragmentação das lactonas sesquiterpênicas foi possível relacionar esses dados com a análise de CLAE-EM/EM da fração diclorometano (CFD), que possibilitou a detecção de todas as lactonas sesquiterpênicas apresentadas nesse estudo. A fração CFD foi submetida a uma corrida cromatográfica (Figura 99), utilizando uma mistura de fase móvel com solução A (H₂O com 0,1 % de ácido fórmico) e solução B (acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico) em uma rampa cromatográfica com apresentado na Tabela 23. O tempo da corrida foi de vinte e cinco minutos e a faixa de energia de colisão foi ajustada de 15-28 eV.

Tabela 23: Parâmetros da corrida cromatográfica para a fração CFD.

Tempo (min.)	Fluxo (mL min ⁻¹)	%A	%B
0	0.50	95.0	5.0
1.00	0.50	95.0	5.0
10.00	0.50	50.0	50.0
20.00	0.50	5.0	95.0
22.00	0.50	95.0	5.0
25.00	0.50	95.0	5.0

Nesse experimento foi identificado a presença de vinte e dois íons precursores (Tabela 24), e dentre esse íons, destaca-se o íon precursor [M+H]⁺ de *m/z* 346. Este íon apresentou fragmentos de íons semelhantes ao do composto CP-VI. Com fragmento de *m/z* 259 [M+H-(C₁₅H₁₄O₄)]⁺ que pode sugerir a eliminação do grupo éster em C-8. Também foi observado o íon de *m/z* 213 referente ao produto de íon [C₁₄H₁₃O₂]⁺ e o fragmento produzido de *m/z* 69 referente ao produto de íon [C₄H₅O]⁺ proveniente da eliminação do grupo isobutirolóxi (Figura 100).

Também foi observado um íon com fragmentação semelhante ao composto CP-III de *m/z* 365. O perfil de fragmentação desse íon é semelhante à fragmentação de lactonas sesquiterpênicas com a unidade tetraidrofurano com fragmentos de *m/z* 261, 229, 201, 183, 159 e 69 (Figura 101).

Também foi observado um íon [M+H]⁺ de *m/z* 347, que apresentou em sua fragmentação íons de *m/z* 261, 243, 233, 215, 187 e 159 que foi idêntico ao composto CP-VIII (Figura 102).

Figura 99: Cromatograma de íons totais da fração CFD.

extrato dicloro

140815 Marcos Extrato P15 Dicloro

1: Scan ES+
BPI
6.44e7

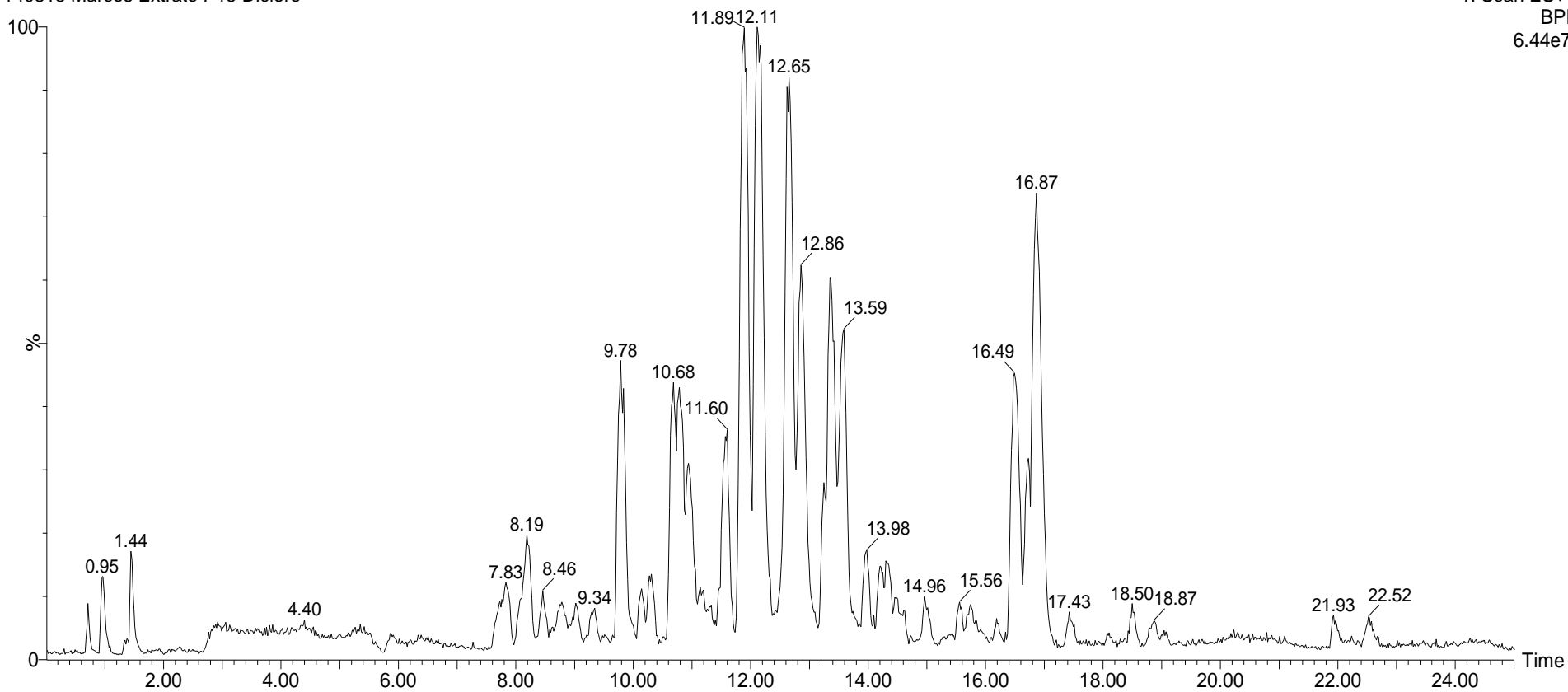


Tabela 24: Espectro de fragmentação dos íons selecionados na análise de LC-MS da fração CFD.

Íon precursor <i>m/z</i>	Fragmentação (pico base*)	Íon precursor <i>m/z</i>	Fragmentação (pico base*)
464	→128	377	→317
287	→153	697	→279
347	→215	350	→279
271	→187	391	→279
259	→185	352	→229
346	→185	353	→229
345	→213/185	629	→259
366	→105	689	→629/259
299	→284/256	649	→277
693	→261	348	→213/185
389	→261/215	387	→259/231/213

* Pico base: pico de maior intensidade em um espectro de massas.

Figura 100: Espectro de fragmentação ESI-(+)-MS/MS do íon de m/z 346 da fração CFD (20 eV).

extrato dicloro

300415 Marcos Extrato P15 Dicloro MSMS B 5 (12.703) Sm (Mn, 2x0.75); Cm (3:8)

6: Daughters of 345ES+
x6 4.19e5

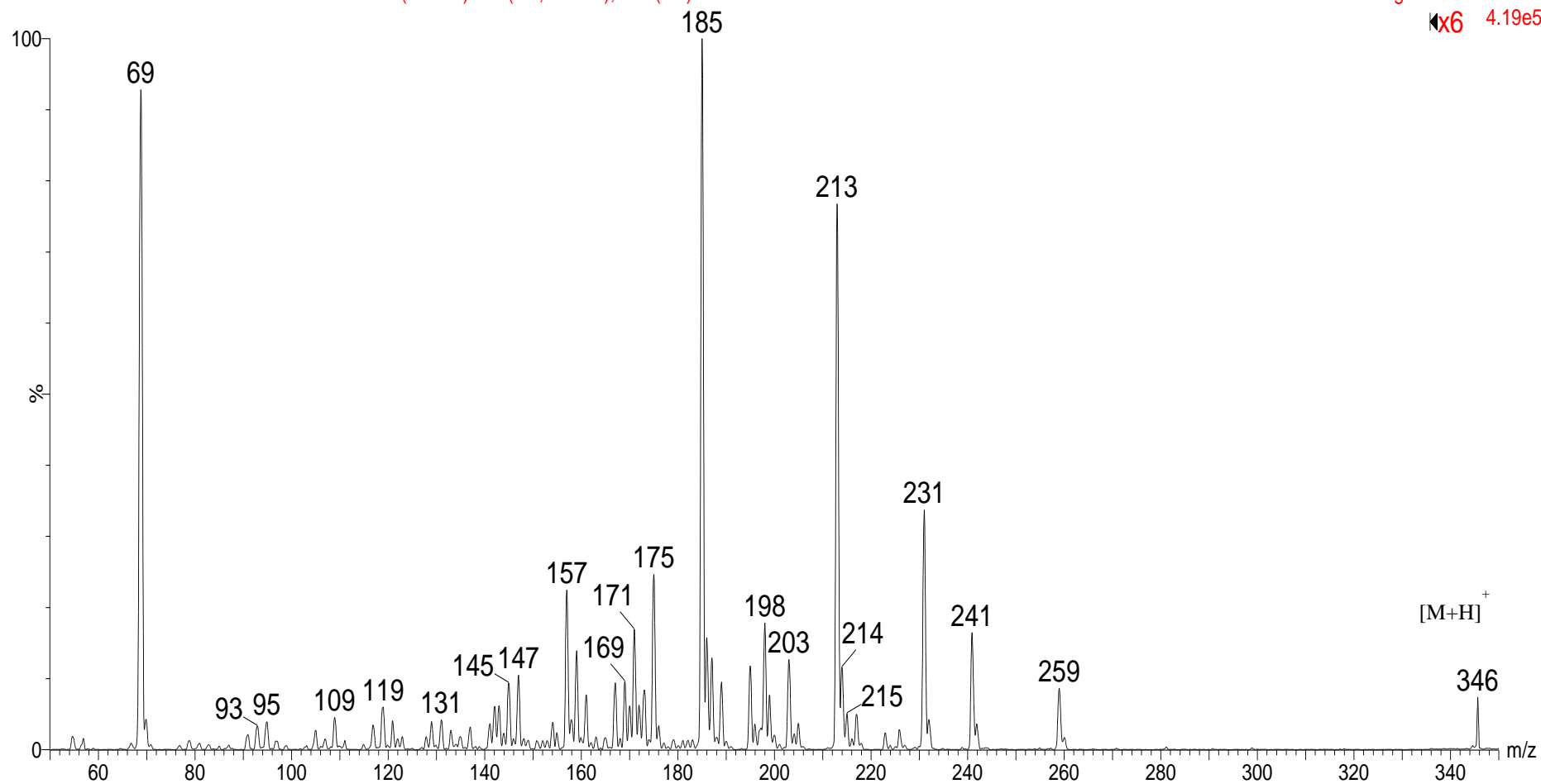


Figura 101: Espectro de fragmentação ESI-(+)-MS/MS do íon de m/z 366 da fração CFD (20 eV).

extrato dicloro

300415 Marcos Extrato P15 Dicloro MSMS B 12 (16.554) Sm (Mn, 2x0.75); Cm (8:17)

7: Daughters of 366ES+
x4 6.66e4

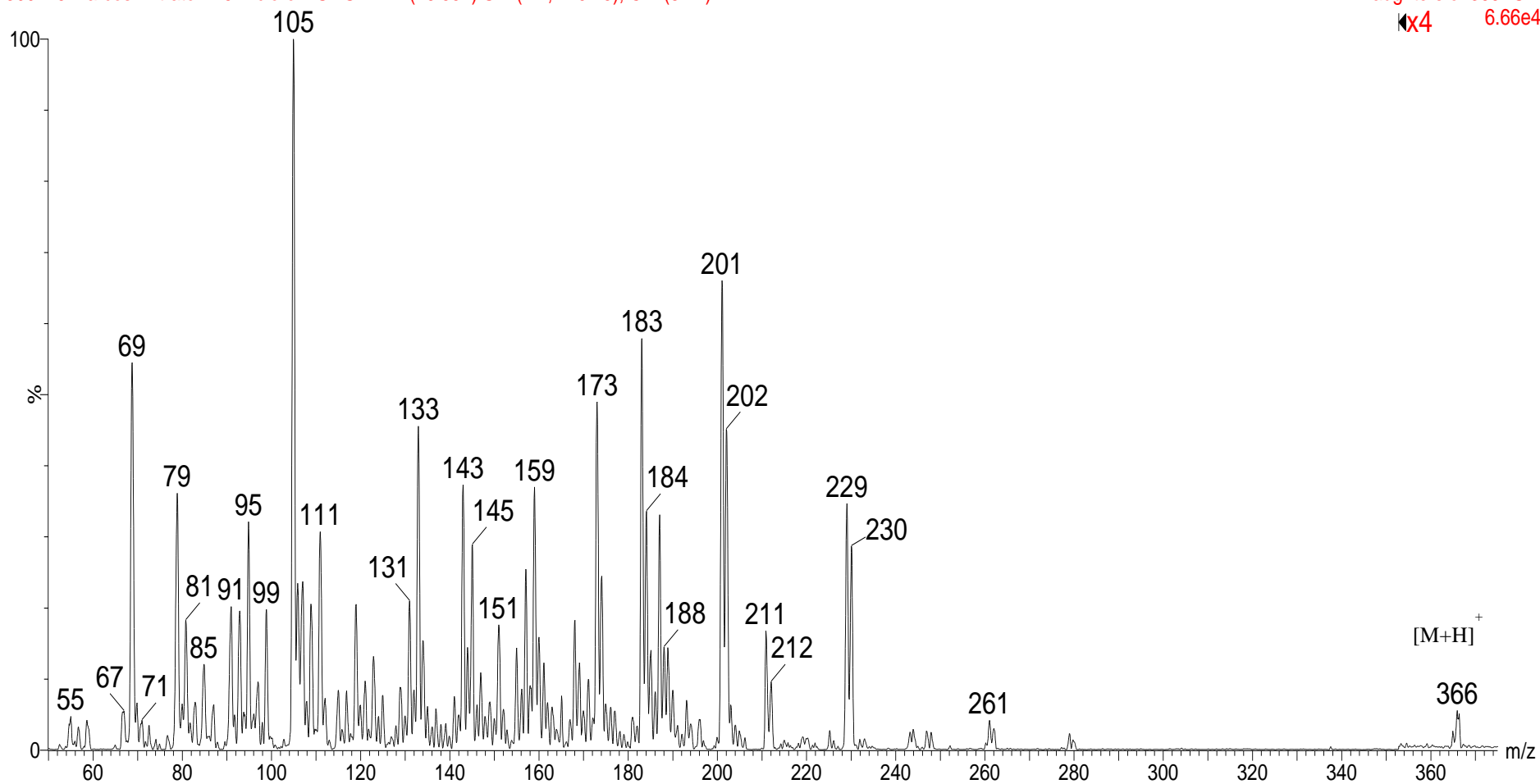
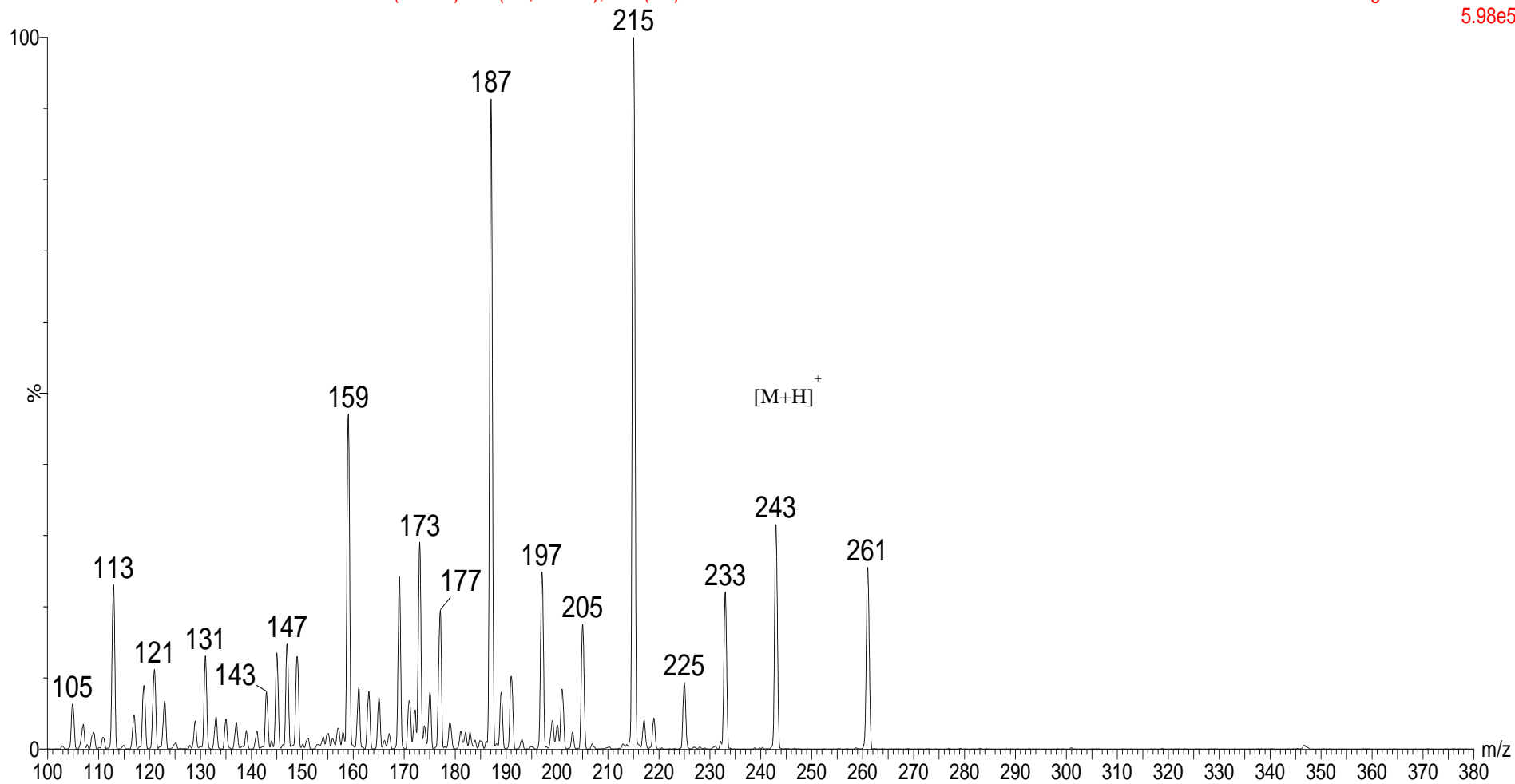


Figura 102: Espectro de fragmentação ESI-(+)-MS/MS do íon de m/z 347 da fração CFD (20 eV).

extrato dicloro

300415 Marcos Extrato P15 Dicloro MSMS A 3 (11.936) Sm (Mn, 2x0.75); Cm (3:5)

7: Daughters of 347ES+
5.98e5



Também foi observada no estudo de análise de CLAE-EM/EM para a fração CFD a presença de íons precursores de m/z 259 e 279, referentes aos compostos com esqueleto furanoeliangolídeo sem o grupo éster ligado na posição C-8. Esses íons apresentaram um perfil de fragmentação semelhante aos compostos CP-III a CP-VIII. Provenientes de perdas sucessivas das moléculas de água e monóxido de carbono, gerando íons com diferença de massa de duas unidades. Essa diferença está relacionada com a insaturação entre os carbonos C4 e C5. A Figura 103 apresenta a proposta de fragmentação desse íon. Além disso, os espectros de fragmentação ESI-(+)-MS/MS desses íons são idênticos aos das lactonas sesquiterpênicas estudadas nesse trabalho.

Figura 103: Proposta de fragmentação para os íons de m/z 259 e 279 da fração CFD.

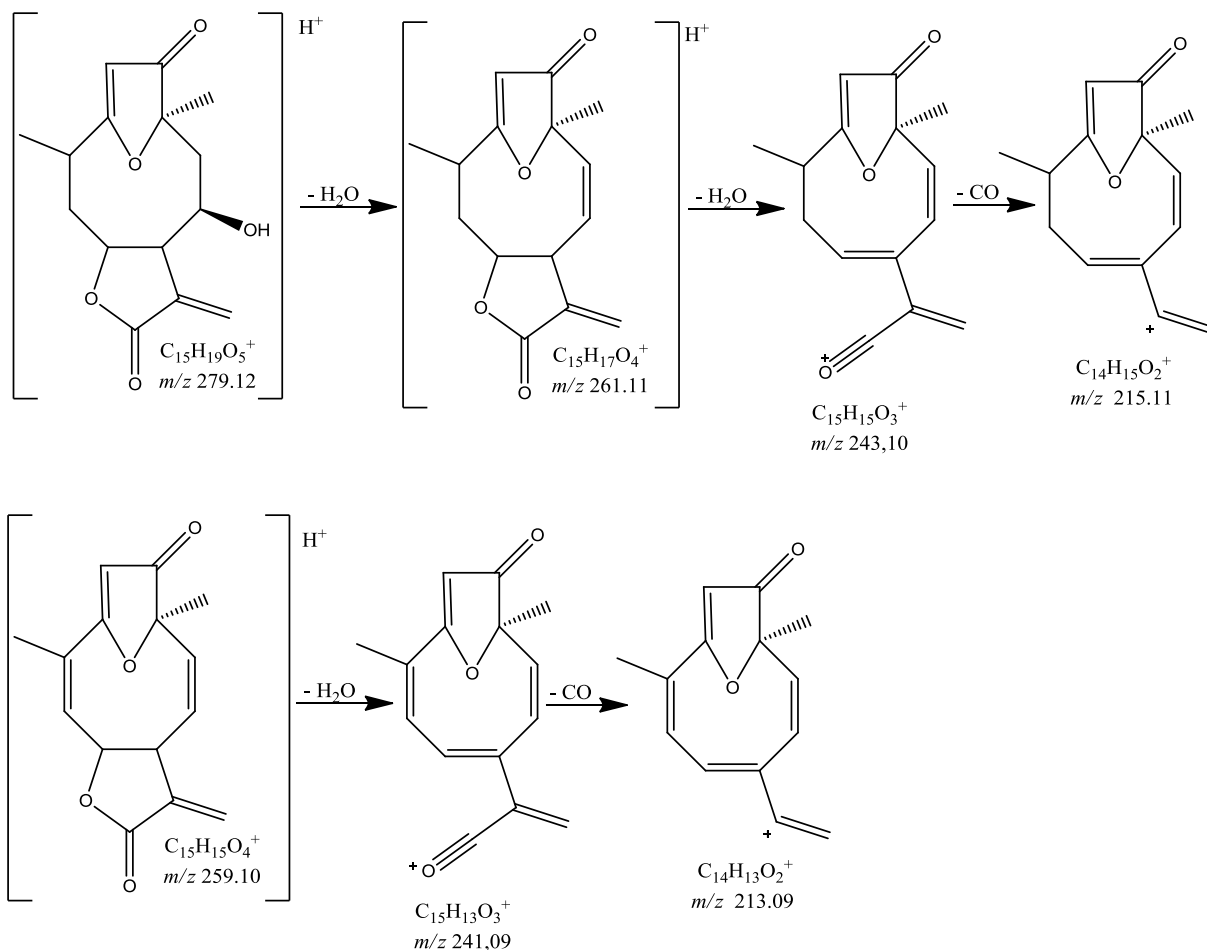


Figura 104: Espectro de fragmentação ESI-(+)-MS/MS do íon de m/z 259 da fração CFD. (25 eV).

extrato dicloro

300415 Marcos Extrato P15 Dicloro MSMS B 5 (12.720) Sm (Mn, 2x0.75); Cm (4:7)

5: Daughters of 259ES+
3.67e5

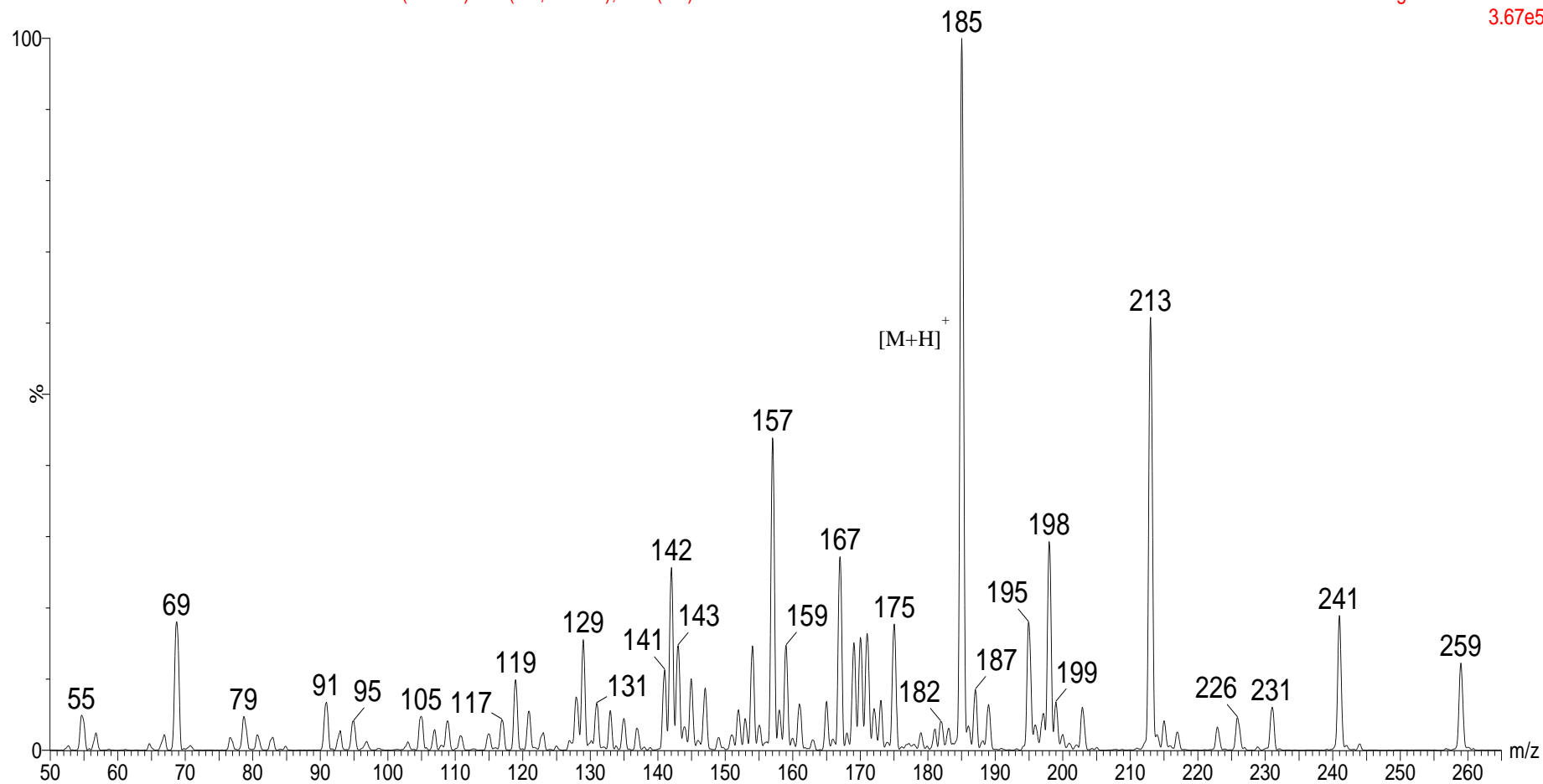
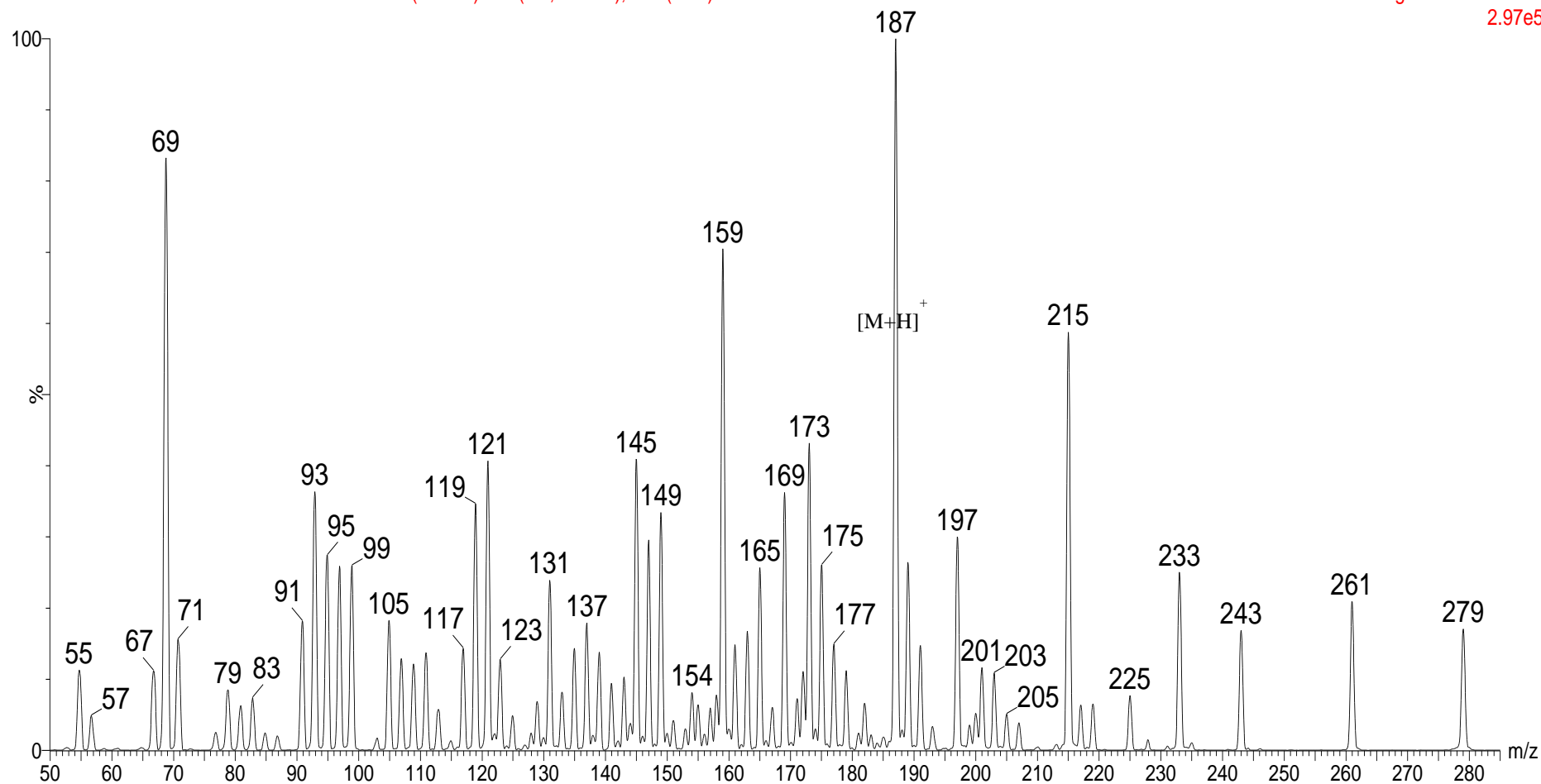


Figura 105: Espectro de fragmentação ESI-(+)-MS/MS do íon de m/z 279 da fração CFD. (25 eV).

extrato dicloro

300415 Marcos Extrato P15 Dicloro MSMS B 11 (12.237) Sm (Mn, 2x0.75); Cm (4:18)

4: Daughters of 279ES+
2.97e5



Outra informação presente nos dados de ESI-MS/MS da fração CFD, foi à proposta de uma lactona dimérica. Este fato foi confirmado com a presença do íon precursor de m/z 689 que podem ser atribuídos a substâncias com duas unidades de lactonas sesquiterpênicas isolado em *Piptocoma rufescens*, conectadas via uma reação de adição tipo Diels-Alder (REN, et. al., 2013) (Figura 106). Esse íon apresenta um perfil de fragmentação característico de estruturas com o esqueleto furanoeliangolídeo, com íons fragmentos de m/z 259, 261, 233, 215, 71e 69 (Figura 107), possibilitando sugerir a presença desse composto na fração CFD. Para esse íon precursor foi proposto uma via de fragmentação (Figuras 108 e 109).

Figura 106: Proposta da biossíntese do composto rufescenolideo C, a partir de uma reação tipo Diels-Alder. Figura retirada do artigo escrito por REN, e et. al., 2013.

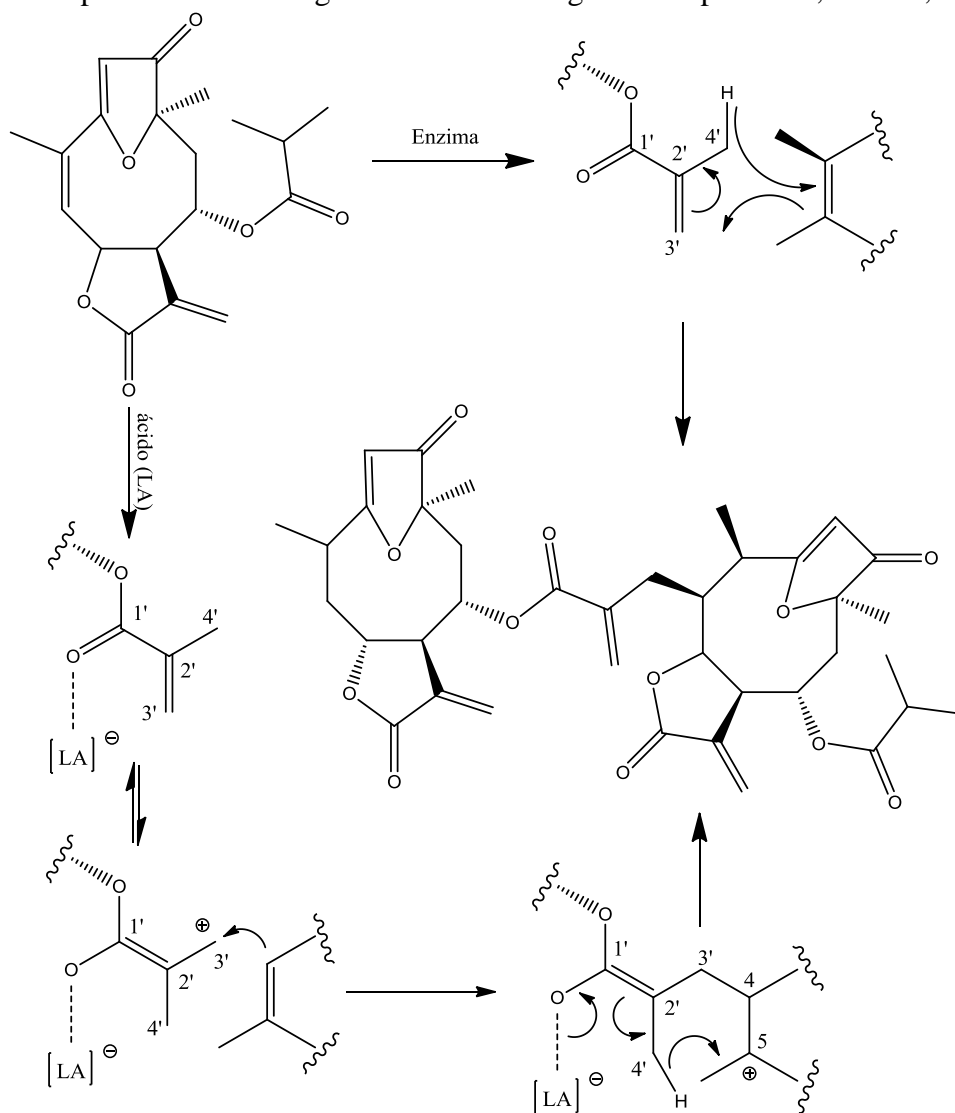


Figura 107: Espectro de fragmentação ESI-(+)-MS/MS do íon de m/z 689 da fração CFD (25 eV).
extrato dicloro

140815 Marcos Extrato P15 Dicloro_MSMS_B 7 (14.319) Sm (Mn, 2x1.00); Cm (1:19)

9: Daughters of 689ES+
6.47e4

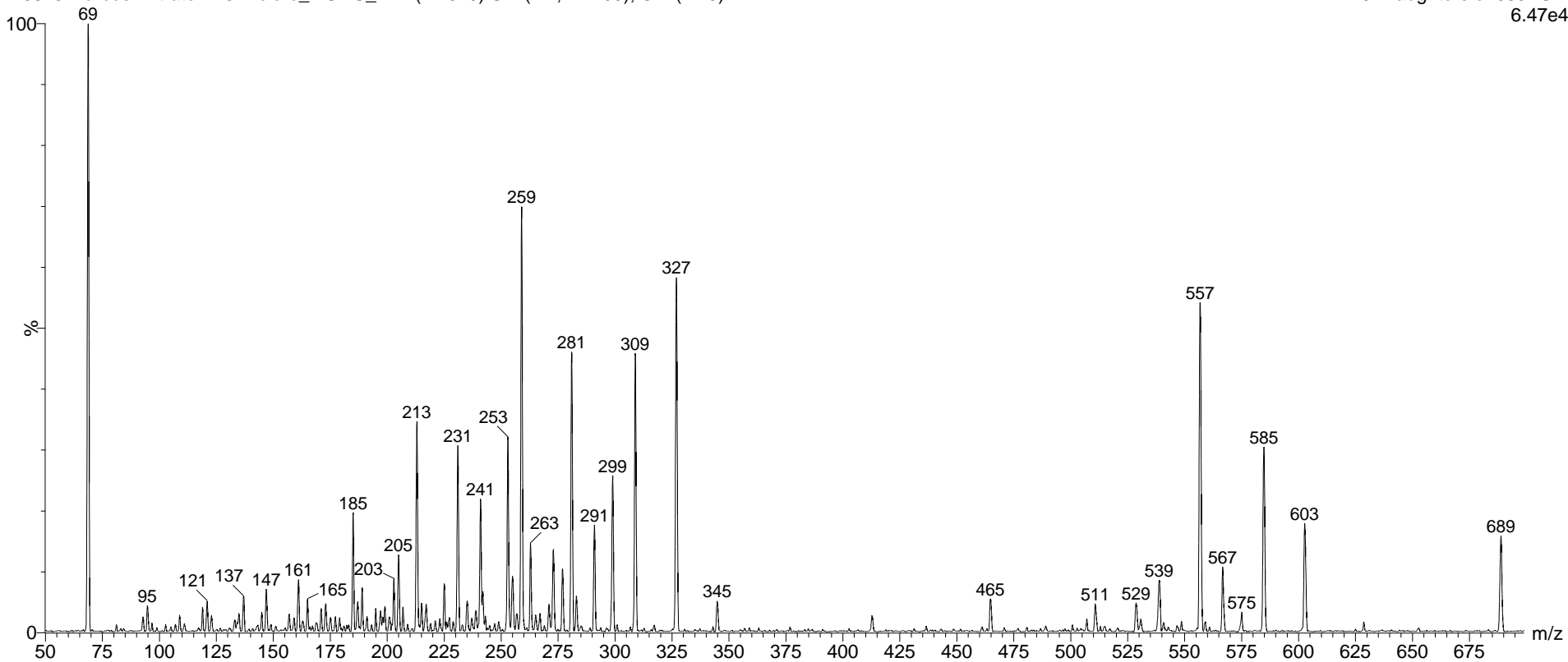


Figura 108: Proposta de fragmentação para o íon de m/z 689 da fração CFD.

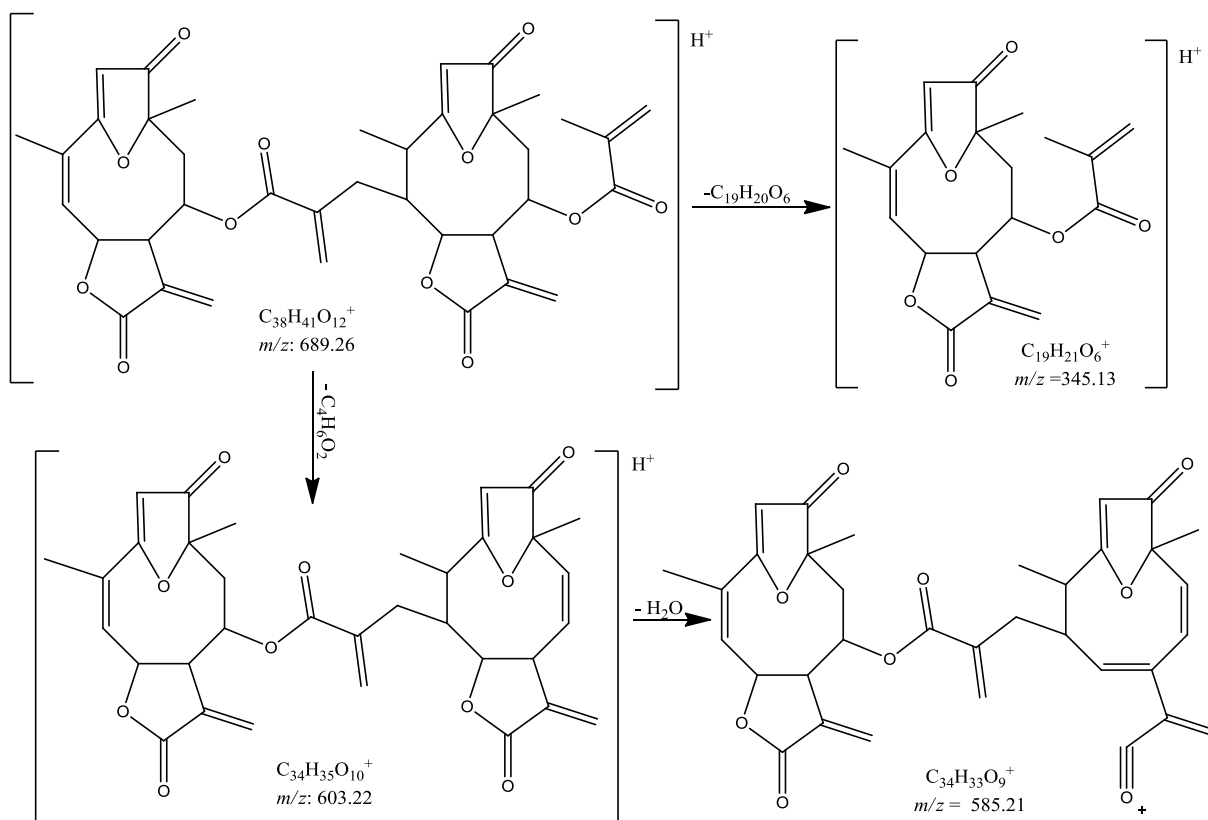
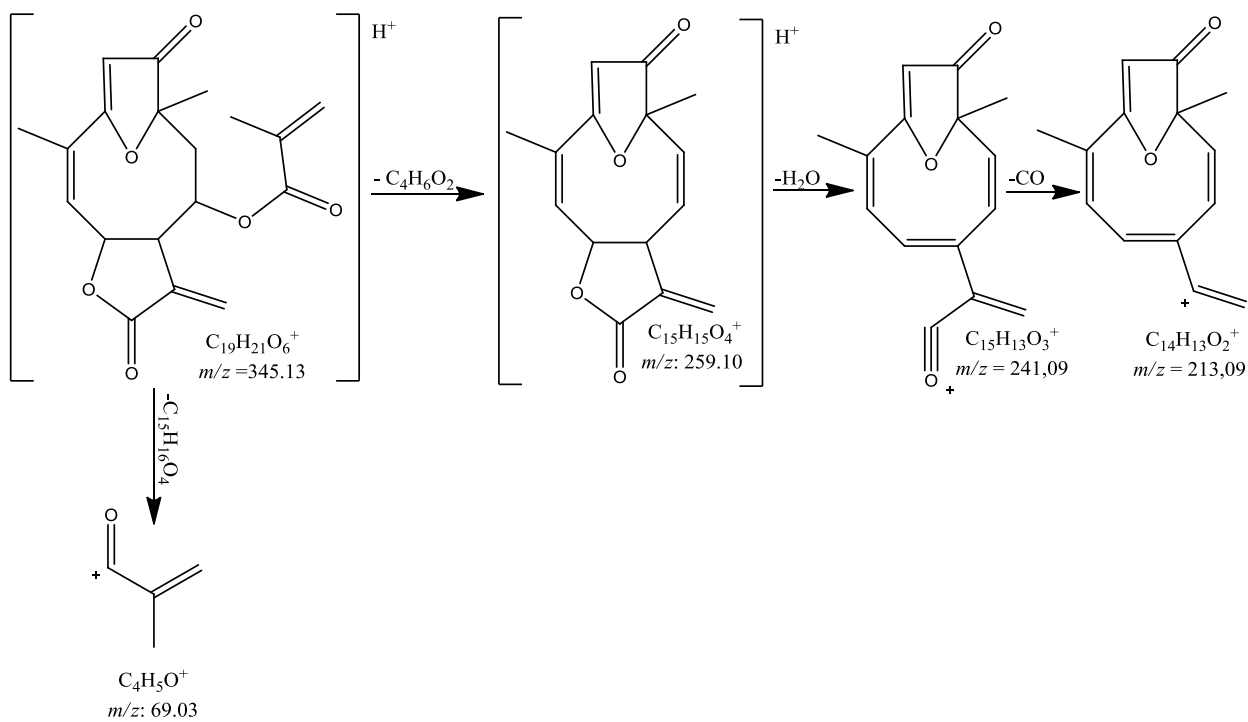


Figura 109: Continuação da proposta de fragmentação para o íon de m/z 689 da fração CFD.



COMPOSTOS CP-IX e CP-X.

Os ácidos clorogênicos 5-*O*-cafeoilquínico (CP-IX) e 4,5-*O*-dicafeoilquínico (CP-X) também foram estudados por infusão direta, em modo negativo como observado na literatura para essa classe de compostos e utilizando fonte de ionização por eletrospray (IES) em espectrômetro com analisador de massas triplo quadrupolo.

O composto CP-IX apresentou um espectro de MS/MS (Figura 110), com íon precursor $[M-H]^-$ de m/z 353, com o pico base de m/z 191 (100%), referente ao íon produto $[M-H-(C_7H_{11}O_6)]^-$. Também, foi observado o fragmento de m/z 179 (14%) característico da perda da unidade cafeoila referente ao íon $[M-H-(C_9H_7O_4)]^-$. Além disso, foram observados os íons de m/z 173(7,4%) e 135 (4,5%), referente à desidratação do íon quinato e a descarboxilação do íon cafeoila, respectivamente. Para esse íon precursor foi proposto uma via de fragmentação (Figuras 111) (CLIFFORD, et. al., 2005; JAISWAL e KUHNERT, 2011; SU, et. al., 2014).

A diferenciação entre o 3-*O*-cafeoilquínico e seu isômero 5-*O*-cafeoilquínico em análises ESI-MS/MS está baseada na intensidade dos íons formados. Quando comparado os dados fornecidos pela análises empregada no composto CP-IX com os dados da literatura, foi confirmado o composto em questão como 5-*O*-cafeoilquínico (JAISWAL, et. al., 2014; SU, et. al., 2014).

Figura 110: Espectro de fragmentação ESI-(+)-MS/MS do íon de m/z 353 do composto CP-IX (15 eV).

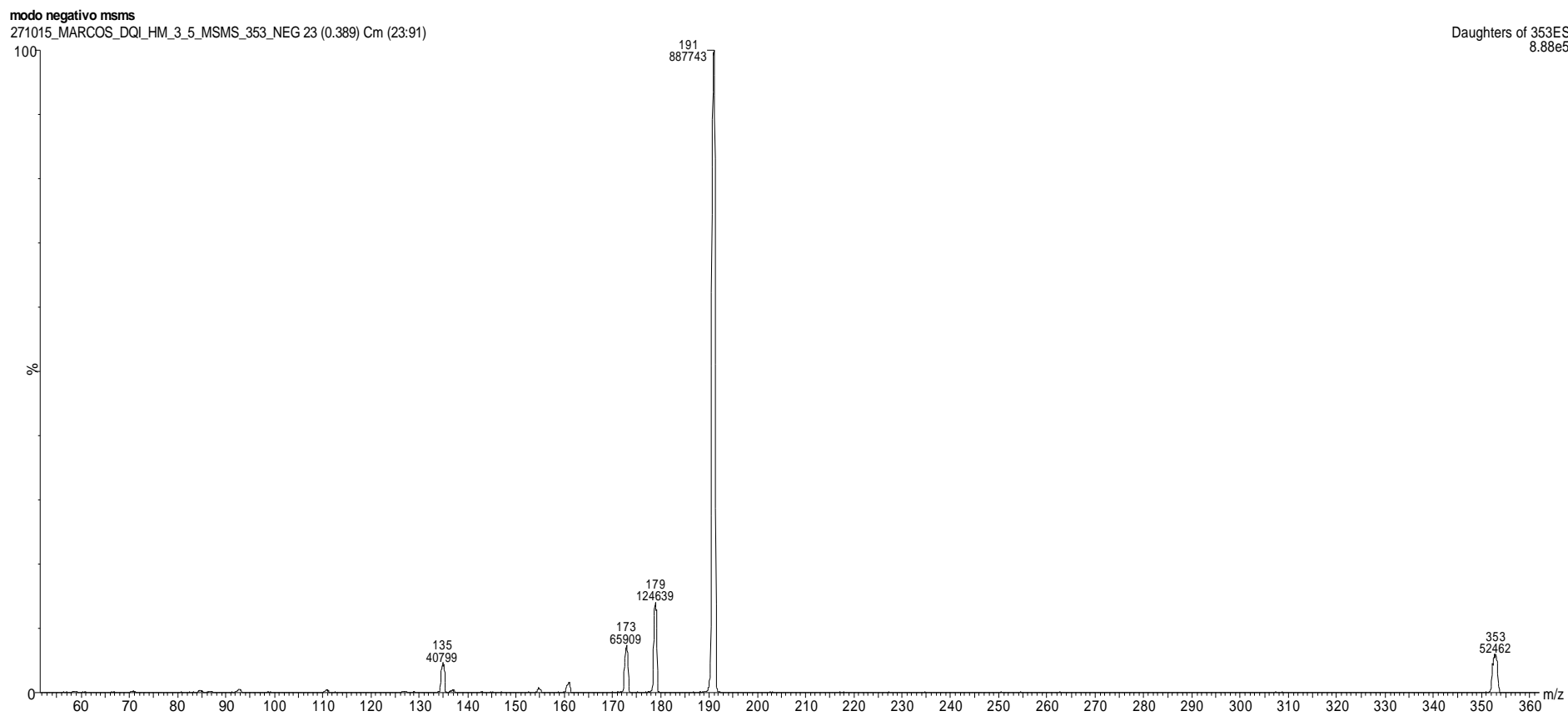
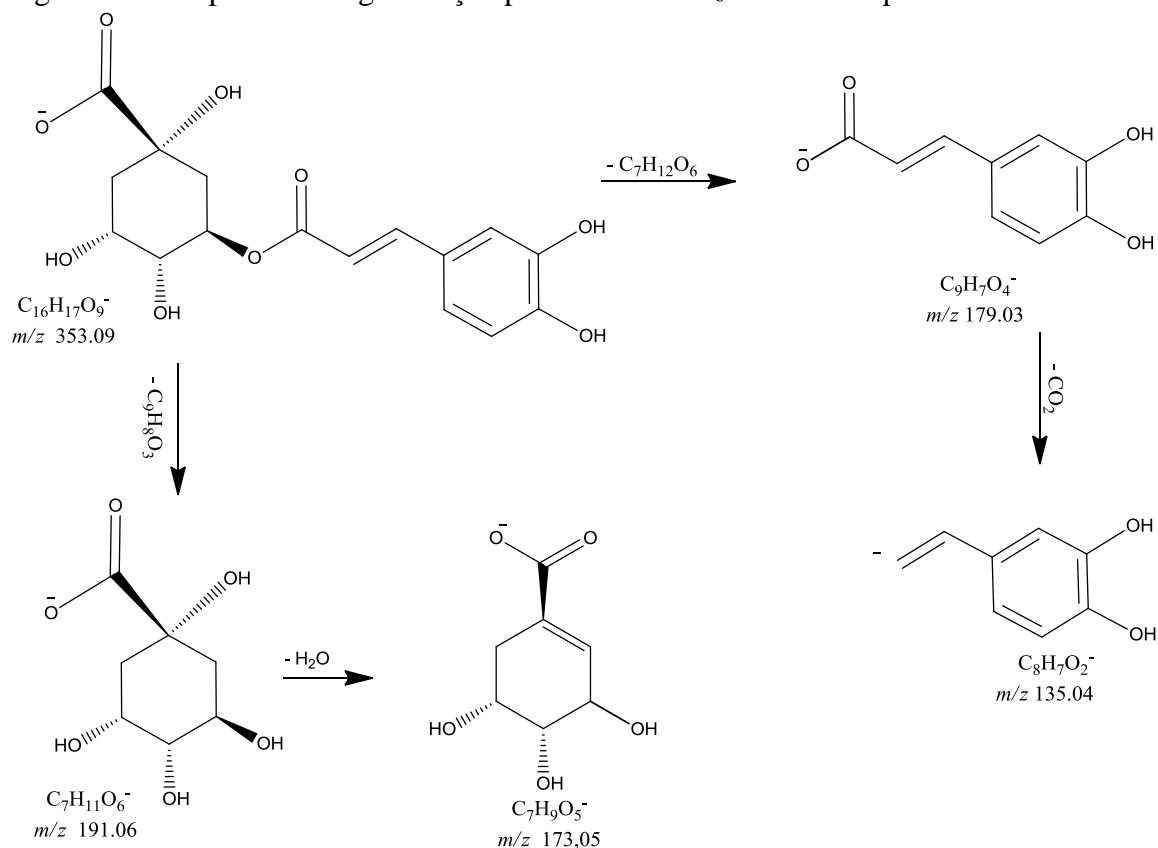


Figura 111: Proposta de fragmentação para o íon de m/z 353 do composto CP-IX.



Para o composto CP-X, o espectro de massas (Figura 112) foi observado o íon precursor $[M-H]^-$ de m/z 515 com o pico base de m/z 353 (100,0 %), um pico de m/z 191 (31,0%) referente ao íon produto $[M-H-(C_7H_{11}O_6)]^-$. Também, foi observado o fragmento com m/z 179 (57,1 %) característico para a perda da unidade cafeoila referente ao íon produto $[M-H-(C_9H_7O_4)]^-$, e os íons de m/z 173(70,5 %) e 135 (5,6 %), referente à desidratação do íon quinato e a descarboxilação do íon cafeoila, respectivamente. Para esse íon precursor foi proposto uma via de fragmentação (Figuras 113) (CLIFFORD, et. al., 2005; JAISWAL e KUHNERT, 2011; SU, et. al., 2014).

A diferenciação entre o ácido 4,5-*O*-dicafeoilquinico e seus isômeros em análises ESI-MS/MS está baseada na intensidade dos íons formados. Quando comparado os dados fornecidos pela análise empregada no composto **CP-X** com os dados da literatura, foi confirmado o compostos em questão como 4,5-*O*-dicafeoilquinico (CLIFFORD, et. al., 2003; JAISWAL, et. al., 2014; NCUBE, et. al., 2014; SU, et. al., 2014).

Figura 112: Espectro de fragmentação ESI(+)-MS/MS do íon de m/z 515 do composto **CP-X** (15 eV).

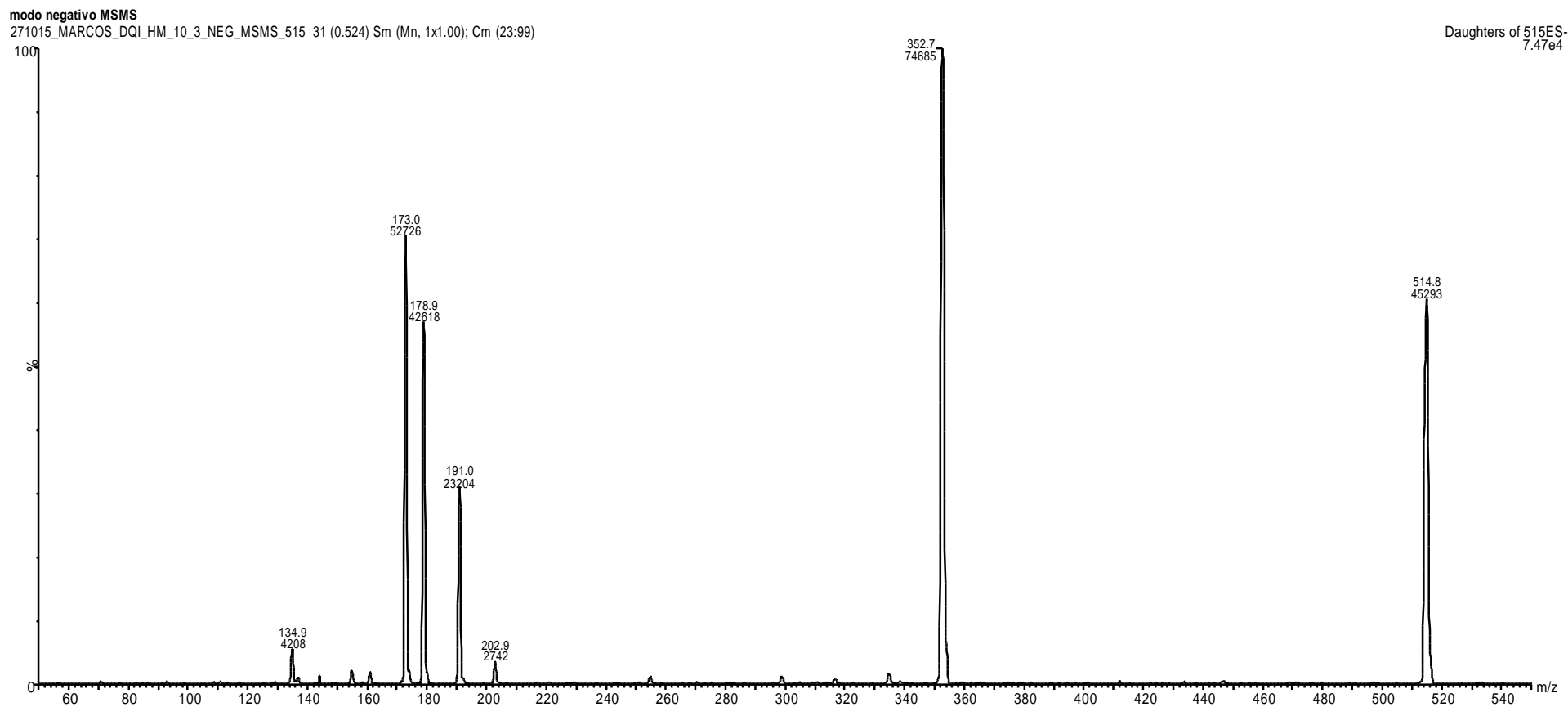
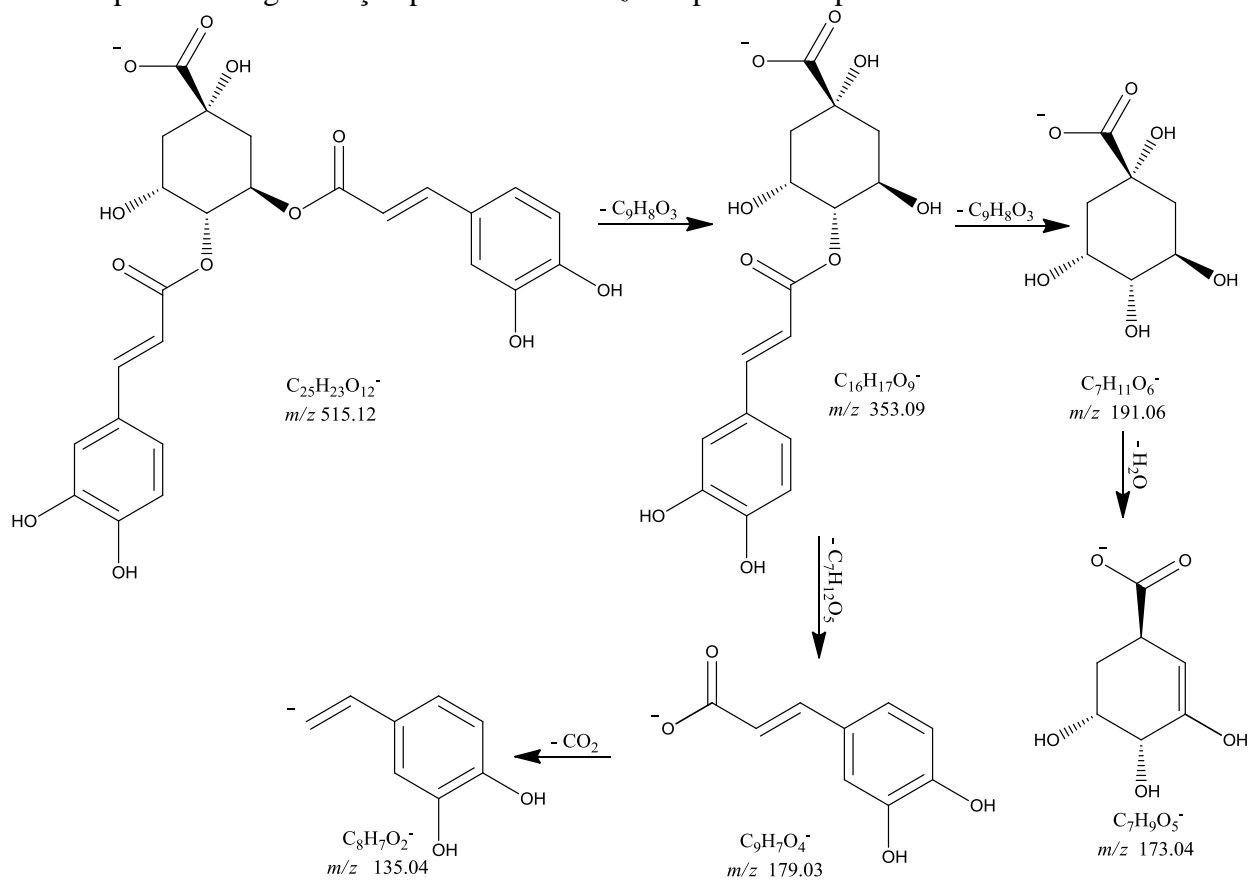


Figura 113: Proposta de fragmentação para o íon de m/z 515 para o composto CP-X.



Metabólitos Produzidos Pelos Fungos Endofíticos Isolados da Espécie Vegetal *C. parvifolia*

Para o nosso estudo relativo a metabólitos secundários de fungos endofíticos de *C. parvifolia* foram escolhidos dezesseis fungos, baseados na morfologia dos mesmos. Todos os extratos foram analisados em CCD (Figura 114). A primeira informação sobre o perfil cromatográfico foi à semelhança dos extratos CF-7, CF-8, CF-11 e CF-12, foi que eles apresentam uma mistura de compostos, dentre essa mistura um composto apresenta maior quantidade. Observa-se também uma semelhança entre o extrato CF-4 com CF-6. Além disso, o extrato CF-13 e CF-16 que apresentam a mesmo comportamento em CCD que o padrão P-I e P-II (padrão Sigma do ácido 3-nitropropiónico).

Todos os extratos foram submetidos a análise de RMN de ^1H e a partir da comparação dos espectros observaram-se sinais nas mesmas regiões para os extratos CF-4 e CF-6; CF-7, CF-8, CF-11 e CF-12; CF-13 e CF-16 (Figuras 115 a 118). Dentre esses extratos, foram escolhidos CF-12, CF-6 e CF-16, relacionado à pureza observada nas análise de espectroscopia e comparação com dados já adquiridos pelo grupo em isolamento de compostos semelhantes, os mesmo foram enviados para análises de RMN 1D e 2D. A discussão relativa aos extratos estudados está apresentada a seguir.

Figura 114: Placa cromatográfica (sílica gel; $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 20%) referente aos extratos de metabólitos secundários provenientes dos fungos endofíticos extraídos da espécie vegetal *C. parvifolia*.

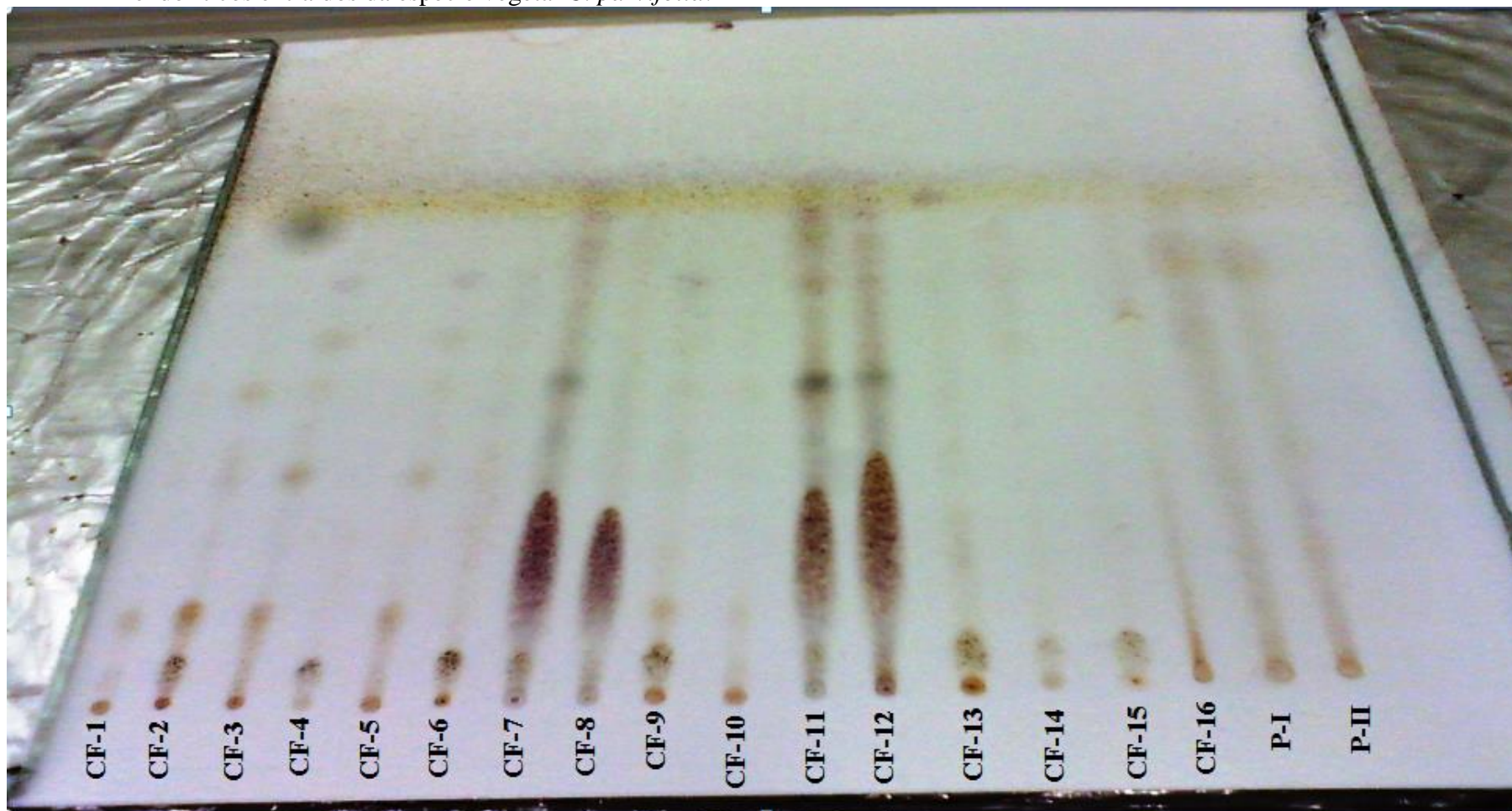
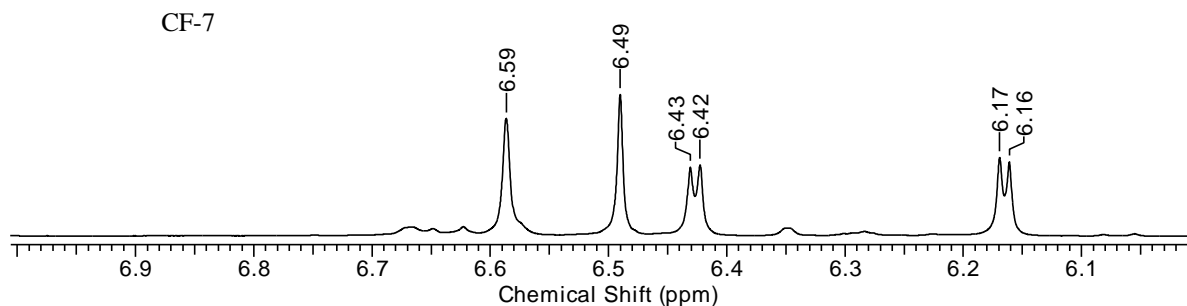
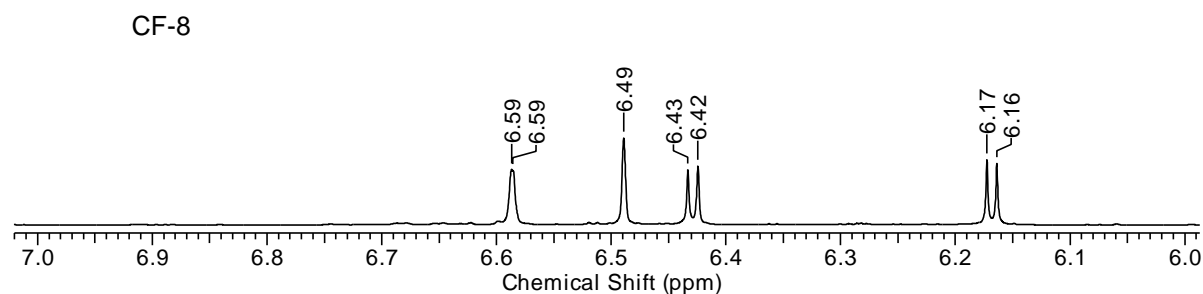


Figure 115: Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 300 MHz), para os extratos brutos CF-7, CF-8, CF-11 e CF-12.

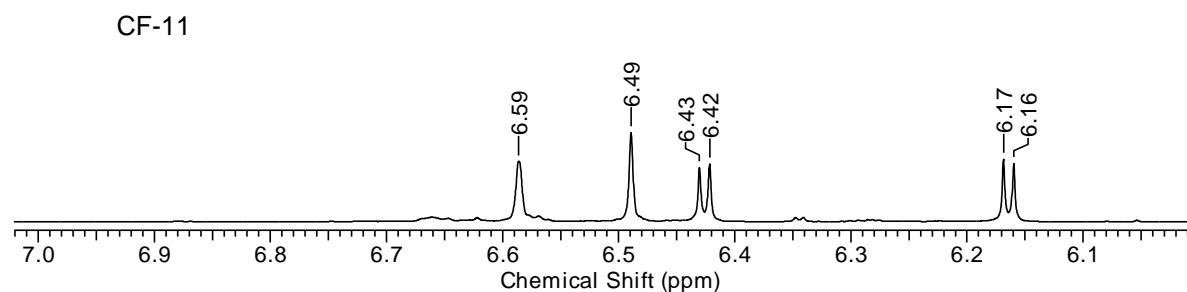
ICAL-31-MeOH.001.esp



ICAL-36-MeOH.001.esp



ICAL-54-MeOH.001.esp



ICAL-59-MeOH.001.esp

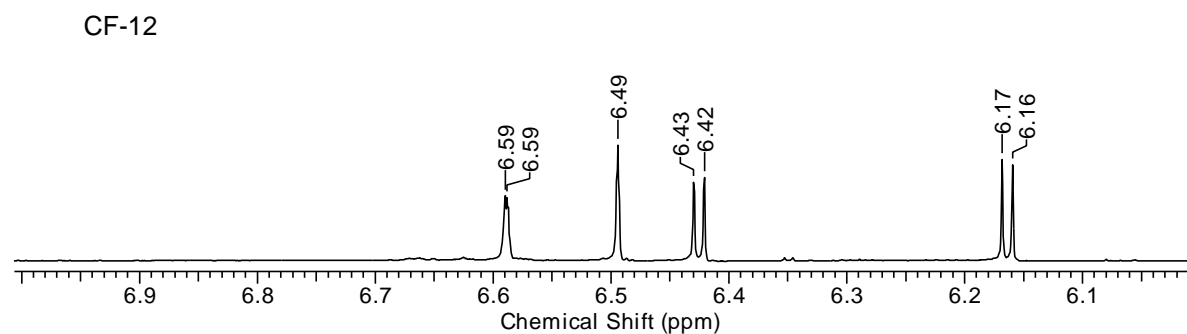


Figure 116: Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 300 MHz), para os extratos brutos CF-7, CF-8, CF-11 e CF-12.

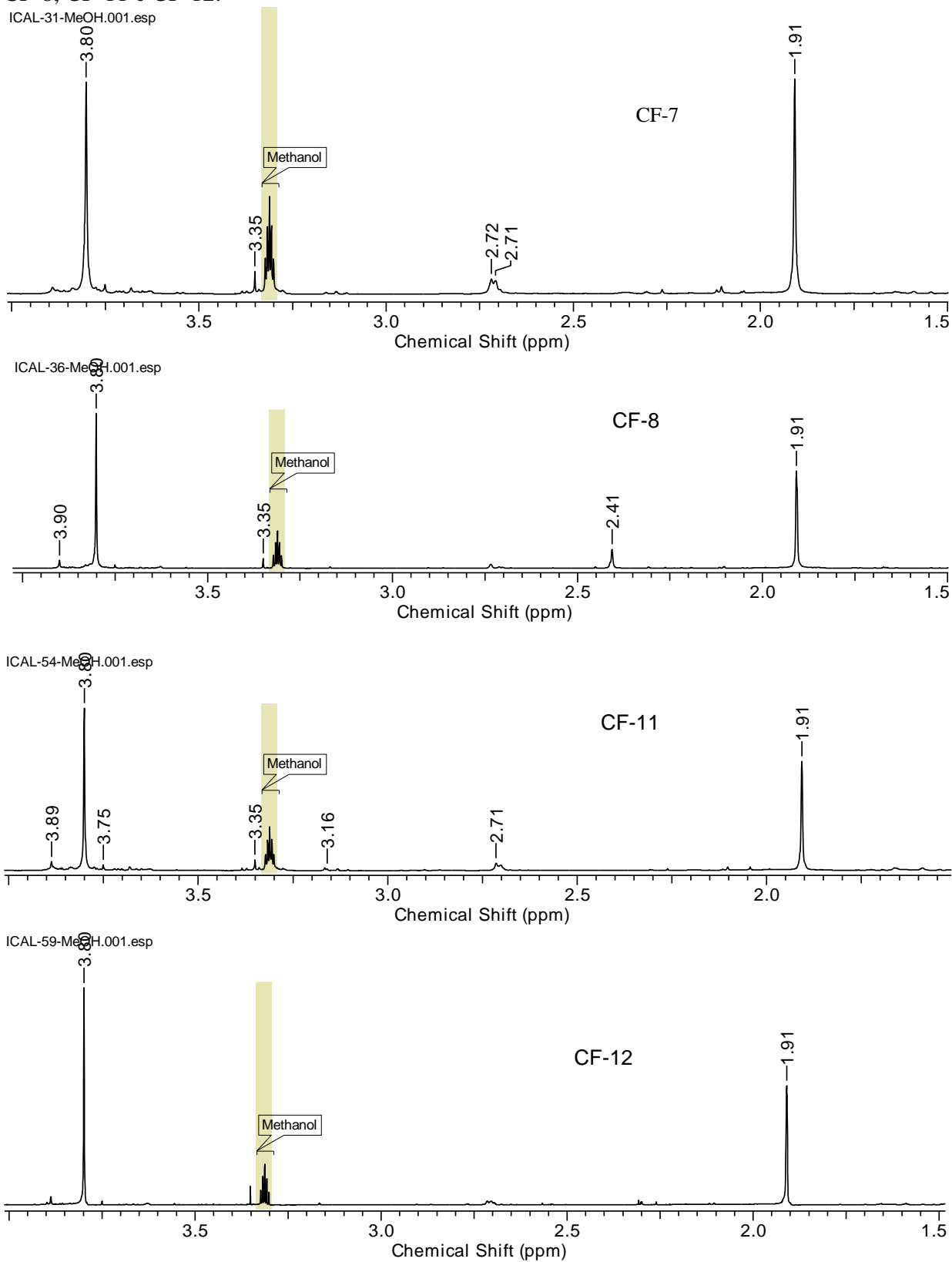
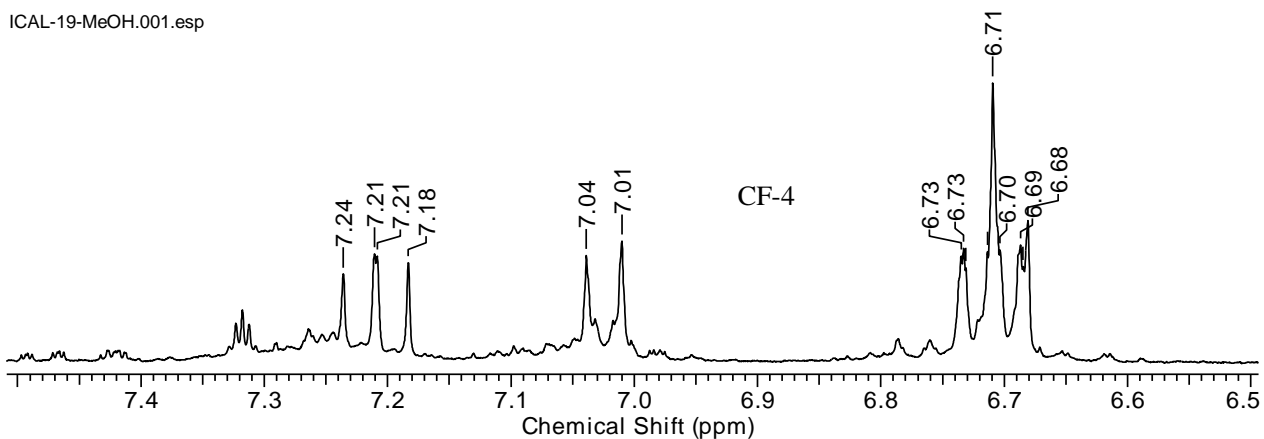
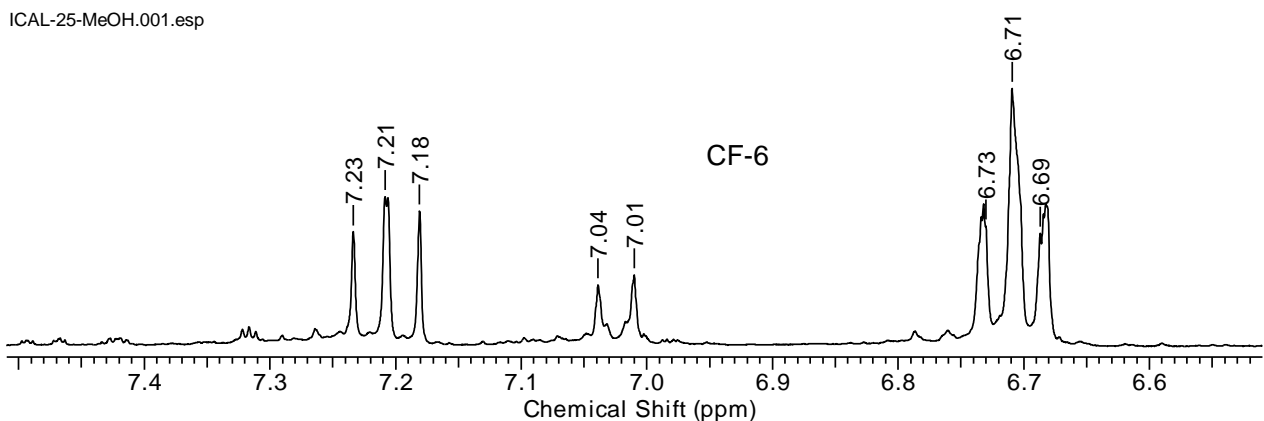


Figure 117: Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 300 MHz), para os extratos brutos CF-4 e CF-6.

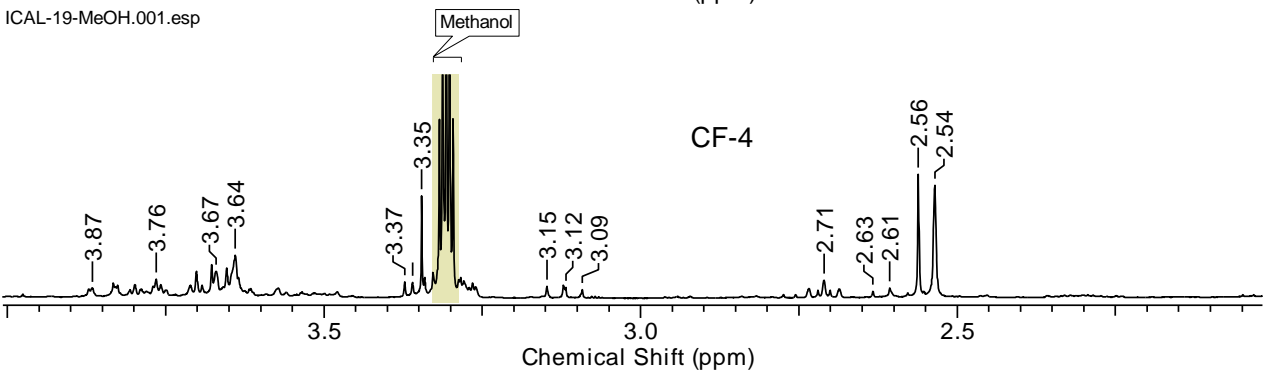
ICAL-19-MeOH.001.esp



ICAL-25-MeOH.001.esp



ICAL-19-MeOH.001.esp



ICAL-25-MeOH.001.esp

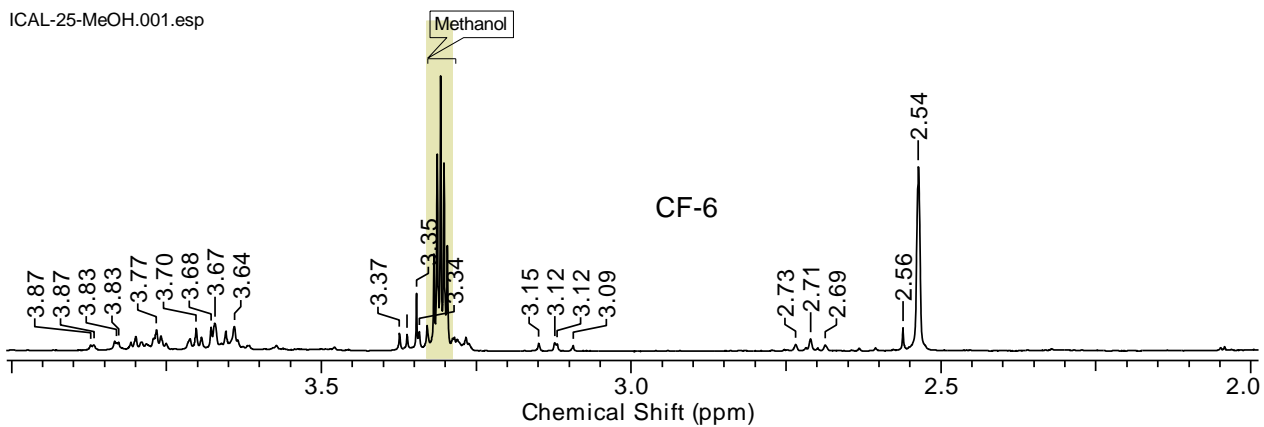
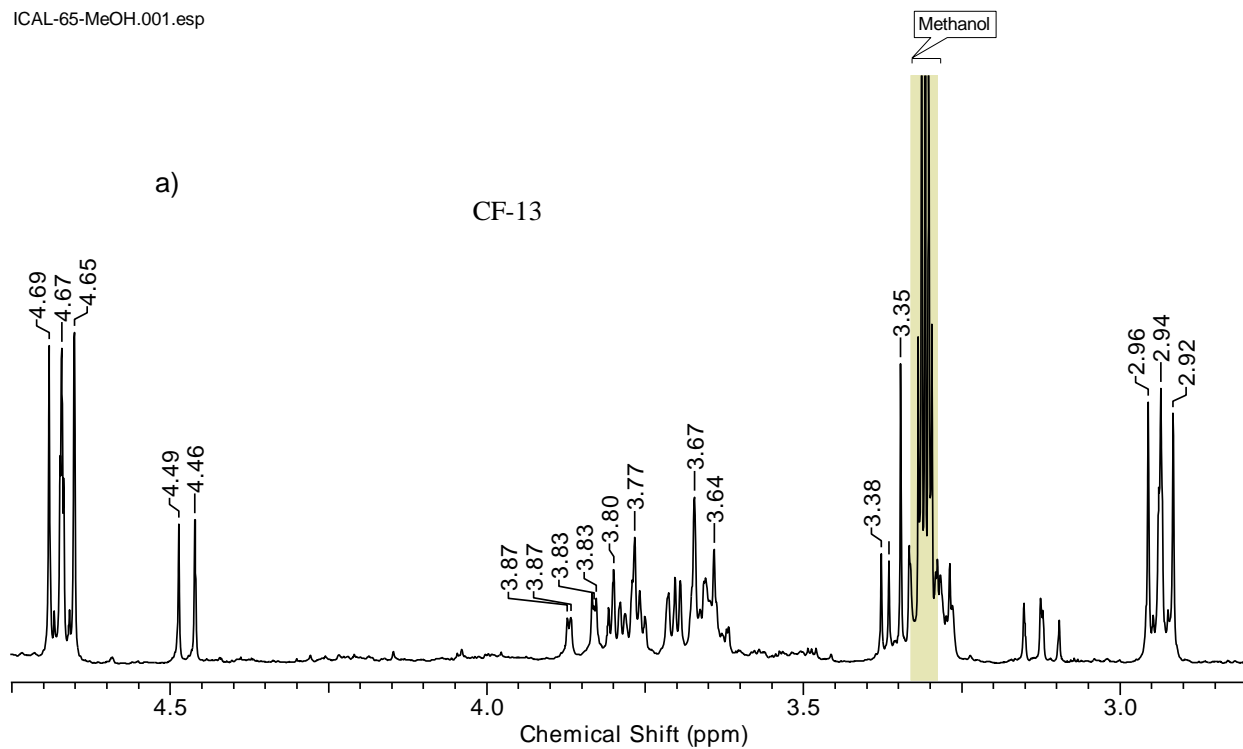
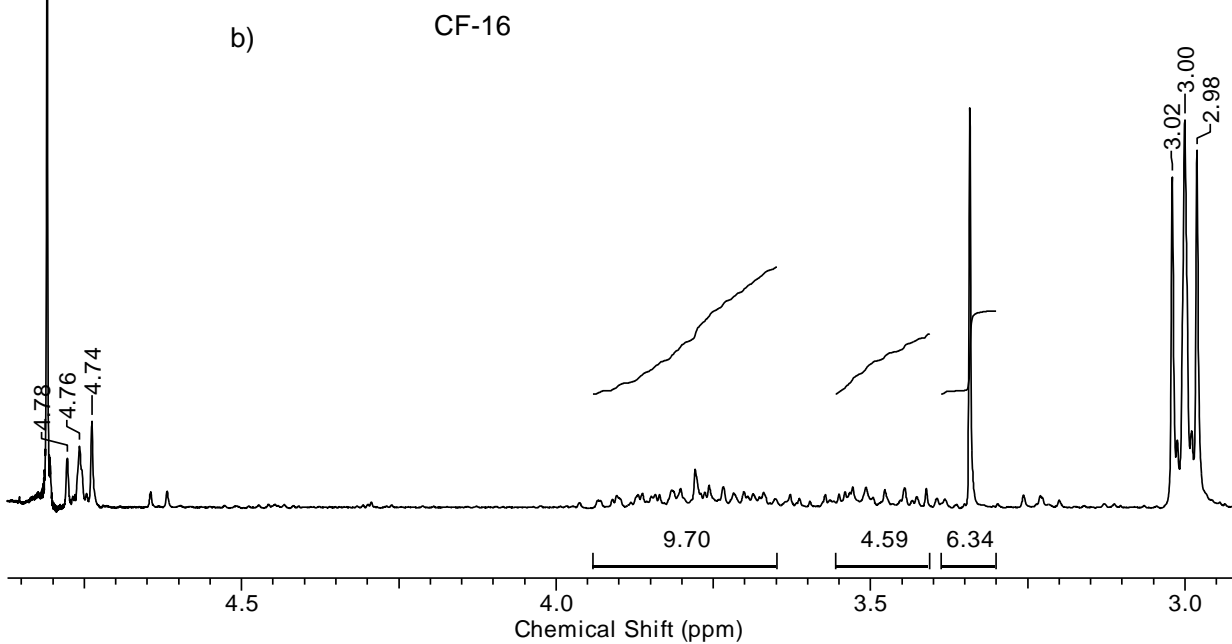


Figure 118: Ampliação do espectro de RMN de ^1H ($\text{CD}_3\text{OD}^{\text{a}}$ e $\text{D}_2\text{O}^{\text{b}}$, 300 MHz), para os extratos brutos CF-13 e CF-16.

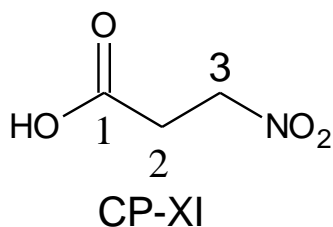
ICAL-65-MeOH.001.esp



ICAL-83-H1.esp



Extrato CF-16 caracterização do composto CP-XI



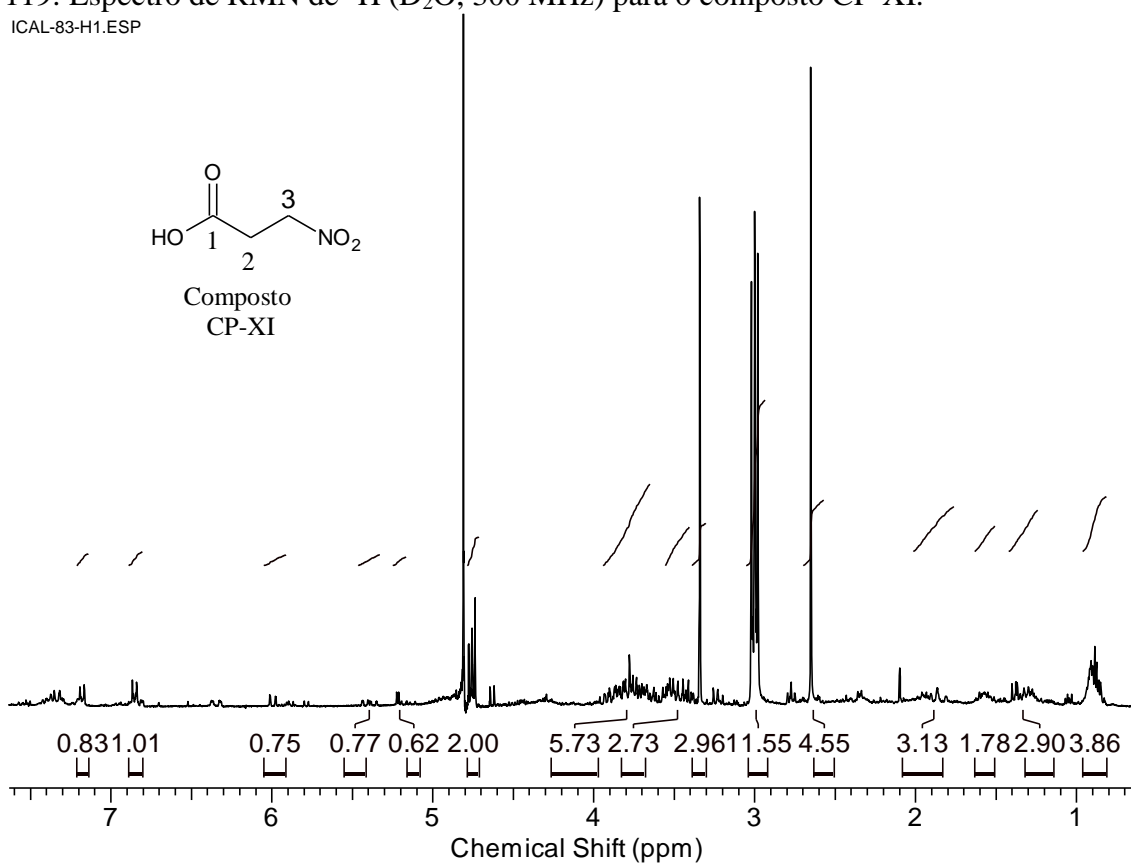
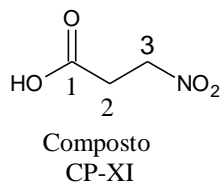
A determinação da estrutura do composto CP-XI presente no extrato CF-16 produzido pelo fungo endofítico *Diaporthe infecunda*, foi realizada a partir da análise dos dados espectroscópicos de RMN ^1H , ^{13}C , COSY (Tabela 25). No espectro de RMN ^1H (Figura 119) foi observado dois tripletos centrados em δ_{H} 3,00 e 4,76 ($J = 6,0$ Hz). No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 120) observou dois carbonos metilênicos em δ_{C} 34,5 e 73,6 referentes aos carbonos C-2 e C-3, e uma carboxila em δ_{C} 174,3. A análise do espectro de COSY (Figura 121) mostrou a correlação entre o hidrogênio em δ_{H} 4,76 com o hidrogênio em δ_{H} 3,00. Sendo assim, foi possível confirmar o composto CF-I como ácido 3-nitropropionico (3-NPA) (FLORES et al., 2013).

Tabela 25: Dados espectroscópicos de RMN de ^1H e ^{13}C (300,0 MHz, D_2O) para o composto Ácido 3-nitropropionico.

Nº	Ácido 3-nitropropionico		Composto CP-XI	
	$\delta_{\text{H m}}$ (J em Hz)	δ_{C}	$\delta_{\text{H m}}$ (J em Hz)	δ_{C}
1		175,8		174,3
2	2,84 t (6,3)	33,8	3,00 t (6,0)	34,5
3	4,64 t (6,3)	72,2	4,76 t (6,0)	73,6

Figura 119: Espectro de RMN de ^1H (D_2O , 300 MHz) para o composto CP-XI.

ICAL-83-H1.ESP



ICAL-83-H1.ESP

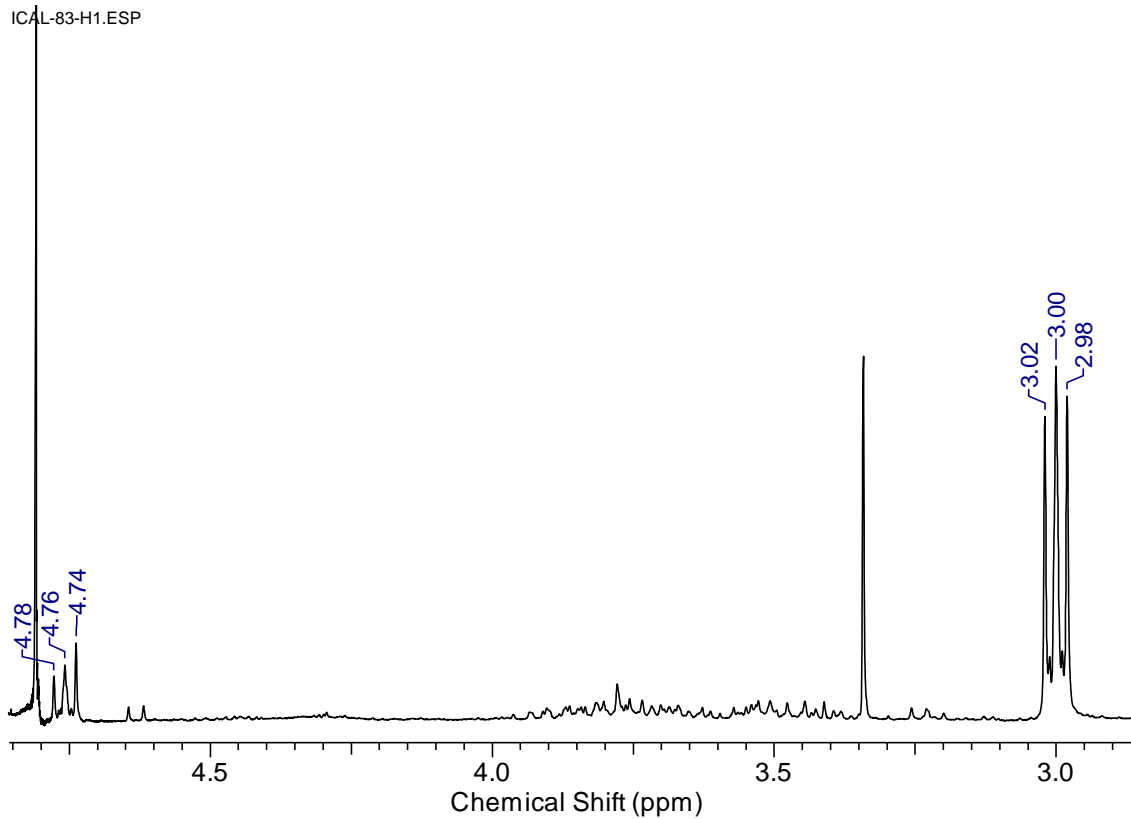


Figura 120: Espectro de RMN de ^{13}C (D_2O , 75,5 MHz) para o composto CP-XI.

ICAL-83-C13.esp

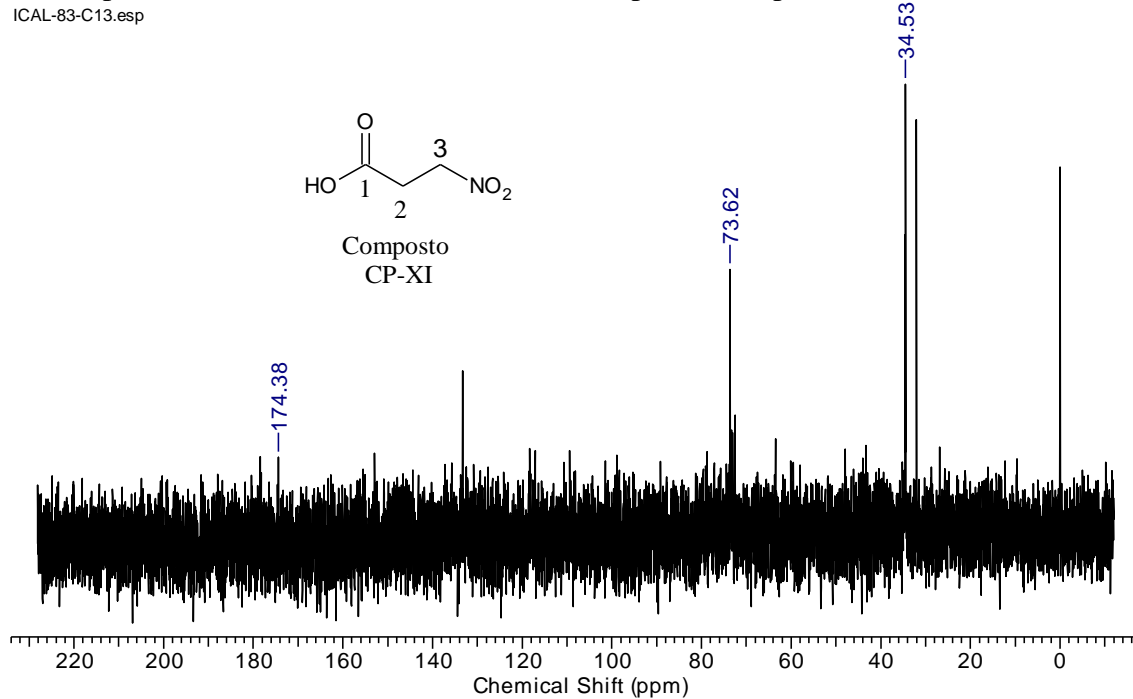
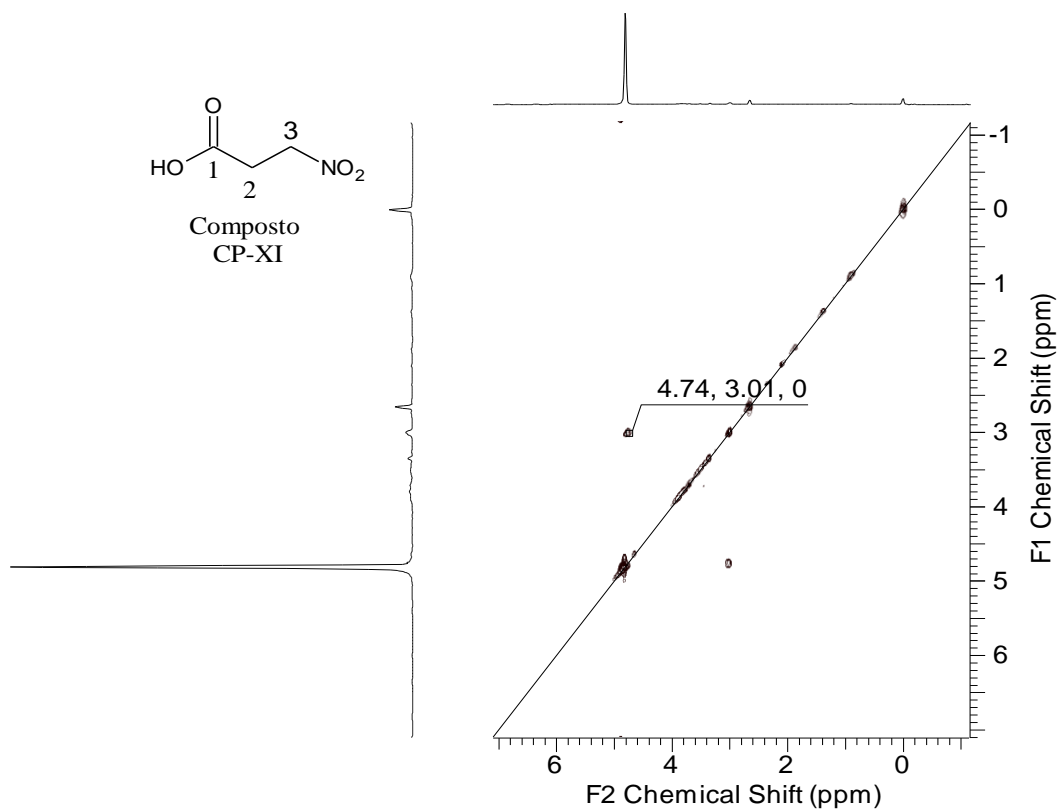
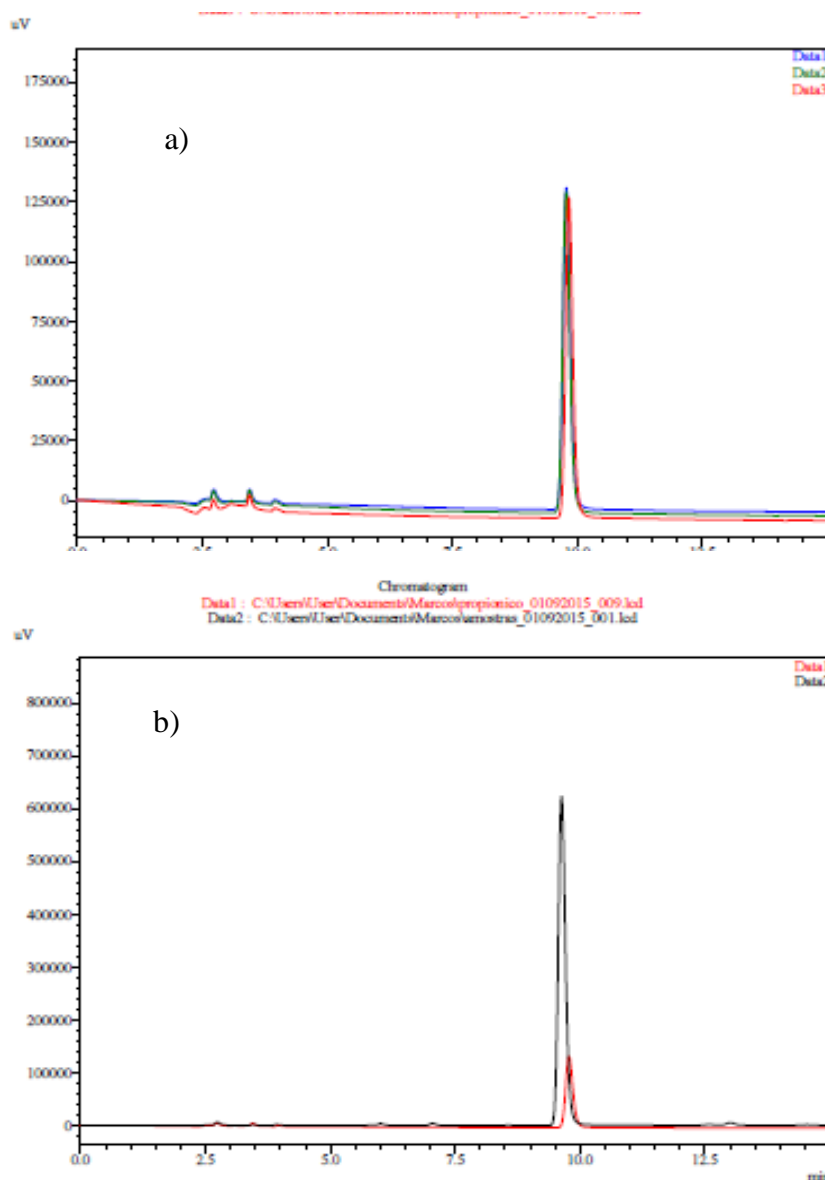


Figura 121: Espectro de RMN de COSY (D_2O , 300 MHz) para o composto CP-XI.



Os cromatogramas obtidos via CLAE do extrato bruto CF-16 e do padrão 3-NPA ($\geq 97\%$, Sigma) apresentaram o mesmo tempo de retenção (9.5-10 min) (Figura 122). Comparando-se estes resultados obtidos com outros trabalhos (MUIR, et. al.; 1984; CHOMCHEON, et. al. 2005; FLORES, et al.; 2013) pode-se confirmar a identificação do composto majoritário presente no extrato bruto como 3-NPA.

Figura 122: Curva de calibração para o composto CF-I e o ácido 3-nitropropilônico em CLAE (C18 – Shim-pack prep.-ODS 250 x 46 mm id (Shimadzu). Detector UV-VIS: modelo SPD-M20A. Fase móvel: 0,15% de ácido ortofosfórico (pH2,0). Fluxo de corrida: 0,9 mL/min. Amostra: 20 μ L. a) Solução padrão de 3-NPA ($\geq 97\%$, Sigma) em triplicata, e b) comparação do composto CP-XI em cor vermelho com o padrão em preto.



A literatura descreve o isolamento desse composto em plantas leguminosas e em fungos (FRANCIS, et. al.; 2013). Dessa forma, a literatura sugere duas rotas biosintéticas para a produção desse composto como metabólito secundário para fungos endofíticos (Figura 123) e plantas (Figura 124) (FRANCIS, et. al.; 2013).

Figura 123: Proposta biosintética do ácido 3-nitropropiónico proveniente de fungo.

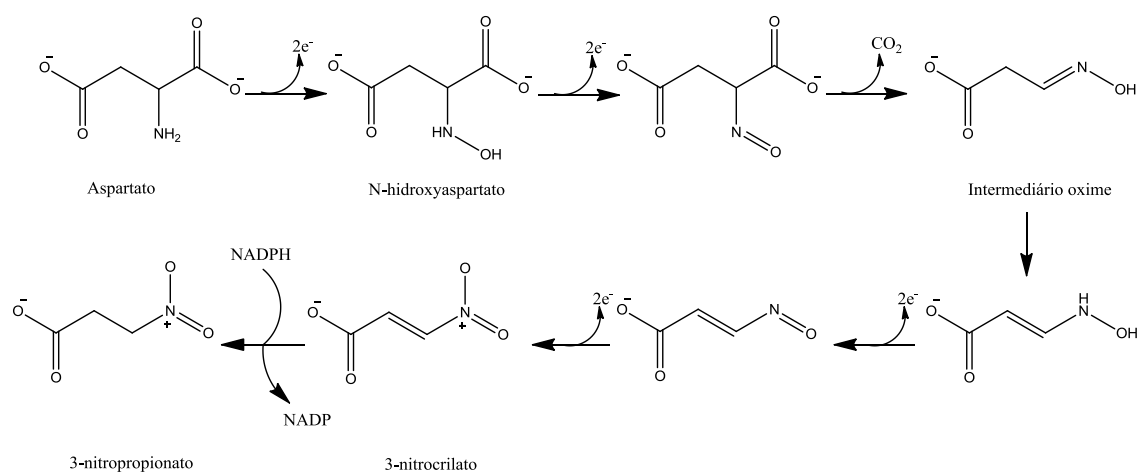
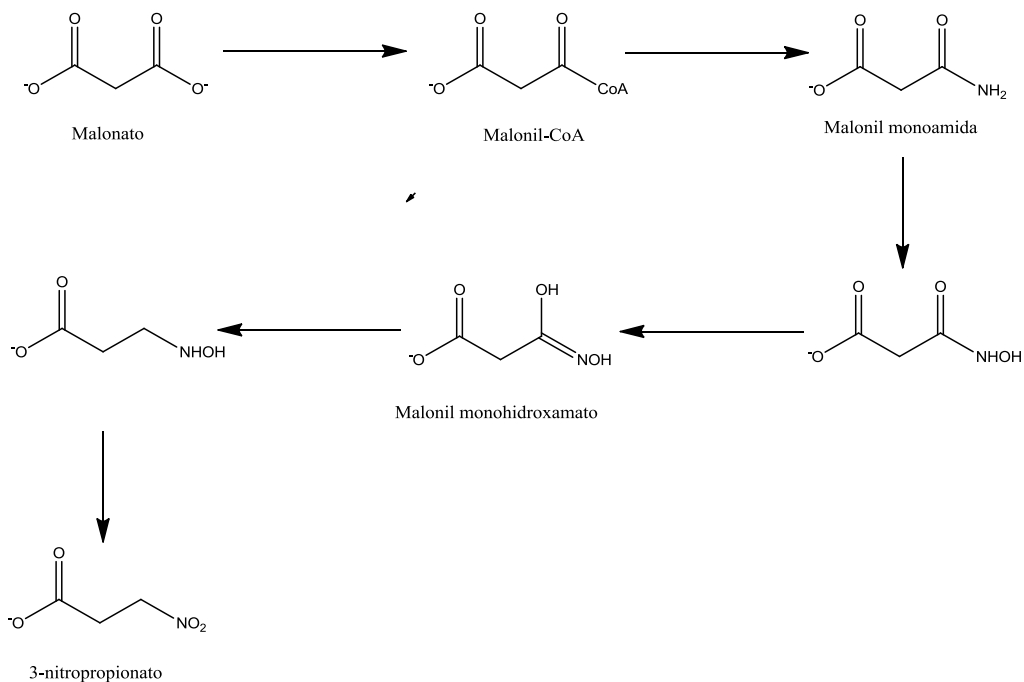
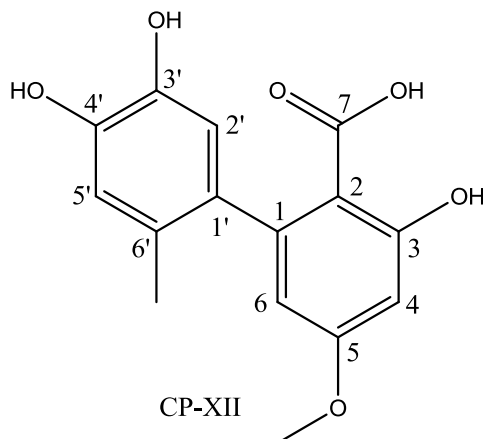


Figure 124: Proposta biosintética do 3-NPA em plantas.



Extrato CF-12 caracterização do composto CP-XII



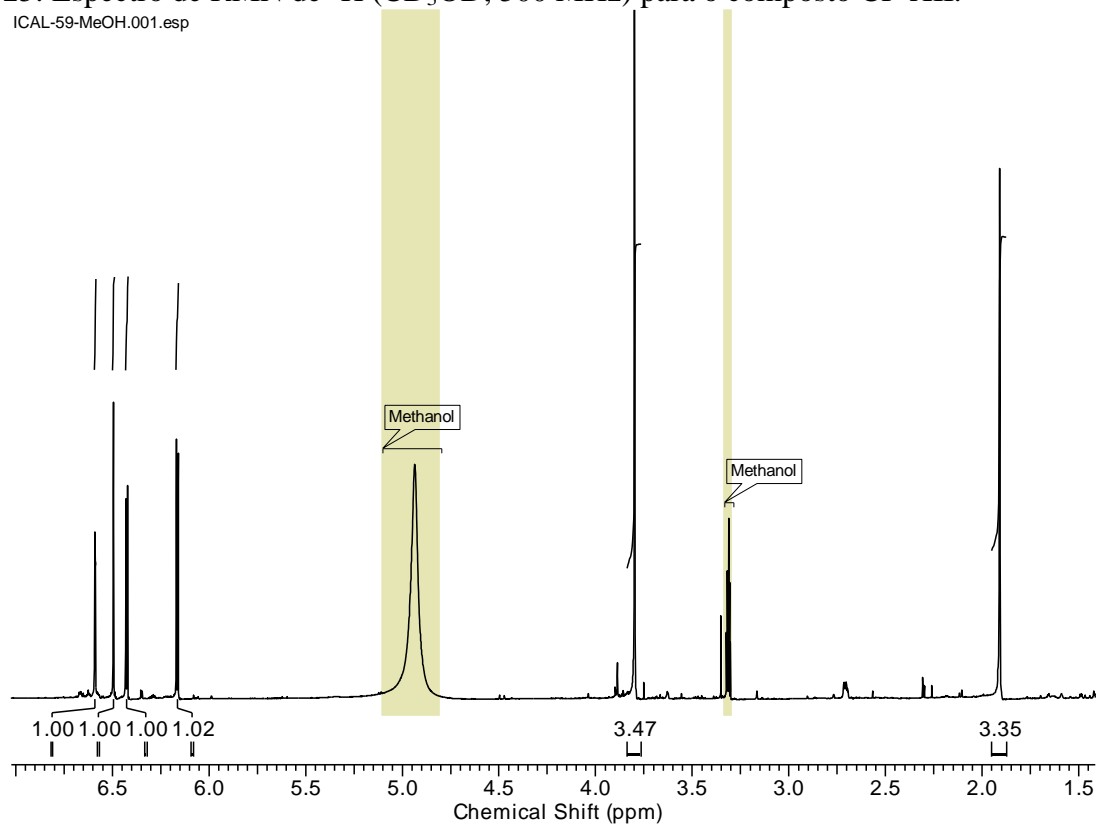
A determinação da estrutura do composto CP-XII, presente no extrato CF-12 produzido pelo fungo endofítico *Alternária* sp que foi realizada a partir da análise dos dados espectroscópicos de RMN ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC e HMBC.

No espectro de RMN ^1H (Figura 125) foram observados os sinais em δ_{H} 6,16 (H-6) e 6,42 (H-4) como dupletos com constante de acoplamento de 2,6 Hz, característico de uma substituição *meta*, observa-se também um singlete em δ_{H} 6,49 (H-2') e um sinal em 6,59 (d; $J = 0,4$ Hz; H-5') indicando uma substituição *para*. Além disso, observou-se a presença de dois singletos em δ_{H} 3,80 e 1,91 referentes aos hidrogênios dos grupos metoxila e metila, respectivamente.

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 126) apresentou um sinal característico para carbonos quaternários aromáticos ligados diretamente em átomos de oxigênio em δ_{C} 165,1 (C-5), 165,7 (C-3), 144,2 (C-4') e 143,4 (C-3'). Também foi observados sinais para um grupo carboxila em δ_{C} 174,5 (C-7), uma metila em δ_{C} 19,1, uma metoxila em δ_{C} 56,2. Outra informação foi à presença de carbonos em δ_{C} 100,6 (C-4), 107,4 (C-2), 111,5 (C-6), 116,7 (C-2'), 117,5 (C-5'), 127,3 (C-6'), 135,3 (C-1') e 148,1 (C-1).

Figura 125: Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) para o composto CP-XII.

ICAL-59-MeOH.001.esp



ICAL-59-MeOH.001.esp

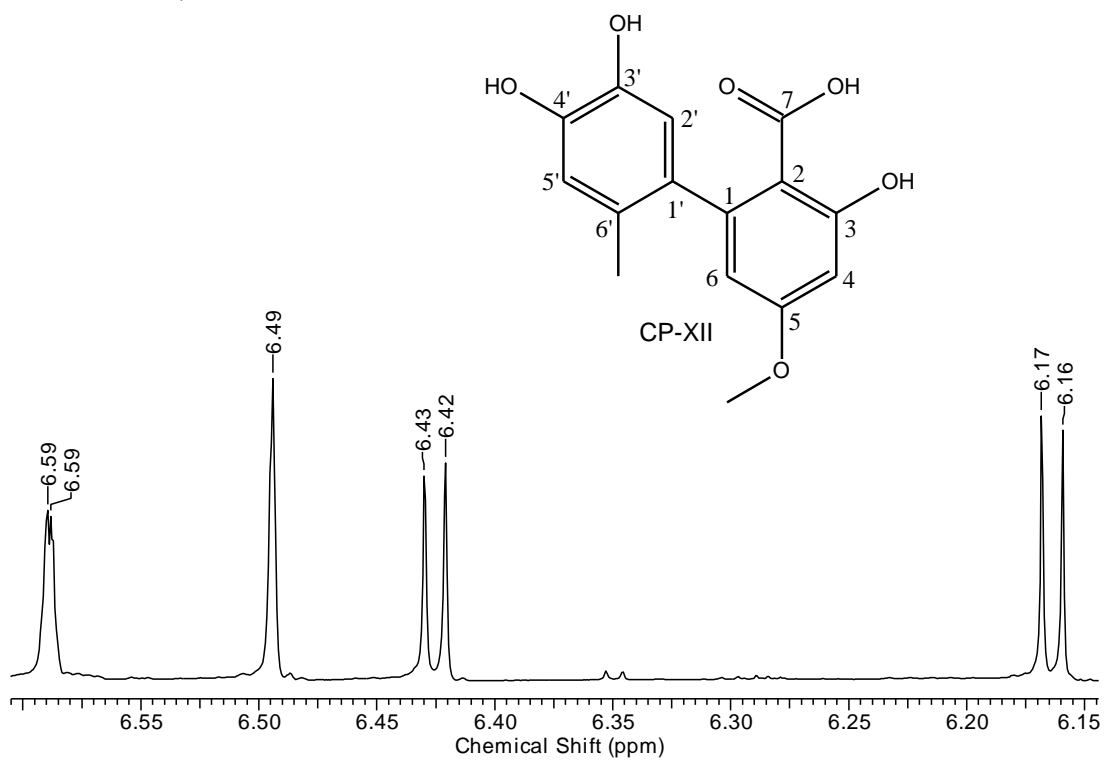
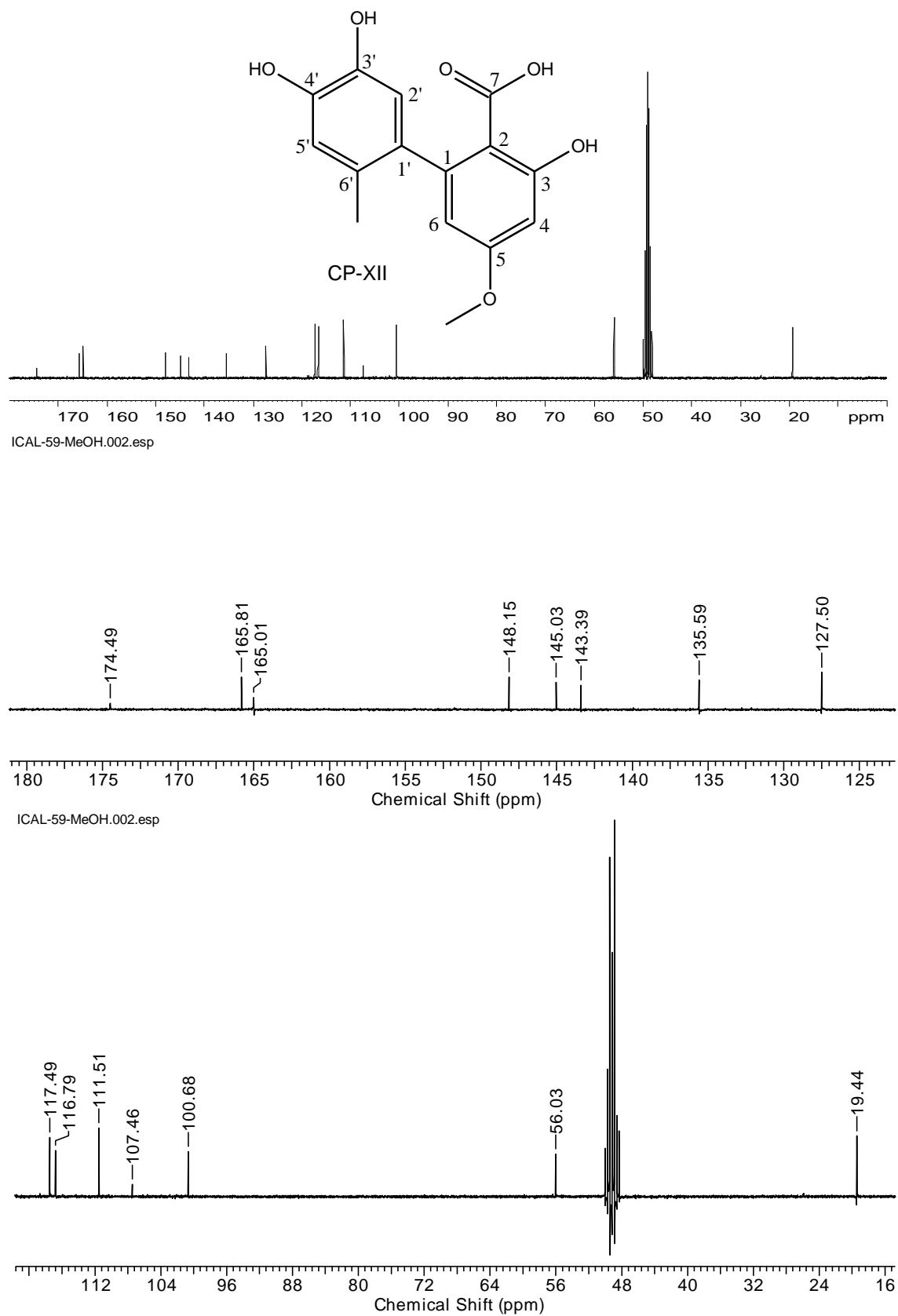


Figura 126: Espectro de RMN de ^{13}C (CD_3OD , 75,5 MHz) para o composto CP-XII.



As correlações entre os carbonos e seus respectivos hidrogênios foram observadas no espectro de HSQC (Figura 127). Neste espectro observou-se a correlação dos hidrogênios em δ_H 6,42, 6,16, 6,49 e 6,59 com os carbonos C-4, C-6, C-2' e C-5', respectivamente. Além disso, foram observados dois sinais em δ_C 56,0 e 19,4 correlacionados com os hidrogênios do grupo metoxila e metila, respectivamente.

O espectro de HMBC (Figura 128 e 129) mostrou a correlação entre o hidrogênio aromático em δ_H 6,59 com os carbonos C1', C3' e C4' e com o carbono em δ_C 19,4, e confirmando o grupo metila no C-6'. Também foi observada a correlação entre o hidrogênio em δ_H 6,49 com os carbonos em δ_C 143,4 e 148,1; essas correlações conectam os dois anéis aromáticos. Outra informação foi à correlação do hidrogênio H-6 com o carbono 134,7. A posição do grupo metoxila no C-5 foi estabelecida pela correlação entre o hidrogênio em δ_H 3,80 com o carbono em δ_C 165,1.

A confirmação do composto CP-XII foi atribuída pela comparação com os dados espectroscópicos de RMN de 1H e ^{13}C com dados da literatura (Tabela 26), concluindo que esse composto trata-se do alternusin (ALY, et. al.; 2008; DE SOUZA, et. al.; 2013). A proposta da rota de biossíntese para o composto alternusin está descrito na Figura 130 (SUN, et. al., 2012).

Figura 127: Espectro de HSQC e expansão (CD₃OD, 500 MHz) para o Composto CP-XII.

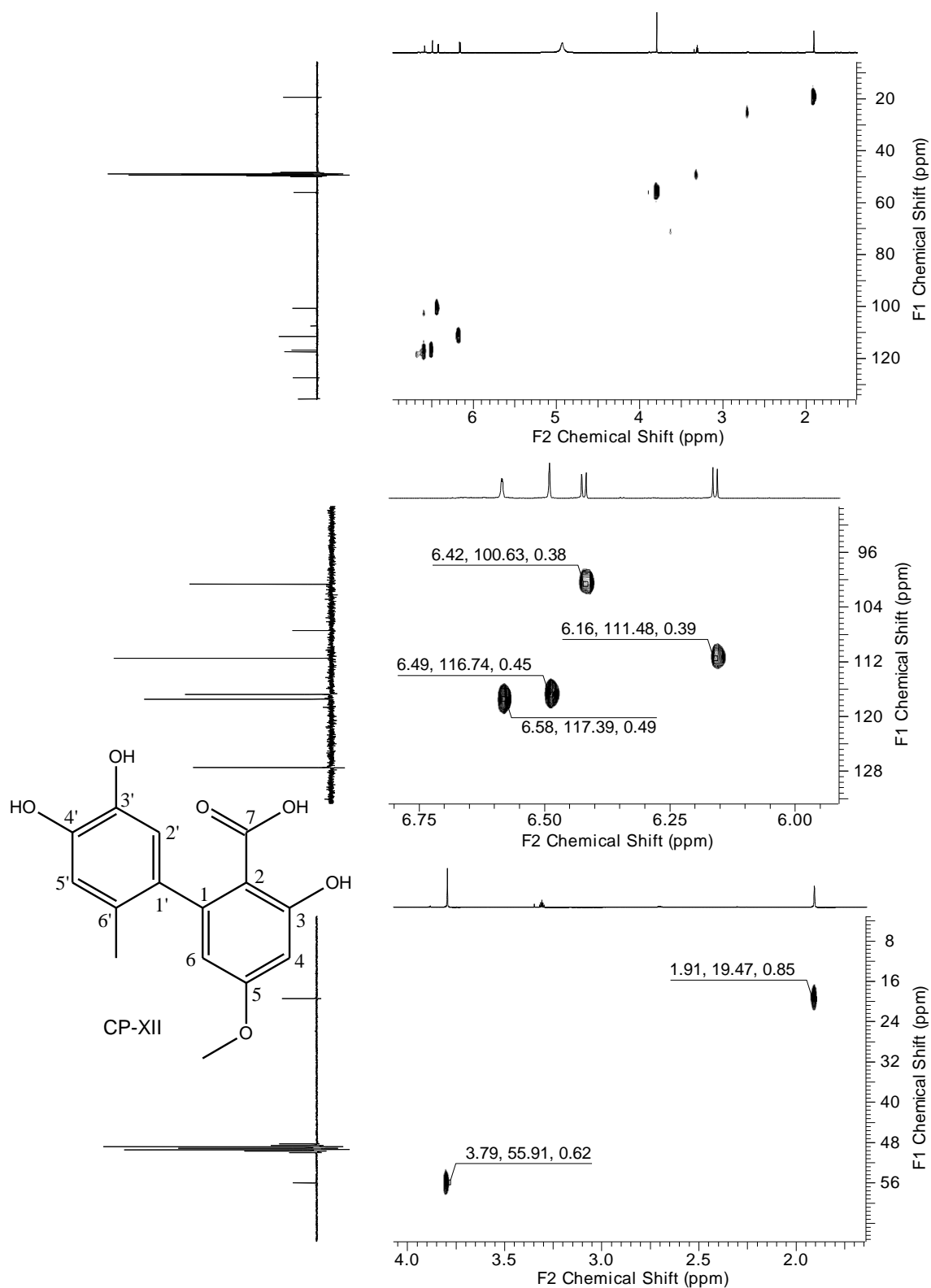


Figura 128: Espectro de HMBC (CD₃OD, 500 MHz) para o Composto CP-XII.

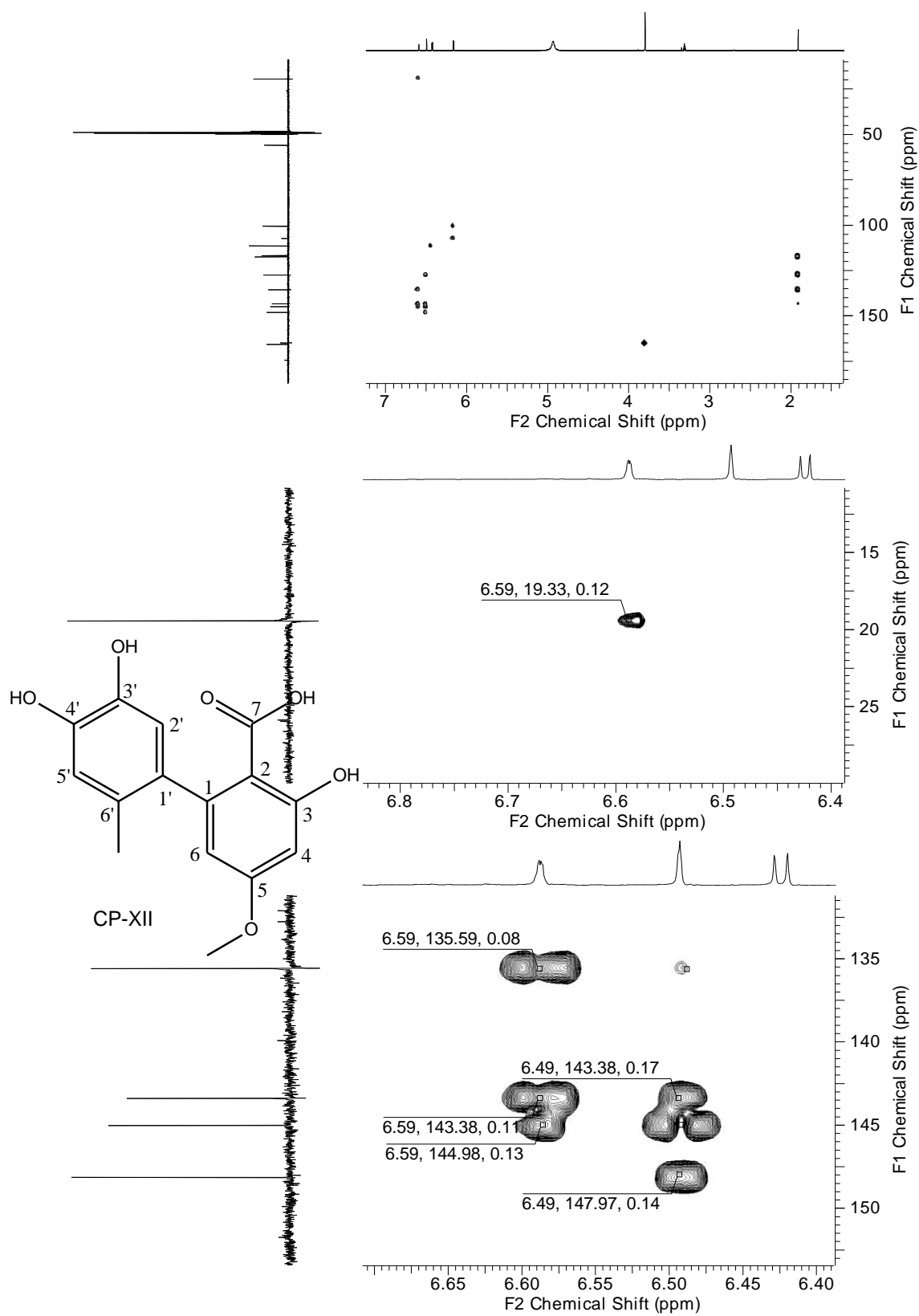


Figura 129: Expansão do espectro de HMBC (CD_3OD , 500 MHz) para o Composto CP-XII.

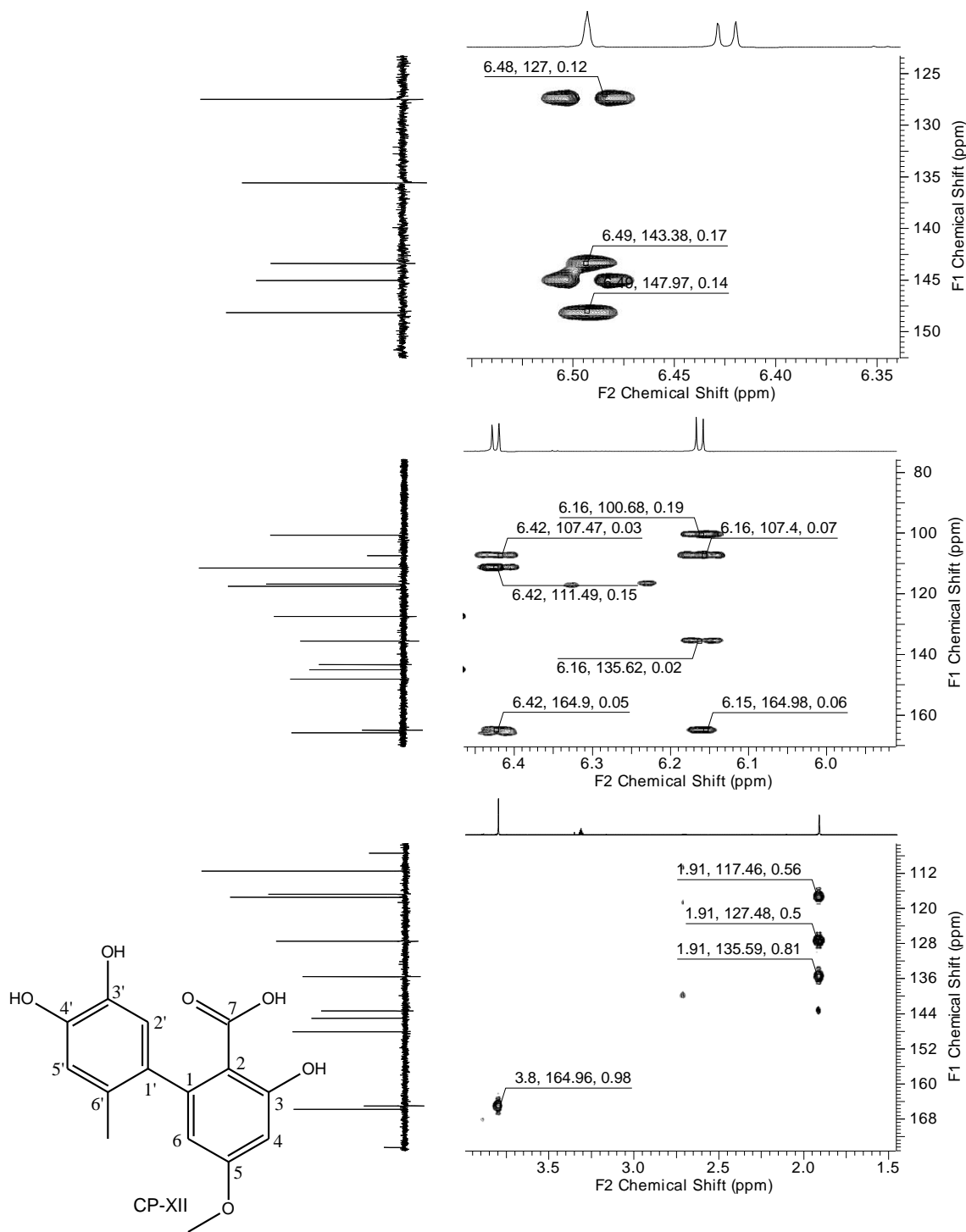
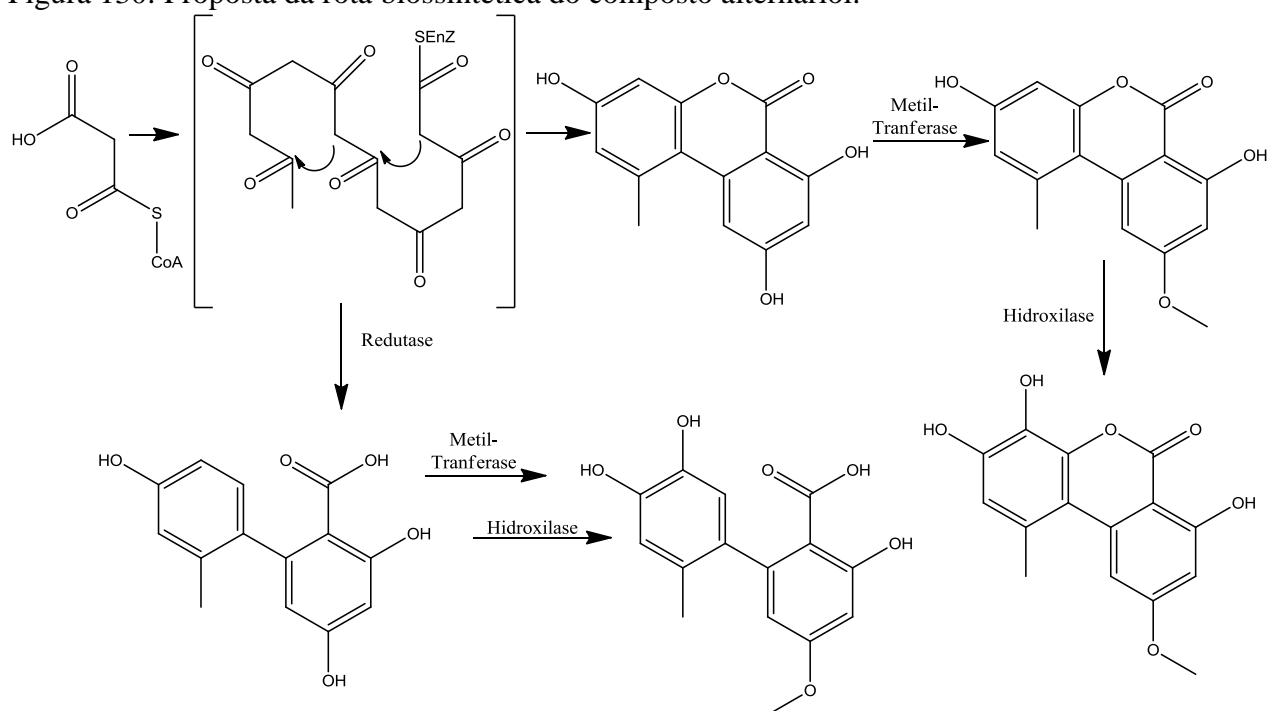


Tabela 26: Dados espectroscópicos de RMN de ^1H e ^{13}C (500,0 MHz, CD_3OD) para o Composto CP-XII e o composto altenusina.

	Altenusina		Composto CP-XII		HMBC
	δ_{H} mult. (J em Hz)	δ_{C}	δ_{H} mult. (J em Hz)	δ_{C}	
1		147,2		148,1	
2		105,3		107,4	
3		165,7		165,8	
4	6,47 d (2,6)	100,6	6,42 d (2,8)	100,6	3, 4,
5		165,1		165,1	
6	6,19 d (2,6)	111,4	6,16 d (2,8)	111,5	6, 2
7				174,5	
1'		134,7		135,3	
2'	6,52 s	116,4	6,49 s	116,7	6', 3', 4', 1
3'		142,5		143,4	
4'		144,2		144,9	
5'	6,63 s	117,1	6,59 d (0,4)	117,5	6', 3', 4'
6'		127,6		127,3	
5-OCH ₃	3,81 s	56,2	3,80 s	56,0	5
6'-CH ₃	1,90 s	19,1	1,91 s	19,4	5', 6', 1'

Figura 130: Proposta da rota biossintética do composto alternariol.



O extrato CF-12 da qual foi isolado o composto CP-XII foi analisada por infusão direta em modo positivo, utilizando fonte de ionização por eletrospray (ESI) em espectrômetro de massas com analisador do tipo triplo-quadrupolo. No espectro de ESI-(+)-MS/MS foram observados dois picos característicos da classe de compostos do tipo alternariol (Figura 131) (DE SOUZA et. al., 2013) de m/z 291 e 273, referentes aos compostos alternusin e alternariol monometil-éster, respectivamente. O isolamento dessa série de compostos é bem descrita na literatura com o uso de estudos de HPLC-ESI-MS/MS (VISHWANATH, et. al., 2009; DE SOUZA, et. al., 2013; VARGA, et. al., 2013).

No espectro de ESI-(+)-MS/MS do íon de m/z 291 $[M+H]^+$ (Figura 132) foi observado pico base de m/z 273, referente à eliminação de água e um fragmento $[C_{14}H_{13}O_4]^+$ de m/z 245, proveniente da eliminação do monóxido de carbono, a partir do íon precursor. O íon de m/z 273 foi representado de duas formas na proposta de fragmentação (Figura 148). Esse comportamento ocorre porque compostos com unidades aromáticas substituídas por grupo hidroxila vizinhos podem formar um epóxido via uma desidratação do anel aromático em uma análise de ESI-(+)-MS/MS (PANDEY, et. al. 2014). Com essa informação foi possível propor os fragmentos iônicos de m/z 255 e o íon produto de m/z 227 $[C_{14}H_{11}O_3]^+$, referentes a desidratação e eliminação de monóxido de carbono do íon $[C_{15}H_{13}O_5]^+$. A proposta de fragmentação do íon precursor de m/z 291 $[M+H]^+$ foi exemplificado na figura 133.

Figura 131: Espectro de fragmentação ESI-(+)-MS/MS do extrato bruto CF-12.

Ical_59pos (NOVOS PARAMETROS)

22072015_ICAL_59_POS_C 6 (0.101) Cm (6:80)

Scan ES+
7.29e6

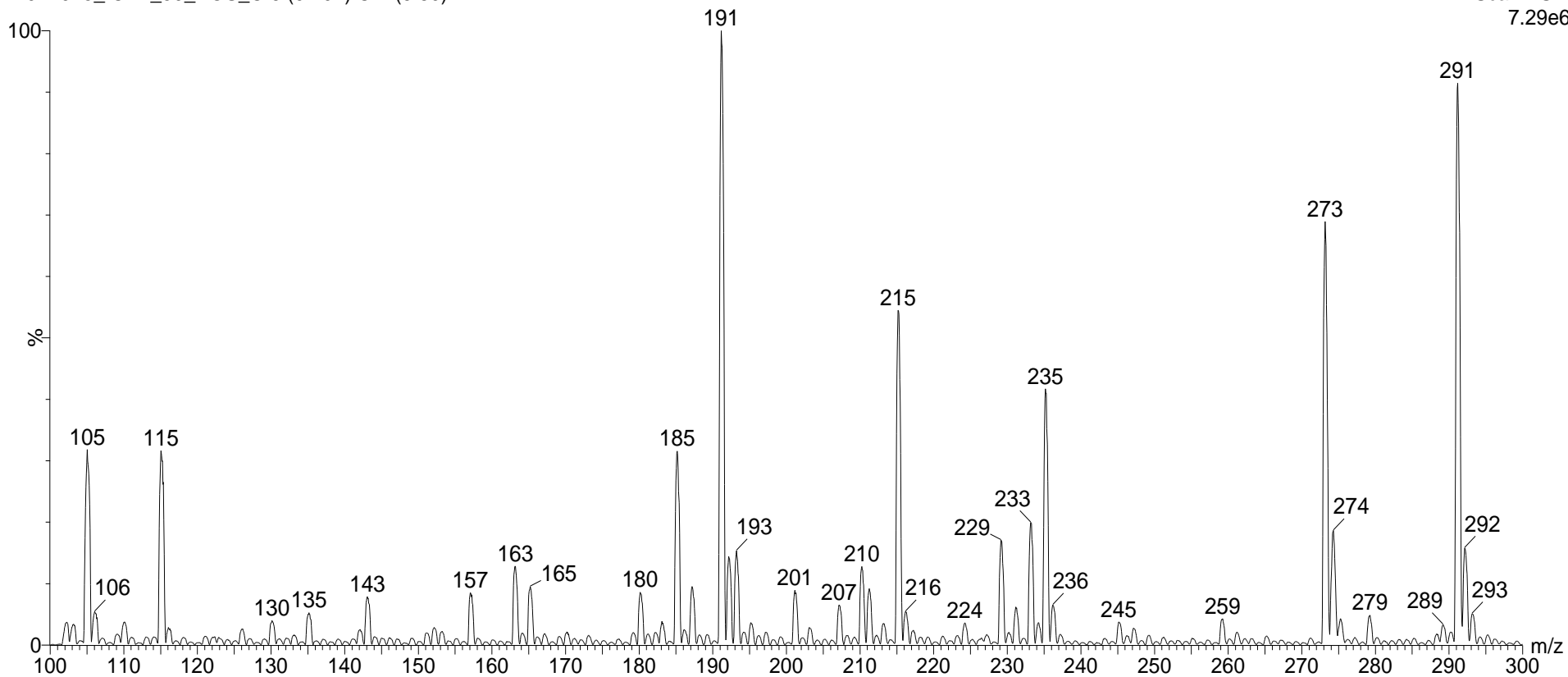


Figura132: Espectro de fragmentação ESI-(+)-MS/MS do íon de m/z 291 do extrato CF-12.

Ical_59pos_291

22072015_ICAL_59_POS_291 27 (0.456) Cm (21:58)

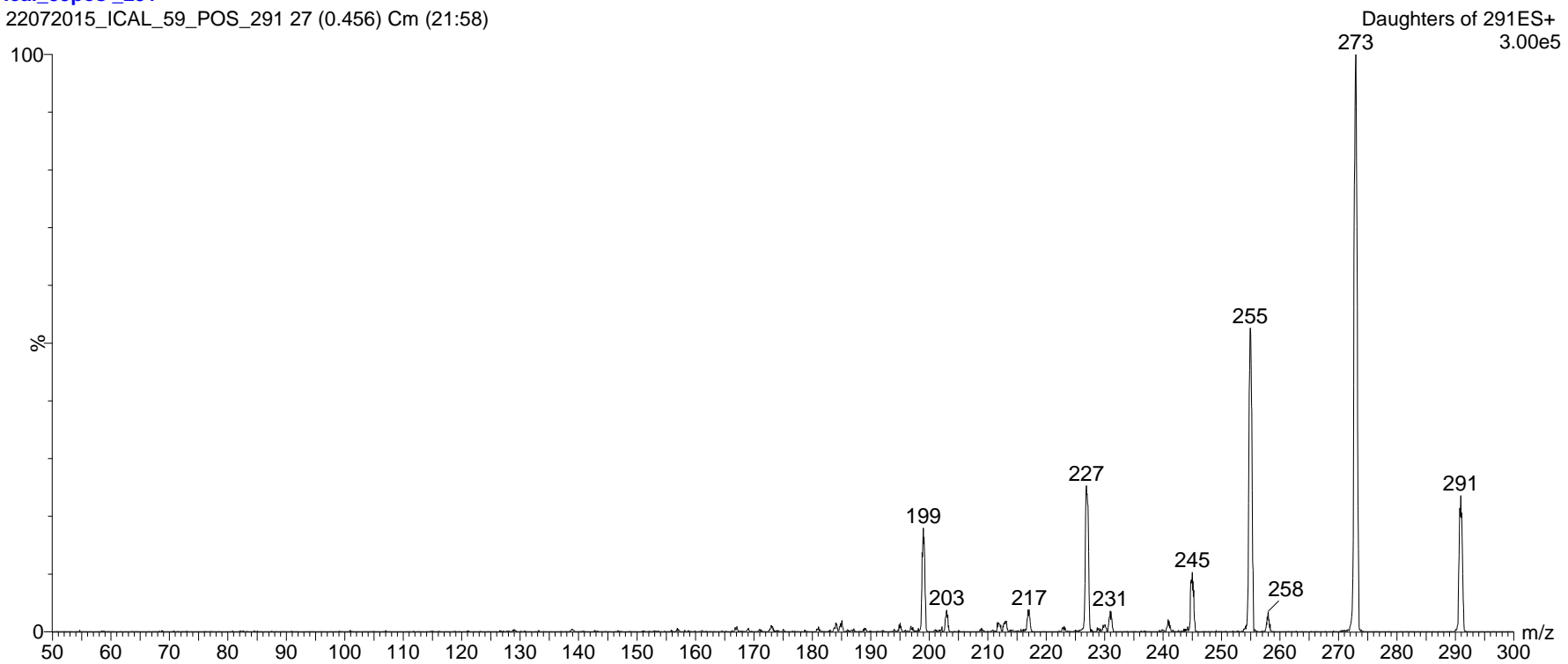
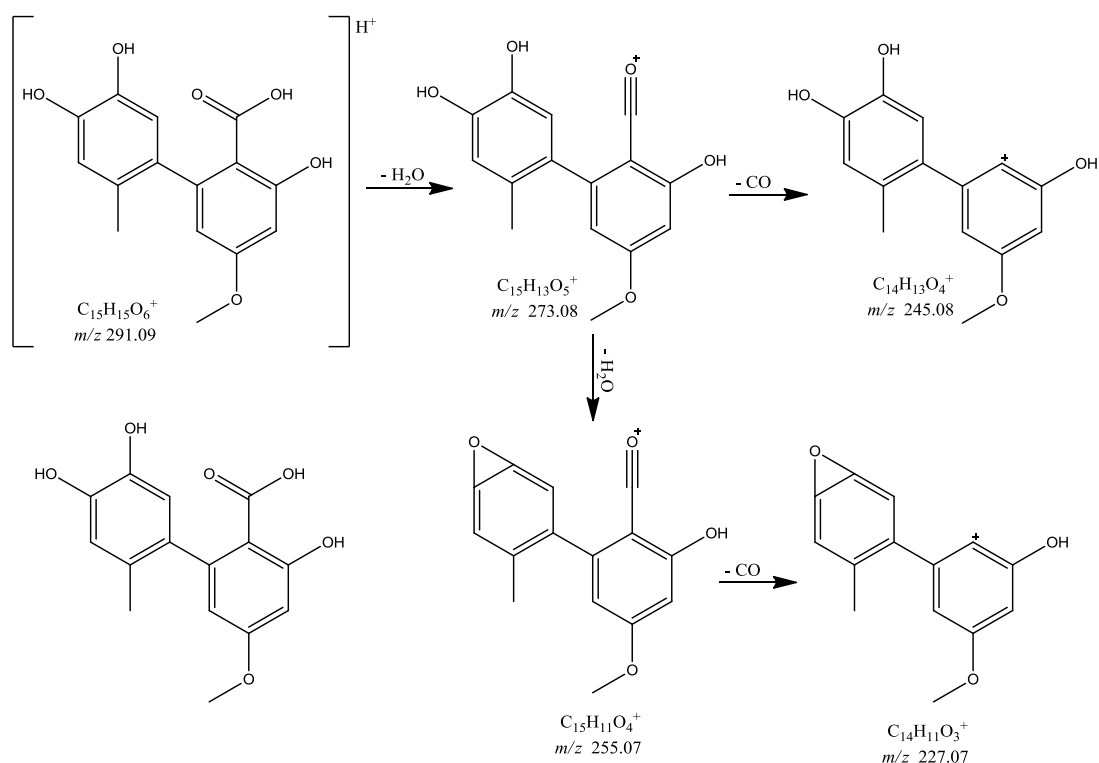


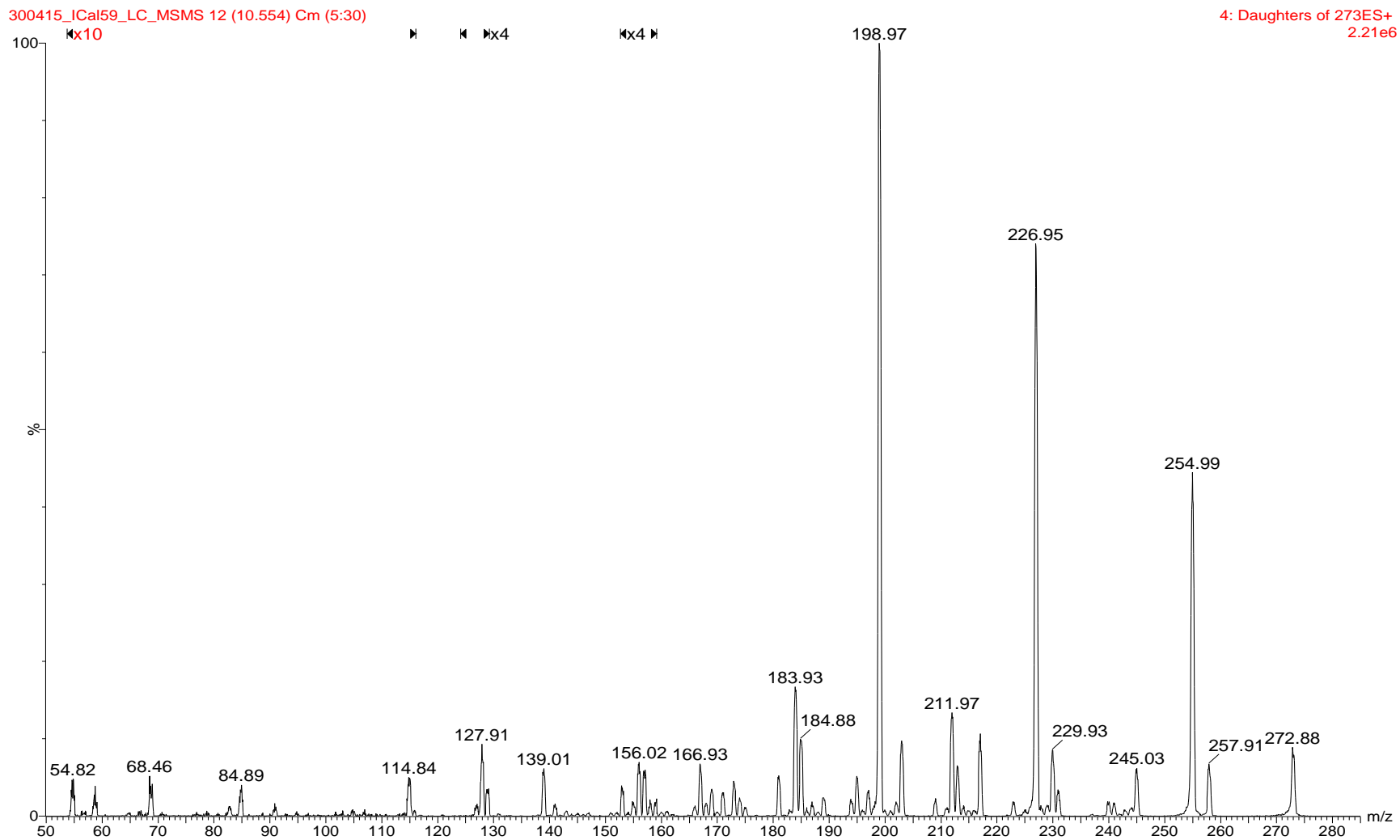
Figura 133: Proposta de fragmentação para o íon de m/z 291.



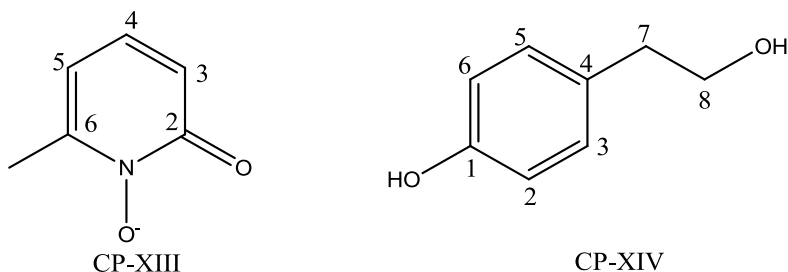
Baseado no perfil de fragmentação para o composto alternusin foi possível estudar o íon precursor de m/z 273 (Figura 134), e propor a estrutura do composto alternariol monometil-éster que não foi detectado por análise espectroscópicas de RMN 1D e 2D, e seus fragmentos. Esse espectro apresentou um pico do íon base com m/z 199, um fragmento $[C_{15}H_{13}O_5]^+$ com m/z 273, um íon produto de m/z 255 e um fragmento $[C_{14}H_{13}O_4]^+$ de m/z 245.

Para esse composto foi observado um sinal de m/z 273 para o íon precursor, um sinal de m/z 255 referente ao íon $[C_{15}H_{11}O_4]^+$, proveniente da perda de uma molécula de água. Outro sinal observado no espectro de ESI-(+)-MS/MS foi o pico de m/z 245, resultado da perda de uma molécula de monóxido de carbono. Após a desidratação do produto de íon $[C_{14}H_{13}O_4]^+$, foi observado um pico de m/z 277 e posterior eliminação de um molécula de água para esse íon gerou o pico de m/z 199, referente ao pico base do espectro.

Figura 134: Espectro de fragmentação ESI-(+)-MS/MS do íon de m/z 273 do extrato CF-12.



Extrato CF-6 / Compostos CF-III e CF-IV



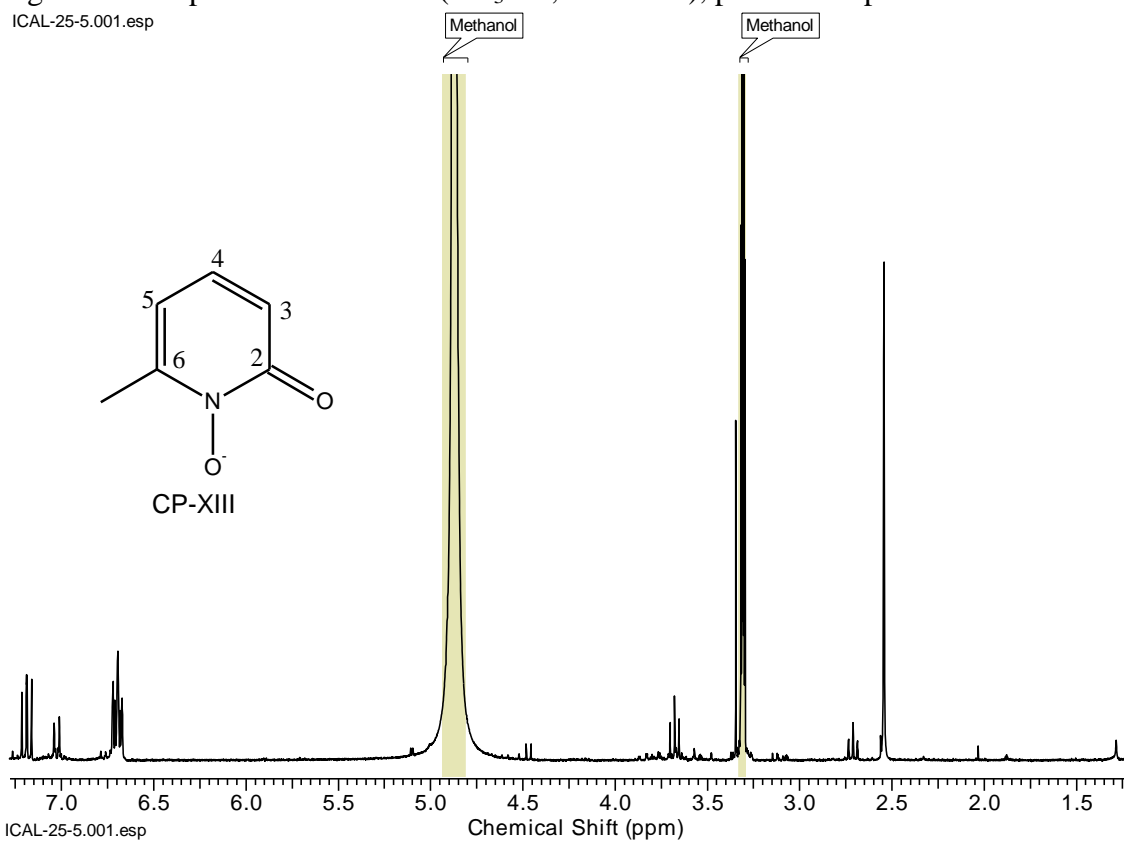
As determinações estruturais da mistura dos compostos CP-XIII e CF-XIV presente no extrato CF-3, produzido pelo fungo fungo endofítico *Diaporthe* sp que foram realizadas a partir de análises de RMN de ^1H , ^{13}C , COSY, DEPT, HMBC e HSQC e comparação de seus dados espectroscópicos com os da literatura.

No espectro de RMN ^1H (Figura 136) para o composto CP-XIII foi observado um sinal em δ_{H} 7,19 (dd; $J = 8,3$ e $7,5$ Hz; H-4) e dois dupletos em δ_{H} 6,71 (H-3) e 6,68 (H-5) com constante de acoplamento de 6,0 Hz, indicando a presença de hidrogênios aromáticos. Também foi observado um singlete em δ_{H} 2,54 com integração para três hidrogênios, sugerindo que o composto possui um grupo metila que não acopla com os hidrogênios aromáticos.

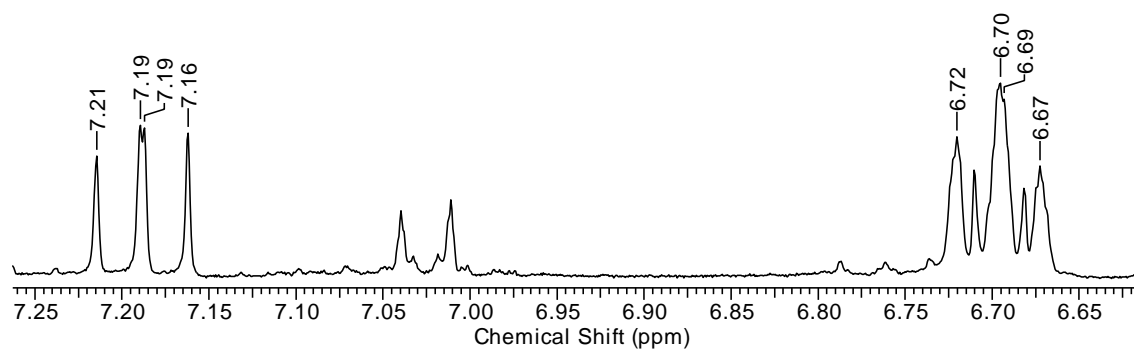
No espectro de RMN ^{13}C (Figuras 137), foi observado sinal para um carbono em δ_{C} 163,3 (C-2), três carbonos aromáticos em δ_{C} 115,8 (C-3), 133,9 (C-4) e 123,4 (C-5), além de um sinal em δ_{C} 23,58, referente ao grupo metila. Esses dados sugerem que o composto apresenta um heteroátomo. O espectro de HSQC, (Figura 138) mostrou as correlações entre os hidrogênios em δ_{H} 6,71, 6,68 e 7,19 com os carbonos C-3, C-5 e C-4, respectivamente. Além disso, foi observado um sinal em δ_{C} 23,6 correlacionando com o hidrogênio do grupo metila em δ_{H} 2,54. O espectro de COSY (Figura 139) confirmou a correlação dos hidrogênios em δ_{H} 7,19 com o H-3 e H-5.

Figura 135: Espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 300 MHz), para o Composto CP-XIII.

ICAL-25-5.001.esp



ICAL-25-5.001.esp



ICAL-25-5.001.esp

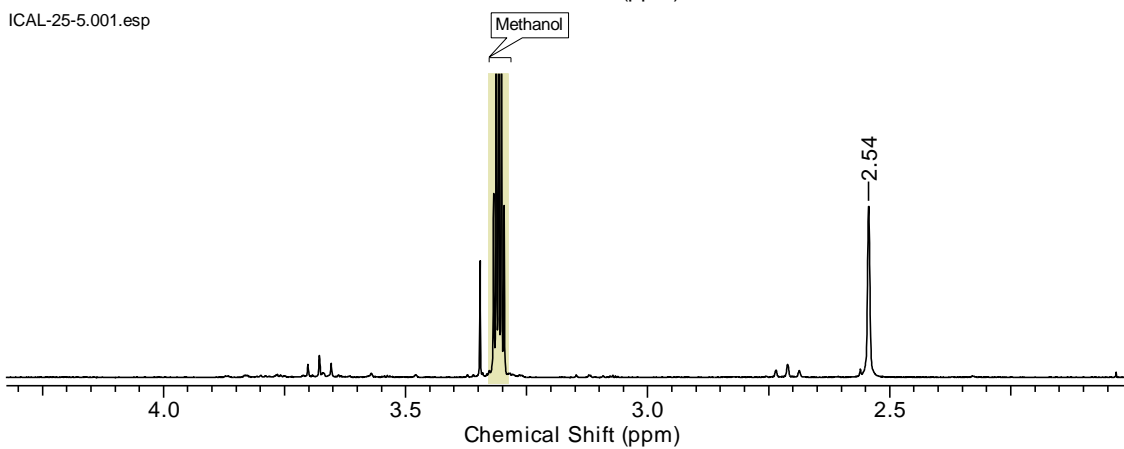
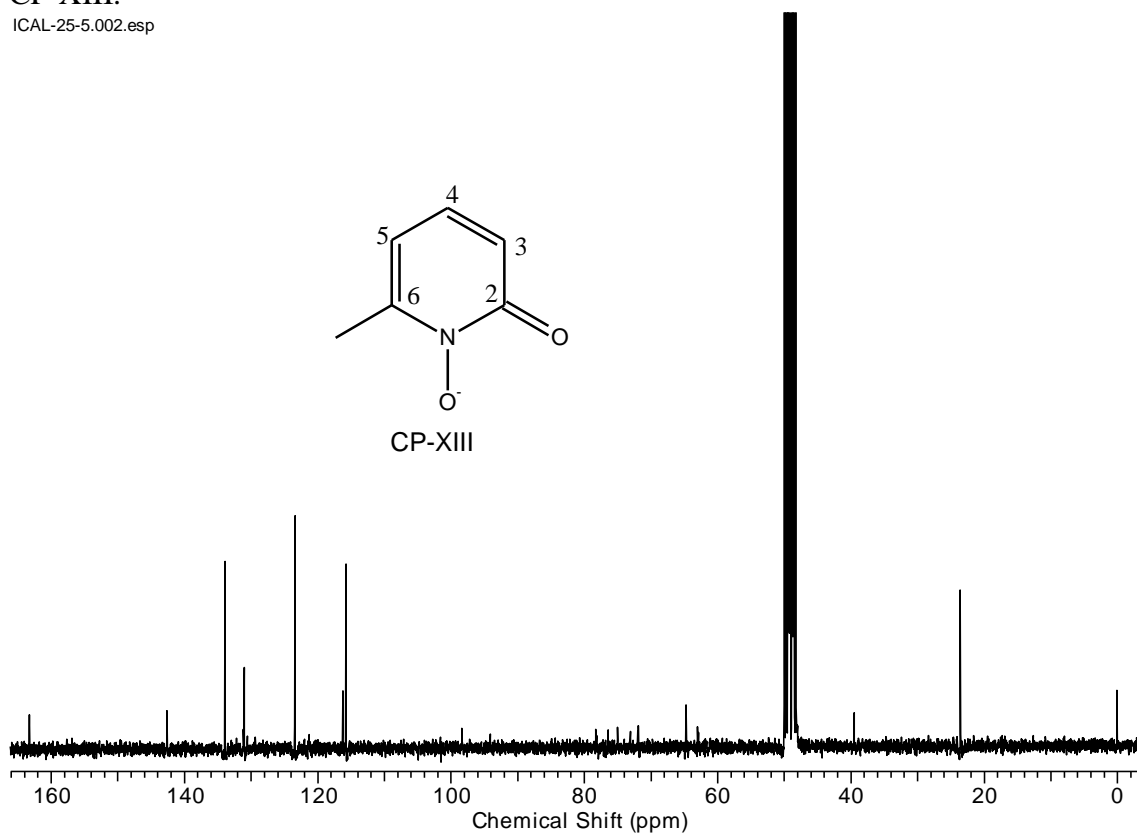
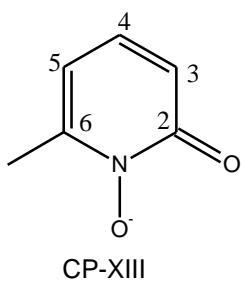


Figure 136: Espectro de RMN ^{13}C e expansão (CD $_3$ OD, 300 MHz), para o Composto CP-XIII.

ICAL-25-5.002.esp



ICAL-25-5.002.esp

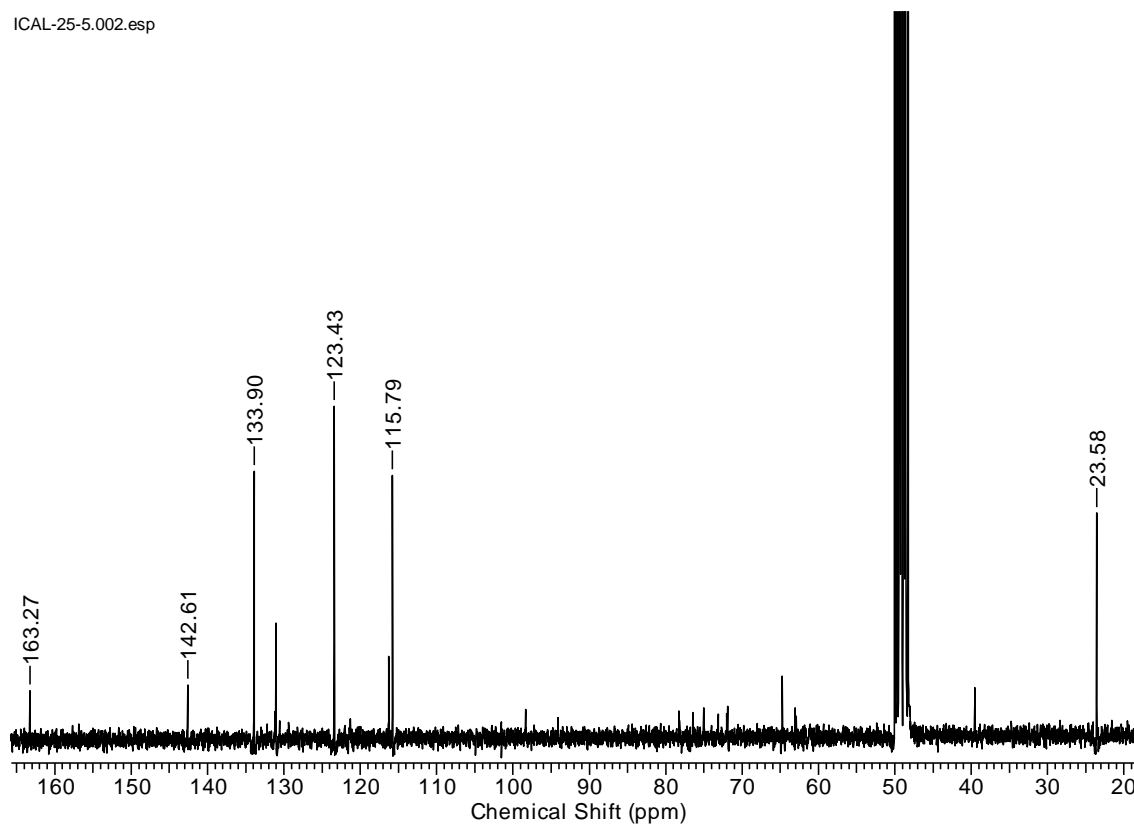


Figure 137: Espectro de RMN HSQC (CD_3OD , 300 MHz) para o Composto CP-XIII.

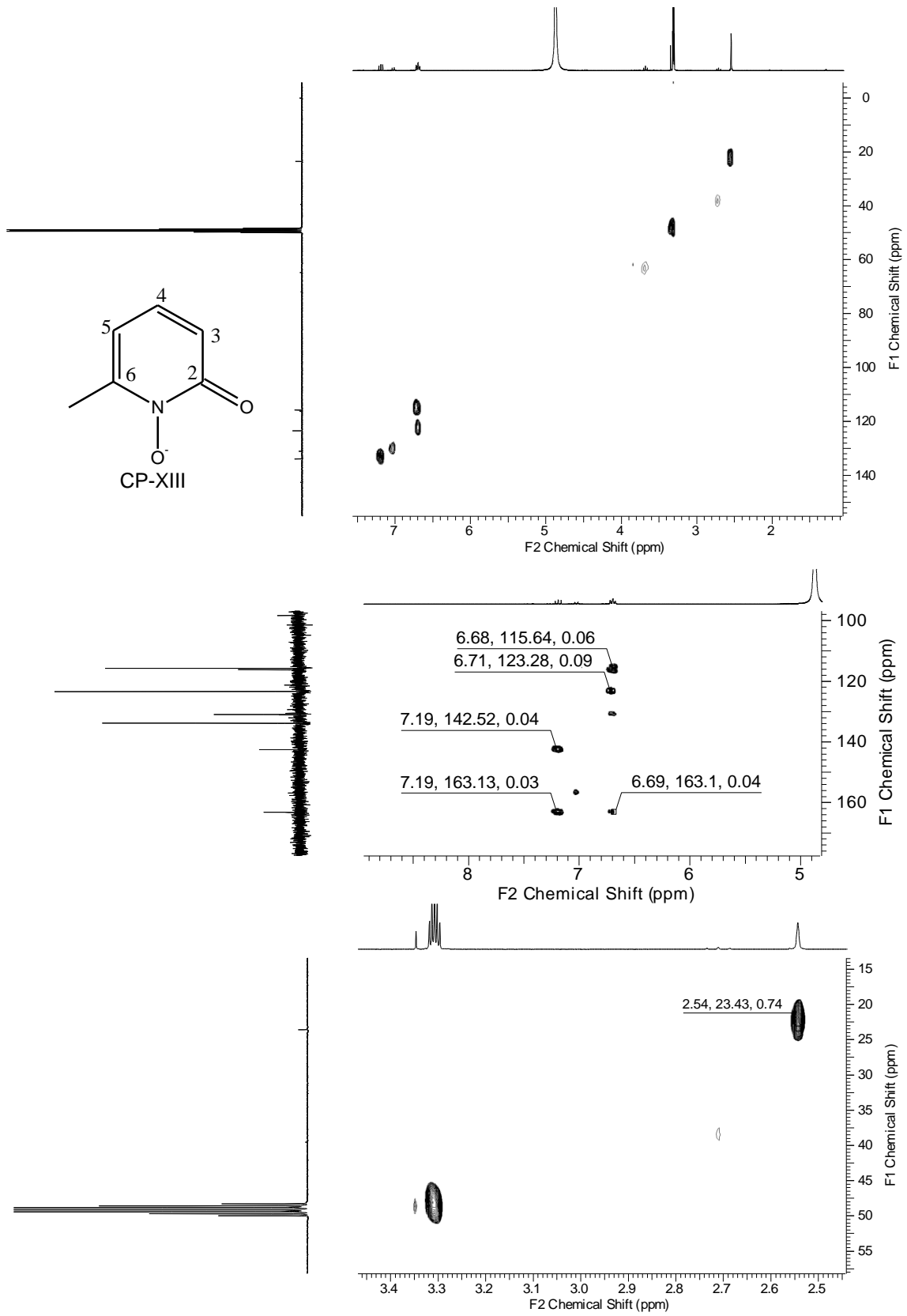
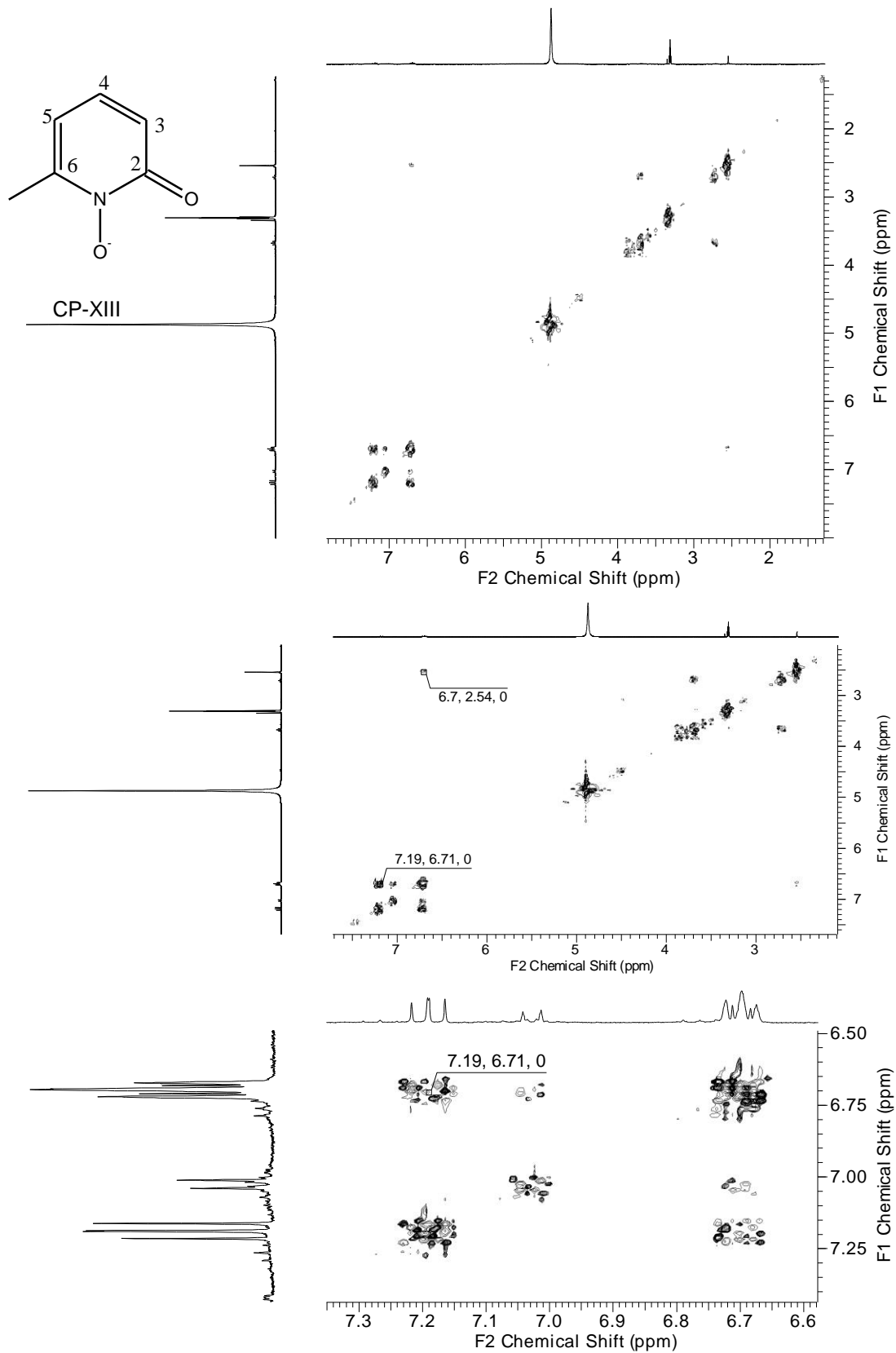


Figure 138: Espectro de RMN COSY e expansão (CD₃OD, 300 MHz) para o Composto CP-XIII.



O espectro de HMBC (Figura 140 e 141) mostrou a correlação entre o hidrogênio em δ_H 7,19 (H-4) com os carbonos em δ_C 163,3 (C-2) e 142,6 (C-6). Também foi observado a correlação do hidrogênio em δ_H 6,71 com os carbonos C-2 e C-5, a correlação do H-5 com os carbonos em δ_C 115,8 (C-3) e com o carbono 23,6 referente ao grupo metila. Além disso, foi observado a correlação do hidrogênio centrado em δ_H 2,54 com os carbonos 115,8 (C-5), 123,4 (C-3) e 142,6 (C-6).

Figure 139: Espectro de RMN HMBC e expansão (CD₃OD, 300 MHz) para o Composto CP-XIII.

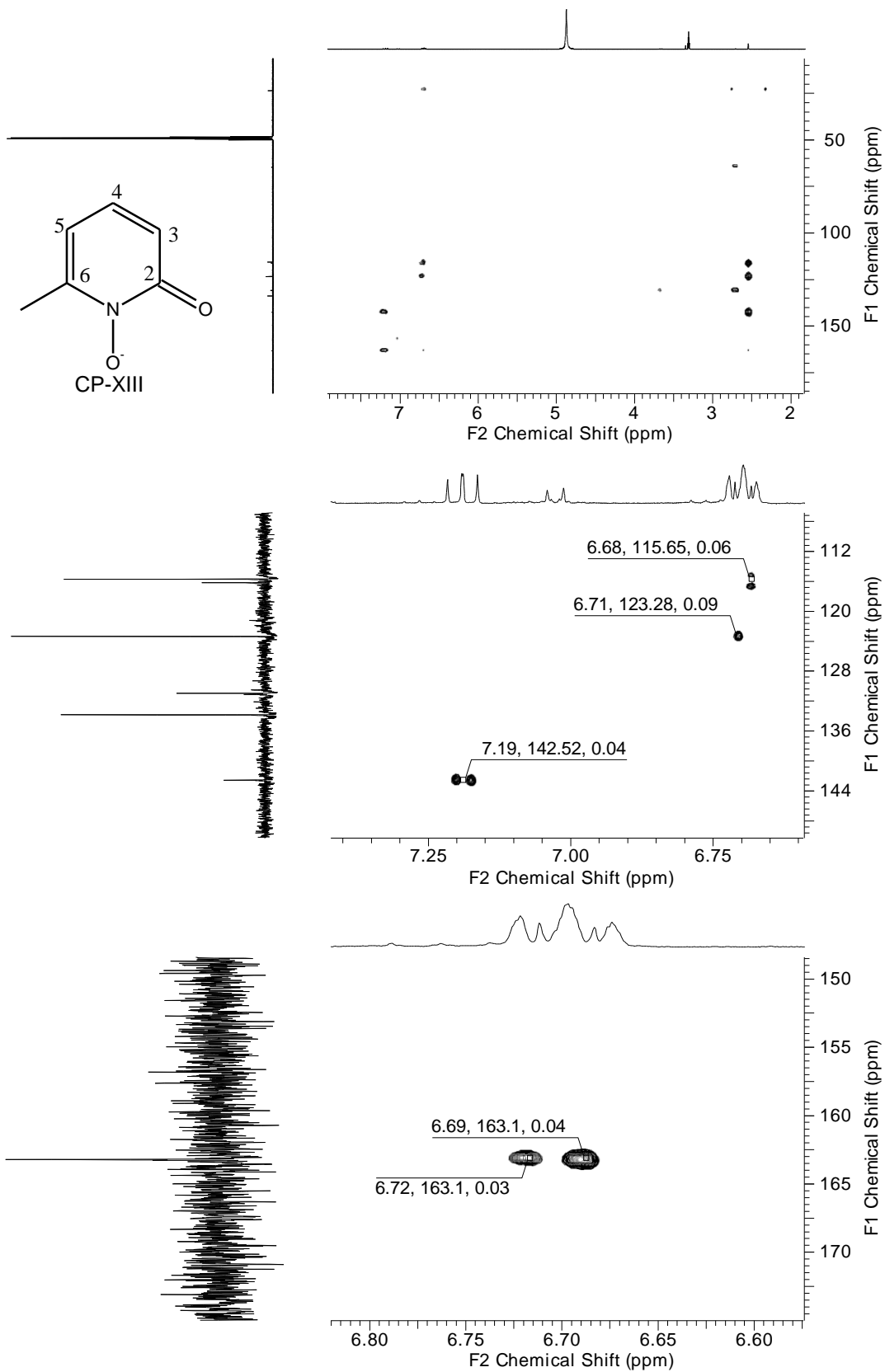
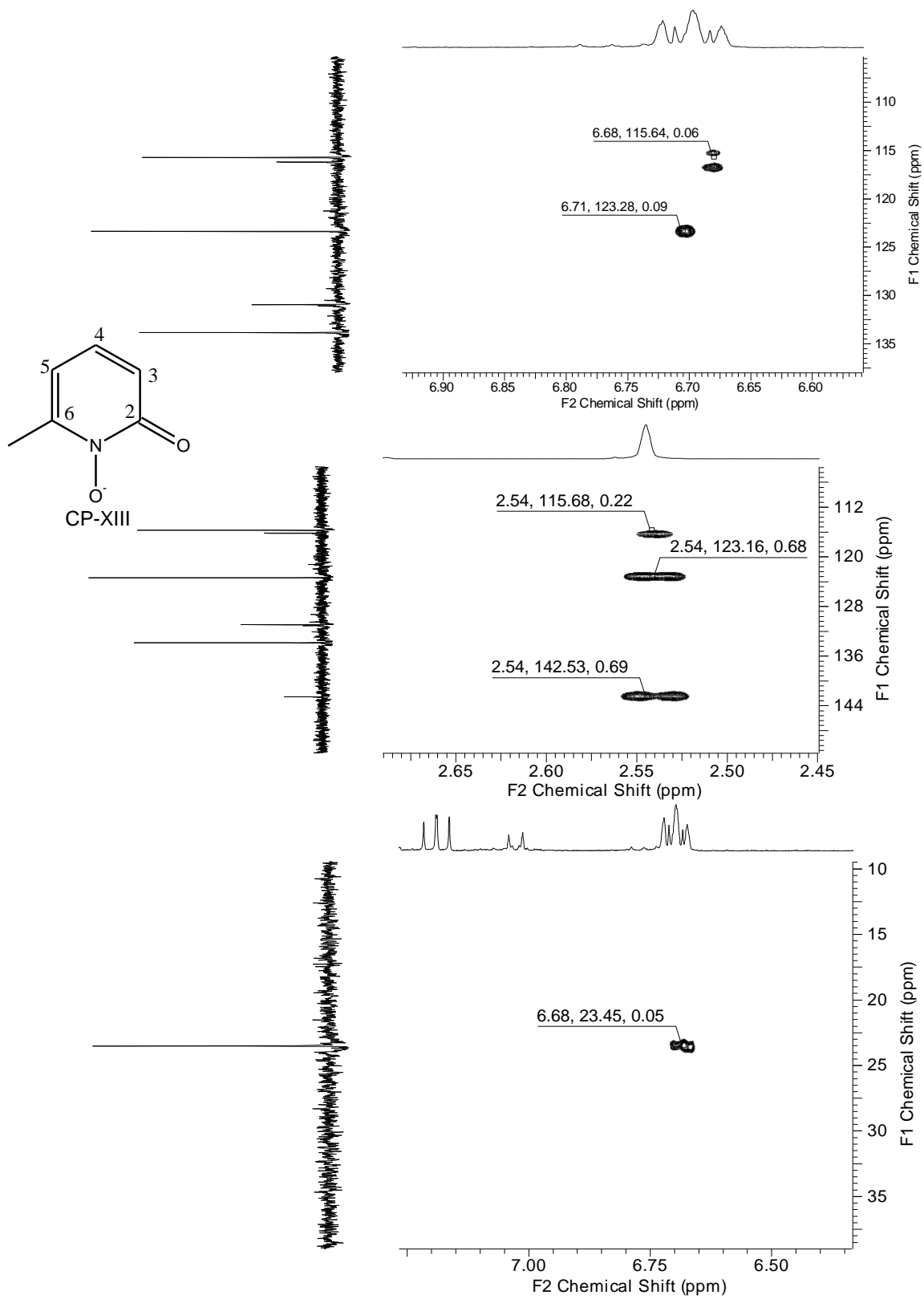


Figure 140: Expansão do espectro de HMBC (CD_3OD , 300 MHz) para o Composto CP-XIII.



A proposta da estrutura do composto CP-XIII foi realizada por comparação com dados da literatura para compostos análogos (VOGELI e PHILIPSBORN, 1973; KONISHI e TAKAHASHI, 1977; BELL, et. al., 1995; SVENSSON, et. al., 2001; CHOPARD, et. al., 2008; BENZ, et. al., 2013), devido à falta de dados espectroscópicos para o composto proposto.

Os dados espectroscópicos de CP-XIII foram comparados com os da literatura para a 6-metil-2-piridona (BENZ et. al., 2015) (Tabela 27). Estudos realizados com 2-amino-4-nitropiridinas e seus *N*-óxidos (LAIHIA, et. al., 2013) propõem que no caso dos *N*-óxidos ocorre um efeito de desblindagem para os hidrogênios H-3 e H-5, afetando também a constante de acoplamento. No mesmo estudo observou-se também o efeito deste grupo nos deslocamentos químicos dos carbonos, os quais, dependendo do substituinte no C-2, podem variar de até 10 ppm para o C-4, como o observado para o composto na tabela 24.

O efeito do grupo *N*-óxido nos deslocamentos químicos pode ser explicado pelas estruturas de ressonância, que levam a um efeito de blindagem eletrônica para os hidrogênios nas posições C-2, C-4 e C-6 e um efeito de desblindagem eletrônica na posição C-3 e C-5 para sistemas heteroaromáticos (Figura 141).

Com base no discutido foi possível propor a estrutura do composto CP-XIII como sendo a do *N*-óxido 2-metil-piridona (Tabela 24) (VOGELI e PHILIPSBORN, 1973; KONISHI e TAKAHASHI, 1977; GREASY, et. al., 1992; BELL, et. al., 1995; KOLEHMAINEN, et. al., 2002; ABRAHAM, et. al., 2014).

Figure 141: Formas de ressonância de um anel aromático *N*-oxidado.

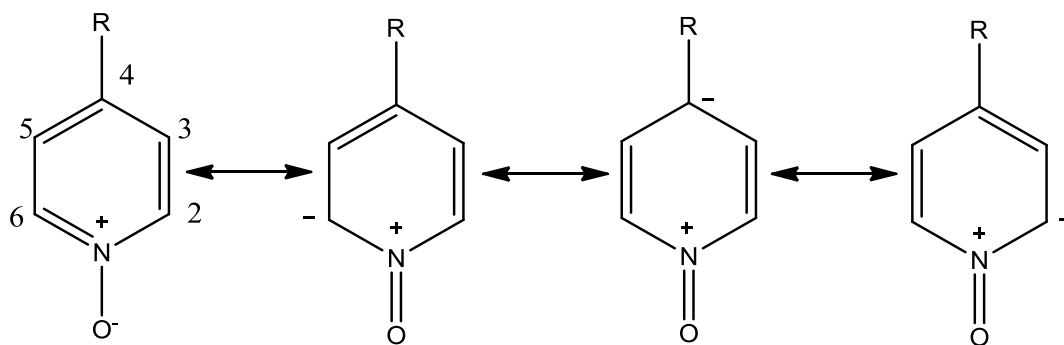


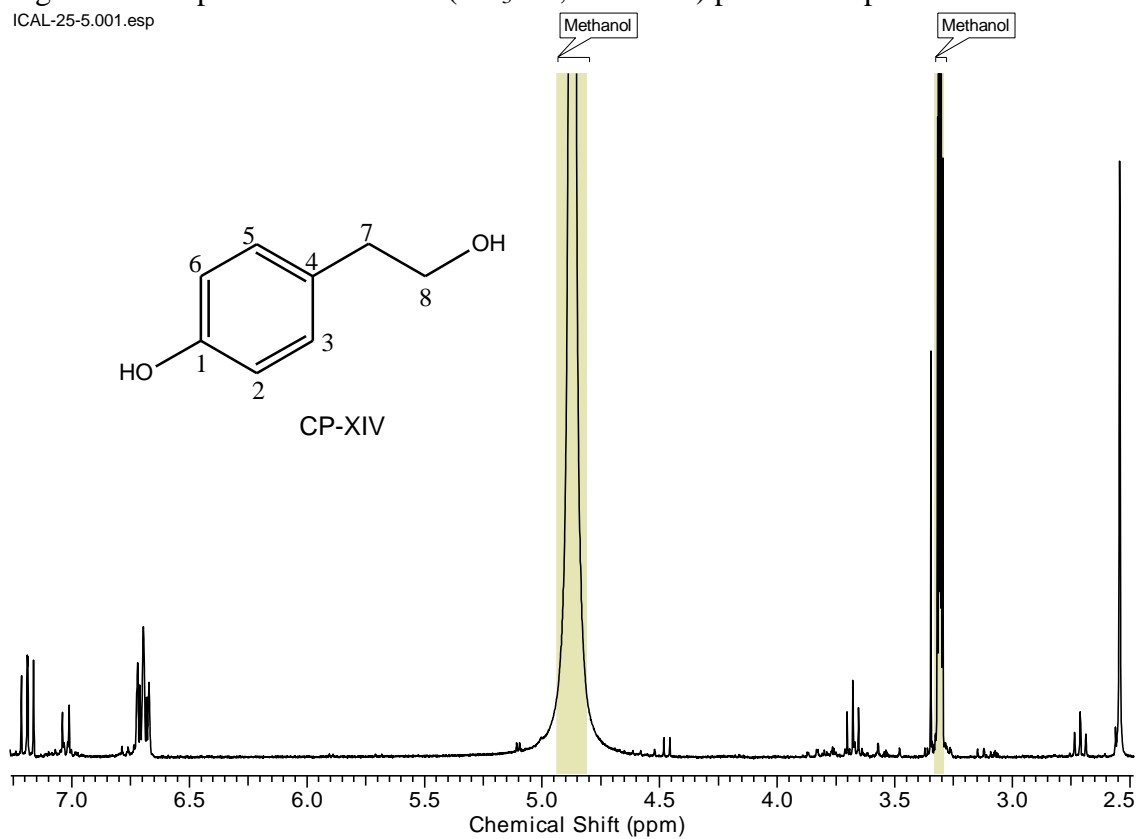
Tabela 27: Dados espectroscópicos de RMN de ^1H e ^{13}C (300,0 MHz, CD_3OD) para o composto CP-XIII e para a 6-metil-2-piridona.

	6-metil-2-piridona		Composto CP-XIII	
	δ_{H} mult. (J em Hz)	δ_{C}	δ_{H} mult. (J em Hz)	δ_{C}
2		166,2		163,3
3	6,43 d (9,1)	106,2	6,71 d (6,0)	123,4
4	7,38 dd (9,1; 6,9)	142,1	7,19 dd (8,3; 7,5)	133,9
5	6,09 d (6,9)	116,5	6,68 d (6,0)	115,8
6		146,1		142,6
- CH_3	2,37 s	19,1		23,6

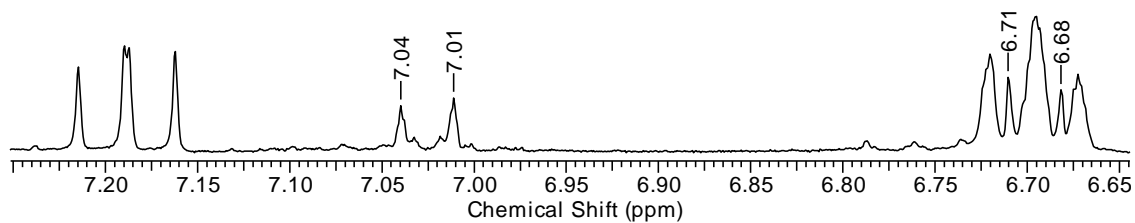
Para composto CP-XIV o espectro de RMN de ^1H (Figuras 142) mostrou um duplete em δ_{H} 7,03 ($J = 8,6$ Hz) referentes aos hidrogênios H-2 e H-6 e outro duplete em δ_{H} 6,69 ($J = 8,6$ Hz) correspondentes aos hidrogênios H-3 e H-5. O valor da constante de acoplamento sugere um anel aromático *para* substituído. Além disso, o espectro de RMN ^1H mostrou os sinais em δ_{H} 3,68 (t; $J = 7,2$ Hz) e 2,71 (t; $J = 7,2$ Hz), referentes aos H-8 e H-7, respectivamente. Na análise dos espectros de RMN ^{13}C e HSQC (Figura 143 e 144) observou-se a correlação dos sinais em δ_{C} 131,0 com os hidrogênios H-2 e H-6. Além disso, foi observado a correlação do carbono em δ_{C} 116,3 com os hidrogênios H-3 e H-5. Também foram observadas a correlações dos sinais em δ_{C} 64,7 e 39,5 com os H-8 e H-7, referentes aos carbonos metilênicos. O sinal em δ_{C} 131,2 que foi atribuído ao C-4.

Figura 142: Espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 300 MHz) para o Composto CP-XIV.

ICAL-25-5.001.esp



ICAL-25-5.001.esp



ICAL-25-5.001.esp

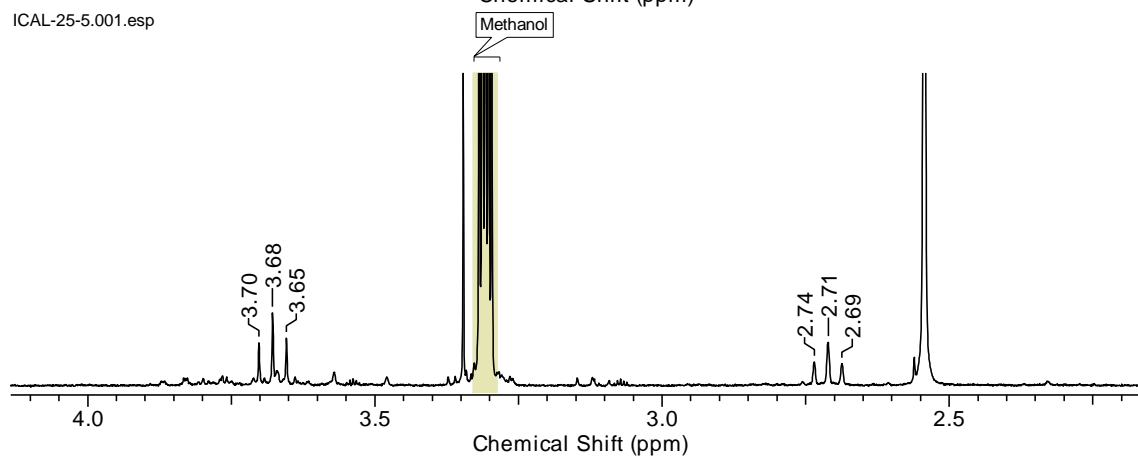


Figure 143: Espectro de RMN ^{13}C (CD_3OD , 300 MHz) para o Composto CP-XIV.
ICAL-25-5.002.esp

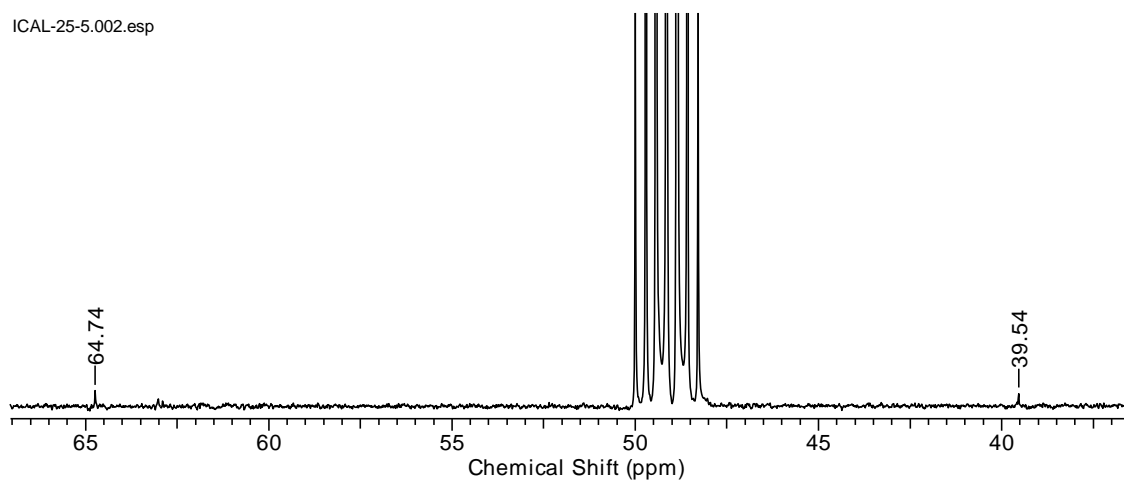
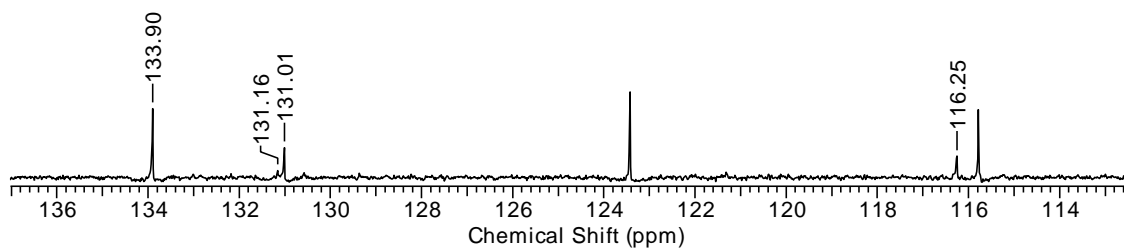
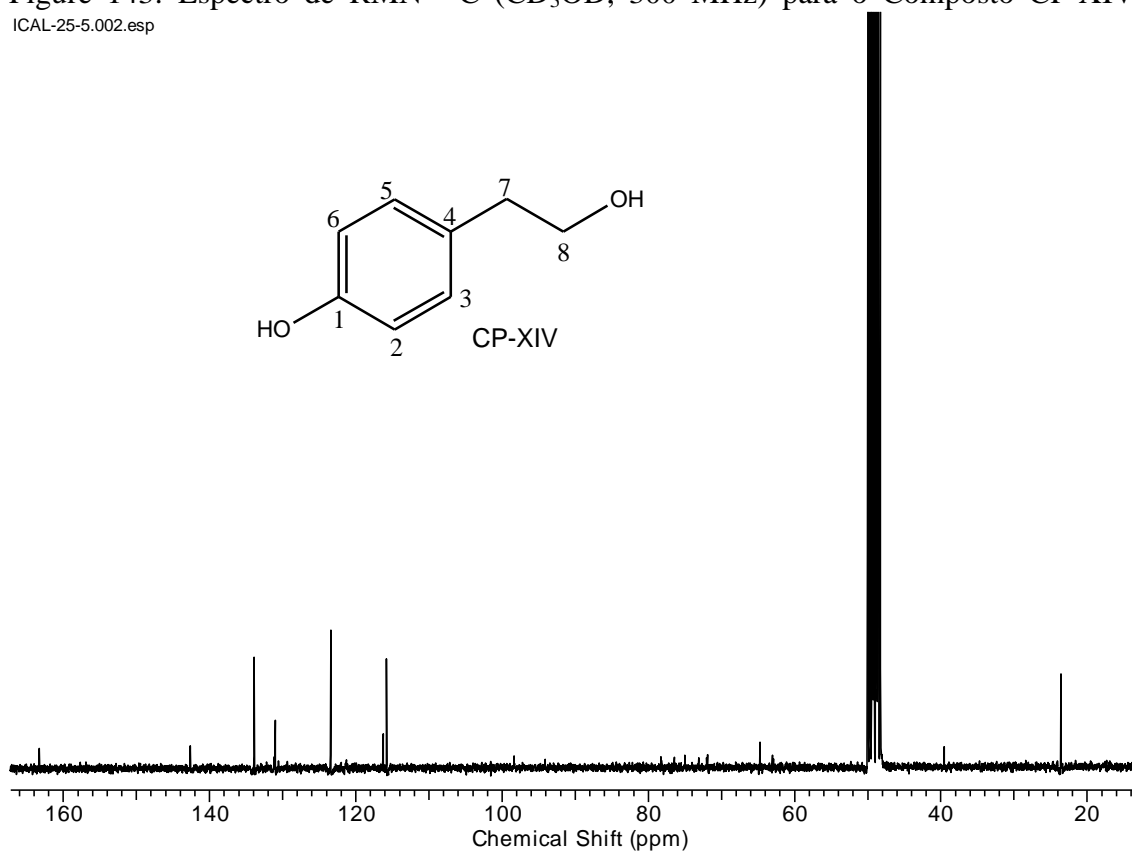
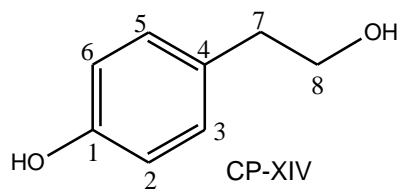
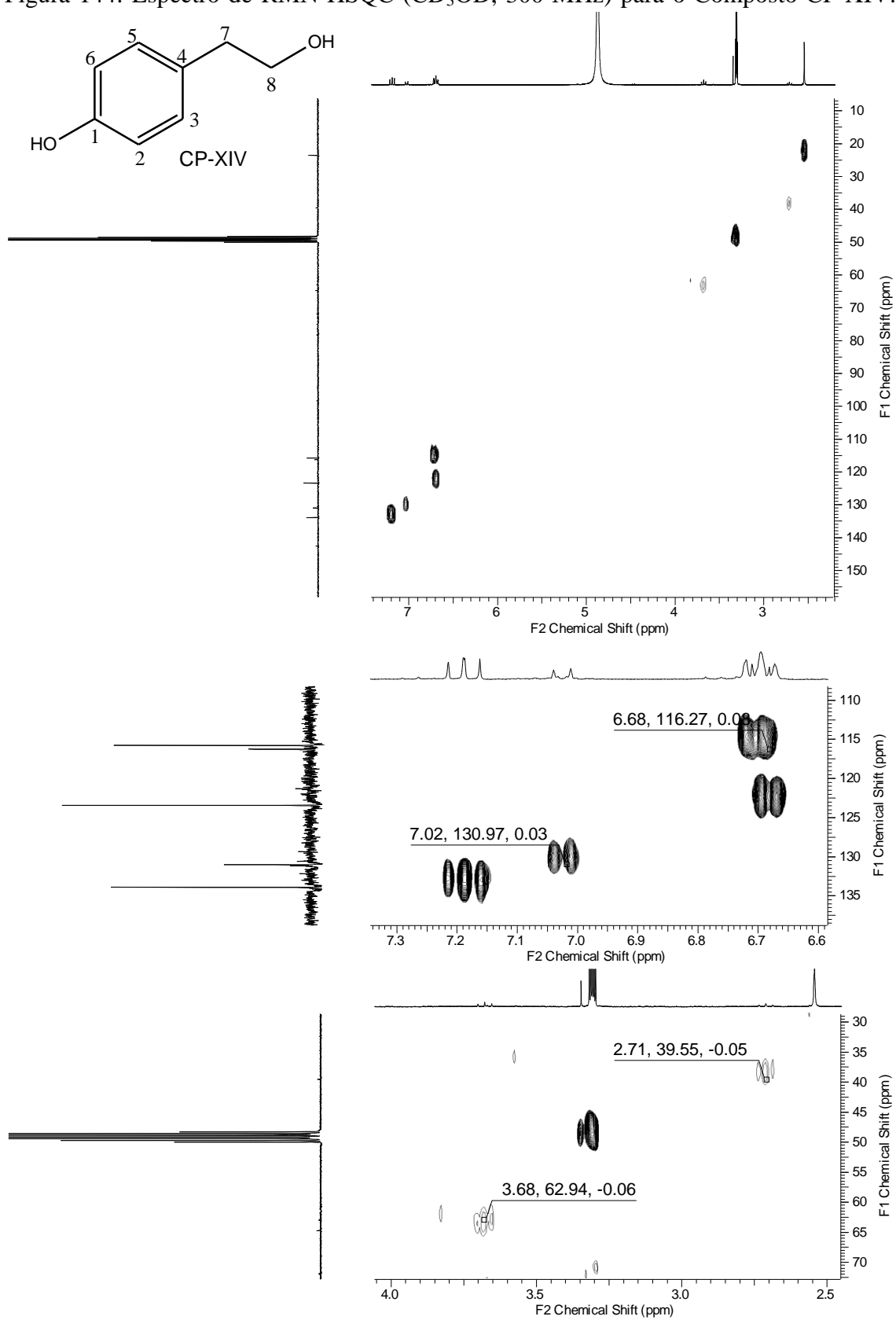


Figura 144: Espectro de RMN HSQC (CD_3OD , 300 MHz) para o Composto CP-XIV.



O espectro de COSY (Figura 145) evidenciou a correlação dos hidrogênios em δ_H 7,03 e 6,69, confirmando a *para* substituição do anel e a correlação entre os hidrogênios metilênicos H-7 e H-8. O espectro de HMBC (Figura 146) mostrou a correlação do hidrogênio em δ_H 7,03 com o carbono em δ_C 156,8, não observado no espectro de RMN de ^{13}C . Além disso, observou-se a correlação do hidrogênio em δ_H 6,69 com o carbono em δ_C 130,8, e a correlação dos hidrogênios metilênicos em δ_H 3,68 e 2,71 com o carbono em 131,2. Essa correlação conecta a cadeia lateral anel aromático. Estes dados, em conjunto com os dados espectroscópico da literatura (Tabela 28) possibilitaram propor o composto CP-XIV como tirosol (FALK, et. al., 2000; KHATIB, et. al., 2006; GUZMÁN-LÓPEZ, et. al., 2007; TAKAYA, et. al., 2007).

Figura 145: Espectro de RMN COSY (CD3OD, 300 MHz) para o Composto CP-XIV.

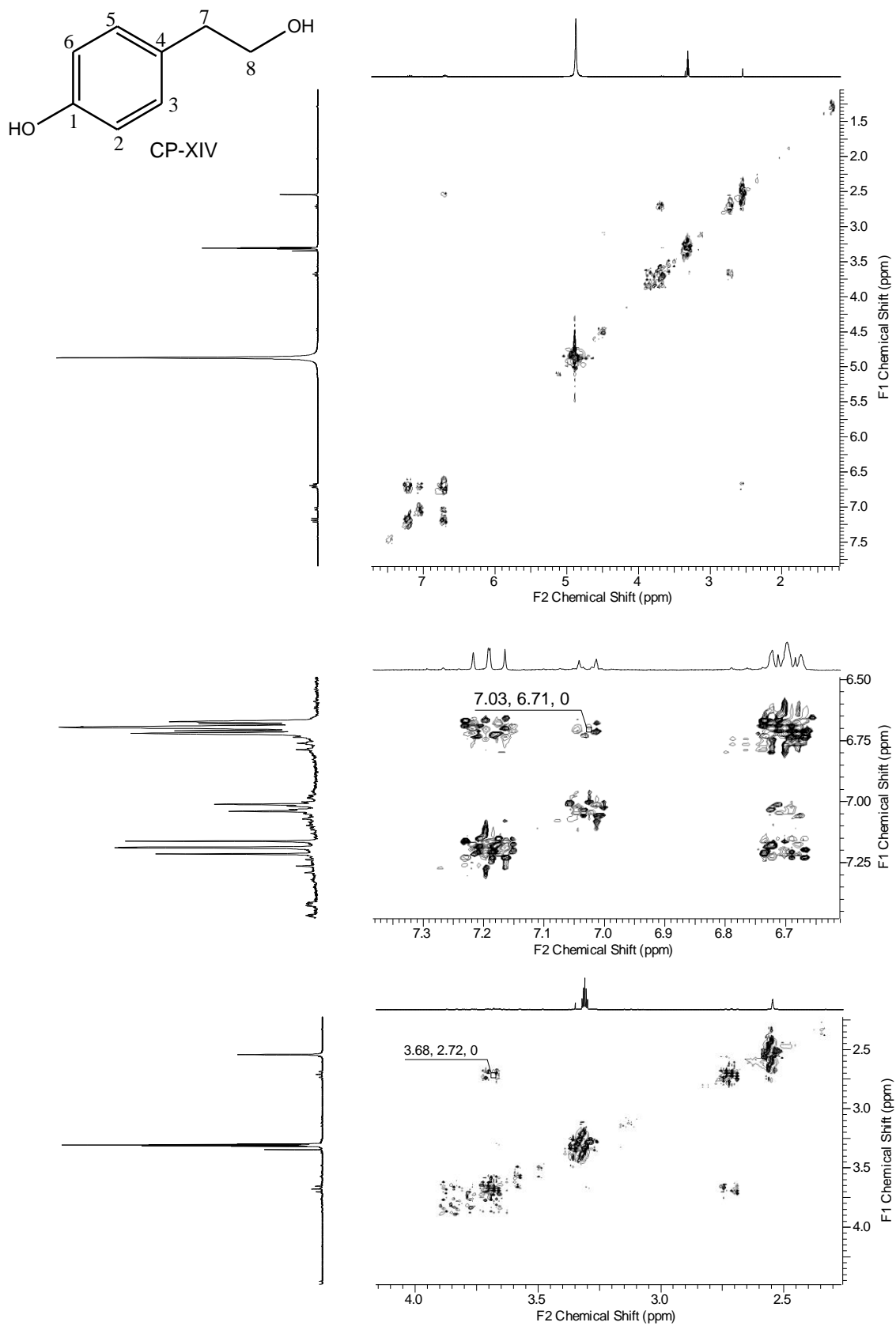


Figura 146: Espectro de RMN HMBC (CD_3OD , 300 MHz) para o Composto CP-XIV.

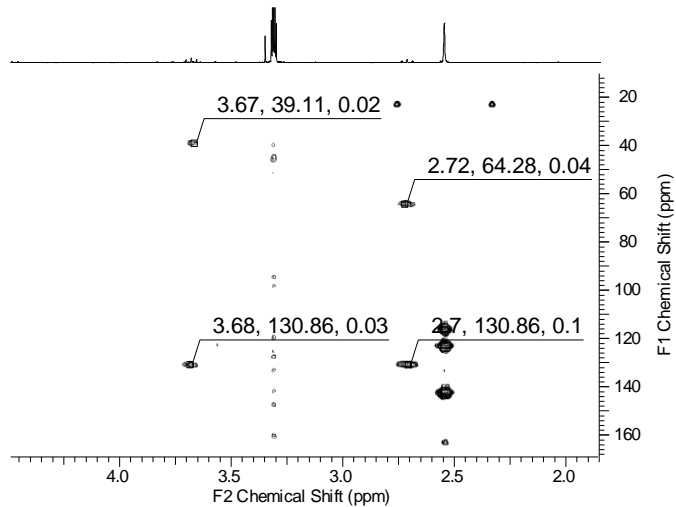
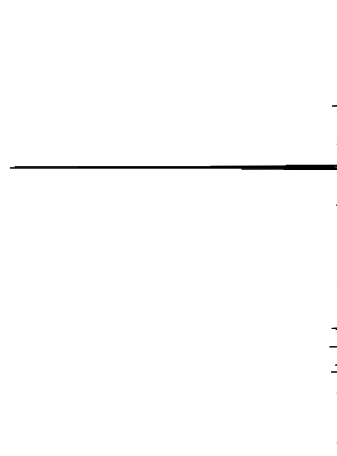
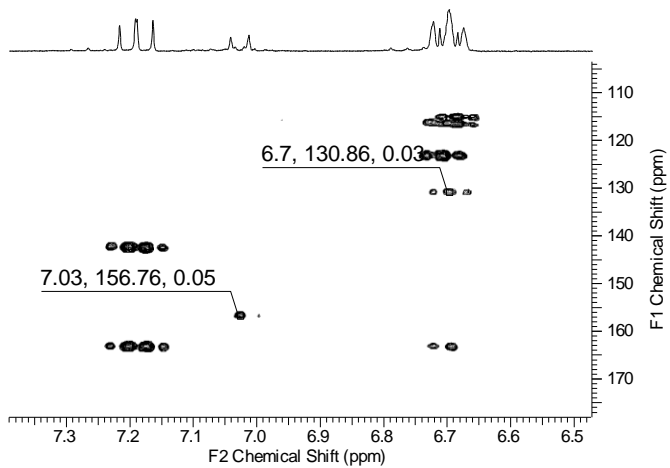
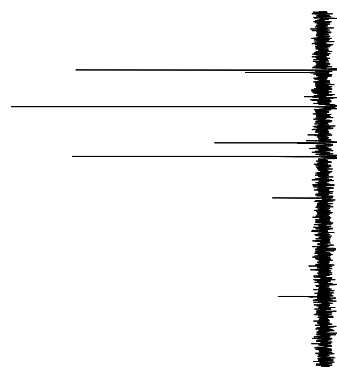
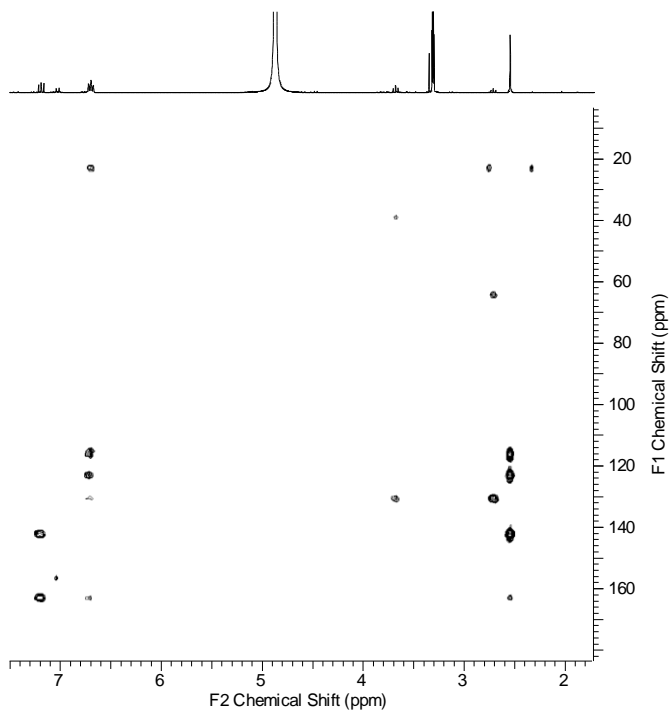
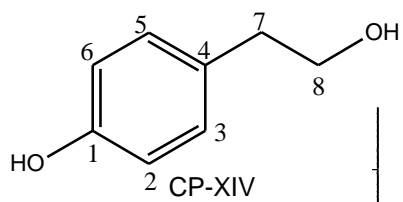


Tabela 28: Dados espectroscópicos de RMN de ^1H e ^{13}C (300,0 MHz, CD_3OD) para o composto CP-XIV e o tirosol.

	Tirosol		Composto CP-XIV	
	δ_{H} mult. (J em Hz)	δ_{C}	δ_{H} mult. (J em Hz)	δ_{C}
1		154,1		156,8
2	6,77 d (8,0)	115,4	6,69 d (8,6)	116,3
3	7,09 d (8,0)	130,0	7,03 d (8,6)	131,0
4		130,2		131,2
5	7,09 d (8,0)	130,0	7,03 d (8,6)	131,0
6	6,77 d (8,0)	115,4	6,69 d (8,6)	116,3
7	2,82 t (6,4)	38,3	2,71 t (7,2)	39,5
8	3,83 t (6,4)	63,8	3,68 t (7,2)	64,7

6. ENSAIOS BIOLÓGICOS

6.1. Atividade antioxidante

Nos ensaios da avaliação da atividade sequestradora de radicais livres foi utilizado o radical livre estável 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH). Esse radical possui a capacidade de capturar hidrogênios dos compostos antioxidantes. Quando ocorre essa captura verifica-se um descoramento do radical anteriormente violeta para uma coloração amarela (DPPH-H). Essa mudança de coloração é monitorada com auxílio do espectrofotômetro UV-visível em 515,5 nm.

A partir dos valores de absorbância foi possível calcular a porcentagem de inibição e construir um gráfico de inibição versus concentração para todas as frações obtidas. Na figura 147 está apresentado um gráfico ilustrativo da fração CFHM. Os valores IC_{50} do extrato bruto e das frações estudadas foram obtidos pela aplicação do método da regressão linear, como mostrado no gráfico (Figura 148).

Figura 147: Determinação da atividade antioxidante das frações da espécie vegetal *C. parvifolia*.

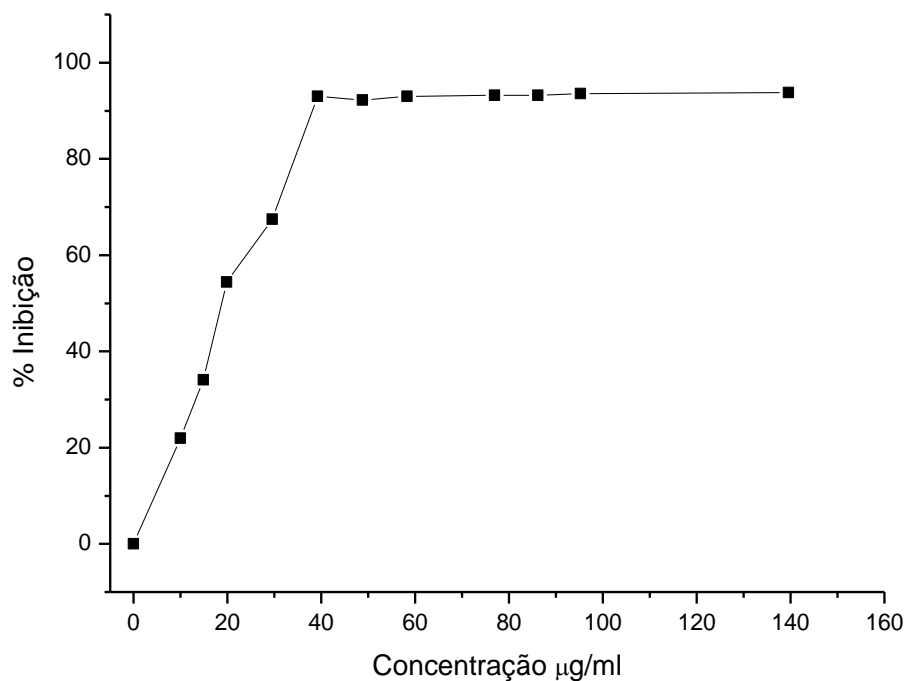
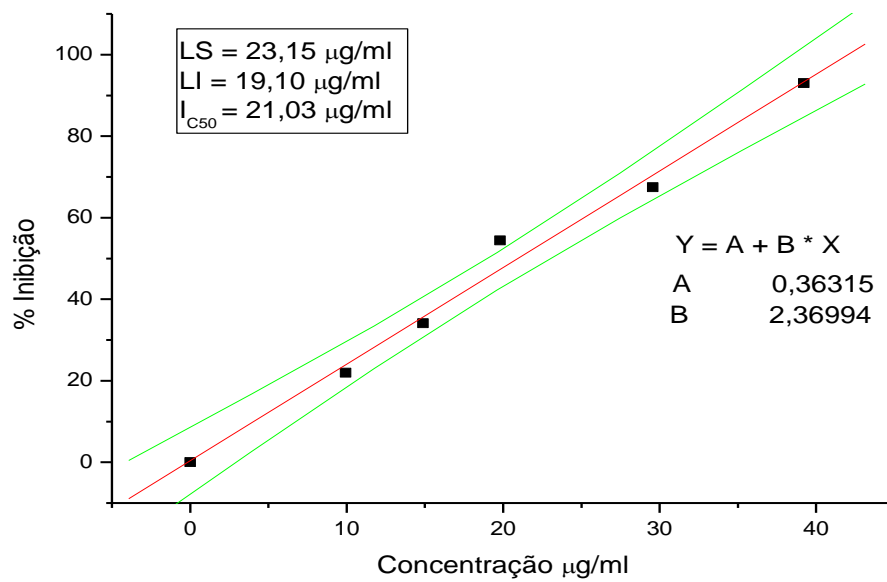


Figura 148: Determinação do percentual de inibição (IC₅₀) para a espécie vegetal *C. parvifolia*.



Os valores foram comparados com o padrão BHT (Tabela 29). De acordo com os resultados dos ensaios, os extratos brutos e as frações examinadas apresentaram potente atividade antioxidante, com valores de IC₅₀ próximos aos do antioxidante padrão BHT. A fração CFHM apresentou IC₅₀ de 21,03 µg/mL. Esse comportamento pode estar associado aos compostos CP-IX e CP-X, uma vez que esses compostos apresentam na posição *orto* do anel aromático dois grupos hidroxilas. Essa característica facilita a transferência de hidrogênio para o radical DPPH, potencializando a atividade antioxidante (VILLANO, et. al.; 2007).

Tabela 29: Valores de IC₅₀ da atividade antioxidante para o extrato bruto e as respectivas frações da planta *C. parvifolia*.

Amostra	IC ₅₀ (µg/mL)
CEB	28,64 (23,76 – 33,34)
CFH	239,05 (nd)
CFD	37,14 (35,80 – 42,10)
CFAC	(nd)
CFHM	21,03 (19,10 – 23,15)
BHT (t-butil-hidroxitolueno)	16,00 (7,93 – 19,26)

* Concentração não detectada no experiment (nd).

6.2. Atividade antibacteriana das frações obtidas de *Calea parvifolia*.

O teste antibacteriano apresentou resultados positivos para a fração diclorometano (CFD) contra *Staphylococcus aureus* e *Shigella flexneri*, mostrando eficiência significativa quando comparada com o controle com MeOH, sendo possível a observação de formação de halos de inibição (Figura 153). O extrato bruto (CEB) apresentou baixa atividade antibacteriana apenas contra *S. aureus*. Não foi possível observar a formação de halos de inibição para as outras frações. A análise estatística dos dados obtidos apresentaram seis grupos distintos (Tabela 27), sendo o grupo um (efetividade “-“), na qual os valores não divergem dos valores obtidos do controle negativo com metanol, ou seja, sem formação de halo de inibição. O grupo dois (+),

grupo três (++) e grupo quatro (+++) foram observados resultados positivos nos tratamentos com as frações CFD e CFEX, e o grupo cinco (++++) e seis (+++++) que corresponderam aos tratamentos no controle positivo com tetraciclina.

Os resultados obtidos não apresentaram valores médios significativamente equivalentes aos controles com tetraciclina, porém pode-se observar que houve um aumento gradativo do efeito de inibição à *S. aureus* quando tratado com a fração CFD, conforme houve o aumento da concentração do extrato (Figura 149). Para cada grupo estatístico crescente obtido pelo teste de Skott-Knott ($p < 0,05$) foi adicionado um “+” para representar a efetividade dos compostos contra as bactérias testadas. Os resultados expressos com “-“ não diferem do controle negativo com metanol. Essa atividade já foi relatada para o gênero com a espécie vegetal *C. platulepis* que apresentou em seu estudo químico o isolamento de flavonoides, lactonas sesquiterpênicas e benzofuranos (NASCIMENTO et al., 2004).

Figura 149: Teste de difusão em disco com a fração CFD da planta *Calea parvifolia*.

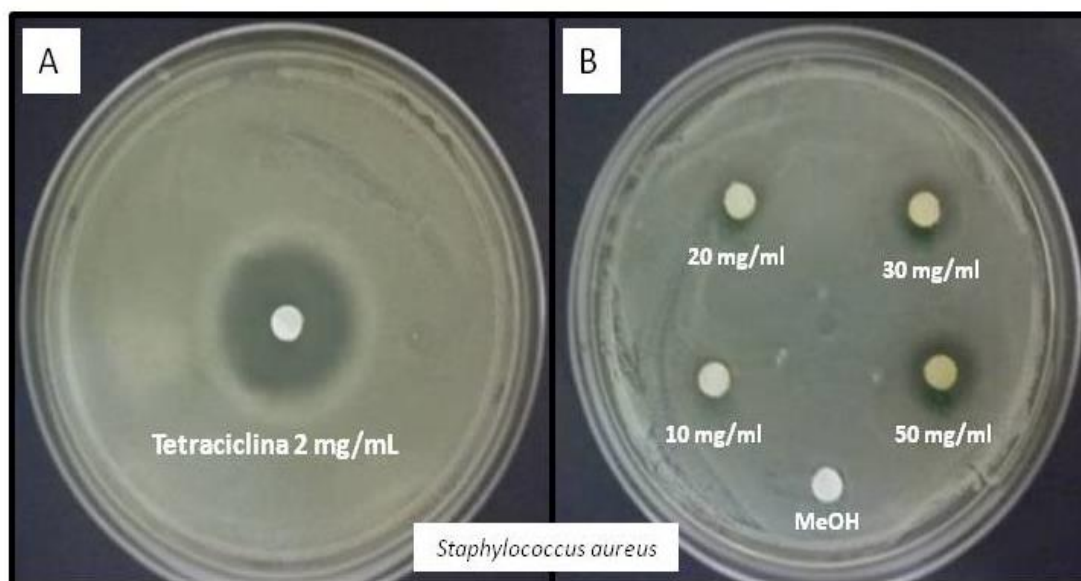


Tabela 30. Avaliação da atividade antimicrobiana das frações de *Calea parvifolia* em relação à formação de halos de inibição, analisadas pelo teste estatístico de Tukey ($p < 0,05$).

Frações	Atividade antibacteriana1 (halo formado)			
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. flexneri</i>

CFH	-	-	-	-
CFD	-	+++ (2,5mm)	-	++ (1,33mm)
CFAC	-	-	-	-
CFHM	-	-	-	-
CFEX	-	+ (0,5 mm)	-	-
Metanol	-	-	-	-
Tetraciclina (4 mg/ml)	++++ (6,5mm)	+++++ (9,6 mm)	+++ (3,0 mm)	++++ (6,9 mm)

6.3. Atividade antitumoral

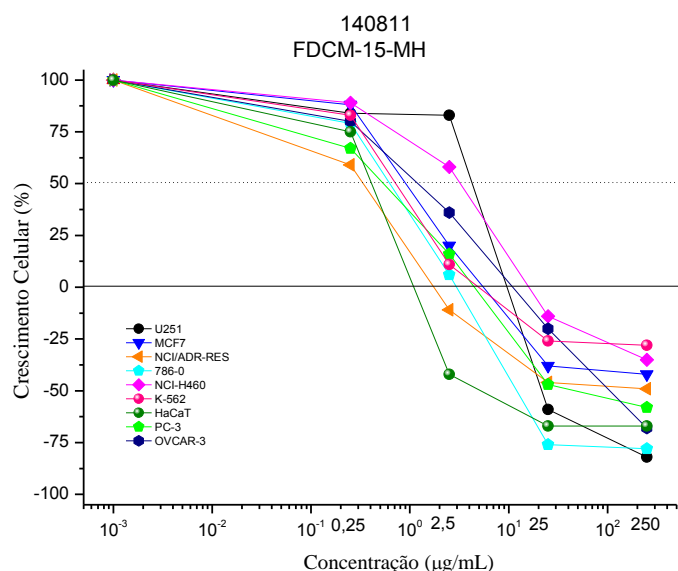
Os resultados da avaliação da atividade antitumoral demonstraram que as frações CFHM e CFAC foram inativas, apresentando IC₅₀ superiores a 100 µM para todas as células testadas. Porém, o CEB e CFH apresentaram atividade moderada. Dentre as frações estudadas a fração CFD foi a mais ativa, apresentando valores de IC₅₀ entre 3,0 a 28,2 (µg/mL) frente às células tumorais testadas (Tabela 31, Figura 150). Os melhores resultados apresentados para esta fração foram para células de rim 786-0, ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos (NCI-ADR/RES) e próstata (PC-3), com IC₅₀ em 2,9, 3,0 e 5,1 µg/mL, respectivamente. Esse comportamento pode estar associado à presença de lactonas sesquiterpênicas com esqueleto do tipo heliangolídeos nesta fração (VILLARREAL et al., 1994).

Tabela 31: Avaliação da atividade antitumoral das frações obtidas da espécie vegetal *Calea parvifolia*.

	2 (µg/m L)	M (µg/m L)	A (µg/m L)	7 (µg/m L)	4 (µg/m L)	P (µg/m L)	O (µg/m L)	K (µg/m L)	Q (µg/m L)
Doxorrubina	3,6	0,62	11,6	2,9	11,7	3,8	9,1	3,1	0,73
CEB	69,4	58,6	26,7	22,5	47,4	83,1	51,8	78,3	39,6
CFH	82,6	43,3	17,4	27,5	41,8	16,0	33,8	32,3	79,1
CFD	10,6	9,3	3,0	2,29	28,2	5,1	11,3	13,0	1,3
CFAC	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
CFHM	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250

Linhagens tumorais humanas: 2 = U251 (glioma); m = MCF-7 (mama); md = MDA-MB-231 (mama); a = NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos); 7 = 786-0 (rim); 4 = NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células); p = PC-3 (próstata); o = OVCAR-03 (ovário); k = K562 (leucemia).
 Linhagem não-tumoral humana:

Figura 150: Gráfico do crescimento celular versus concentração dos resultados do teste antitumoral da fração FCD.



6.4. Atividade Antileishmania

6.5. Atividade Antileishmania

As atividades antileishmania das frações CFH, CFD, CFAC, CFHM e do extrato bruto CEB proveniente da espécie *C. parvifolia* foram avaliadas frente à forma promastigotas de *Leishmania amazonensis* com o tempo de 72 horas de exposição, onde foram avaliados os valores de IC₅₀. Dentre as frações estudadas, a CFH e o CEB exibiram um notável efeito sob *Leishmania amazonensis* com IC₅₀ de 7,14-2,29 e 1,04-0,89 µg/mL, respectivamente. A tabela 30 apresenta os valores de IC₅₀ de todas as frações, onde foi observado que as frações CFD, CFAC e CFHM apresentaram efeitos moderados com valores superiores a 100 µg/mL, sendo considerada inativa.

Tabela 32: Atividade In vitro frente à forma promastigota de *Leishmania amazonensis*.

Frações	CI ₅₀ (µg/mL)
CFH (Fração hexano)	7,14 ± 2,29
CFD (Fração diclorometano)	>100
CFAC (Fração acetato)	>500
CFHM (Fração hidrometanólica)	>100
CEB (Estrato Bruto)	1,04 ± 0,89

7. CONCLUSÕES

O estudo químico das partes aéreas da *Calea parvifolia* resultou no isolamento de uma série de lactonas sesquiterpênicas identificadas como: mistura de um composto não descrito na literatura (CP-III) e da tirotundina-3-*O*-metil éter (CP-IV), 15-deoxigoiazensolideo (CP-V), 2,3-di-hidro-15-deoxygoiazensolideo (CP-VI), derivado zexbrevina (CP-VII), 4,5-di-hidro-15-deoxigoiazensolideo (CP-VIII); da mistura dos *O*-metilflavonóides acacetina (CP-I) e genkwanina (CP-II), além dos ácidos clorogênicos 5-*O*-cafeoilquínico (CP-IX) e do ácido 4,5-*O*-dicafeoilquínico (CP-X).

Os compostos CP-I, CP-II, CP-V, CP-VI e CP-VIII, já foram relatados para o gênero *Calea*. Os compostos CP-III, CP-IX, CP-X não foram relatados para esse gênero. O composto CP-IV já foi relatado para a família Asteraceae.

O estudo químico dos metabólitos secundários produzidos pelos fungos endofíticos isolados da espécie vegetal *C. parvifolia* resultou na identificação do ácido 3-nitropropiónico (CP-XI), sendo que este composto já foi isolado de extratos do fungo endofítico *Phomopsis longicolla*. Além disso, também foram isolados e identificados os compostos altenusina (CP-XII), também isolado do fungo endofítico *Alternaria sp.*, e a mistura de compostos *N*-óxido 2-metil-piridona e tirosol.

O estudo de ESI-(+ e -)-MS/MS para os compostos identificados e isolados na *C. parvifolia* possibilitou caracterizar e identificar um perfil de fragmentação consistente que foi capaz de identificar os compostos na fração diclorometano sem nem um tratamento cromatográfico. Utilizando esse perfil de fragmentação foi possível propor um dímero com o esqueleto furanoheliangolídeo já isolado em uma espécie do gênero e dois outros compostos sem os grupos metacrilóxi e isso-butirolóxi, que não foram perceptíveis em análises de RMN. Para o extrato CF-12 que forneceu o composto CP-XII essa técnica foi capaz de identificar e propor um mecanismo de fragmentação.

Os resultados dos ensaios biológicos mostraram que a fração hidrometanólica apresentou melhor resultado para a atividade antioxidante com valores de IC₅₀ comparáveis aos do BHT. Esse comportamento está relacionado com a presença de compostos fenólicos CP-IX e CP-X.

Os resultados da avaliação da atividade antibacteriana os resultados foram significativos para a fração CFD contra *Staphylococcus aureus* e *Shigella flexneri*.

Analisando os resultados para atividade antitumoral, frente a diversas linhagens de células tumorais humanas, foi observada que a fração diclorometano foi a mais ativa dentre as frações testadas, com valores de IC₅₀ na faixa de 2,9 a 5,1 µg/ml. Essa atividade está provavelmente relacionada às lactonas sesquiterpênicas isoladas da fração diclorometano.

A realização de ensaios biológicos para avaliação das atividades anti-leishmania do extrato e frações, mostraram que as frações hexano e extrato bruto

exibiram um notável efeito sob *Leishmania amazonensis*, com IC₅₀ de 7,14-2,29 e 1,04-0,89 µg/mL, respectivamente.

8. REFERÊNCIA

ALY, A. H.; EDRADA-EBEL, R.; INDRIANI, I. D.; WRAY, V.; MULLER, W. E. G.; TOTZKE, F.; ZIRRGIEBEL, U.; SCHACHTELE, C.; KUBBUTAT, M. H. G.; LIN, W. H.; PROKSCH, P.; EBEL, R. Cytotoxic Metabolites from the Fungal Endophyte *Alternaria* sp. And Their Subsequent Detection in Its Host Plant *Polygonum senegalense*. **Journal of Natural Products**, 71, 972-980, 2008.

AHMED, A. A.; HUSSEIN, T. A.; MAHMOUD, A. A.; FARAG, M. A.; PARÉ, P. W.; WOJCINSKA, M.; KARCHESY, J.; MABRY, T. J. Nor-ent-kaurane diterpenes and hidroxy lactones from *Antennaria geyeri* and *Anaphalis margaritacea*. **Phytochemistry**, 65, 2539-2543, 2004.

AZEVEDO, J. L., MACCHERONI JR, W., PEREIRA, J. O., ARAÚJO, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 15-16, 2000.

AZEVEDO J.L.; MACCHERONI W.J.R.; ARAUJO, W.L.; PEREIRA, J.O.; Microrganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais. In: Serafini LA, Barros NM, Azevedo JL (eds) *Biotechnologia: avanços na agricultura e na agroindústria*. EDUSC, Caxias do Sul, p. 233-268, 2002.

AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI, B. N.; DESHMUKH, S. K. (Org.) **Fungi: multifaceted microbes**, CRC Press, Boca Raton. p.189-207. 2007.

AYATOLLAHI, S. A.; SHOJAI, A.; KOBARFARD, F.; MOHAMMADZADEH, M.; CHOUDHARY, M. I. Two flavones from *Salvia leiriaefolia*. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, 8, 179-184, 2009.

BARUAH, N. C.; SHARMA, R. P.; MADHUSUDANAN, K. P.; THYAGARAJAN, G. Sesquiterpene lactones of *Tithinia diversifolia*. Stereochemistry of the tagitinins and related compounds. **The Journal of Organic Chemistry**, 44, 1831-1835, 1979.

BEI-BEI, Z.; YUAN, D.; ZHI-XIN, L. Chemical constituents of *Saussurea eopygmaea*. **Chinese Journal of Natural Medicines**, 9, 33-37, 2011.

BELL, C. L.; EGAN, R. S.; BAUER, L. Nuclear Magnetic Resonance Studies of Heteroaromatic Systems. Methyl Coupling of 2-Substituted Picolines, 2-Pyridones and 2-Pyridithiones. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, 2, 420-429, 1965.

BENTLEY, R. Mycophenolic acid: a one hundred year odyssey from antibiotic to immunosuppressant. **Chemical Reviews**, 100, 3801-3826, 2000.

BENZ, S.; NOTZLI, S.; SIGEL, J. S.; EBERLI, D.; JESSEN, H. J. Controlled Oxygen Release from Pyridone Endoperoxides Promotes Cell Survival under Anoxic Conditions. **Medicinal Chemistry**, 56, 10171-10182, 2013.

BRADER, G.; COMPANY, S.; MITTER, B.; TROGNITZ, F.; SESSITSCH, A.; Metabolic potential of endophytic bacteria. **Current Opinion Biotechnology**, 27, 30-37, 2014.

BOHLMANN, F.; GUPTA, R. K.; JAKUPOVIC, JASMIN.; KING, R. M.; ROBINSON, H. Eudesmanolides and Heliangolides from *Calea rotundifolia*. **Phytochemistry**, 7, 1635-1637, 1981.

BOHLMANN, F.; ZDERO, C.; KING, R. M.; ROBINSON, H. Heliangolides, and nerolidol and *p*-hydroxyacetophenone derivatives from *Calea species*. **Phytochemistry**, 20, 1643-1647, 1981.

BOHLMANN, F.; BAPUJI, M.; KING, R. M.; ROBINSON, H. New heliangolides from *Calea oxylepis*. **Phytochemistry**, 21, 1164-1166, 1982.

BOHLMANN, F.; GUPTA, R. K.; JAKUPOVIC, J.; KING, R. M.; ROBINSON, H. Furanoheliandolides and farnesol derivatives from *Calea hispida*. **Phytochemistry**, 21, 2899-2903, 1982.

CHEN, Y-T.; CHEN, H-W.; WU, C-F.; CHU, L. J.; CHIANG, W-F.; WU, C-C.; YU, J-S.; TSAI, C-H.; LIANG, K-H.; CHANG, Y-S.; WU, M.; YANG, W-T. O. Development of a Multiplexed Liquid Chromatography Multiple-Reaction-Monitoring Mass Spectrometry (LC-MRM/MS) Method for Evaluation of Salivary Proteins as Oral Cancer Biomarkers. **Molecular & Cellular Proteomics**, 24, 799-811, 2017.

CLIFFORD, M. N.; JOHNSTON, K. L.; KNIGHT, S.; KUHNERT, N. Hierarchical Scheme for LC-MSⁿ Identification of Chlorogenic Acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51, 2900-2911, 2003.

CLIFFORD, M. N.; KNIGHT, S.; KUHNERT, N. Discriminating between the Six Isomers of Dicafeoylquinic Acid by LC-MSⁿ. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53, 3821-3832, 2005.

CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. Fungos endofíticos: Uma fonte Inexplorada e sustentável de novos e bioativos produtos naturais. **Revista Virtual de Química**, 5, 421-437, 2013.

CHOMCHEON, P.; WIYAKRUTTA, S.; SRIUBOLMAS, N.; NGAMROJANAVANICH, N.; ISARANGKUL, D.; KITTAKOOP, P. 3-Nitropropionic Acid (3-NPA), a Potent Antimycobacterial Agent from Endophytic

fungi: Is 3-NPA in Some Plants Produced by Endophytes?. **Journal of Natural Products**, 68, 1103-1105, 2005.

CHOPARD, C.; AZERAD, R.; PRANGÉ, T. Naphthalene-dioxygenase-catalysed *cis*-dihydroxylation of azaarene derivatives Part 1: 2-pyridones and 2-quinolones. **Journal of Molecular Catalysis B**, 50, 53-60, 2008.

CHOWDHURY, P. K.; SHARMA, R. P.; THYAGARAJAN, G. Stereochemistry of Ciliarin, Zexbrevin, and Their Relatives. **Journal of Organic Chemistry**, 45, 4993-4997, 1980.

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

CROTTI, A. E. M.; FONSECA, T.; HONG, H.; STAUNTON, J.; GALEMBECK, S. E.; LOPES, N. P.; GATES, P. J. The fragmentation mechanism of five-membered lactones by electrospray ionization tandem mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry**, 232, 271-276, 2004.

CROTTI, A. E. M.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. Triple quadrupole tandem mass spectrometry of sesquiterpene lactones: a study of gayazensolide and its congeners. **Journal of Mass Spectrometry**, 40, 1030-1034, 2005.

DANINO, O.; GOTTLIEB, H. E.; GROSSMAN, S.; BERGMAN, M. Antioxidant activity of 1,3-dicaffeoylquinic acid isolated from *Inula viscosa*. **Food Research International**, 42, 1273-1280, 2009.

DE SOUZA, G. D.; MITHOFER, A.; DAOLIO, C.; SCHNEIDER, B.; RODRIGUES-FILHO, E. Identification of *Alternaria alternata* Mycotoxins by LC-SPE-NMR and Their Cytotoxic Effects to Soybean (*Glycine max*) Cell Suspension Culture. **Molecules**, 18, 2528-2538, 2013.

EL-MASSRY, K. F.; EL-GHORAB, A. L.; FAROUK, A. Antioxidant activity and volatile components of *Egyptian artemisia judaica* aL. **Food Chemistry**,79, 331-336, 2002.

FRANCIS, K.; SMITHERMAN, C.; NISHINO, S. F.; SPAIN, J. C.; GADDA, G. The biochemistry of the metabolic poison propionate 3-nitronate and Its conjugate acid, 3-nitropropionate. **Biochemistry and Molecular Biology for life Scientists**, 65, 759-768, 2013.

FLORES, A. C.; PAMPHILE, J. A.; SARRAGIOTTO, M. H.; CLEMENTE, E. Production of 3-nitropropionic acid by endophytic fungus *Phomopsis longicolla* isolated from *Trichilia elegans* A. JUSS ssp. *elegans* and evaluation of biological activity. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 29, 1251-1252, 2013.

FUNK, V. A.; BAYER, R. J.; KEELEY, S.; CHAN, R.; WATSON, L.; GEMEINHOLZER, B.; SCHILLING, E.; PANERO, J. L.; BALDWIN, B. G.; GARCIA-JACAS, N.; SUSANNA, A.; JANSEN, R. K. Everywhere but Antarctica: Using a supertree to understand the diversity and distribution of the Compositae. **Biologiske Skrifter**, 55, 343-373, 2005.

GOLDMAN, P. Herbal medicines today and the roots of modern pharmacology. **Annals of Internal Medicine**, 135, 594-600, 2001.

GÓMEZ, M. e GIL, J. F. Topical anti-inflammatory activity of *Calea prunifolia* H.B.K. (Asteraceae) in the TFA model of mouse Ear inflammation. **Journal of the Brazilian chemical society**, 22, 2391-2395, 2011.

GUNATHILAKA, A.A.L. Natural products from plant-associated microorganisms: Distribution, structural diversity, bioactivity and implication of their occurrence. **Journal of Natural Products**, 69: 509-526, 2006.

GUO, X.; YUE, Y.; TANG, F.; WANG, J.; YAO, X.; SUN, J. A comparison of C-glycosidic flavonoid isomers by electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry in negative and positive ion mode. **International Journal of Mass Spectrometry**, 333, 59-66, 2013.

GUZMÁN-LÓPEZ, O.; TRIGOS, Á.; FERNÁNDEZ, F. J.; YAÑEZ-MORALES, M. J.; SAUCEDO-CASTAÑEDA. Tyrosol and tryptophol produced by *Ceratocytis adiposa*. **World Journal Microbiol Biotechnol**, 23, 1473-1477, 2007.

HELENO, V. C., CROTTI, A. E. M., CONSTANTINO, M. G., LOPES, N. P., LOPES, J. L. C. Spectral Assignments and Reference Data. **Magnetic Resonance in Chemistry**, 42, 364-367, 2004.

HERZ, W.; KUMAR, N. Heliangolides from *Helianthus maximiliani*. **Phytochemistry**, 20, 93-98, 1980.

JAKUPOVIC, J.; BOHLMANN, F. A new type of sesquiterpene and acorane derivative from *Calea prunifolia*. **Journal of Natural Products**, 47, 802-808, 1983.

JAISWAL, R.; HALABI, E. A.; KARAR, M. G. E.; KUHNERT, N. Identification and characterization of the phenolics of *Ilex glabra* L. Gray (Aquifoliaceae) leaves by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Phytochemistry**, 106, 141-155, 2014.

JAISWAL, R. e KUHNERT, N. How to identify and discriminate between the methyl quinates of chlorogenic acids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, 46, 269-281, 2011.

JAKUPOVIC, J.; GANZER, U.; BOHLMANN, F.; KING, R. M. Kaurane and beyerane derivatives from *Calocephalus knapii*. **Phytochemistry**, 30, 2651-2652, 1991.

KAUL, S.; GUPTA, S.; AHMED, M.; DHAR, M. K. Endophytic fungi from medicinal plants: a treasure hunt for bioactive metabolites. **Phytochemistry Reviews**, 11, 487-505, 2012.

KHATIB, A.; WILSON, E. G.; KIM, H. K.; LEFEBER, A. W.M.; ERKELENS, C.; CHOI, Y. H.; VERPOORE, R. Application of two-dimensional *J*-resolved nuclear magnetic resonance spectroscopy to differentiation of beer. **Analytica Chimica Acta**, 559, 264-270, 2006.

KIM, J. Y.; CHO, J-Y.; MA, Y-K.; PARK, K. Y.; LEE, S-H.; HAM, K-S.; LEE, H. J.; PARK, K-H.; MOON, J-H. Caffeoyl acid derivatives and flavonoid glycosides from glasswort (*Salicornia herbacea* L.) and their antioxidative activity. **Food Chemistry**, 125, 55-62, 2011.

KLEMKE, C.; KEHRAUS, S.; WRIGHT, A. D.; KONING, G. M. New secondary metabolites from the marine endophytic fungi *Apiospora montagnei*. **Journal of Natural Products**, 67, 1058-1063, 2004.

KOBAYASHI, D. Y.; PALUMBO, J. D. Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. **Microbial endophytes**, p. 199-233, 2000.

KONISHI, K. and TAKAHASHI, K. NMR Studies of Picolyl-type Carbanions. IV. Anions Produced by Reactions of 2-Substituted Pyridines with Butyllithium. **Bulletin of Chemical Society of Japan**, 50, 2512-2516, 1977.

KURODA, M.; YOKOSUKA, A.; KOBAYASHI, R.; JITSUNO, M.; KANDO, H.; NOSAKA, K.; ISHII, H.; YAMORI, T.; MIMAKI, Y. Sesquiterpenoids and flavonoids from the aerial parts of *Tithonia diversifolia* and their cytotoxic activity. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, 55, 1240-1244.

KUSARI, S.; SINGH, S.; JAYABASKARAN, C. Biotechnological potential of plant-associated endophytic fungi: hope versus hype. **Trends in biotechnology**, v. 32, n. 6, p. 297-303, 2014.

LACAVA, P. T.; SEBASTIANES, F. L. S. and AZEVEDO J. L. (2010). Fungos, uma introdução a biologia, bioquímica e biotecnologia. In: Fungos endofíticos:

biodiversidades e aplicações biotecnológicas, 2nd edn. (Esposito E and Azevedo JL, eds.). **Revisada e ampliada. EDUCS**, Caxias do Sul, Brasil, pp. 533-569.

LARSEN, T. O.; SMEDEGAARD, J.; NIELSEN, K. F.; HANSEN, M. E.; FRISVAD, J. C. Phenotypic taxonomy and metabolite profiling in microbial drug discovery. **Natural Product Reports**, 22, 672-695, 2005.

LEE, E. J.; KIM, J. S.; KIM, H. P.; LEE, J-H.; KANG, S. S. Phenolic constituents from the flower buds of *Lonicera japonica* and their 5-lipoxygenase inhibitory activities. **Food Chemistry**, 120, 134-139, 2010.

LIU, Y.; WANG, M. W. Botanical drugs: Challenges and opportunities Contribution to Linnaeus Memorial Symposium. **Life Sciences**, 82, 445-449, 2008.

Li, H.; Qing, C.; Zhang, Y.; Zhao, Z. Screening for endophytic fungi with antitumor and antifungal activities from Chinese medicinal plants. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 21,1515–1519, 2005.

LOEUILLE, B.; MITTELSTAEDT, C. A.; SEMIR, J.; PIRANI, J. R. Flora da serra do cipó, minas gerais: Compositae-Gnaphalieae e Inuleae. **Boletim Botânico da Universidade de São Paulo**, 31, 1325, 2013.

LOEUILLE, B.; MONGE, M. *Lucilia* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Available in: <http://www.floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB106915> Access on: 10 Nov. 2014.

MALDONADO, E.; MARQUEZ, C.; ORTEGA, A. A thymol derivative from *Calea nelsonii*. **Phytochemistry**, 31, 2527-2528, 1992.

MENDES, R.; AZEVEDO, J.L. (2007). Valor biotecnológico de fungos endofíticos isolados de plantas de interesse econômico. p.129-140. **In:** Maia, L.C.; Malosso. E.;

Yano-Melo, A.N., (orgs). Micologia: avanços no conhecimento. **Sociedade Brasileira de Micologia**, Recife. pp. 129-140.

MENDES F. R.; DUARTE-ALMEIDA, J. M.; MATTOS, P. E. O.; PIRES, J. M.; CARLINI, E. A. O conhecimento do Estudante e do Pesquisador Brasileiro sobre a Legislação do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético – CGEN. **Revista Fitos**, 4(1), 2009.

MONKS, A.; SCUDIERO, D.; SKEHAN, 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. **Journal National Cancer Institute**, 1991, 83, 757-766.

MORAES, M. C. B. e LAGO, C. L. Espectrometria de massas com ionização por “ELECTROSPRAY” aplicada ao estudo de espécies inorgânicas e organometálicas. **Química Nova**, 26, 556-563, 2003.

MORISHITA, H.; IWAHASHI, H.; OSAKA, N.; KIDO, R. Chromatographic separation and identification of naturally occurring chlorogenic acids by ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy and mass spectrometry. **Journal of Chromatography**, 315, 253-260, 1984.

MORO, R. S., CARMO, M. R. B. A vegetação campestre nos campos gerais vegetação campestre. **Patrimônio Natural dos campos Gerais do Paraná**, Ponta Grossa: Editora UEPG, 93-98, 2006.

MUIR, A. D.; MAJAK, W.; PASS, M. A.; YOST, G. S. Conversion of 3-nitropropanol (Miserotoxin Aglycone) to 3-nitropropionic acid in Cattle and Sheep. **Toxicology Letters**, 20, 137-141, 1984.

NASCIMENTO, A. M.; SILVA, F. S.; OLIVEIRA, D. C. R. Constituents of *Calea platylepis* Sch. Bip. ex Baker. **Biochemical Systematics and Ecology**, 30, 993-996, 2002.

NASCIMENTO, A. M.; SALVADOR, M. J.; CANDIDO, R. C.; ITO, I. Y.; OLIVEIRA, D. C. R. Antimicrobial activity of extracts and some compounds from *Calea platylepis*. **Fitoterapia**, 75, 514-519, 2004.

NASCIMENTO, A. M.; OLIVEIRA, D. C. R. A new 5-deoxy flavone glycoside from the aerial parts of *Calea clauseniana*. **Carbohydrate Research**, 342, 1261-1263, 2007.

NEWMAN, D.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of New Drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, 73, 311-335, 2012.

NEWMAN, D.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, 79, 629-661, 2016.

NOGATA, Y.; SEKIYA, K.; OHTA, H.; KUSUMOTO, K-I.; ISHIZU, T. Inhibitors of platelet lipooxygenase from ponkan fruit. **Phytochemistry**, 56, 729-732, 2001.

NCUBE, E. N.; MHLONGO, M.; PIATER, L. A.; STEENKAMP, P. A.; DUBERY, I. A.; MADALA, N. E. Analyses of Chlorogenic acids and related cinnamic acid derivatives from *Nicotiana tabacum* tissues with the aid of UPLC-QTOF-MS/MS based on the in-source collision-induced dissociation method. **Chemistry Central Journal**, 66, 1-10, 2014.

NUNEZ, C. V., AMÊNDOLA, M. C., LAGO, J. H. G., ROQUE, N. F. Diterpene acids from *MIKANIA* sp. nov (Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, 32, 233-237, 2004.

OBER, A. G.; QUIJANO, L.; URBATSCH, L. E.; FISCHER, N. H. Eudesmanolides from *Calea trichomata*. **Phytochemistry**, 23, 910-912, 1984.

OBER, A. G.; FISHER, N. H.; PARODI, F. Jamaicolides A-D, four sesquiterpene lactones from *Calea jamaicensis*. **Phytochemistry**, 25, 877-881, 1986.

ORTEGA, A.; LÓPEZ, J. D. C.; MALDONADO, E. A tri-norsesquiterpene lactone and other sesquiterpenes from *Calea crocinervosa*. **Phytochemistry**, 28, 2735-2736, 1989.

PARK, K. H.; PARK, M.; CHOI, S. E.; JEONG, M. S.; KWON, J. H.; OH, M. H.; CHOI, H. K.; SEO, S. J.; LEE, M. W. The anti-oxidative and anti-inflammatory effects of caffeoyl derivatives from the roots of *Aconitum koreanum* R. Raymond. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, 32, 2020-2033, 2009.

PEIXOTO-NETO, P.A.S.; AZEVEDO, J. L.; ARAUJO, W. L. Microrganismos endofíticos: interação com plantas e potencial biotecnológico. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 29, p. 62-76, 2002.

PICHINI, S.; CORTES, L.; MARCHEI, E.; SOLIMINI, R.; PACIFICI, R.; GOMEZ-ROIG, M. D.; GARCÍA-ALGAR, O. Ultra-high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of antidepressant and anxiolytic drugs in neonatal meconium and maternal hair. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 118, 9-16, 2016.

PUEBLA, P.; ARANGUREN, N.; RINCÓN, J.; ROJAS, M.; GUERRERO, M.; SAN FELICIAN, A. Polar compounds isolated from the leaves of *Calea prunifolia* H.B.K. and their anti-adrenergic related vasodilator activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 22, 2281-2285, 2011.

RAINHA, N.; KOCI, K.; COELHO, A. V.; LIMA, E.; BAPTISTA, J.; FERNANDES-FERREIRA, M. HPLC-UV-ESI-MS analysis of phenolic compounds and antioxidante properties of *Hypericum undulatum* shoot cultures and wild-growing plants. **Phytochemistry**, 86, 83-91, 2013.

RASSER, F.; ANKE, T.; STERNER, O. Secondary metabolites from a *Gloeophyllum* species. **Phytochemistry**, 54, 511-516, 2000.

REN, Y.; ACUÑA, U. M.; JIMÉNEZ, F.; GARCÍA, R.; MEJÍA, M.; CHAI, H.; GALLUCCI, J.C.; FARNSWORTH, N. R.; SOEJARTO, D. D.; BLANCO, E. J. C.; KINGHORN, A. D. Cytotoxic and NF-kB inhibitory sesquiterpene lactones from *Piptocoma rufescens*. **Tetrahedron**, 68, 2671-2678, 2012.

RHODEN, S.A.; GARCIA, A.; RUBIN-FILHO, C.J.; AZEVEDO, J.L.; PAMPHILE, J.A. Phylogenetic diversity of endophytic leaf fungus isolates from the medicinal tree *Trichilia elegans* (Meliaceae). **Genetics and Molecular Research**, 11, 2513-2522, 2012.

SARTORI, L. R.; VESSECCI, R.; HUMPF, H-U., DA COSTA, F. B.; LOPES, N. P. A systematic investigation of the fragmentation pattern of two furanoheliangolide C-8 stereoisomers using electrospray ionization mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, 28, 723-730, 2013.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; BOEKER, R.; JAKUPOVIC, J.; BOHLMANN, F. A myrtenylfuroheliandolide from *Calea rupicola*. **Phytochemistry**, 25, 1753-1754, 1986.
SCHUSTER, A.; STOKE, A.; PAPASTERGIOU, F.; CASTRO, V.; POVEDA, L.; JAKUPOVIC, J. Sesquiterpene lactones from two *Tithonia* species. **Phytochemistry**, 31, 3139-3141, 1992.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, v. 109, p. 661-686, 2005.

SCHUSTER, A.; POVEDA, C. L.; PAPASTERGIOU, F.; JAKUPOVIC, J. Sesquiterpene Lactones from *koanophyllon albicaule*. **Phytochemistry**, 31, 3143-3146, 1992.

SCOTTI, T. M.; EMERENCIANO, V.; FERREIRA, M. J. P.; SCOTTI, L.; STEFANI, R.; DA SILVA, M. S.; JUNIOR, F. J. B. M. Self-Organizing Maps of Molecular Descriptors for Sesquiterpene Lactones and Their Application to the Chemotaxonomy of the Asteraceae Family. **Molecules**, 17, 4685-4702, 2012.

SHI, S.; HANG, K.; ZHANG, Y.; ZHAO, Y.; DU, Q. Purification and identification of antiviral components from *Laggera pterodonta* by high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography B**, 859, 119-124, 2007.

STIERLE, A. A.; STIERLE, D. B.; BUNGENI, T. Sequoiatones A and B: novel antitumor metabolites isolated from a redwood endophyte. **The Journal of Organic Chemistry**, 64, 5479-5484, 1999.

STROBEL, G. A.; FORD, E.; WORAPONG, J.; HARPER, J. K.; ARIF, A. M.; GRANT, D. M.; FUNG P. C. W.; CHAU, R. M. W. Isopestacin, an isobenzofuranone from *Pestalotiopsis microspora*, possessing anti-fungal and antioxidant activities. **Phytochemistry**, 60, 179-183, 2002.

SU, D.; HUANG, J.; SONG, Y.; FENG, Y. Comparative pharmacokinetics and tissue distribution study of mono-, and di-caffeoylquinic acids isomers of *Ainsliaea fragrans* Champ by a fast UHPLC-MS/MS method. **Fitoterapia**, 99, 139-152, 2014.

SUN, J.; AWAKAWA, T.; NOGUCHI, H.; ABE, I. Induced production of mycotoxins in an endophytic fungus from the medicinal plant *Datura stramonium* L. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 22, 6397-6400, 2012.

TAKAYA, Y.; FURUKAWA, T.; MIURA, S.; AKUTAGAWA, T.; HOTTA, Y.; ISHIKAWA, N.; NIWA, M. Antioxidant Constituents in Distillation Residue of Awamori Spirits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 55, 75-79, 2007.

VARGA, E.; GLAUNER, T.; BERTHILLER, F.; KRŠKA, R.; SCHUHMANCHER, R.; SULYOK, M.; Development and validation of a (semi-)quantitative UHPLC-MS/MS method for the determination of 191 mycotoxins and other fungal metabolites in almonds, hazelnuts, peanuts and pistachios. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 405, 5087-5104, 2013.

VENEGAS-FLORES, H.; SEGURA-CABOS, D.; VÁZQUEZ-CRUZ, B. Anti-inflammatory activity of the aqueous extract of *Calea zacatechichi*. **Proceedings of the Western Pharmacology Society**, 45, 110-111, 2002.

VENDRAMETTO, M. C.; SANTOS A. O.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P.; CORTEZ, D. A.; UEDA-NAKAMURA, T. Evaluation of antileishmanial activity of eupomatenoid-5, a compound isolated from leaves of *Piper regnellii* var. *pallescens*. **Parasitology International**, vol. 59, n. 2, p. 154-158, 2010.

VICHNEWSKI, W.; GOULART, E. G.; HERZ, W. A heliangolide from *Calea lantanoides*. **Phytochemistry**, 21, 464-465, 1982.

VILLAÑO, D.; FERNÁNDEZ-PACHÓN, M. S.; MOYÁ, M. L.; TRONCOSO, A. M.; GARCÍA-PARRILLA, M. C. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. **Talanta**, 71, 230-235, 2007.

VILLARREAL, M. L.; ALVAREZ, L.; ALONSO, D.; NAVARRO, V.; GARCÍA, P.; DELGADO, G. Cytotoxic and antimicrobial screening of selected terpenoids from Asteraceae species. **Journal of Ethnopharmacology**, 42, 25-29, 1994.

VISHWANATH, V.; SULYOK M.; LACUDA, R.; BICKER, W.; KRŠKA, R. Simultaneous determination of 186 fungal and bacterial metabolites in indoor matrices by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 395, 1355-1372, 2009.

VIVAR, A. R.; GUERRERO, C.; DIAZ, E.; ORTEGA, A. Structure and stereochemistry of zexbrevin A 3(2H) furanone germacranolide. **Tetrahedron**, 26, 1657-1664, 1970.

VOGELI, U. and PHILIPSBORN, W. V. ^{13}C and ^1H NMR Spectroscopic Studies on the Structure of N-Methyl-3-pyridone and 3-Hydroxypyridine. **Organic Magnetic Resonance**, 5, 551-559, 1973.

WAGNER, H. e CHARI, V. M. ^{13}C -NMR-Spektren natpürlich vorkommender flavonoide. **Tetrahedron**, 21, 1799-1802, 1976.

WOLLENWEBER, E.; STEVENS, J. F.; IVANCIC, M. Flavonoid aglycones and a thiophene derivative from *Helichrysum cassianum*. **Phytochemistry**, 47, 1441-1443, 1998.

WOLLENWEBER, E.; CHRISTM, M.; DUNSTAN, R. H.; ROITMAN, J. N.; STEVENS, J. F. Exudate flavonoids in some Gnaphalieae and Inuleae (Asteraceae). **Zeitschrift fur Naturforschung**, 60, 671-678, 2005.

WU, H.; FRONCZEK, F. R.; BURANDT, C. L.; ZJAWIONY, J. K. Antileishmanial germacranolides from *Calea zacatechichi*. **Planta med**, 77, 749-753, 2011.

YAMADA, M.; MATSURA, N.; SUZUKI, H.; KUROSAKA, C.; HASEGAWA, N.; UBUKATA, M.; TANAKA, T.; IINUMA, M. Germacranolides from *Calea urticifolia*. **Phytochemistry**, 65, 3107-3111, 2004.

ZHAO, J.; SUN, W.; SHAN, T.; MOU, Y.; LOU, J.; LI, Y.; WANG, M.; ZHOU, L. Antimicrobial metabolites from the endophytic fungus *Gliomastix murorum* Ppf 8 associated with the medicinal plant *Paris polyphylla var. yunnanensis*. **Journal of Medicinal Plants Research**, 6, 2100-2104, 2012.

ZHENG, X.; WANG, W.; PIAO, H.; XU, W.; SHI, H.; ZHAO, C. The Genus *Gnaphalium* L. (Compositae): Phytochemical and Pharmacological Characteristics. **Molecules**, 18, 8298-8318, 2013.