

Layzon Antonio Lemos da Silva

**INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA DA ESPÉCIE *Vernonanthura
tweediana* (Baker) H. Rob.**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Farmácia, sob orientação da Profa. Dra. Maique Weber Biavatti.

Florianópolis
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Silva, Layzon Antonio Lemos da
INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA DA ESPÉCIE *Vernonanthura*
tweedieana (Baker) H. Rob. / Layzon Antonio Lemos da Silva
; orientadora, Maíque Webber Biavatti - Florianópolis, SC,
2015.
184 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-
Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. *Vernonanthura tweedieana*. 3.
Asteraceae. 4. Lactona sesquiterpênica. 5. Compostos
fenólicos. I. Biavatti, Maíque Webber. II. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Farmácia. III. Título.

Layzon Antonio Lemos da Silva

INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA DA ESPÉCIE *Vernonanthura tweediana* (Baker) H. Rob.

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre em Farmácia”, e aprovado a em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 30 de março de 2015.

Prof.^a Tânia Beatriz Crecznski Pasa, Dr.^a
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof.^a Maique Weber Biavatti, Dr.^a
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Prof.^a Angela Malheiros, Dr.^a
Universidade do Vale do Itajaí – Univali

Prof.^a Inês Maria Costa Brighente, Dr.^a
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Prof.^a Miriam de Barcellos Falkenberg, Dr.^a
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Carlos e Elair, e minha
mana Talissa.*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Maique Weber Biavatti, por ter me acolhido desde o início, e por todo o aprendizado e parceria durante o desenvolvimento deste trabalho.

À UFSC, ao Programa de Pós-graduação em Farmácia e todos os professores pelos ensinamentos durante o mestrado.

À CAPES pela bolsa de estudo.

Às técnicas do laboratório Claudinha e Solange, e a Sandra por toda a ajuda e amizade.

Aos colegas e amigos de laboratório, Tamires, Solomon, Larissa, Narjara, Luise, Vanessa, Rafaela, Luiz, Daniela, Gabriele, Ana Cláudia, Maria Izabel, Tauana, entre outros amigos dos laboratórios vizinhos e parceiros, presentes e àqueles que já seguiram por outros caminhos, obrigado por todos os momentos felizes e agradáveis que passamos juntos que tornaram tudo mais fácil.

Aos professores Dr. Andersson Barison e Dra. Francinete Ramos Campos, ao Alan e a Lívia, da UFPR, que gentilmente contribuíram para a realização das análises de RMN e EM.

Ao Professor Dr. Ademir Reis pela ajuda na identificação do material vegetal.

À Elis pelas análises de EM.

Ao Professor Dr. Mário Steindel e a Milene pela realização dos ensaios biológicos.

Aos amigos e familiares que de alguma forma estiveram presente, contribuindo e torcendo por mim.

Agradeço, muito, em especial à Larissa, pelo carinho, afeto, companheirismo, e por estar ao meu lado me incentivando e me apoiando em todos os momentos. E aos meus pais, Carlos e Elair, e minha mana Talissa, por todo o amor e carinho que sempre tiveram por mim, pela paciência nos momentos difíceis, pela confiança, dedicação, suporte, por acreditarem em mim e por tornarem possível que eu fosse atrás dos meus sonhos. Amo muito vocês!

RESUMO

O uso de plantas medicinais com fins terapêuticos é uma das mais antigas práticas medicinais da humanidade. A espécie *Vernonanthura tweedieana* (Asteraceae), conhecida popularmente como “assa-peixe” e “mata-pasto”, tem sido utilizada no Brasil para o tratamento de doenças respiratórias. Com o intuito de promover a investigação fitoquímica da espécie para avaliação da atividade biológica *in vitro* dos componentes majoritários, os extratos brutos hidroetanólicos de partes aéreas, de caules e raízes, e o extrato acetônico de lavagem foliar foram submetidos a sucessivos procedimentos cromatográficos. A partir dos diversos processos cromatográficos foi possível purificar e caracterizar 11 substâncias, sendo dois ácidos fenólicos, ácidos cafeico e protocatecuico; um derivado etoxilado do ácido cafeico, cafeato de etila; cinco flavonoides, naringenina, crisoeriol, eriodictiol, apigenina e luteolina; dois fenilpropanoides, 3-hidroxi-1-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-propan-1-ona e evofolina B; e uma lactona sesquiterpênica, glaucolídeo A. Com exceção do eriodictiol, já reportado para as folhas de *V. tweedieana*, as demais substâncias estão sendo relatadas pela primeira vez para a espécie. Avaliado biologicamente *in vitro* quanto às atividades leishmanicida (frente a *Leishmania amazonensis*) e tripanocida (frente a *Trypanosoma cruzi*), o eriodictiol apresentou fraca atividade tripanocida (com porcentagem de inibição de crescimento de 22,65%) e não apresentou atividade leishmanicida. Os resultados obtidos possibilitam aprofundar o conhecimento da composição química e do potencial biológico para a espécie *V. tweedieana*, considerando as poucas informações disponíveis na literatura.

Palavras-chave: *Vernonanthura tweedieana*. Asteraceae. Lactona sesquiterpênica. Compostos fenólicos.

ABSTRACT

Phytochemical investigation of the specie *Vernonanthura tweedieana* (Baker) H. Rob.

The use of medicinal plants for therapeutic purposes is one of the oldest medicinal practices in humanity. The species *Vernonanthura tweedieana* (Asteraceae), popularly known as “assa-peixe” and “mata-pasto”, has been used in Brazil for the treatment of respiratory diseases. In order to promote the phytochemical investigation of the species to evaluate *in vitro* biological activity of major components, the hydroethanolic crude extracts from aerial parts, from stems and roots, and from leaf washing acetone extract were subjected to successive chromatographic procedures. From the various chromatographic processes was possible to purify and characterize 11 substances, two phenolic acids, caffeic and protocatechuic acid; one ethoxylated derivative of caffeic acid, ethyl caffeate; five flavonoids, naringenin, crysoeriol, eriodictyol, apigenin and luteolin; two phenylpropanoids, 3-hydroxy-1-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl) propan-1-one and evofolin B; and one sesquiterpene lactone, glaucolide A. With the exception of eriodictyol, which as reported to leaves of *V. tweedieana*, other substances are being related for the first time in this species. Biologically evaluated *in vitro* for the leishmanicidal (against *Leishmania amazonensis*) and trypanocidal (against *Trypanosoma cruzi*) activities, the eriodictyol had a weak trypanocidal activity (with growth inhibition percentage of 22.65%) and showed no leishmanicidal activity. The results allow greater understanding of the chemical composition and biological potential for the species *V. tweedieana*, considering the limited information available in the literature.

Keywords: *Vernonanthura tweedieana*. Asteraceae. Sesquiterpene lactone. Phenolic compounds.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo biossintético dos metabólitos secundários.	38
Figura 2 – Via do acetato/mevalonato para síntese de difosfato de isopentenila (IPP).	40
Figura 3 – Principais esqueletos carbocíclicos para as lactonas sesquiterpênicas.	42
Figura 4 – Esqueletos carbocíclicos de hirsutinolídeo e glaucolídeo.	43
Figura 5 – Núcleo fundamental dos flavonoides e sua numeração.	46
Figura 6 – Rota biossintética simplificada de formação dos flavonoides.	47
Figura 7 – Ilustração de espécimes de <i>V. tweedieana</i> (Baker) H. Rob.	51
Figura 8 – Constituintes químicos caracterizados de <i>V. tweedieana</i> .	54
Figura 9 – Análise microscópica de folhas secas de <i>V. tweedieana</i> .	75
Figura 10 – Análise por cromatografia em camada delgada das frações orgânicas da partição dos extratos brutos de partes aéreas (EAF) e caules e raízes (ECR) de <i>V. tweedieana</i> .	79
Figura 11 – Análise por cromatografia em camada delgada do extrato bruto de lavagem foliar (ELF) de <i>V. tweedieana</i> .	80
Figura 12 – Análise por cromatografia em camada delgada da substância VT1 (cafeato de etila) de <i>V. tweedieana</i> .	90
Figura 13 – Espectro de ^1H RMN (600 MHz, TMS, acetona- d_6) para a substância VT1 (cafeato de etila) de <i>V. tweedieana</i> .	91
Figura 14 – Espectro de ^1H RMN (600 MHz, TMS, acetona- d_6) para a substância VT1 (cafeato de etila) de <i>V. tweedieana</i> , ampliado na região entre δ 6,20 e δ 7,60.	91
Figura 15 – Espectro de ^1H RMN (600 MHz, TMS, acetona- d_6) para a substância VT1 (cafeato de etila) de <i>V. tweedieana</i> , ampliado na região entre δ 6,80 e δ 7,20.	92
Figura 16 – Espectro de ^1H RMN (600 MHz, TMS, acetona- d_6) para a substância VT1 (cafeato de etila) de <i>V. tweedieana</i> , ampliado na região entre δ 1,20 e δ 4,20.	92
Figura 17 – Mapa de correlação HSQC (600 MHz ^1H e 125 MHz ^{13}C , TMS, acetona- d_6) para a substância VT1 (cafeato de etila) de <i>V. tweedieana</i> .	93
Figura 18 – Mapa de correlação HMBC (600 MHz ^1H e 125 MHz ^{13}C , TMS, acetona- d_6) para a substância VT1 (cafeato de etila) de <i>V. tweedieana</i> .	93

- Figura 19** – Mapa de correlação HMBC (600 MHz ^1H e 125 MHz ^{13}C , TMS, acetona- d_6) para a substância VT1 (cafeato de etila) de *V. tweedieana*, ampliado na região entre δ 7,80 e δ 8,80 para ^1H , e entre δ 100 e δ 160 para ^{13}C . 94
- Figura 20** – Estrutura molecular da substância VT1 (cafeato de etila) de *V. tweedieana*. 95
- Figura 21** – Correlações a longa distância entre ^1H - ^{13}C da substância VT1 (cafeato de etila) de *V. tweedieana*. 95
- Figura 22** – Espectro de ^1H RMN (600 MHz, TMS, acetona- d_6) para as substâncias VT2 (naringenina) e VT3 (crisoeriol) de *V. tweedieana*. 97
- Figura 23** – Espectro de ^1H RMN (600 MHz, TMS, acetona- d_6) para a substância VT2 (naringenina) de *V. tweedieana*, ampliado na região entre δ 5,40 e δ 6,00 (mistura com VT3). 97
- Figura 24** – Espectro de ^1H RMN (600 MHz, TMS, acetona- d_6) para a substância VT2 (naringenina) de *V. tweedieana*, ampliado na região entre δ 2,60 e δ 3,30 (mistura com VT3). 98
- Figura 25** – Espectro de ^1H RMN (600 MHz, TMS, acetona- d_6) para a substância VT2 (naringenina) de *V. tweedieana*, ampliado na região entre δ 6,85 e δ 7,45 (mistura com VT3). 98
- Figura 26** – Mapa de correlação HSQC (600 MHz ^1H e 125 MHz ^{13}C , TMS, acetona- d_6) para as substâncias VT2 (naringenina) e VT3 (crisoeriol) de *V. tweedieana*. 99
- Figura 27** – Mapa de correlação HMBC (600 MHz ^1H e 125 MHz ^{13}C , TMS, acetona- d_6) para as substâncias VT2 (naringenina) e VT3 (crisoeriol) de *V. tweedieana*. 100
- Figura 28** – Espectro de ^1H RMN (600 MHz, TMS, acetona- d_6) para a substância VT3 (crisoeriol) de *V. tweedieana*, ampliado na região entre δ 6,20 e δ 6,75 (mistura com VT2). 102
- Figura 29** – Espectro de ^1H RMN (600 MHz, TMS, acetona- d_6) para a substância VT3 (crisoeriol) de *V. tweedieana*, ampliado na região entre δ 6,95 e δ 7,70 (mistura com VT2). 102
- Figura 30** – Espectro de ^1H RMN (600 MHz, TMS, acetona- d_6) para a substância VT3 (crisoeriol) de *V. tweedieana*, ampliado na região entre δ 3,80 e δ 4,30 (mistura com VT2). 103
- Figura 31** – Estrutura molecular da substância VT2 (naringenina) de *V. tweedieana*. 104
- Figura 32** – Correlações a longa distância entre ^1H - ^{13}C da substância VT2 (naringenina) de *V. tweedieana*. 104

- Figura 33** – Estrutura molecular da substância VT3 (crisoeriol) de *V. tweedieana*. 106
- Figura 34** – Correlações a longa distância entre ^1H - ^{13}C da substância VT3 (crisoeriol) de *V. tweedieana*. 106
- Figura 35** – Análise por cromatografia em camada delgada da substância VT4 (eriodictiol) de *V. tweedieana*. 107
- Figura 36** – Espectro de ^1H RMN (600 MHz, TMS, CD_3OD) para a substância VT4 (eriodictiol) de *V. tweedieana*. 108
- Figura 37** – Espectro de ^1H RMN (600 MHz, TMS, CD_3OD) para a substância VT4 (eriodictiol) de *V. tweedieana*, ampliado na região entre δ 5,20 e δ 6,00. 108
- Figura 38** – Espectro de ^1H RMN (600 MHz, TMS, CD_3OD) para a substância VT4 (eriodictiol) de *V. tweedieana*, ampliado na região entre δ 2,60 e δ 3,20. 109
- Figura 39** – Espectro de ^1H RMN (600 MHz, TMS, CD_3OD) para a substância VT4 (eriodictiol) de *V. tweedieana*, ampliado na região entre δ 6,75 e δ 6,95. 109
- Figura 40** – Mapa de correlação HSQC (600 MHz ^1H e 125 MHz ^{13}C , TMS, CD_3OD) para as substâncias VT4 (eriodictiol) de *V. tweedieana*. 110
- Figura 41** – Mapa de correlação HMBC (600 MHz ^1H e 125 MHz ^{13}C , TMS, CD_3OD) para as substâncias VT4 (eriodictiol) de *V. tweedieana*. 111
- Figura 42** – Estrutura molecular da substância VT4 (eriodictiol) de *V. tweedieana*. 113
- Figura 43** – Correlações a longa distância entre ^1H - ^{13}C da substância VT4 (eriodictiol) de *V. tweedieana*. 113
- Figura 44** – Espectro de ^1H RMN (600 MHz, TMS, acetona- d_6) para as substâncias VT5 (3-hidroxi-1-[4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil]-propan-1-ona) e VT6 (evofolina B) de *V. tweedieana*. 114
- Figura 45** – Espectro de ^1H RMN (600 MHz, TMS, acetona- d_6) para a substância VT5 (3-hidroxi-1-[4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil]-propan-1-ona) de *V. tweedieana*, ampliado na região entre δ 3,10 e δ 3,95 (mistura com VT6). 115
- Figura 46** – Espectro de ^1H RMN (600 MHz, TMS, acetona- d_6) para a substância VT5 (3-hidroxi-1-[4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil]-propan-1-ona) de *V. tweedieana*, ampliado na região entre δ 7,20 e δ 7,45 (mistura com VT6). 116
- Figura 47** – Mapa de correlação HSQC (600 MHz ^1H e 125 MHz ^{13}C , TMS, acetona- d_6) para as substâncias VT5 (3-hidroxi-1-[4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil]-propan-1-ona) e VT6 (evofolina B) de *V. tweedieana*. 116

- Figura 48** – Mapa de correlação HMBC (600 MHz ^1H e 125 MHz ^{13}C , TMS, acetona- d_6) para as substâncias VT5 (3-hidroxi-1-[4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil]-propan-1-ona) e VT6 (evofolina B) de *V. tweedieana*. 117
- Figura 49** – Espectro de ^1H RMN (600 MHz, TMS, acetona- d_6) para a substância VT6 (evofolina B) de *V. tweedieana*, ampliado na região entre δ 6,70 e δ 7,70 (mistura com VT5). 118
- Figura 50** – Espectro de ^1H RMN (600 MHz, TMS, acetona- d_6) para a substância VT6 (evofolina B) de *V. tweedieana*, ampliado na região entre δ 3,60 e δ 4,85 (mistura com VT5). 119
- Figura 51** – Espectro de ^1H RMN (600 MHz, TMS, acetona- d_6) para a substância VT6 (evofolina B) de *V. tweedieana*, ampliado na região entre δ 3,75 e δ 4,00 (mistura com VT5). 119
- Figura 52** – Estrutura molecular da substância VT5 (3-hidroxi-1-[4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil]-propan-1-ona) de *V. tweedieana*. 120
- Figura 53** – Correlações a longa distância entre ^1H - ^{13}C da substância VT5 (3-hidroxi-1-[4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil]-propan-1-ona) de *V. tweedieana*. 121
- Figura 54** – Estrutura molecular da substância VT6 (evofolina B) de *V. tweedieana*. 122
- Figura 55** – Correlações a longa distância entre ^1H - ^{13}C da substância VT6 (evofolina B) de *V. tweedieana*. 122
- Figura 56** – Espectro de massas ESI-Q-TOF para as substâncias VT5 (3-hidroxi-1-[4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil]-propan-1-ona) e VT6 (evofolina B) de *V. tweedieana*. 123
- Figura 57** – Espectro de ^1H RMN (600 MHz, TMS, CD_3OD) para a substância VT7 (apigenina) de *V. tweedieana*. 124
- Figura 58** – Espectro de ^1H RMN (600 MHz, TMS, CD_3OD) para a substância VT7 (apigenina) de *V. tweedieana*, ampliado na região entre δ 6,15 e δ 6,65. 125
- Figura 59** – Espectro de ^1H RMN (600 MHz, TMS, CD_3OD) para a substância VT7 (apigenina) de *V. tweedieana*, ampliado na região entre δ 6,90 e δ 7,90. 125
- Figura 60** – Mapa de correlação HSQC (600 MHz ^1H e 125 MHz ^{13}C , TMS, CD_3OD) para a substância VT7 (apigenina) de *V. tweedieana*. 126
- Figura 61** – Mapa de correlação HMBC (600 MHz ^1H e 125 MHz ^{13}C , TMS, CD_3OD) para a substância VT7 (apigenina) de *V. tweedieana*. 127
- Figura 62** – Estrutura molecular da substância VT7 (apigenina) de *V. tweedieana*. 129
- Figura 63** – Correlações a longa distância entre ^1H - ^{13}C da substância VT7 (apigenina) de *V. tweedieana*. 129

- Figura 64** – Espectro de ^1H RMN (600 MHz, TMS, acetona- d_6) para as substâncias VT8 (ácido cafeico) e VT9 (ácido protocatecuico) de *V. tweedieana*. 130
- Figura 65** – Espectro de ^1H RMN (600 MHz, TMS, acetona- d_6) para a substância VT8 (ácido cafeico) de *V. tweedieana*, ampliado na região entre δ 6,20 e δ 7,60 (mistura com VT9). 131
- Figura 66** – Mapa de correlação HSQC (600 MHz ^1H e 125 MHz ^{13}C , TMS, acetona- d_6) para as substâncias VT8 (ácido cafeico) e VT9 (ácido protocatecuico) de *V. tweedieana*. 131
- Figura 67** – Mapa de correlação HMBC (600 MHz ^1H e 125 MHz ^{13}C , TMS, acetona- d_6) para as substâncias VT8 (ácido cafeico) e VT9 (ácido protocatecuico) de *V. tweedieana*. 132
- Figura 68** – Estrutura molecular da substância VT8 (ácido cafeico) de *V. tweedieana*. 133
- Figura 69** – Correlações a longa distância entre ^1H - ^{13}C da substância VT8 (ácido cafeico) de *V. tweedieana*. 134
- Figura 70** – Espectro de ^1H RMN (600 MHz, TMS, acetona- d_6) para a substância VT9 (ácido protocatecuico) de *V. tweedieana*, ampliado na região entre δ 6,85 e δ 7,55 (mistura com VT8). 134
- Figura 71** – Estrutura molecular da substância VT9 (ácido protocatecuico) de *V. tweedieana*. 135
- Figura 72** – Correlações a longa distância entre ^1H - ^{13}C da substância VT9 (ácido protocatecuico) de *V. tweedieana*. 136
- Figura 73** – Espectro de ^1H RMN (600 MHz, TMS, acetona- d_6) para a substância VT10 (luteolina) de *V. tweedieana*. 136
- Figura 74** – Espectro de ^1H RMN (600 MHz, TMS, acetona- d_6) para a substância VT10 (luteolina) de *V. tweedieana*, ampliado na região entre δ 6,20 e δ 6,60. 137
- Figura 75** – Espectro de ^1H RMN (600 MHz, TMS, acetona- d_6) para a substância VT10 (luteolina) de *V. tweedieana*, ampliado na região entre δ 6,95 e δ 7,55. 138
- Figura 76** – Mapa de correlação HSQC (600 MHz ^1H e 125 MHz ^{13}C , TMS, acetona- d_6) para a substância VT10 (luteolina) de *V. tweedieana*. 138
- Figura 77** – Mapa de correlação HMBC (600 MHz ^1H e 125 MHz ^{13}C , TMS, acetona- d_6) para a substância VT10 (luteolina) de *V. tweedieana*. 139
- Figura 78** – Estrutura molecular da substância VT10 (luteolina) de *V. tweedieana*. 141
- Figura 79** – Correlações a longa distância entre ^1H - ^{13}C da substância VT10 (luteolina) de *V. tweedieana*. 141

- Figura 80** – Análise por cromatografia em camada delgada da substância VT11 (glaucolídeo A) de *V. tweedieana*. 142
- Figura 81** – Espectro de ^1H RMN (400 MHz, TMS, CDCl_3) para a substância VT11 (glaucolídeo A) de *V. tweedieana*. 142
- Figura 82** – Espectro de ^1H RMN (400 MHz, TMS, CDCl_3) para a substância VT11 (glaucolídeo A) de *V. tweedieana*, ampliado na região entre δ 5,65 e δ 6,25. 144
- Figura 83** – Espectro de ^1H RMN (400 MHz, TMS, CDCl_3) para a substância VT11 (glaucolídeo A) de *V. tweedieana*, ampliado na região entre δ 4,70 e δ 5,00. 144
- Figura 84** – Espectro de ^1H RMN (400 MHz, TMS, CDCl_3) para a substância VT11 (glaucolídeo A) de *V. tweedieana*, ampliado na região entre δ 1,50 e δ 2,15. 145
- Figura 85** – Mapa de correlação HSQC (400 MHz ^1H e 100 MHz ^{13}C , TMS, CDCl_3) para a substância VT11 (glaucolídeo A) de *V. tweedieana*. 145
- Figura 86** – Mapa de correlação HMBC (400 MHz ^1H e 100 MHz ^{13}C , TMS, CDCl_3) para a substância VT11 (glaucolídeo A) de *V. tweedieana*. 146
- Figura 87** – Estrutura molecular da substância VT11 (glaucolídeo A) de *V. tweedieana*. 148
- Figura 88** – Correlações a longa distância entre ^1H – ^{13}C da substância VT11 (glaucolídeo A) de *V. tweedieana*. 148
- Figura 89** – Espectro de massas ESI-Q-TOF da substância VT11 (glaucolídeo A) de *V. tweedieana*. 149
- Figura 90** – Cromatograma da substância VT4 (eriodictiol) de *V. tweedieana* por CLUE-DAD. 150
- Figura 91** – Espectro de UV da substância VT4 (eriodictiol) de *V. tweedieana*... 151

LISTA DE FLUXOGRAMAS

- Fluxograma 1** – Etapas do particionamento do extrato bruto hidroetanólico de partes aéreas (EAF) de *V. tweedieana*. 77
- Fluxograma 2** – Etapas do particionamento do extrato bruto hidroetanólico de caules e raízes (ECR) de *V. tweedieana*. 78
- Fluxograma 3** – Etapas do fracionamento cromatográfico das frações orgânicas do extrato bruto de partes aéreas (EAF) de *V. tweedieana* 81
- Fluxograma 4** – Etapas do fracionamento cromatográfico das frações orgânicas do extrato bruto de caules e raízes (ECR) de *V. tweedieana*. 82
- Fluxograma 5** – Etapas de fracionamento cromatográfico do extrato bruto de lavagem foliar (ELF) de *V. tweedieana*. 83
- Fluxograma 6** – Etapas do fracionamento cromatográfico da fração DM do extrato bruto de partes aéreas (EAF) de *V. tweedieana*. 85
- Fluxograma 7** – Etapas do fracionamento cromatográfico da fração AcOEt do extrato bruto de partes aéreas (EAF) de *V. tweedieana*. 86
- Fluxograma 8** – Etapas do fracionamento cromatográfico da fração DM do extrato bruto de caules e raízes (ECR) de *V. tweedieana*. 87
- Fluxograma 9** – Etapas do fracionamento cromatográfico da fração AcOEt do extrato bruto de caules e raízes (ECR) de *V. tweedieana*. 88
- Fluxograma 10** – Etapas do fracionamento cromatográfico do extrato bruto de lavagem foliar (ELF) de *V. tweedieana*. 89

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** – Classificação dos compostos fenólicos de acordo com o tipo de esqueleto carbônico básico. 45
- Quadro 2** – Doenças tropicais negligenciadas. 55
- Quadro 3** – Valores de tempo de retenção, área do pico e porcentagem de área para a substância VT4 (eriodictiol) de *V. tweediana*. 151

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Dados de ^1H RMN e ^{13}C RMN para a substância VT1 (cafeato de etila) de *V. tweedieana*, e dados comparativos da literatura. 94
- Tabela 2** – Dados de ^1H RMN e ^{13}C RMN para a substância VT2 (naringenina) de *V. tweedieana*, e dados comparativos da literatura. 103
- Tabela 3** – Dados de ^1H RMN e ^{13}C RMN para a substância VT3 (crisoeriol) de *V. tweedieana*, e dados comparativos da literatura. 105
- Tabela 4** – Dados de ^1H RMN e ^{13}C RMN para a substância VT4 (eriodictiol) de *V. tweedieana*, e dados comparativos da literatura. 112
- Tabela 5** – Dados de ^1H RMN e ^{13}C RMN para a substância VT5 (3-hidroxi-1-[4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil]-propan-1-ona) de *V. tweedieana*, e dados comparativos da literatura. 120
- Tabela 6** – Dados de ^1H RMN e ^{13}C RMN para a substância VT6 (evofolina B) de *V. tweedieana*, e dados comparativos da literatura. 121
- Tabela 7** – Dados de ^1H RMN e ^{13}C RMN para a substância VT7 (apigenina) de *V. tweedieana*, e dados comparativos da literatura. 128
- Tabela 8** – Dados de ^1H RMN e ^{13}C RMN para a substância VT8 (ácido cafeico) de *V. tweedieana*, e dados comparativos da literatura. 133
- Tabela 9** – Dados de ^1H RMN e ^{13}C RMN para a substância VT9 (ácido protocatecuico) de *Vernonanthura tweedieana*, e dados comparativos da literatura. 135
- Tabela 10** – Dados de ^1H RMN e ^{13}C RMN para a substância VT10 (luteolina) de *V. tweedieana*, e dados comparativos da literatura. 140
- Tabela 11** – Dados de ^1H RMN e ^{13}C RMN para a substância VT11 (glaucolídeo A) de *V. tweedieana*, e dados comparativos da literatura. 147
- Tabela 12** – Valores de porcentagem de inibição de crescimento para a substância VT4 (eriodictiol) de *V. tweedieana* para as atividades leishmanicida e tripanocida. 152

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, FÓRMULAS E UNIDADES

AcOEt	<i>Acetato de etila</i>
C ₆ D ₆	<i>Benzeno deuterado</i>
CC	<i>Coluna cromatográfica</i>
CC ₅₀	<i>Concentração que inibe 50% do crescimento celular</i>
CCD	<i>Cromatografia em camada delgada</i>
CD ₃ OD	<i>Metanol deuterado</i>
CDCl ₃	<i>Clorofórmio deuterado</i>
CLUE	<i>Cromatografia líquida de ultra eficiência</i>
CLV	<i>Cromatografia líquida a vácuo</i>
<i>d</i>	<i>Dupleto</i>
<i>dd</i>	<i>Dupleto de dupleto</i>
<i>ddd</i>	<i>Duplo-dupleto de dupleto</i>
DM	<i>Diclorometano</i>
DMSO	<i>Dimetilsulfóxido</i>
DMSO-d ₆	<i>Dimetilsulfóxido deuterado</i>
DPPH	<i>2,2-difenil,1-picrilidrazila</i>
EAF	<i>Extrato da combinação de partes aéreas</i>
ECR	<i>Extrato da combinação de caules e raízes</i>
ELF	<i>Extrato de lavagem foliar</i>
EM	<i>Espectrometria de massas</i>
ESI-Q-TOF	<i>Ionização por eletronebulização com analisadores do tipo quadrupolo acoplado a tempo de voo (do inglês, Electrospray ionization-quadrupole-time of flight)</i>
FE	<i>Fase estacionária</i>
FID	<i>Decaimento de indução livre (do inglês, Free induction decay)</i>
FM	<i>Fase móvel</i>
<i>g</i>	<i>Gramas</i>
HEPES	<i>Ácido N-(2-hidroxi-etil)-piperazina-N'-(2-etanosulfônico)</i>
HMBC	<i>Correlação heteronuclear de ligações múltiplas (do inglês, Heteronuclear multiple bond correlation)</i>
HSQC	<i>Correlação heteronuclear de quantum simples (do inglês, Heteronuclear single quantum Correlation)</i>
IC ₅₀	<i>Concentração que inibe 50% dos parasitos</i>
<i>J</i>	<i>Constante de acoplamento (expresso em Hertz, Hz)</i>

K	<i>Kelvin</i>
kg	<i>Quilograma</i>
L	<i>Litro</i>
LS	<i>Lactonas sesquiterpênicas</i>
<i>m</i>	<i>Multiplete</i>
MeOH	<i>Metanol</i>
mg	<i>Miligrama</i>
min	<i>Minuto</i>
mL	<i>Mililitro</i>
mm	<i>Milímetro</i>
mM	<i>Milimolar</i>
MTT	<i>Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio</i>
nm	<i>Nanômetro</i>
PMA	<i>Forbol-12-miristato-13-acetato</i>
<i>q</i>	<i>Quadruplete</i>
Rf	<i>Fator de retenção (do inglês, Retention factor)</i>
RMN	<i>Ressonância magnética nuclear</i>
RMN ¹ H	<i>Ressonância magnética nuclear de hidrogênio</i>
<i>s</i>	<i>Simpleto</i>
<i>sl</i>	<i>Simpleto largo</i>
SBF	<i>Soro bovino fetal</i>
<i>t</i>	<i>Triplete</i>
TMS	<i>Tetrametilsilano</i>
UV	<i>Ultravioleta</i>
v	<i>Volume</i>
δ (delta)	<i>Deslocamento químico (expresso em partes por milhão – ppm, em relação ao padrão interno - TMS)</i>
°C	<i>Grau Celsius</i>
μg	<i>Micrograma</i>
μL	<i>Microlitro</i>
μM	<i>Micromolar</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	31
2 REVISÃO DA LITERATURA	35
2.1 PLANTAS MEDICINAIS	35
2.2 METABOLISMO VEGETAL	37
2.2.1 Metabólitos secundários	37
2.2.1.1 Terpenoides	39
2.2.1.1.1 <i>Lactonas sesquiterpênicas</i>	40
2.2.1.2 Compostos fenólicos	44
2.2.1.2.1 <i>Flavonoides</i>	45
2.3 FAMÍLIA ASTERACEAE	48
2.3.1 Gênero <i>Vernonanthura</i>	49
2.4 ESPÉCIE <i>Vernonanthura tweediana</i>	51
2.5 DOENÇAS TROPICAIS NEGLIGENCIADAS	54
2.5.1 Leishmanioses	56
2.5.2 Tripanossomíase americana	58
3 OBJETIVOS	61
3.1 OBJETIVO GERAL	61
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	61
4 MATERIAIS E MÉTODOS	63
4.1 MATERIAL VEGETAL	63
4.1.1 Investigação fitoquímica de metabólitos secundários	63
4.1.2 Pesquisa de lactonas sesquiterpênicas	63
4.2 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES EXTRATIVAS	64
4.2.1 Extratos hidroetanólicos para investigação fitoquímica	64
4.2.1.1 Obtenção dos extratos brutos	64
4.2.1.2 Particionamento dos extratos bruto	65
4.2.2 Extratos de lavagem foliar para pesquisa de LS	65
4.3 FRACIONAMENTO PRELIMINAR E MONITORAMENTO CROMATOGRÁFICO	65
4.3.1 Fracionamento cromatográfico preliminar	65
4.3.2 Monitoramento por cromatografia em camada delgada	66
4.4 PURIFICAÇÃO E ISOLAMENTO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	66
4.4.1 Investigação fitoquímica do extrato EAF	66
4.4.1.1 Fracionamento da fração DM de partição: substâncias VT1	67
4.4.1.1.1 <i>Coluna CLV de reunião AF7 e AF8: 1ª coluna EAF</i>	67
4.4.1.1.2 <i>Coluna cromatográfica da fração AF7-8F: 2ª coluna EAF</i>	67
4.4.1.1.3 <i>Coluna Sephadex da fração AF7-8FVII: 3ª coluna EAF</i>	67

4.4.1.2 Fracionamento da fração AcOEt de partição: substâncias VT1, VT2, VT3 e VT4	67
4.4.1.2.1 CC de fração AF25: 4ª coluna EAF	68
4.4.1.2.2 Coluna Sephadex de fração AF25F: 5ª coluna EAF	68
4.4.1.2.3 CCD preparativa da fração AF25FIV: CCD preparativa EAF	68
4.4.1.2.4 Coluna Sephadex de fração AF25G: 6ª coluna EAF	68
4.4.1.2.5 Coluna CLV da fração AF26: 7ª coluna EAF	68
4.4.1.2.6 CC de reunião AF26K e AF26L: 8ª coluna EAF	69
4.4.2 Investigação fitoquímica do extrato ECR	69
4.4.2.1 Fracionamento da fração DM de partição: substâncias VT5 e VT6	69
4.4.2.1.1 CC de fração CR10: 1ª coluna ECR	69
4.4.2.1.2 Coluna Sephadex de fração CR10E: 2ª coluna ECR	69
4.4.2.2 Fracionamento da fração AcOEt de partição: substâncias VT4, VT7, VT8, VT9 e VT10	70
4.4.2.2.1 CC de fração CR21: 3ª coluna ECR	70
4.4.2.2.2 CC de fração CR21H: 4ª coluna ECR	70
4.4.2.2.3 CCD preparativa da fração CR21HV: CCD preparativa ECR	70
4.4.2.2.4 Coluna Sephadex de fração CR21K: 5ª coluna ECR	70
4.4.3 Pesquisa de LS do extrato ELF	71
4.4.3.1 Fracionamento de fração LF8 de CLV: substância VT11	71
4.4.3.1.1 CC de fração LF8: 1ª coluna ELF	71
4.5 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL	71
4.5.1 Ressonância magnética nuclear	71
4.5.2 Espectrometria de massas	72
4.6 AVALIAÇÃO ATIVIDADE BIOLÓGICA <i>in vitro</i>	72
4.6.1 Análise de pureza por cromatografia líquida de ultra eficiência	72
4.6.2 Avaliação das atividades leishmanicida e tripanocida	73
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
5.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL E PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS	75
5.1.1 Obtenção do material vegetal e análise microscópica	75
5.1.1.1 Investigação fitoquímica de metabólitos secundários	75
5.1.1.2 Pesquisa de lactonas sesquiterpênicas (LS)	75
5.1.2 Preparação dos extratos brutos	76
5.1.2.1 Extratos hidroetanólicos para investigação fitoquímica	76
5.1.2.1.1 Particionamento dos extratos brutos	76
5.1.2.2 Extrato de lavagem foliar para pesquisa de LS	79
5.2 FRACIONAMENTO PRELIMINAR DOS EXTRATOS BRUTOS	80
5.2.1 CLV das frações orgânicas dos extratos EAF e ECR	80
5.2.2 CLV do extrato ELF	83

5.3 PURIFICAÇÃO E ISOLAMENTO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	84
5.3.1 Investigação fitoquímica dos extratos EAF e ECR	84
5.3.1.1 Fracionamento das frações DM e AcOEt do extrato EAF	84
5.3.1.2 Fracionamento das frações DM e AcOEt do extrato ECR	84
5.3.2 Pesquisa de LS do extrato ELF	89
5.4 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL	89
5.4.1 Substância VT1 (Cafeato de etila)	89
5.4.2 Substâncias VT2 (Naringenina) e VT3 (Crisoeriol)	95
5.4.3 Substância VT4 (Eriodictiol)	106
5.4.4 Substâncias VT5 (3-hidroxi-1-[4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil]-propan-1-ona) e VT6 (Evofolina B)	113
5.4.5 Substância VT7 (Apigenina)	124
5.4.6 Substância VT8 (Ácido cafeico) e VT9 (Ácido protocatecuico)	129
5.4.7 Substância VT10 (Luteolina)	136
5.4.8 Substância VT11 (Glaucolídeo A)	141
5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA <i>in vitro</i>	150
5.5.1 Análise de pureza por cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE)	150
5.5.2 Avaliação das atividades leishmanicida e tripanocida	152
6 CONCLUSÃO	153
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	155
REFERÊNCIAS	159

1 INTRODUÇÃO

O emprego de plantas medicinais com finalidade terapêutica é uma das práticas medicinais mais antigas da humanidade. O uso das plantas e medicamentos fitoterápicos tem sido uma tendência crescente nos últimos anos, sendo recentemente, um destaque no tratamento de doenças crônicas (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005; ALVIM et al., 2006; ALEXANDRE; BAGATINI; SIMÕES, 2008).

A grande diversidade vegetal torna as plantas medicinais brasileiras altamente promissoras. No entanto, o conhecimento relacionado à flora nativa e às propriedades medicinais destas plantas é ainda muito escasso (SIMÕES; SCHENKEL, 2002; HEINZMANN; BARROS, 2007).

Os produtos naturais mostram-se uma ferramenta muito útil na descoberta de novos fármacos, servindo como fonte de padrões moleculares inovadores. Neste contexto, o Brasil pode se tornar um grande centro na pesquisa de plantas medicinais, deixando de ser apenas fornecedor de matéria-prima, mas oferecendo ao mercado farmacêutico substâncias e produtos de valor tecnológico agregado (ALVES et al., 2008; CALIXTO; SIQUEIRA JUNIOR, 2008).

No Brasil, a regulamentação acerca das plantas medicinais e dos fitoterápicos se dá pela Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, aprovada pelo Decreto Presidencial nº 5.813, de 22 de junho de 2006, que visa promover acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e de fitoterápicos, uso sustentável da biodiversidade, e desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional. A partir desta Política, instituiu-se um Grupo de Trabalho Interministerial responsável por elaborar o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, aprovado pela Portaria Interministerial nº 2960 de 9 de dezembro de 2008, o qual também cria o Comitê Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos com a missão de monitorar e avaliar a implantação da Política Nacional (BRASIL, 2009).

Apesar do avanço de pesquisadores e indústria na busca de novos medicamentos, a maioria dos medicamentos fitoterápicos nacionais tem sua fundamentação restrita ao uso popular das plantas, sem a adequada comprovação clínica. Da mesma forma, a maior parte das plantas medicinais disponíveis no mercado não possuem dados que permitam uma precisa avaliação de sua qualidade, eficácia e segurança. Como resultado, os produtos nacionais acabam não sendo competitivos internacionalmente, e nem em nível nacional (YUNES; PEDROSA;

CECHINEL FILHO, 2001; CALIXTO, 2005; CALIXTO; SIQUEIRA JUNIOR, 2008).

O desenvolvimento e obtenção de um medicamento fitoterápico envolvem diversas etapas, que vão desde a seleção da planta, passando pela coleta e identificação desta, pela extração, purificação e elucidação estrutural dos constituintes de interesse, bem como a realização de ensaios para determinação das atividades biológicas e de toxicidade, até as etapas relacionadas à produção, desenvolvimento tecnológico e controle de qualidade do produto, além da realização dos ensaios clínicos para comprovação de qualidade, eficácia e segurança (RATES, 2001).

A investigação fitoquímica objetiva conhecer os constituintes químicos das espécies vegetais, podendo ser direcionada para isolamento e elucidação de uma classe específica de interesse. Devido à complexidade química das preparações vegetais, bem como à diversidade quanto à atividade biológica, são poucas as substâncias derivadas de plantas que apresentam comprovação para uso clínico. Todavia, a purificação das substâncias presentes em uma preparação vegetal é fundamental para a identificação dos compostos responsáveis por seu potencial biológico (BROCHINI; LAGO, 2007; FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2007; SOUSA et al., 2008).

Entre as plantas de interesse pertencente à família Asteraceae (tribo Vernonieae) o gênero *Vernonanthura* apresenta 65 espécies distribuídas pelo México, Índias Ocidentais e Américas Central e do Sul (ROBINSON, 1992; ROBINSON, 1999; MENDONÇA et al., 2009).

Conhecida popularmente como “assa-peixe” e “mata-pasto”, a espécie *Vernonanthura tweedieana* (Baker) H. Rob. tem demonstrado atividades antibacteriana, antifúngica, antinociceptiva e antiedematogênica (PORTILLO et al., 2005; ZANON, 2006; DÍAZ et al., 2008; ZANON et al., 2008; TREVISAN et al., 2012).

São poucos os estudos encontrados na literatura envolvendo a espécie *V. tweedieana*, revelando a importância da pesquisa acerca da composição química e atividade biológica para a espécie (ZANON, 2006).

As informações científicas geradas com a pesquisa envolvendo plantas medicinais de determinada região permitem auxiliar os profissionais da saúde acerca da orientação à população, quanto ao uso racional desses recursos terapêuticos, preconizando sua segurança e a eficácia (LAPA et al., 2007).

Apesar do aumento no número de trabalhos de pesquisa envolvendo produtos naturais, ainda é pequena a proporção de plantas

investigadas quimicamente. A tribo Vernonieae tem sido considerada um dos grupos mais complexos de Asteraceae sob o ponto de vista taxonômico, sofrendo alteração quanto à circunscrição de alguns gêneros com o passar dos anos (MENDONÇA; ESTEVES; GONÇALVES-ESTEVES, 2007). O conhecimento quimiotaxonômico tem permitido a descoberta de novos fármacos de origem natural, podendo ser utilizados sem alteração ou servir como modelo para síntese de novas substâncias. Entre os metabólitos secundários considerados mais apropriados em estudos taxonômicos, destacam-se as lactonas sesquiterpênicas (VON POSER; MENTZ, 2007).

Pertencem ao grupo dos sesquiterpenos (hidrocarbonetos formados por cadeias carbônicas de 15 carbonos), as lactonas sesquiterpênicas representam um conjunto de substâncias muito importante dentro dos produtos naturais, podendo ser obtidas de diversas espécies de plantas. Derivam-se do esqueleto carbônico sesquiterpênico básico, mas com a oxidação de um dos grupos metila da porção isopropila, o que permite a formação do anel lactônico fundido a esta cadeia (MERFORT, 2002; CHATURVEDI, 2011).

As lactonas sesquiterpênicas possuem propriedades antibacterianas, antifúngicas, antiplasmódica, citotóxicas e antitumorais, e representam a mais importante classe de metabólitos secundários da família Asteraceae (NEERMAN, 2003; STRAPASSON, 2010).

A investigação do potencial de bioatividade de substâncias químicas obtidas a partir de plantas com uso popular impulsiona a busca de novos fármacos (DIAS et al., 2006).

A avaliação biológica de plantas e preparações vegetais é etapa essencial na determinação de suas ações farmacológicas. Os bioensaios podem envolver a utilização de sistemas *in vitro* (por exemplo, células cultivadas), *ex vivo* (sistemas de tecidos e órgãos isolados), e sistemas *in vivo* (experimentos pré-clínicos com diferentes tipos de animais e ensaios clínicos). Ao se testar biologicamente plantas medicinais ou potenciais medicamentos torna-se necessário considerar fundamentos científicos, econômicos e éticos, sendo que nos estágios iniciais de pesquisa os testes *in vitro* assumem prioridade sobre os estudos *in vivo* (GURIB-FAKIM, 2006; LACRET et al., 2012).

As doenças negligenciadas tropicais são um grande problema de saúde pública para a maioria dos países em desenvolvimento. Compõem um grupo de 17 doenças crônicas e debilitantes, causadas por infecções virais, fúngicas, parasitárias e bacterianas, acometendo especialmente pessoas de baixa renda (HOTEZ et al., 2007; WHO,

2007; HOTEZ et al., 2008; FEASEY et al., 2010; GYAPONG et al., 2010; WHO, 2015).

Entre estas, as leishmanioses e as tripanossomíases exigem grande atenção devido à sua incidência, distribuição e acometimento da população. Causadas por protozoários, as leishmanioses são um complexo de doenças causadas por protozoários parasitas do gênero *Leishmania*. Já a tripanossomíase americana ou doença de Chagas é causada pelo protozoário parasita flagelado, *Trypanosoma cruzi* (KAYSER; KIDERLEN; CROFT, 2002; HOTEZ et al., 2008; PINTO et al., 2014).

Diferentes preparações vegetais e compostos derivados de produtos naturais tem apresentado atividade leishmanicida e tripanocida *in vitro* (HOET et al., 2004; ROCHA et al., 2005; UCHIYAMA, 2009; GONZÁLEZ-COLOMA et al., 2012; JONES et al., 2013; QURESHI et al., 2014). Ainda assim, torna-se necessário investir na pesquisa e desenvolvimento não somente de novos produtos para o tratamento destas enfermidades, mas garantir que estes produtos novos e atuais sejam apropriados para uso pela população (MRAZEK; MOSSIALOS, 2003).

Desse modo, a descoberta de substâncias quimicamente definidas isoladas de origem natural e que apresentem potentes atividades biológicas, pode representar um avanço na busca de novos agentes antiprotozoários, tendo em vista a urgente necessidade de novos agentes terapêuticos para o tratamento dessas doenças negligenciadas (ROCHA et al., 2005).

Neste contexto, a investigação fitoquímica da espécie *Vernonanthura tweedieana* pode levar ao aprofundamento e enriquecimento do conhecimento de sua composição química, além de um progresso relevante diante da possibilidade futura de obtenção de novos fármacos ou novos protótipos de origem natural.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 PLANTAS MEDICINAIS

Há milhares de anos a natureza tem se mostrado uma fonte para o desenvolvimento de medicina e de medicamentos a partir de origem naturais, e as plantas medicinais e seus derivados têm papel preponderante nesta evolução (BALUNAS; KINGHORN, 2005; CRAGG; GROTHAUS; NEWMAN, 2009).

Os produtos naturais, tanto terrestres quanto marinhos, têm contribuído substancialmente para a descoberta de novos agentes ativos, como por exemplo, os chamados fitomedicamentos ou fitofármacos, constituídos por uma ou pela mistura de substâncias químicas que atuam isoladamente ou em associação à terapia convencional. As plantas contribuem com aproximadamente 25% dos medicamentos prescritos em todo o mundo, com 121 dessas moléculas ativas em uso atual (CORDELL, 2000; GURIB-FAKIM, 2006; HARVEY, 2008; AHMAD, 2009).

A fim de se compreender a contribuição dos produtos naturais para a descoberta de agentes medicinais, torna-se necessário estabelecer as etapas e as fontes de tais agentes. A farmacognosia, ciência que trata da história, produção, comércio, coleta, seleção, identificação, valorização, preservação e uso de drogas ou derivados de origem vegetal e animal, é de fundamental importância neste contexto (CORDELL, 2000; SKALICKA-WOZNIAK; WIDELSKI; GLOWNIAK, 2008).

Diversas áreas do conhecimento estão envolvidas no desenvolvimento de um medicamento a partir de plantas medicinais. Entre as várias etapas envolvidas, o processo se inicia pela seleção, coleta e correta identificação do material vegetal, passando pela extração, isolamento, purificação e elucidação dos componentes ativos de interesse, pela avaliação de suas atividades biológica e toxicidade, além da produção, desenvolvimento tecnológico e controle de qualidade do produto, até ser submetido a amplos programas de triagem clínica e toxicológica para avaliação de sua qualidade, eficácia e segurança antes que de ser registrados como medicamento (CORDELL, 1995; RATES, 2001; BALUNAS; KINGHORN, 2005; SKALICKA-WOZNIAK; WIDELSKI; GLOWNIAK, 2008).

O aprimoramento das técnicas cromatográficas de extração juntamente com os avanços dos métodos espectroscópicos tem contribuído para o progresso da química de produtos naturais. Uma vez

sendo possível estabelecer o farmacóforo da substância, podem-se empregar os conhecimentos relativos à química medicinal por meio de modificações através de semissíntese, no intuito de aumentar a potência, reduzir a toxicidade e/ou aprimorar a solubilidade dos constituintes ativos (CORDELL, 2000; BROSS-WALCH et al., 2005; PHILLIPSON, 2007).

Estima-se que existam entre 300.000 a 600.000 espécies de plantas classificadas e documentadas. Entretanto, estima-se que apenas 15% desse total já tenham sido investigados fitoquimicamente, e somente de 6 a 10% avaliados quanto sua ação farmacológica (SIMÕES; SCHENKEL, 2002; CHINO, 2008; CRAGG; GROTHAUS; NEWMAN, 2009).

O pouco conhecimento das plantas é mais evidente na região dos trópicos, sendo que no Brasil, das cerca de 55.000 espécies de plantas estima-se que apenas 0,4% tenham relatos de estudos. Embora sejam escassos os conhecimentos apropriadamente registrados, devido às ricas e diversas culturas de cura da África e das Américas Central e do Sul, essas regiões mostram-se como uma fonte evidente de novos fármacos à base de plantas para os próximos anos (VAN WYK; WINK, 2004; GURIB-FAKIM, 2006).

Certamente, a natureza continuará a ser uma das principais provedoras de novas fontes para o desenvolvimento de fármacos. Para isso, estratégias e abordagens inovadoras perante os produtos naturais são necessárias para se aproveitar ao máximo sua diversidade química em descobertas futuras. Mesmo com todos os desafios da pesquisa com plantas medicinais, os produtos naturais isolados de plantas se manterão essenciais para a busca de novos medicamentos (CORDELL, 2000; BALUNAS; KINGHORN, 2005; CRAGG; GROTHAUS; NEWMAN, 2009).

Uma abordagem multidisciplinar se mostra necessária no que diz respeito à descoberta e desenvolvimento de medicamentos a partir de fontes de produtos naturais. Neste sentido, a academia pode desempenhar uma importante função nesta área de pesquisa, que somada à necessária interação e colaboração com as indústrias farmacêuticas, pode contribuir para a produção de novos medicamentos e novos protótipos de origem natural com comprovação científica de segurança, qualidade e eficácia (PHILLIPSON, 2001; SIMÕES; SCHENKEL, 2002; NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003; CALIXTO, 2005; NEWMAN; CRAGG, 2012).

2.2 METABOLISMO VEGETAL

O sistema metabólico de uma planta é constituído por um conjunto de reações químicas reguladas por enzimas em diferentes rotas metabólicas. Os produtos químicos formados, ou transformados, dessas reações são denominados metabólitos, os quais são divididos em dois grupos: metabólitos primários e metabólitos secundários (GURIB-FAKIM, 2006; SANTOS, 2007; VON POSER; MENTZ, 2007).

Os metabólitos primários estão associados a processos fundamentais, comuns a todas as plantas. São produzidos como parte das atividades metabólicas normais das plantas, com funções vitais bem definidas, sendo formados por açúcares, aminoácidos, nucleotídeos e lipídeos (VON POSER; MENTZ, 2007; CHINO, 2008).

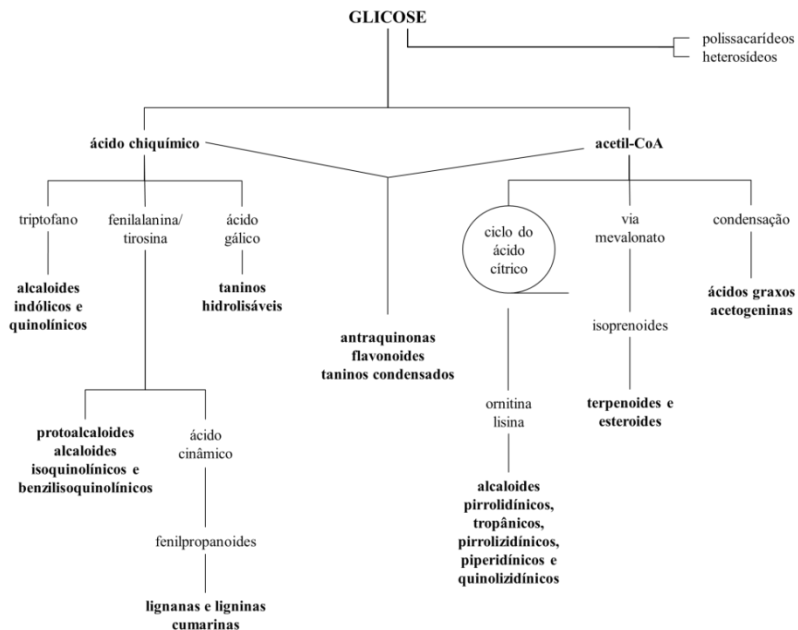
Os metabólitos secundários são extremamente diversificados. Apresentam estrutura complexa, baixo peso molecular, marcantes atividades biológicas, sendo necessários para a sobrevivência e preservação do vegetal. Podendo ser produzidos e acumulados em determinadas famílias, gêneros e/ou espécies, fornecem uma base para a taxonomia e quimiosistemática (GURIB-FAKIM, 2006; VON POSER; MENTZ, 2007; CHINO, 2008).

2.2.1 Metabólitos secundários

A real função destes metabólitos secundários para os vegetais ainda não é totalmente conhecida, embora sejam reconhecidas funções de várias substâncias desses metabólitos na defesa contra herbivoria, predadores e microrganismos, proteção contra luz UV, e atração de polinizadores e animais dispersores de sementes (SANTOS, 2007; VON POSER; MENTZ, 2007; CHINO, 2008; CRAGG; GROTHAUS; NEWMAN, 2009).

A origem dos metabólitos secundários se dá a partir do metabolismo da glicose, por duas vias de intermediários, via do ácido chiquímico e via do acetato, conforme ilustrado resumidamente na Figura 1. O acetato fornece unidades para formação do intermediário ativo, acetil-coenzima A (Acetil-CoA), verdadeiro precursor de várias substâncias (SANTOS, 2007).

Figura 1 – Ciclo biossintético dos metabólitos secundários.



Fonte: adaptado de Santos (2007).

Podendo ser classificados com base em sua estrutura química, composição, solubilidade, ou via pela qual são biossintetizados, os metabólitos secundários são divididos simplifcadamente em três grandes grupos: *terpenoides* (originados de via do mevalonato, composto quase inteiramente de carbono e hidrogênio); *fenólicos* (originados a partir de açúcares simples, contendo anéis benzênicos, hidrogênio e oxigênio); e *compostos nitrogenados* (ou também contendo ácido sulfúrico) (CHINOU, 2008). Dentre exemplos de classes de metabólitos estão esteroides, terpenoides, taninos, saponinas, alcaloides, cumarinas, glicosídeos, ácidos graxos e flavonoides (BENNETT; WALLSGROVE, 1994; MILLS; BONE, 2000; AHMAD, 2009).

Além de apresentar importância alimentar (nutracêutico), agrônômica e para perfumaria, por serem fatores de interação entre organismos, os metabólitos secundários frequentemente possuem atividades biológicas interessantes que despertam o interesse farmacêutico (SANTOS, 2007; CHINOU, 2008).

Devido à ampla diversidade molecular dos metabólitos secundários em todo o reino vegetal, estes se tornam um recurso valioso

para a pesquisa e descoberta de novas moléculas de origem vegetal e para o desenvolvimento de medicamentos inovadores (GURIB-FAKIM, 2006).

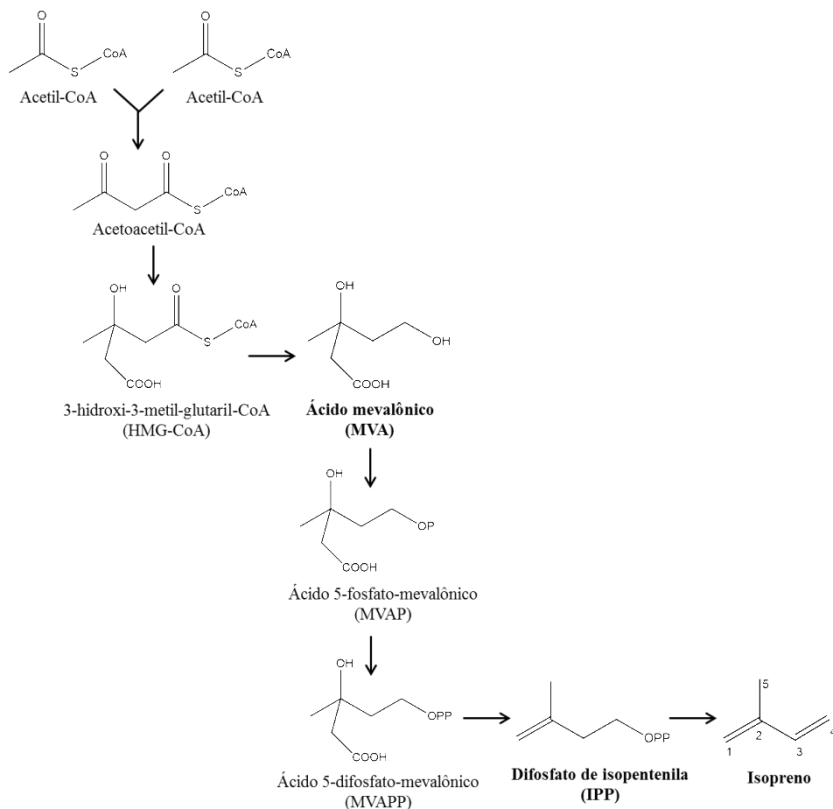
2.2.1.1 Terpenoides

Os terpenoides ou terpenos, com ocorrência na maioria das espécies, correspondem a um dos grupos mais importantes de compostos ativos em plantas, com mais de 20.000 estruturas conhecidas. Sua formação se dá a partir de unidades carbônicas de cinco membros, contendo duas insaturações, os isoprenos. As unidades isoprênicas são obtidas do difosfato de isopentenila (IPP), o qual é sintetizado a partir do acetato pela via do mevalonato (PENGELLY, 2004; SIMÕES; SPITZER, 2007; HEINRICH et al., 2012), como ilustrado resumidamente na Figura 2.

Os terpenos são formados por uma série de reações baseadas na condensação de um número variável de unidades isoprênicas, ligados conforme a regra “cabeça-cauda” (ligação entre o C-4 de um isopreno ao C-1 de outro). O número de unidades incorporadas ao esqueleto carbonado serve de base para a classificação dos diferentes terpenoides (PENGELLY, 2004; SIMÕES; SPITZER, 2007; AHMAD, 2009; HEINRICH et al., 2012).

Os *hemiterpenos*, derivados da modificação do IPP, têm a fórmula C_5H_8 . São os terpenoides mais simples, tendo como exemplo os isômeros dos ácidos tíglico e angélico. Já os *monoterpenos* são formados por duas unidades isoprênicas, apresentando 10 carbonos (exemplo $C_{10}H_{16}$). São os principais constituintes de óleos essenciais (cerca de 90%), justificando sua importância econômica como aromas e perfumes. Os *sesquiterpenos* (15 carbonos) são formados por três isoprenos e são caracterizados pelo “princípio amargo”. Podem existir na forma alifática, bi e tricíclica, sendo destaque a formação de anéis lactônicos fundidos ao esqueleto carbônico (lactonas sesquiterpênicas). *Diterpenos* são formados por quatro unidades de isoprenos, com 20 carbonos, compõem as resinas ácidas. Os *triterpenos* (30 carbonos), constituídos por seis unidades de isopreno, caracterizam as saponinas e esteroides. Os *tetraterpenos* ou carotenoides, formados por oito unidades de isopreno, contendo 40 carbonos. Além destes, os *politerpenos* são aqueles formados por mais de oito unidades isoprênicas, $(C_5H_8)_n$ (PENGELLY, 2004; AHMAD, 2009; HEINRICH et al., 2012).

Figura 2 – Via do acetato/mevalonato para síntese de difosfato de isopentenila (IPP).



Fonte: adaptado de Croteau et al. (2000) e Santos (2007).

Entre suas funções, os terpenos podem participar da regulação de crescimento vegetal, como agentes protetores e de defesa contra fitopatógenos, e influenciar as interações entre plantas e animais (polinização, feromônios) (KOCH; BASAR; RICHTER, 2008).

2.2.1.1.1 Lactonas sesquiterpênicas

Os sesquiterpenos são a maior classe de compostos terpenoides, e assim como os monoterpênicos, são constituintes dos óleos essenciais (PENGENLY, 2004; ZIDORN, 2008; HEINRICH et al., 2012).

Pertencentes aos sesquiterpenos, as lactonas sesquiterpênicas (LS) constituem uma grande e diversificada classe de compostos de ampla ocorrência na natureza. Cerca de 90% desses metabólitos secundários foram obtidos da família Asteraceae, sendo componentes característicos para a família (NEERMAN, 2003; ZIDORN, 2008; STRAPASSON, 2010).

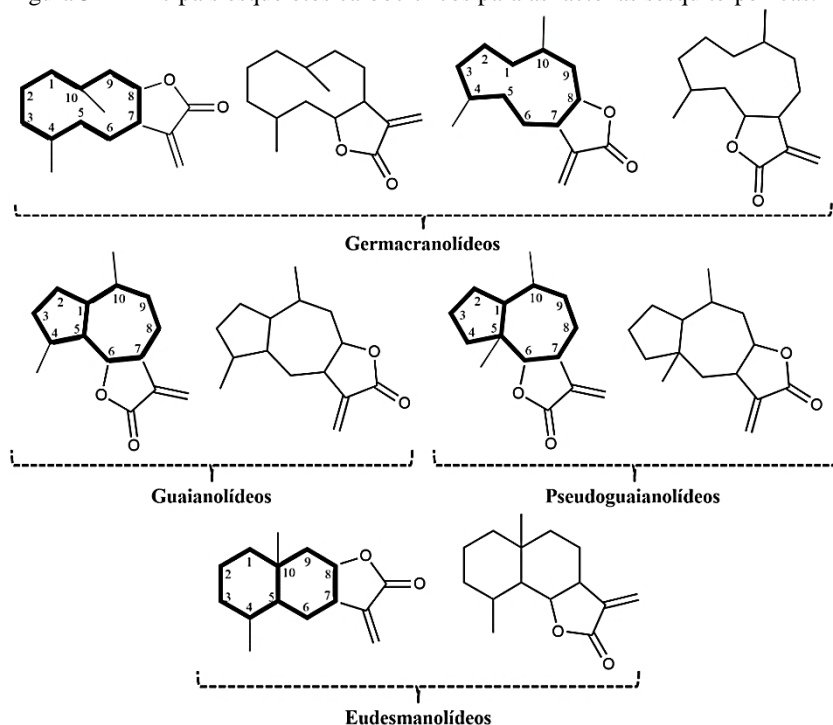
As LS são geralmente substâncias incolores, amargas, relativamente estáveis e de caráter lipofílico. São sintetizadas a partir do *trans,trans*-farnesilpirofosfato (formado pela condensação de três moléculas de IPP), que passa por uma ciclização inicial para obtenção do cátion germacrano. Por meio de subseqüentes modificações oxidativas, este cátion serve de precursor para formação dos diferentes esqueletos das LS. A oxidação da cadeia lateral isopropila do esqueleto sesquiterpênico, seguida da adição de oxigênio em C-6 ou C-8 possibilita o fechamento do anel lactônico (RODRIGUEZ; TOWERS; MITCHELL, 1976; EMERENCIANO, 1983; SCHMIDT, 2006).

A classificação da LS é realizada com base no esqueleto carbocíclico, podendo ser divididas em quatro grupos principais: germacranolídeos (com um anel de 10 membros), eudesmanolídeos (com dois anéis de seis membros fundidos), guaianolídeos (com anéis de cinco e sete membros fundidos, e uma metila em C-4) e pseudoguaianolídeos (com anéis de cinco e sete membros fundidos, e uma metila em C-5) (SEAMAN, 1982; PICMAN, 1986; NEERMAN, 2003; PENGELLY, 2004; STRAPASSON, 2010). A Figura 3 ilustra os principais esqueletos das LS.

No entanto, LS podem apresentar uma variedade de esqueléticos carbocíclicos. Modificações moleculares dos esqueletos principais podem envolver principalmente a incorporação de grupos funcionais como hidroxilas, anéis epóxidos e ésteres (RODRIGUEZ; TOWERS; MITCHELL, 1976; PICMAN, 1986; CHATURVEDI, 2011).

Acredita-se que existam mais de 4.000 estruturas de LS e cerca de 30 tipos diferentes de esqueletos carbocíclicos, já relatados para as várias tribos de Asteraceae (DA COSTA; TERFLOTH; GASTEIGER, 2005; SCHMIDT, 2006; CHATURVEDI, 2011).

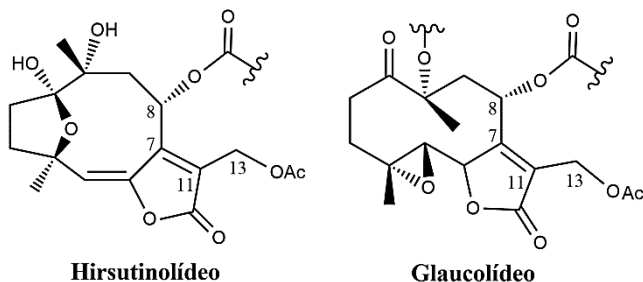
Figura 3 – Principais esqueletos carbocíclicos para as lactonas sesquiterpênicas.



Fonte: adaptado de Picman (1986), Neerman (2003) e Chaturvedi (2011).

Os hirsutinolídeos e glaucolídeos são esqueletos germacranolídeos altamente oxigenados. Suas moléculas possuem insaturação endocíclica entre C-7 e C-11, um grupamento acetoxi em C-13 e uma cadeia de éster em C-8 (Figura 4). Ambos os esqueletos parecem ser restritos à subtribo Vernoniinae, da tribo Vernonieae (Asteraceae) (SEAMAN, 1982; DA COSTA; TERFLOTH; GASTEIGER, 2005; BUSKÜHL, 2007; BORKOSKY et al., 2009).

Figura 4 – Esqueletos carbocíclicos de hirsutinolídeo e glaucolídeo.



Fonte: adaptado de Da Costa et al. (2005).

Uma importante característica comum às LS é a presença de um anel γ -lactônico (anel de cinco membros), podendo ser ciclizado em direção a C-6 ou C-8. Outra característica frequente é a presença de α,β -insaturações, sendo observada ao menos uma vez em cerca de 80% das LS. Nas γ -lactonas a ligação dupla conjugada pode ser endocíclica, gerando o α -ciclopenteno; ou exocíclica, gerando a α -metileno- γ -lactona (PICMAN, 1986; ZHANG et al., 2005; SCHMIDT, 2006).

No que diz respeito ao potencial biológico, além da vantagem como digestivos amargos, as LS possuem propriedades antibacterianas, antimalárica, antiviral, antifúngicas, antiprotozoária, antiplasmódica, anti-inflamatórias, moluscicida, leishmanicida, gastroprotetora, analgésica, genotóxica, citotóxicas, alergênica e antitumoral (PICMAN, 1986; GIORDANO et al., 1990; NEERMAN, 2003; PENGELLY, 2004; GURIB-FAKIM, 2006; GAUTAM; JACHAK, 2009; STRAPASSON, 2010; ODONNE et al., 2011).

Acredita-se que a bioatividade das LS seja mediada pela alquilação de nucleófilos por meio das α,β - ou α,β,γ -insaturações, como as observadas nas α -metileno- γ -lactonas ou ciclopentenonas α,β -insaturadas. A presença desses grupos funcionais como aceptores eletrofílicos é de grande importância para a atividade das LS, atividade esta que pode ser influenciada também por outros elementos estruturais, como grupos epóxi, aldeídos, peróxidos e radicais ésteres, como metacrilato e tiglato (SCHMIDT, 2006; VIEIRA; FERNANDES; ANDREI, 2007; CHATURVEDI, 2011).

As LS nas Asteraceae ocorrem frequentemente em tricomas glandulares nas folhas, flores ou de sementes, e a porcentagem desses metabólitos pode variar quantitativamente entre as espécies de 0,001% a 8% de peso seco (RODRIGUEZ; TOWERS; MITCHELL, 1976;

SEAMAN, 1982; KOCH; BASAR; RICHTER, 2008; CHATURVEDI, 2011).

O conteúdo dos tricomas glandulares geralmente é formado por terpenos e óleos essenciais, dificilmente armazenados em grandes quantidades no interior da célula. A ocorrência de tricomas, com a presença de marcadores químicos como as LS, mostra-se como caráter interessante no diagnóstico taxonômico para a família Asteraceae (WAGNER, 1991; ASCENSÃO, 2007).

2.2.1.2 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos compreendem uma das maiores classes de metabólitos secundários amplamente distribuídos nas plantas. Apresentam uma grande variedade estrutural e são de considerável importância fisiológica e morfológica para as plantas (BENNETT; WALLSGROVE, 1994; BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006; GURIB-FAKIM, 2006).

Os fenólicos possuem um anel benzênico com no mínimo um dos hidrogênios substituído por um grupamento hidroxila, podendo também ter outros substituintes como, por exemplo, grupos metila (PENNELLY, 2004; CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2007).

Os compostos fenólicos podem ser originados por duas rotas metabólicas, a via do ácido chiquímico e a via do acetato/palmitato. A rota biossintética determina o padrão de substituição dos compostos, sendo para primeira via observadas hidroxilas em posição *orto* (formado a partir do ácido cinâmico); e para a segunda, observada hidroxilas dispostas em *meta* (BENNETT; WALLSGROVE, 1994; CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2007).

Devido à ampla diversidade estrutural, os compostos fenólicos podem apresentar desde estruturas simples, contendo anel aromático monocíclico com um grupo álcool, aldeído ou ácido carboxílico, como de ácidos fenólicos, até compostos complexos, como os flavonoides, taninos, lignanas (PENNELLY, 2004; GURIB-FAKIM, 2006).

A classificação dos fenólicos é realizada de acordo com o esqueleto principal dos compostos, baseando-se no número de carbonos da cadeia substituinte, além dos carbonos aromáticos (PENNELLY, 2004; BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006; GURIB-FAKIM, 2006; CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2007). O Quadro 1 apresenta as principais classes de compostos fenólicos.

Podem ainda ser divididos conforme sua ocorrência, entre *fenólicos amplamente distribuídos*, que englobam ácidos fenólicos,

cumarinas, flavonoides, taninos e lignanas; e *fenólicos de distribuição restrita*, abrangendo as demais classes (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2007).

Os compostos fenólicos são distribuídos entre todas as classes de plantas. Contribuem para o sabor, odor e coloração de vários vegetais, sendo utilizados como flavorizantes e corantes de bebidas e alimentos. Possuem, também, propriedades bactericida, antisséptica, anti-inflamatória, antioxidante e anti-helmíntica (PENGELLY, 2004; PAUL; GOHIL; BHUTANI, 2006; CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2007; ZHANG et al., 2009; BELLIK et al., 2012; ZHANG et al., 2015).

Quadro 1 – Classificação dos compostos fenólicos de acordo com o tipo de esqueleto carbônico básico.

Tipo de esqueleto básico	Classes
C ₆	Fenóis simples e benzoquinonas
C ₆ -C ₁	Ácidos fenólicos
C ₆ -C ₂	Acetofenonas e ácidos fenilacéticos
C ₆ -C ₃	Fenilpropanoides (ácidos cinâmicos e análogos, fenilpropenos, cumarinas, isocumarinas e cromona)
C ₆ -C ₄	Naftoquinonas
C ₆ -C ₁ -C ₆	Xantonas
C ₆ -C ₂ -C ₆	Estilbenos e antraquinonas
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoides e isoflavonoides
(C ₆ -C ₃) ₂	Lignanas
(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂	Diflavonoides
(C ₆) _n	Melaninas vegetais
(C ₆ -C ₃) _n	Ligninas
(C ₆ -C ₁) _n	Taninos hidrolisáveis
(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Taninos condensados

Fonte: adaptado de Balasundram et al. (2006) e Carvalho et al. (2007).

2.2.1.2.1 Flavonoides

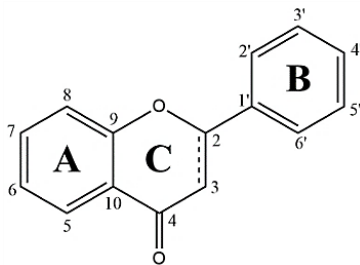
Os flavonoides representam um dos compostos fenólicos mais importantes e diversificados entre os compostos de origem natural, sendo conhecidas mais de 4.000 substâncias diferentes. São

principalmente hidrossolúveis e estão presentes nas plantas ligados a um açúcar como heterosídeo ou na forma aglicônica (livre) (HARBORNE, 1998; PENGELLY, 2004; ZUANAZZI; MONTANHA, 2007).

Os flavonoides são produtos de reações da via do acetato (acetil-CoA) e via do ácido chiquímico. São sintetizados a partir das chalconas, cuja formação se dá pela condensação de três unidades precursoras de malonil-CoA e uma de 4-coumaroil-CoA (éster CoA ácido hidroxicinâmico). O malonil-CoA é sintetizado do intermediário acetil-CoA e dióxido de carbono, enquanto o 4-coumaroil-CoA deriva-se da via do ácido chiquímico, envolvendo aminoácidos aromáticos, como a fenilalanina e tirosina (PENGELLY, 2004; ZUANAZZI; MONTANHA, 2007; AHMAD, 2009).

A estrutura química dos flavonoides baseia-se em um esqueleto de 15 átomos de carbono, sendo dois anéis benzênicos (anéis A e B) ligados por uma cadeia de três carbonos. Em geral, essa cadeia carbônica se fecha formando um anel heterocíclico (anel C). Esta estrutura tricíclica, conforme ilustrado na Figura 5, compreende o núcleo fundamental dos flavonoides (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006; DAVIES; YÁÑEZ, 2012).

Figura 5 – Núcleo fundamental dos flavonoides e sua numeração.

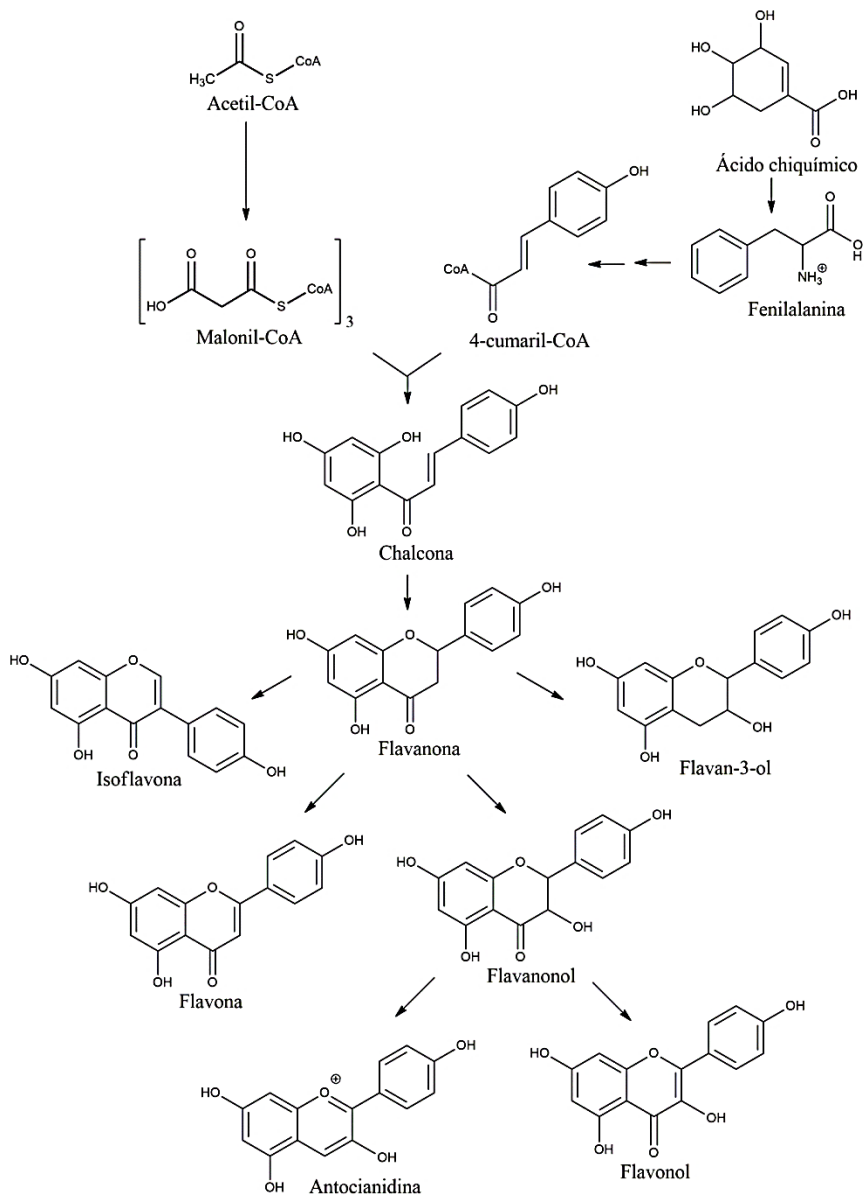


Fonte: adaptado de Zuanazzi e Montanha (2007) e Davies e Yáñez (2012).

Dependendo do nível de oxidação do anel C e das variações no esqueleto carbônico básico, promovidas por reações de hidroxilação, metilação, glicosilação, acilação, prenilação, e sulfonação, permite a formação das diferentes subclasses de flavonoides, tais como flavanonas, flavanonóis, flavonas, flavonóis, isoflavonas, flavan-3-ols e antocianidinas (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009; DAVIES; YÁÑEZ, 2012).

A Figura 6 apresenta um esquema simplificado da rota biossintética para a formação das diferentes subclasses de flavonoides.

Figura 6 – Rota biossintética simplificada de formação dos flavonoides.



Fonte: adaptado de Zuanazzi e Montanha (2007), Ahmad (2009) e Khan et al. (2014).

As funções dos flavonoides nos vegetais incluem a proteção contra danos pela radiação UV, proteção contra insetos e microrganismos, como atraentes de agentes polinizadores, antioxidantes, inibidores de enzimas e controle hormonal, pigmentos e agentes alelopáticos. Estudos demonstram que flavonoides também possuem propriedades antiviral, anti-inflamatória, antitumoral, antimutagênica, antiproliferativa, vasorrelaxante e vasoprotetora, antifúngica e antibacteriana (COOK; SAMMAN, 1996; MIDDLETON; KANDASWAMI; THEOHARIDES, 2000; PENGELLY, 2004; CUSHNIE; LAMB, 2005; ZUANAZZI; MONTANHA, 2007; COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009; DAVIES; YÁÑEZ, 2012; KHAN; HUMA; DANGLES, 2014; LAGO et al., 2014).

2.3 FAMÍLIA ASTERACEAE

A família Asteraceae, anteriormente também conhecida por Compositae, corresponde a uma das mais importantes fontes de espécies vegetais com valor medicinal, devido ao grande número de plantas usadas popularmente, muitas das quais amplamente estudadas química e farmacologicamente (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002; GURIB-FAKIM, 2006).

A Asteraceae é a maior família das angiospermas e compreende 12 subfamílias, 43 tribos, cerca de 1.500 gêneros e aproximadamente 25.000 espécies, distribuídas na maioria dos ecossistemas do planeta, com exceção da Antártida, sendo particularmente bem representada na região das Américas. No Brasil, a família compreende 28 tribos, 278 gêneros e cerca de 2.000 espécies, especialmente encontradas no cerrado, em campos rupestres, campos de altitude e restinga (GURIB-FAKIM, 2006; MENDONÇA; ESTEVES; GONÇALVES-ESTEVES, 2007; AHMAD, 2009; HEINRICH et al., 2012; NAKAJIMA et al., 2015a; OGASAWARA; ROQUE, 2015).

A família Asteraceae ainda não possui uma classificação universalmente aceita. A maior parte dos membros da família é anual ou perene, com hábitos variando desde ervas, arbustos, trepadeiras, e ocasionalmente árvores, sendo a grande maioria dos gêneros constituída de plantas de pequeno porte. Do ponto de vista morfológico, a característica mais importante é em relação às inflorescências, sendo que todos os membros da família apresentam inflorescência composta em capítulos (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002; AHMAD, 2009; HEINRICH et al., 2012).

Outro aspecto em que a família é bastante diversificada diz respeito à sua composição química, sendo mais de 5.000 espécies da família já estudadas quimicamente, com cerca de 7.000 compostos já isolados. Em termos fitoquímicos as asteráceas são caracterizadas pela presença de lactonas sesquiterpênicas em alguns segmentos da família, estes que são produtos naturais importantes e, quando presentes, responsáveis em grande parte por sua atividade farmacológica. Também apresentam tipicamente polifrutanos, compostos poliacetilênicos, óleos essenciais, em alguns casos, alcaloides e diterpenoides (ALVARENGA et al., 2001; GURIB-FAKIM, 2006; HEINRICH et al., 2012).

A tribo Vernoniae pertencente à família Asteraceae é considerada taxonomicamente um dos grupos mais complexos da família. Subdividida em 21 subtribos, com aproximadamente 100 gêneros e cerca de 1.500 espécies, a tribo é amplamente distribuída pelo Paraguai, Uruguai, Bolívia, Argentina e Brasil, basicamente concentrando-se no sudeste brasileiro. No Brasil, apresenta 15 subtribos, cerca de 50 gêneros e aproximadamente 450 espécies (KEELEY; FORSMAN; CHAN, 2007; SALLES-DE-MELO et al., 2010; MARINHO, 2014; NAKAJIMA et al., 2015b).

A tribo compreende membros anuais ou perenes, cujos hábitos são variados, desde ervas, arbustos, lianas (trepadeiras) e, raramente, árvores de grande porte. Em termos fitoquímicos, já foram obtidos mais de 800 compostos diferentes para tribo, sendo destaque para as lactonas sesquiterpênicas e triterpenos, além de terpenoides, flavonoides, cumarinas, poliacetilenos e fenilpropanoides (ALVARENGA et al., 2001; MENDONÇA; ESTEVES; GONÇALVES-ESTEVES, 2007; OGASAWARA; ROQUE, 2015).

2.3.1 Gênero *Vernonanthura*

O gênero *Vernonanthura* pertence à tribo Vernoniae (Asteraceae) e compreende cerca de 70 espécies, distribuídas nas regiões do México, Índias Ocidentais e América Central e do Sul. No Brasil, existem aproximadamente 40 espécies, predominantemente encontradas nas regiões Sul e Sudeste. O gênero *Vernonanthura* H. Rob. foi criado para designar um grupo de espécies antes pertencentes ao gênero *Vernonia* Schreb, muito embora a nomenclatura para esse novo gênero ainda não seja totalmente consolidada na literatura, sendo empregado em muitos trabalhos o basônimo (*Vernonia*) das espécies estudadas (ROBINSON, 1992; ROBINSON, 1999; MENDONÇA et al., 2009;

VEGA; DEMATTEIS, 2010; VEGA; DEMATTEIS, 2011; REDONDA-MARTÍNEZ; VILLASEÑOR; TERRAZAS, 2012).

O gênero é caracterizado pelo hábito lenhoso e ereto, por vezes com xilopódio e inflorescência tirsoide ou paniculiforme e com grãos de pólen do tipo A (REDONDA-MARTÍNEZ; VILLASEÑOR; TERRAZAS, 2012; MOREIRA, 2013).

As espécies de *Vernonanthura* representam as chamadas "assapeixes", que no Brasil são utilizadas popularmente na preparação de xaropes para o tratamento de gripes e resfriados. Correspondem a arbustos, subarbustos ou árvores de pequeno porte, que frequentemente são encontrados nas vegetações próximas às cidades, facilitando sua coleta (LEITÃO et al., 2014).

Diferentes classes de compostos já foram identificadas para o gênero, como ácidos graxos, flavonoides, terpenoides, ácidos fenólicos, esteroides, e principalmente lactonas sesquiterpênicas (BORKOSKY et al., 1995; BAZON et al., 1997; BORKOSKY et al., 1997; KOTOWICZ et al., 1998; POLLORA et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2012; IGUAL et al., 2013; MANZANO et al., 2013; SANTANA et al., 2013; MANZANO et al., 2014; MARTUCCI et al., 2014).

Das atividades descritas para preparações e/ou substâncias obtidas do gênero estão, por exemplo, as atividades antifúngica (PORTILLO et al., 2005; SANTANA et al., 2012; MANZANO et al., 2013), antiprotozoária (SANTANA et al., 2014), antibacteriana (ROCHA-GRACIA et al., 2013), “antifeedant” (DEL CORRAL et al., 2014) e antiulcerogênica (BARBASTEFANO, 2007; OLIVEIRA et al., 2011).

São encontrados muitos outros estudos envolvendo espécies de *Vernonanthura*, mas sendo frequentemente empregados seus basônimos (*Vernonia*), tanto para estudos fitoquímicos de caracterização, desde alcaloides, flavonoides, terpenoides, esteroides, poliacetilenos, ácidos fenólicos a lactonas sesquiterpênicas (MABRY et al., 1975a; BOHLMANN et al., 1983; ABEGAZ et al., 1994; CARVALHO; COSTA; SANTOS ABREU, 1999; PÉREZ-AMADOR et al., 2008; MAIA et al., 2010; TOYANG; VERPOORTE, 2013); quanto para estudos biológicos, sendo demonstradas as atividades anti-inflamatória, antibacteriana, analgésica, reguladora de pressão arterial, antiproliferativa, antifúngica, leishmanicida, antiulcerogênica e antinociceptiva (VALVERDE et al., 2001; SILVEIRA; FOGLIO; GONTIJO, 2003; BARBASTEFANO et al., 2007; BRAGA et al., 2007; RISSO; SCARMINIO; MOREIRA, 2010; SANTOS JÚNIOR et al., 2010).

2.4 ESPÉCIE *Vernonanthura tweedieana*

A espécie *Vernonanthura tweedieana* (Baker) H. Rob. (Figura 7) era anteriormente referida por seu basônimo e sinonímia botânica, *Vernonia tweedieana* Baker (BAKER, 1873; ROBINSON, 1992; FLANN, 2015; IPNI, 2015; THEPLANTLIST.ORG, 2015; TROPICOS.ORG, 2015), passando a integrar o gênero *Vernonanthura* após reclassificação realizada por Robinson (1992).

Figura 7 – Ilustração de espécimes de *Vernonanthura tweedieana* (Baker) H. Rob.



Fonte: Fotos do autor

Popularmente conhecida como “assapeixe”, “língua-de-vaca”, “chamarrita”, “erva-de-mula”, “orelha-de-mula”, “mata-pasto”, “erva-de-laguna” e “laguneira”, a espécie tem ocorrência no Brasil, Argentina e Paraguai. No Brasil, é encontrada principalmente na região sul, mas ocorre também nos estados de São Paulo, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais. No estado de Santa Catarina é predominante na região do meio oeste e vale do Itajaí, e constitui uma das principais plantas invasoras de

pastagens, principalmente de solos úmidos, sendo encontrada em quase toda vegetação secundária catarinense (CABRERA; KLEIN, 1980; ROBINSON, 1999; SOARES, 2012; GARCIA et al., 2013; GASPER et al., 2013).

A espécie *V. tweedieana* compreende subarbustos eretos com aproximadamente 2 m de altura, caule ramificado, ramos achatados densamente griseo-pubescentes, sulcados. Com folhas alternadas, levemente pecioladas (com pecíolo de 0,7 a 1,3 cm de contorno plano-convexo), membranáceas, lanceoladas, agudas no ápice e atenuadas na base, com bordos serrados, medindo de 5 a 12 cm de comprimento e de 1,3 a 2,5 cm de largura, com face adaxial estrigosa-setosa e face abaxial estrigosa a setosa, com tricomas em forma de “T”, tendo a epiderme revestida por cutícula levemente ornamentada, que apresenta estrias mais evidentes nas proximidades dos estômatos anomocíticos, localizados em ambas as faces epidérmicas. Apresenta nervura central mais pronunciada na face abaxial. Possui capítulos numerosos, pedicelados, em número de 2 a 3, formando cincínios curtos agrupando-se em uma densa panícula corimbiforme. Os aquênios pubescentes de 2 mm de comprimento, com papus alvo, persistente, externo plano, interno cilíndrico 6 a 7 mm, e flores brancas ou roxas (de 14 a 25), de corola lilás, com tubo de 7 a 9 mm, anteras de 3 a 4 mm e estilete de 7 a 10 mm, sendo florescente no verão entre os meses de fevereiro e abril, predominantemente em março (CABRERA; KLEIN, 1980; SOARES, 2012; DUARTE; CHELLA, 2014).

Empregada na medicina popular para o tratamento de doenças respiratórias, a espécie *V. tweedieana* mostra-se como alternativa terapêutica para gripes, bronquites e tosses (ZANON, 2006; ZANON et al., 2008).

Diferentes são as atividades biológicas demonstradas para a espécie. Ensaio realizados com soluções extrativas de *V. tweediana* em hexano, clorofórmio, acetato de etila e em metanol demonstraram atividade bacteriana contra *Proteus vulgaris*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii* e *Bacillus cereus* (DÍAZ et al., 2008).

Petri e colaboradores (2008) demonstraram atividade imunomoduladora em camundongos para o extrato hidroetanólico de *V. tweedieana*. Foi comprovada também, a atividade antioxidante para extrato bruto hidroetanólico, e para as frações diclorometânica, acetato de etila e butanólica de *V. tweedieana*, em modelo de DPPH (ZANON, 2006).

Trevisan e colaboradores (2012) confirmaram atividade antinociceptiva e antiedematogênica do esteroide α -espinasterol obtido de *V. tweediana*. O sesquiterpeno 6-cinamoil-1-hidroxiudesm-4-en-3-ona, purificado a partir de raízes da espécie apresentou atividade antifúngica contra *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Microsporium gypseum*, *Saccharomyces cerevisiae* e principalmente *Trichophyton mentagrophytes* (PORTILLO et al., 2005).

Identificou-se atividade tóxica de solução extrativa hexânica de raiz e clorofórmica de partes aéreas de *V. tweediana* contra *Artemia salina*, cujos valores de DL₅₀ foram 9,32 ppm e 1 ppm, respectivamente (BARDÓN et al., 2007; DÍAZ et al., 2008).

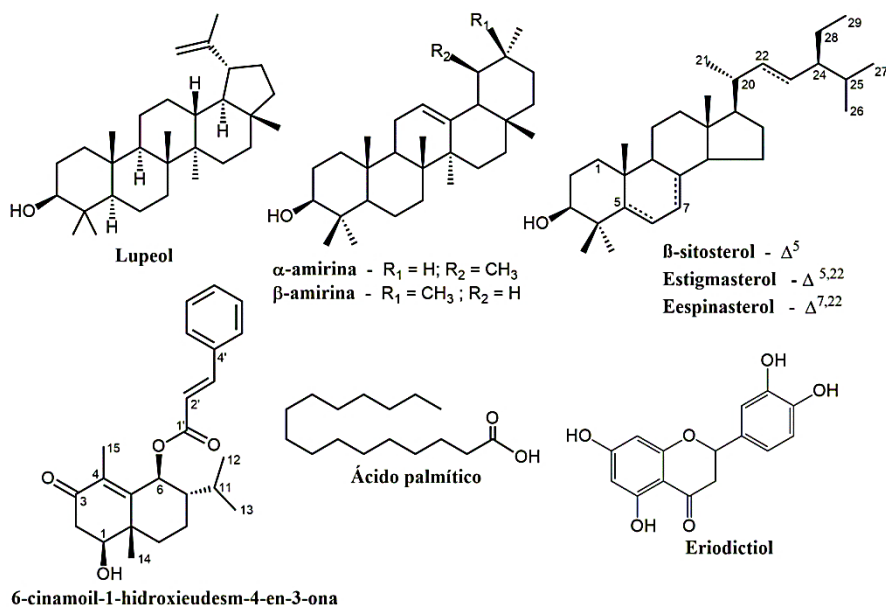
Da mesma forma, Olguin e colaboradores (2005) confirmaram leve atividade tóxica do extrato hexânico de raiz de *V. tweediana* contra *A. salina* (DL₅₀ = 922 ppm), além de demonstrar a atividade alelopática dos extratos hexânico e acetato de etila frente ao crescimento de radículas de *Lactuca sativa* (alface).

Em contrapartida, Zanon (2006) demonstrou não haver toxicidade aguda em camundongos para o extrato bruto hidroetanólico, e para as frações diclorometânica, acetato de etila e butanólica de *V. tweediana*.

Segundo Montanha e colaboradores (2004) os extratos, aquoso e hidroetanólico de *V. tweediana*, testados contra cepas virais HSV-1, não apresentaram atividade antiviral (CC₅₀ = 1,0 e 0,5 mg/ml, respectivamente). Da mesma forma, os óleos essenciais das flores e folhas de *V. tweediana* não apresentaram atividade antimicrobiana frente a *Enterococcus faecalis* e *S. aureus* (LOQUETE et al., 2008).

Entre os constituintes químicos já caracterizados para a espécie *V. tweediana* estão triterpenos, como α - e β -amirina e lupeol, esteroides como β -sitosterol, estigmasterol e espinasterol, a flavanona eriodictiol, o sesquiterpeno 6-cinamoil-1-hidroxiudesm-4-en-3-ona, e o ácido palmítico, ilustrados na Figura 8 (PORTILLO et al., 2005; ZANON, 2006; DÍAZ et al., 2008; ZANON et al., 2008; ROSSATO et al., 2011; TREVISAN et al., 2012).

Figura 8 – Constituintes químicos caracterizados de *Vernonanthura tweedieana* (Baker) H. Rob.



Fonte: Adaptado de Portillo et al. (2005), Zanon (2006), Díaz et al. (2008), Zanon et al. (2008), Rossato et al. (2011) e Trevisan et al. (2012).

2.5 DOENÇAS TROPICAIS NEGLIGENCIADAS

As doenças tropicais negligenciadas são um grupo diversificado de doenças com efeitos crônico, debilitante, incapacitante e desfigurante. Promovem infecções virais, fúngicas, bacterianas e parasitárias, estando entre as principais causas de doença que acometem populações de baixa renda (HOTEZ et al., 2008; GYAPONG et al., 2010; WHO, 2015).

As doenças tropicais negligenciadas compreendem um grupo de 17 doenças endêmicas em 149 países, afetando cerca de 1,4 bilhões de pessoas. Essas doenças podem ser divididas conforme seus patógenos em quatro grupos: protozoários, bactérias, helmintos e vírus (HOTEZ et al., 2008; FEASEY et al., 2010; WHO, 2015). A Quadro 2 apresenta as diferentes enfermidades que compõem as doenças tropicais negligenciadas.

Quadro 2 – Doenças tropicais negligenciadas.

Tipo de patógeno	Doenças
Protozoários	Doença de Chagas Tripanossomíase Humana Africana (“doença do sono”) Leishmanioses
Bactérias	Úlcera de Buruli Lepra (Hanseníase) Tracoma (Conjuntivite granulomatosa) Bouba
Helmintos	Cisticercose/Teníase Dracunculíase (doença do “verme-da-guiné”) Equinococose Trematodíases transmitidas por alimentos Filariose linfática (Elefantíase) Oncocercose (“cegueira dos rios”) Esquistossomose Helmintíases transmitidas pelo solo
Vírus	Dengue e Chicungunha Raiva

Fonte: adaptado de WHO (2015).

Predominantes na região dos trópicos, essas doenças são um grande problema de saúde pública para a maioria dos países em desenvolvimento. Sendo associadas a altos níveis de morbidade e/ou mortalidade, uma vez que vacinas e tratamentos medicamentosos adequados não estão disponíveis, acometem quase exclusivamente as populações marginalizadas e de baixa renda. Embora a pobreza seja quesito preponderante, outros fatores podem estar relacionados à epidemiologia dessas doenças, como etnia, idade, gênero e fatores ecológicos (MRAZEK; MOSSIALOS, 2003; WHO, 2007; HOTEZ et al., 2008; FEASEY et al., 2010; GYAPONG et al., 2010).

Com incidência no Brasil e América do Sul as doenças parasitárias (leishmanioses e doenças de Chagas) merecem atenção por sua distribuição, prevalência e acometimento da população. O estímulo na pesquisa e desenvolvimento de novos, seguros, eficazes e adequados tratamentos medicamentosos e vacinas para essas doenças torna-se necessário para promover a melhoria da saúde e do desenvolvimento econômico dos países em que ocorrem (MRAZEK; MOSSIALOS, 2003; HOTEZ et al., 2007; HOTEZ et al., 2008).

2.5.1 Leishmanioses

As leishmanioses são doenças parasitárias causadas por protozoários intracelulares obrigatórios do gênero *Leishmania*, incluindo cerca de 20 espécies que podem causar um espectro de doenças que vai desde úlceras cutâneas a doença visceral fatal. Com prevalência global de 12 milhões e com estimativa de população de 350 milhões em situação de risco, as leishmanioses estão presentes em 88 países diferentes, sendo predominantes na Índia, Sul da Ásia, África Subsaariana, América Latina e Caribe (HOTEZ et al., 2007; WHO, 2007; FEASEY et al., 2010).

Dependendo de fatores como predisposição genética e condições imunológicas do hospedeiro, e da espécie de *Leishmania* envolvida, as leishmanioses podem apresentar uma variedade de sintomas clínicos, que vão desde manifestações cutâneas e mucocutâneas mais brandas, até sintomas viscerais fatais. Sendo assim, as leishmanioses podem ser divididas em cutânea (tegumentar) e visceral (KAYSER; KIDERLEN; CROFT, 2002; HOTEZ et al., 2007; WHO, 2007).

A leishmaniose cutânea é a mais comum, considerada uma enfermidade polimórfica e espectral da pele e das mucosas. Caracterizada por lesões ulcerosas, indolores, únicas ou múltiplas no rosto, braços e pernas, que embora curem espontaneamente, causam incapacidade grave e deixam cicatrizes graves e desfigurantes permanentemente. A forma cutaneomucosa é caracterizada por lesões mucosas agressivas que afetam as regiões nasofaríngeas, destruindo tecidos moles do nariz, boca e garganta. Na forma disseminada apresenta múltiplas úlceras cutâneas por disseminação hematogênica ou linfática e, finalmente, a forma difusa com lesões nodulares não-ulceradas (GENARO; REIS, 2005; WHO, 2007).

No Brasil, a leishmaniose cutânea pode ser causada por diferentes espécies, como *Leishmania braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. lainsoni*, *L. shawi*, *L. naiffi* e *L. amazonensis*. No ano de 2005 foram registrados cerca de 62.000 casos da forma cutânea na América Latina, sendo 28.375 casos no Brasil (GENARO; REIS, 2005; HOTEZ et al., 2008).

A leishmaniose visceral é uma doença crônica, grave, de alta letalidade se não tratada, podendo ser fatal dentro de dois anos. Consiste de uma infecção sistêmica, de evolução crônica, caracterizada por febre irregular de intensidade média e de longa duração, esplenomegalia, hepatomegalia, acompanhada dos sinais biológicos de anemia,

leucopenia, trombocitopenia, hipergamaglobulinemia e hipoalbuminemia. A linfadenopatia periférica é comum em alguns focos da doença (GENARO; REIS, 2005; WHO, 2007).

A doença visceral é causada por parasitos do complexo *L. donovani* que inclui as espécies *L. donovani*, *L. infantum* e *L. chagasi*, esta última sendo responsável pelas formas clínicas nas Américas. Cerca de 90% dos casos mundiais estão concentrados na Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão e Brasil. Em 2004, dos 5.000 casos que foram registrados na América Latina, 3.386 foram no Brasil (MICHALICK; GENARO, 2005; HOTEZ et al., 2008).

Nas Américas, a transmissão da leishmaniose ocorre a partir de flebotomíneos fêmeas do gênero *Lutzomyia*, conhecidos por “mosquito-palha”. Os ciclos de transmissão podem ser silvestres (em que a transmissão pode ocorrer entre os animais, sem intervir infecção humana) ou domésticos (em que os reservatórios predominantes são seres humanos e cães) (KAYSER; KIDERLEN; CROFT, 2002; FEASEY et al., 2010).

A doença apresenta dois ciclos, um no vetor (mosquito) e outro no hospedeiro vertebrado. No intestino do inseto transmissor, bem como em meio de cultura de tecidos, o parasita existe como formas promastigotas extracelulares, alongadas e flageladas. As formas promastigotas, que são encontradas no tubo digestivo do mosquito (hospedeiro invertebrado) na forma livre ou aderidas ao epitélio intestinal, são injetadas na pele durante a alimentação do mosquito e rapidamente são absorvidas pelos fagócitos mononucleares, principalmente macrófagos residentes, onde ficam mantidas no vacúolo intracelular. Dentro do fagolisossoma os parasitas se transformam em amastigotas e se multiplicam como ovóides, que são especialmente adaptadas para as elevadas temperaturas dentro do mamífero hospedeiro e do ambiente hostil no interior dessas células. A multiplicação amastigota maciça leva ao rompimento celular e liberação de parasitas para infectar células hospedeiras recém-recrutadas. A infecção do inseto ocorre ao picar o hospedeiro vertebrado, no repasto sanguíneo, quando juntamente com o sangue ingere macrófagos parasitados por formas amastigotas, que ao serem liberados no esôfago do mosquito sofrem uma divisão binária e se transformam rapidamente em promastigotas (KAYSER; KIDERLEN; CROFT, 2002; GENARO; REIS, 2005; MICHALICK; GENARO, 2005).

O tratamento é complexo, realizado com antimoniais, anfotericina B e antimoniato de N-metil glucamina. Deve ser adaptado para os sintomas, a gravidade da infecção, as espécies infectantes. Entre

os problemas relacionados ao tratamento estão o alto custo, a incidência de efeitos colaterais, resistência aos fármacos e a baixa adesão (MRAZEK; MOSSIALOS, 2003; HOTEZ et al., 2007; FEASEY et al., 2010; PELISSARI et al., 2011).

Na revisão realizada por Rocha e colaboradores (2005) foram identificadas 101 plantas com potencial leishmanicida, sendo relatadas 239 substâncias naturais com atividade leishmanicida. Entre os compostos isolados e identificados estão terpenoides, alcaloides, flavonoides, esteroides, lipídios, cumarinas, hidrocarbonetos, entre outros. As potentes propriedades leishmanicidas apresentadas por substâncias isoladas de origem natural representam um avanço na busca de novos agentes antiprotozoários em meio à necessidade urgente de medicamentos inovadores para o tratamento dessas doenças.

2.5.2 Tripanossomíase americana

A tripanossomíase americana, ou doença de Chagas, é uma doença parasitária causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*. Nas Américas, o *T. cruzi* infecta cerca de 200.000 novas pessoas por ano. Isso faz com que a doença de Chagas seja uma condição parasitária humana mais importante nas Américas. No Brasil, esta endemia atinge cerca de oito milhões de habitantes, principalmente populações pobres que residem em condições precárias, mostrando um problema médico-social grave (KAYSER; KIDERLEN; CROFT, 2002; LANA; TAFURI, 2005; WHO, 2007; FEASEY et al., 2010).

A doença de Chagas tem prevalência global de 8-9 de milhões, tendo de 25-90 milhões de pessoas em situação de risco, sendo que a América Latina (em 13 países) e o Caribe são as regiões de maior prevalência (HOTEZ et al., 2007; HOTEZ et al., 2008).

O *T. cruzi* é transmitido por meio das fezes de triatomíneos, insetos hematófagos conhecidos como “barbeiro”. A infecção ocorre pela penetração de formas tripomastigotas metacíclicas, que são eliminadas nas fezes ou na urina do barbeiro durante o hematofagismo, que podem invadir feridas, olhos ou mucosas. Cerca de 30% dos indivíduos infectados desenvolvem a doença de Chagas crônica (KAYSER; KIDERLEN; CROFT, 2002; BARRETT et al., 2003; LANA; TAFURI, 2005; FEASEY et al., 2010).

Outras formas de transmissão do *T. cruzi* envolvem transfusão de sangue infectado, como segundo modo mais significativo, transmissão congênita, com mais de 100 casos no Brasil e Chile, além

da transmissão por acidentes laboratoriais e por transplante (LANA; TAFURI, 2005; WHO, 2007).

As manifestações clínicas da doença de Chagas podem ser agudas ou crônicas. As agudas podem ser sintomáticas, começando 6-10 dias após a contaminação pelo barbeiro, iniciando com manifestações locais além de sintomas gerais como febre, edema localizado e generalizado, poliadenia, hepatomegalia, esplenomeglia e, às vezes, insuficiência cardíaca e perturbações neurológicas; podem ser ainda assintomáticas, indeterminada que pode durar anos. A infecção crônica, que geralmente começa na infância, pode danificar irreversivelmente o coração, esôfago, cólon e sistema nervoso periférico na vida adulta, com cardiomiopatia, megacólon, megaesôfago (BARRETT et al., 2003; LANA; TAFURI, 2005; HOTEZ et al., 2007; WHO, 2007).

O ciclo biológico do *T. cruzi* é do tipo heteroxênico, com uma fase de multiplicação intracelular no hospedeiro vertebrado (homem e mamíferos) e extracelular no inseto vetor (triatomíneos, barbeiro). No inseto, são encontradas formas arredondadas com flagelo denominadas esferomastigotas presentes no estômago e intestino. Também formas epimastigotas presentes em todo o intestino e tripomastigotas presentes no reto, sendo tripomastigota metacíclica a forma mais natural de infecção para o hospedeiro vertebrado. Os tripomastigotas metacíclicos transmitidos pelo vetor interagem com células da pele ou mucosas, onde ocorre a transformação dos tripomastigotas em amastigotas, que aí se multiplicam por divisão binária simples. A seguir, ocorre a diferenciação dos amastigotas em tripomastigotas, que caem na corrente circulatória, atingem outras células de qualquer tecido ou órgão para cumprir novo ciclo celular ou são destruídos por mecanismos imunológicos do hospedeiro. Podem ainda ser ingeridos por novo inseto, onde cumprirão seu ciclo extracelular (KAYSER; KIDERLEN; CROFT, 2002; LANA; TAFURI, 2005).

Não há tratamento específico para a doença de Chagas. O tratamento é experimental e pode incluir uso de nifurtimox e benznidazol, mas ambos os fármacos são eficazes apenas na fase aguda da doença, além de que estão associados com longo período de tratamento, efeitos colaterais severos, fraca tolerância e baixa adesão (BARRETT et al., 2003; MRAZEK; MOSSIALOS, 2003; HOTEZ et al., 2007).

As plantas têm se mostrado uma rica fonte de substâncias com atividade contra as formas amastigota, epimastigota e tripomastigota do *T. cruzi*, e se apresentam como uma das direções promissoras na busca de fármacos eficazes na prevenção e tratamento da doença de Chagas.

Diferentes substâncias de origem natural de diversas classes, como quinonas, flavonoides, alcaloides e terpenos mostraram-se ativas contra o *T. cruzi* (SAÚDE-GUIMARÃES; FARIA, 2007; UCHIYAMA, 2009).

A carência de medicamentos mais eficazes para a cura da infecção nas suas fases aguda e crônica permanece, podendo ser os produtos naturais uma alternativa na busca de novos fármacos ou protótipos para o tratamento da doença de Chagas.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a investigação fitoquímica da espécie *Vernonanthura tweedieana* (Asteraceae) para isolamento dos componentes majoritários e a avaliação da atividade antiparasitária *in vitro*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Obter os componentes majoritários dos extratos hidroetanólicos preparados a partir das partes aéreas e da combinação de caules e raízes de *V. tweedieana* (Asteraceae);

Investigar a presença de lactonas sesquiterpênicas em extratos específicos preparados a partir das folhas de *V. tweedieana* (Asteraceae);

Purificar e caracterizar as substâncias majoritárias e minoritárias dos extratos hidroetanólicos por meio de técnicas espectroscópicas como Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Espectrometria de Massas (EM);

Ensaiai as substâncias majoritárias isoladas e identificadas em modelos biológicos *in vitro* para avaliação da atividade antiparasitária (em parceria);

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAL VEGETAL

O material vegetal empregado neste estudo foi obtido e preparado de maneira diferente, de acordo com a finalidade proposta. A coleta e preparação, bem como a elaboração das soluções extrativas derivadas, foram divididas em duas etapas, sendo a primeira etapa destinada à investigação fitoquímica de metabólitos secundários em geral; e a segunda, voltada à pesquisa de lactonas sesquiterpênicas.

4.1.1 Investigação fitoquímica de metabólitos secundários

Os espécimes de *Vernonanthura tweedieana* (Asteraceae) empregados nesta etapa foram coletados em abril de 2013, no município de Florianópolis, estado de Santa Catarina, Brasil. Foram realizadas duas coletas, sendo a primeira realizada dia 04/04/2013 na região da Costa da Lagoa da Conceição (27°33'54.8"S 48°25'48.0"W) e a segunda coleta, dia 06/04/2013 nos arredores da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) - Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima Trindade (27°35'54.7"S 48°31'00.3"W).

A identidade botânica foi confirmada pelo biólogo Dr. Ademir Reis, sendo avaliada por meio da comparação com exsiccatas representativas da espécie. O material herborizado foi depositado no Herbário Barbosa Rodrigues (HBR), no município de Itajaí/SC, sob registro “*L. A. da Silva s.n. 06/04/2013 - HBR 54999*”, e no Herbário RB do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, município do Rio de Janeiro, sob registro “*RB 612274*”.

O material vegetal de ambas as coletas foi separado em dois conjuntos de farmacógenos, um composto por partes aéreas, as quais foram rasuradas manualmente; e outro constituído por caules e raízes, que tiveram o tamanho reduzido com auxílio de tesoura de jardinagem. Os farmacógenos foram utilizados frescos no processo de extração.

4.1.2 Pesquisa de lactonas sesquiterpênicas (LS)

Para a pesquisa de LS realizou-se nova coleta em outubro de 2014, no município de Florianópolis/SC, na região da Costa da Lagoa da Conceição (27°33'54.8"S 48°25'48.0"W). O local de coleta selecionado

foi o mesmo onde foram coletados os espécimes empregados na análise fitoquímica (*item 4.1.1*), garantindo a identidade botânica, confirmada previamente.

Para esta etapa, foram coletadas somente as folhas de *V. tweedieana* (Asteraceae), manipuladas de modo a evitar rasuras. As folhas de *V. tweedieana* foram secas à temperatura ambiente e ao abrigo de luz solar, revolvidas cuidadosamente duas vezes ao dia, durante cinco dias.

Uma alíquota das folhas secas foi avaliada microscopicamente, em microscópio óptico Studar Lab[®], para investigação da presença de tricomas glandulares. Para tanto, as folhas foram seccionadas transversalmente a mão-livre, clarificadas em hipoclorito de sódio a 2% e observadas em microscópio com aumento de 400 vezes.

4.2 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES EXTRATIVAS

4.2.1 Extratos hidroetanólicos para investigação fitoquímica

4.2.1.1 Obtenção dos extratos brutos

As duas combinações de farmacógenos frescos de *Vernonanthura tweedieana* (conforme *item 4.1.1*), sendo 2,6 kg de partes aéreas e 5,9 kg de caules e raízes, foram utilizadas separadamente para a preparação dos extratos. Os extratos foram obtidos por maceração à temperatura ambiente, utilizando como líquido extrator uma mistura hidroetanólica a 75%, durante um período total de 56 dias. A renovação do solvente se deu três vezes, sendo as duas primeiras vezes a cada 21 dias, e a última após sete dias, sendo ainda mantida a maceração por mais sete dias após a última renovação do líquido extrator.

Os extratos hidroetanólicos foram filtrados por papel filtro e o solvente foi removido sob pressão reduzida com auxílio de evaporador rotatório. O solvente recuperado foi ajustado para a proporção inicial e empregado na re-extração do material vegetal.

Os extratos hidroetanólicos brutos da combinação das partes aéreas (EAF) e dos caules e raízes (ECR) foram levados à secura e armazenados em temperatura reduzida (8 °C), até posterior processo de particionamento. Após avaliação por cromatografia em camada delgada, as combinações EAF das diferentes coletas foram reunidas. O mesmo se deu para as combinações ECR obtidas diferentes coletas.

4.2.1.2 Particionamento dos extratos brutos

O processo de particionamento dos extratos brutos EAF reunidos (172,0 g) e ECR reunidos (291,6 g) foi realizado, separadamente, em funil de separação e utilizando solventes de ordem crescente de polaridade (*maiores detalhes, item 5.1.2.1.1 – Fluxogramas 1 e 2*).

Para tanto, os extratos brutos levados à secura foram suspensos em água destilada e submetidos a uma partição líquido/líquido, sob agitação manual, de forma exaustiva e sucessiva, utilizando hexano, diclorometano (DM) e acetato de etila (AcOEt), respectivamente.

A fração aquosa residual resultante foi liofilizada e armazenada em temperatura reduzida (8 °C). Os extratos orgânicos tiveram o solvente removido em evaporador rotatório e sob pressão reduzida, para obtenção das frações hexano, DM e AcOEt, respectivamente.

As frações orgânicas foram então submetidas a diferentes e consecutivos processos de fracionamento cromatográfico para purificação dos compostos de interesse.

4.2.2 Extrato de lavagem foliar para pesquisa de LS

As folhas secas e íntegras (704,0 g) de *V. tweediana* (conforme *item 4.1.2*) foram usadas na preparação dos extratos de lavagem foliar, segundo técnica adaptada de Faleiro (2014). Uma alíquota de cerca de 20 folhas foi transferida para frasco de vidro e imersa durante 30 segundos em acetona P.A. (1 L), sob leve agitação.

Cada litro de acetona foi reutilizado para a extração de seis alíquotas de folhas, como descrito anteriormente. Empregou-se um total de 5 L de líquido extrator para a lavagem de todas as folhas.

Os extratos da lavagem foram reunidos e filtrados por papel filtro. O solvente foi removido em evaporador rotatório sob pressão reduzida, resultando no extrato bruto acetônico de lavagem foliar (ELF), o qual foi levado à secura e armazenado em temperatura reduzida (8 °C) para posterior fracionamento cromatográfico.

4.3 FRACIONAMENTO PRELIMINAR E MONITORAMENTO CROMATOGRÁFICO

4.3.1 Fracionamento cromatográfico preliminar

As frações orgânicas DM e AcOEt derivadas de ambos os extratos EAF e ECR, bem como o extrato ELF para pesquisa de LS, foram submetidos ao fracionamento preliminar por cromatografia líquida a vácuo (CLV).

Utilizou-se como fase estacionária (FE) sílica gel 60 (230-400 *mesh*; 0,04-0,063 mm). O eluente utilizado como fase móvel (FM), em sistema gradiente, foi composto por solventes de grau P.A. em ordem de polaridade crescente. Empregou-se desde hexano, passando por concentrações crescentes de DM em hexano, concentrações crescentes de AcOEt ou acetona em DM, misturas de metanol (MeOH) e AcOEt ou acetona, até MeOH puro. Para alguns casos, a última eluição se deu com misturas de água e MeOH.

A proporção de cada solvente utilizado nas preparações das misturas binárias foi selecionada conforme o perfil de cada fração em cromatografia em camada delgada.

4.3.2 Monitoramento por cromatografia em camada delgada (CCD)

Para acompanhar e monitorar a separação das substâncias nas frações obtidas empregaram-se a análises por CCD, em que foram utilizadas cromatofolhas de sílica gel 60 com indicador de fluorescência (F₂₅₄) em suporte de alumínio (SiliCycle®). Para frações mais polares foram utilizadas cromatofolhas de sílica de fase reversa (C₁₈), com indicador de fluorescência (F₂₅₄), também em suporte de alumínio (Macherey-Nagel®).

Para cada separação cromatográfica selecionou-se previamente o solvente ou a mistura de solventes para compor o eluente, considerando o perfil em CCD das amostras analisadas, para obtenção de sistema cromatográfico que proporcionasse a melhor separação dos constituintes.

O perfil cromatográfico das frações e/ou amostras foi estabelecido após análise sob luz visível, luz UV, nos comprimentos de onda de 254 (extinção) e 366 nm (fluorescência), antes e após revelação com anisaldeído sulfúrico (WAGNER; BLADT, 2001).

4.4 PURIFICAÇÃO E ISOLAMENTO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

4.4.1 Investigação fitoquímica do extrato EAF

4.4.1.1 Fracionamento da fração DM de partição: substância VT1

O fracionamento cromatográfico preliminar por CLV da fração DM (3,6 g) do extrato EAF permitiu a obtenção de 17 subfrações, denominadas de AF1 a AF17.

4.4.1.1.1 Coluna CLV de reunião AF7 e AF8: 1ª coluna EAF

A reunião (676,6 mg) das frações AF7 e AF8 foi submetida a novo fracionamento por CLV, empregando sílica gel 60 (230-400 *mesh*; 0,04-0,063 mm) como FE e sistema gradiente para FM, compostos de mistura de concentrações crescentes de DM em hexano (40-70%), seguido de mistura de acetona em DM (0-70%), mistura de MeOH em acetona (0-50%), até MeOH puro. Foram obtidas 16 frações, denominadas AF7-8A a AF7-8P.

4.4.1.1.2 Coluna cromatográfica da fração AF7-8F: 2ª coluna EAF

A subfração AF7-8F (368,7 mg) foi fracionada por coluna cromatográfica (CC) clássica, usando com FE sílica gel 60 (230-400 *mesh*; 0,04-0,063 mm) e como FM um gradiente composto de mistura de acetona em hexano (25-50%), seguido de acetona 100%, até MeOH puro.

As frações obtidas foram agrupadas de acordo com o perfil em CCD pela comparação das manchas, resultando em 10 frações denominadas AF7-8FI a AF7-8FX. Destas, a fração AF7-8FVIII corresponde à substância VT1 (37,3 mg).

4.4.1.1.3 Coluna Sephadex da fração AF7-8FVII: 3ª coluna EAF

A fração AF7-8FVII (180,5 mg) foi submetida à coluna em resina Sephadex LH20 empregando acetona 100% como FM. Esta etapa permitiu novamente a obtenção da substância VT1 (40,1 mg).

4.4.1.2 Fracionamento da fração AcOEt de partição: substâncias VT1, VT2, VT3 e VT4

Após fracionamento por CLV da fração AcOEt (10,4 g) do extrato EAF foram obtidas 18 frações denominadas AF18 a AF35.

4.4.1.2.1 CC de fração AF25: 4ª coluna EAF

A fração AF25 (319,0 mg) foi novamente fracionada em CC utilizando como FE sílica gel 60 (230-400 *mesh*; 0,04-0,063 mm) e como FM um gradiente composto de mistura de DM em hexano (80-95%), seguido de acetona em DM (0-70%), de mistura de MeOH em acetona (0-50%), até MeOH 100%. As frações semelhantes foram reunidas conforma perfil em CCD, resultando em 11 frações, denominadas AF25A a AF25K.

4.4.1.2.2 Coluna Sephadex de fração AF25F: 5ª coluna EAF

A fração AF25F (66,6 mg) foi fracionada em coluna de resina Sephadex LH20 usando como FM acetona 100%. Obteve-se, após reunião das frações semelhantes, um conjunto de seis frações, nomeadas de AF25FI a AF25FVI.

4.4.1.2.3 CCD preparativa da fração AF25FIV: CCD preparativa EAF

A partir da fração AF25FIV (29,4 mg) realizou-se purificação em CCD preparativa. A fração foi aplicada com capilar de vidro em placas de sílica gel e a CCD foi desenvolvida em eluente composto por mistura de DM: acetona, na proporção 90:10 (v/v).

A substância obtida foi raspada e solubilizada em acetona. Em seguida, a solução foi filtrada por funil com placa de vidro sinterizado de granulometria G3, sob vácuo. Este processo permitiu isolamento da substância VT1 (27,8 mg).

4.4.1.2.4 Coluna Sephadex de fração AF25G: 6ª coluna EAF

A fração AF25G (22,0 mg) foi fracionada em coluna usando como FE resina Sephadex LH20 e acetona 100% como FM. Após reunião das frações semelhantes foram obtidas sete frações, nomeadas de AF25GI a AF25GVII.

A fração AF25GV (3,4 mg) corresponde à mistura das substâncias VT2 e VT3.

4.4.1.2.5 Coluna CLV da fração AF26: 7ª coluna EAF

A fração AF26 (2079,3 mg) foi novamente submetida ao fracionamento por CLV, empregando como FE sílica gel 60 (230-400

mesh; 0,04-0,063 mm) e com FM um sistema gradiente compostos da mistura de DM em hexano (80%), seguida da mistura de acetona em DM (0-30%), da mistura de MeOH em acetona (0-50%), até mistura de água em MeOH (0-10%). Foram obtidas 17 frações nomeadas de AF26A a AF26Q.

4.4.1.2.6 CC de reunião AF26K e AF26L: 8ª coluna EAF

A reunião (262,1 mg) das frações AF26K e AF26L foi submetida à CC utilizando como FE sílica gel 60 (230-400 *mesh*; 0,04-0,063 mm) e como FM um gradiente composto de mistura de acetona em DM (15-70%), seguida de mistura de MeOH em acetona (0-30%), até MeOH 100%. As frações semelhantes quanto ao perfil em CCD foram reunidas, sendo obtidas nove frações, denominadas de AF26K-LI a AF26K-LIX. Destas, a fração AF26K-LIV corresponde à substância VT4 (104,7 mg).

4.4.2 Investigação fitoquímica do extrato ECR

4.4.2.1 Fracionamento da fração DM de partição: substâncias VT5 e VT6

O fracionamento preliminar por CLV da fração DM (4,2 g) do extrato ECR rendeu 18 frações, nomeadas de CR1 a CR18.

4.4.2.1.1 CC de fração CR10: 1ª coluna ECR

A fração CR10 (112,0 mg) foi fracionada em CC empregando como FE sílica gel 60 (230-400 *mesh*; 0,04-0,063 mm) e como FM um gradiente composto da mistura de acetona em DM (3-70%), seguida da mistura de MeOH em acetona (0-70%), até MeOH 100%. Após reunião das frações semelhantes foram obtidas 12 subfrações, denominadas de CR10A a CR10L.

4.4.2.1.2 Coluna Sephadex de fração CR10E: 2ª coluna ECR

Submeteu-se a fração CR10E (19,7 mg) ao fracionamento em coluna de Sephadex LH20, utilizando como FM acetona 100%. As frações semelhantes quanto ao perfil em CCD foram reunidas, rendendo

seis subfrações, denominadas de CR10EI a CR10EVI. Destas, a fração CR10EVI (0,8 mg) corresponde à mistura das substâncias VT5 e VT6.

4.4.2.2 Fracionamento da fração AcOEt de partição: substâncias VT4, VT7, VT8, VT9 e VT10

No fracionamento cromatográfico preliminar por CLV da fração AcOEt (2,5 g) derivada de extrato ECR obteve-se sete subfrações. Estas foram denominadas de CR19 a CR25.

4.4.2.2.1 CC de fração CR21: 3ª coluna ECR

A fração CR21 (135,9 mg) foi submetida a fracionamento em CC tendo como FE sílica gel 60 (230-400 *mesh*; 0,04-0,063 mm) e como FM um gradiente composto da mistura de AcOEt em DM (10-90%), seguido de mistura de MeOH em AcOEt (0-75%), até mistura de água em MeOH (0-5%). Após reunião das frações semelhantes, obteve-se 15 subfrações, denominadas de CR21A a CR21O.

4.4.2.2.2 CC de fração CR21H: 4ª coluna ECR

A fração CR21H (16,7 mg) foi novamente fracionada em CC utilizando sílica gel 60 (230-400 *mesh*; 0,04-0,063 mm) como FE e como FM um gradiente composto da mistura de MeOH em DM (5%) até MeOH 100%. As frações reunidas de acordo com semelhança no perfil em CCD, sendo obtidas seis subfrações, foram denominadas de CR21HI a CR21HVI.

4.4.2.2.3 CCD preparativa da fração CR21HV: CCD preparativa ECR

Da fração CR21HV (9,6 mg) promoveu-se a purificação em CCD preparativa. A fração foi aplicada com capilar de vidro em cromatofolhas de sílica de fase reversa (C₁₈) para CCD que foi desenvolvida em eluente composto por mistura de MeOH: água, na proporção 70:30 (v/v).

As substâncias obtidas foram raspadas e solubilizadas em MeOH. Em seguida, as soluções foram filtradas por funil com placa de vidro sinterizado de granulometria G3, sob vácuo. Este processo permitiu isolamento da substância VT4 (4,9 mg) e substância VT7 (0,7 mg).

4.4.2.2.4 Coluna Sephadex de fração CR21K: 5ª coluna ECR

A fração CR21K (21,3 mg) foi fracionada em coluna usando como FE resina Sephadex LH20 e acetona 100% como FM. Após avaliação em CCD reuniu-se das frações semelhantes, sendo obtidas oito frações nomeadas de CR21KI a CR21KVIII.

A fração CR21KV (11,0 mg) corresponde à mistura das substâncias VT8 e VT9. Já a fração CR21KVII corresponde à substância VT10 (1,0 mg).

4.4.3 Pesquisa de LS do extrato ELF

4.4.3.1 Fracionamento de fração LF8 de CLV: substância VT11

A partir do fracionamento cromatográfico preliminar por CLV do extrato ELF (1,7 g) obteve-se 15 subfrações, as quais foram denominadas de LF1 a LF15.

4.4.3.1.1 CC de fração LF8: 1ª coluna ELF

A fração LF8 (329,1 mg) foi submetida a fracionamento por CC empregando como FE sílica gel 60 (230-400 *mesh*; 0,04-0,063 mm) e como FM um gradiente composto da mistura de acetona em hexano (5-15%), seguido de acetona 100%, até MeOH puro. Após reunião das frações semelhantes no perfil em CCD foram obtidas 14 subfrações, denominadas de LF8A a LF8N.

Desta, a fração LF8K (16,5 mg) corresponde à substância VT11.

4.5 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL

As amostras derivadas do fracionamento cromatográfico, ao apresentar apenas uma mancha em CCD e/ou cristalização espontânea, foram submetidas a análises espectroscópicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Espectrometria de massas (EM), para a elucidação estrutural e caracterização das substâncias.

Os experimentos espectroscópicos foram realizados em parceria, junto à Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba/PR.

4.5.1 Ressonância magnética nuclear (RMN)

As substâncias isoladas foram submetidas a análises de RMN de Hidrogênio (RMN ^1H) e experimentos bidimensionais (HSQC e HMBC). Os sinais referentes aos carbonos (^{13}C) foram atribuídos considerando os experimentos bidimensionais de HSQC e HMBC.

Os experimentos foram desenvolvidos em equipamento Bruker[®] modelo *Avance 400* (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C) e em equipamento Bruker[®] modelo *Ascend 600* (600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C), sendo ambos vinculados ao Departamento de Química da UFPR, Curitiba/PR.

Os dados adquiridos (FID) foram processados em software *ACD lab* (SpecManager[®]) e em software *TopSpin 3.1* (Bruker[®]), e os resultados comparados com dados disponíveis na literatura.

4.5.2 Espectrometria de massas (EM)

Algumas das substâncias foram também caracterizadas por EM. Os experimentos foram desenvolvidos em equipamento ESI-Q-TOF Bruker[®] modelo *ultrOTOFG*, vinculado ao Departamento de Farmácia da UFPR, Curitiba/PR.

Foram também realizados experimentos de EM junto ao Laboratório Central de Biologia Molecular Estrutural (CEBIME), da UFSC. Os experimentos foram realizados em espectrômetro de massas ESI-Q-TOF Bruker[®], modelo *microTOF-Q II 10243*.

4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA *in vitro*

4.6.1 Análise de pureza por cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE)

A substância purificada a ser ensaiada biologicamente foi submetida à análise de pureza por CLUE. Os experimentos de CLUE foram realizados em equipamento WATERS[®] modelo *Acquity UPLC*, equipado com detector de arranjo de fotodiodos (DAD) hifenado ao detector de espalhamento de luz evaporativo (ELSD), injetor automático e forno. Este equipamento é vinculado ao Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFSC.

Para as análises, o volume de injeção utilizado foi de 2 μL . Empregou-se uma coluna *Acquity UPLC BEH C₁₈* (2,1 x 50 mm i.d., 1,7 μm) com forno de coluna à temperatura de 40 °C (± 2 °C). A FM utilizada constituiu de gradiente combinando acetonitrila (A) e solução aquosa acidificada com ácido fórmico a 0,1% (B), nas seguintes

condições: 0-1 min, gradiente da proporção de A:B (10:90, v/v) até proporção A:B (20:80, v/v); 1-5 min, gradiente até proporção A:B (45:55, v/v); 5-6 min, gradiente até proporção A:B (65:35, v/v); 6-7 min, retorno do gradiente até proporção inicial de A:B (10:90, v/v), totalizando 7 minutos de análise a um fluxo constante de 0,40 mL.min⁻¹.

Todos os solventes utilizados foram de grau HPLC, filtrados por membrana Millipore[®] (poro de 0,22 µm) e desgaseificados em banho de ultrassom durante 15 minutos, sob pressão reduzida, antes de sua utilização. A amostra foi também preparada empregando solventes de grau HPLC e filtrada por membrana (0,22 µm).

Os cromatogramas foram adquiridos no comprimento de onda de 287 nm, sendo os espectros de UV monitorados na faixa de 200 a 400 nm. Os dados foram processados em software *Empower 3* (Waters[®]).

Para a avaliação de pureza da substância (expressa em porcentagem) foram integradas as áreas dos picos contidos no cromatograma da substância e calculada a porcentagem respectiva de cada pico em relação à somatória das áreas.

4.6.2 Avaliação das atividades leishmanicida e tripanocida

A investigação *in vitro* das atividades leishmanicida e tripanocida foi realizada em parceria com o Laboratório de Protozoologia, sob supervisão do professor Dr. Mário Steindel, vinculado ao Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UFSC.

Para tanto, empregou-se linhagem celular THP-1 (ATCC TIB202) de macrófagos humanos que foi cultivada em meio RPMI-1640 sem vermelho de fenol, suplementado com 10% (v/v) de SBF, tampão HEPES a 12,5 mM, penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL) e Glutamax[®] (2 mM), em incubação a 37 °C em atmosfera umidificada com 5% de CO₂.

As formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/77/LTB0016) utilizadas, expressando β-galactosidase, foram cultivadas a 26 °C em meio *Schneider's insect medium* (Sigma-Aldrich Co, St. Louis) suplementado com 5% (v/v) de SBF inativado por calor e 2% (v/v) de urina humana.

Para a triagem leishmanicida contra formas amastigotas intracelulares as células THP-1 (4,0x10⁴ células/poço) foram cultivadas em placas de 96 poços em meio RPMI-1640 e tratadas com 100 ng/mL de forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) durante 72 horas a 37 °C em 5% de CO₂, para permitir a diferenciação das células THP-1 em

macrófagos que não se dividem (SCHWENDE et al., 1996). Após quatro dias de cultivo a cultura de promastigotas ajustada para $4,0 \times 10^6$ parasitos/mL foi lavada com solução salina tamponada com fosfato, pH 7,4 (PBS) e incubada em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro humano AB⁺ inativado por calor durante uma hora a 34 °C para a opsonização do parasito. As células THP-1 aderentes foram incubadas com a solução de promastigotas opsonizadas na proporção parasitos: célula de 10:1, durante quatro horas a 34 °C e 5% de CO₂. Após este período os parasitos não aderentes foram removidos por lavagem com PBS. As células infectadas foram incubadas com 180 µL de meio RPMI-1640 completo nas mesmas condições de opsonização durante 24 horas, para permitir a transformação de promastigotas em amastigotas intracelulares.

Para triagem tripanocida as cepas de *Trypanosoma cruzi*, β-galactosidase, (Tulahuen) foram fornecidas pelo Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular, Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ, Belo Horizonte. Tripomastigotas derivados de culturas obtidas a partir de linhagem celular L929 infectadas foram usadas para infectar células THP-1 diferenciadas ($4,0 \times 10^4$ células/poço) em microplacas de 96 poços, numa proporção de parasito: célula de 3:1 e incubados durante a noite a 37 °C com 5% de CO₂. O meio contendo parasitos não internalizados foi removido e substituído por 180 µL de meio fresco.

A amostra foi solubilizada em DMSO e diluída em série (de 50 µM a 1,56 µM). As células infectadas foram tratadas com 20 µL de cada amostra, em triplicata, seguida de incubação durante 48 horas a 34 °C ou 37 °C e 5% de CO₂. Após o tratamento, as células foram cuidadosamente lavadas com PBS e incubadas durante 16 horas a 37 °C com 250 µL de clorofenol-vermelho-β-D-galactopiranosídeo a 100 µM e Nonidet P-40 a 0,1%. A densidade óptica foi determinada a 570 e 630 nm em espectrofotômetro Tecan[®] modelo *Infinite M200*.

A anfotericina B e o benznidazol foram utilizados como controle positivo para as atividades leishmanicida e tripanocida, respectivamente. DMSO 1% foi empregado como controle negativo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL E PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS

5.1.1 Obtenção do material vegetal e análise microscópica

5.1.1.1 Investigação fitoquímica de metabólitos secundários

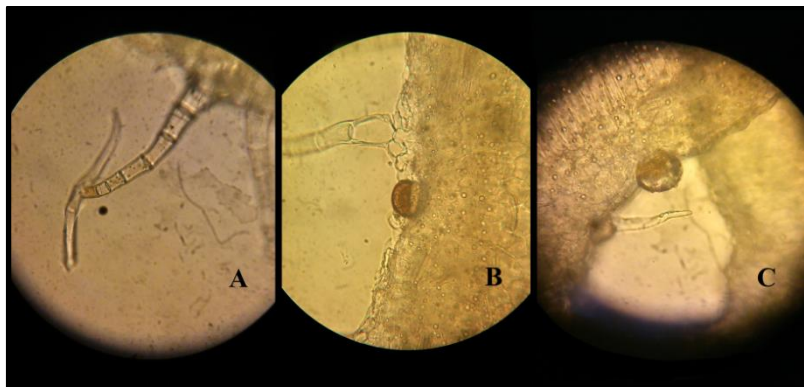
Após a separação do material vegetal derivado das duas coletas (Costa da Lagoa da Conceição e Campus Trindade da UFSC, conforme *item 4.1.1*), foram obtidos para os dois grupos de farmacógenos frescos, um total de 2,6 kg de partes aéreas e 5,9 kg de caules e raízes de *V. tweediana*.

5.1.1.2 Pesquisa de lactonas sesquiterpênicas (LS)

A coleta do material vegetal para a pesquisa de LS rendeu, após a secagem, um total de 704,0 g de folhas secas de *V. tweediana*.

A análise microscópica das folhas revelou a presença de tricomas tectores característicos para a espécie (Figura 9A).

Figura 9 – Análise microscópica de folhas secas de *Vernonanthura tweediana*.



Epiderme adaxial de folha de *V. tweediana* em corte transversal observado com aumento de 400 vezes; **A**: tricoma tector em formato de “T”; **B-C**: possível gotícula de material lipofílico.

Não foram observadas as estruturas correspondentes aos tricomas glandulares. Apesar disso, foram identificados achados que podem indicar a presença de conteúdo de natureza lipofílica (Figura 9B-C), o qual pode ter sido liberado de tricomas.

Segundo Duarte e Chella (2014), a espécie *V. tweediana* apresenta dois tipos de tricomas, tectores e glandulares. Os tectores são pluricelulares, unisseriados, exibindo uma célula apical alongada, que se pode inclinar perpendicularmente e determinar um formato em “T”. Já os tricomas glandulares são capitados, com pedicelo curto e cabeça bicelular, inseridos em pequena depressão na epiderme.

A liberação do conteúdo glandular dos tricomas, devido à fragilidade destes, pode ser resultado da influência de diferentes fatores tanto bióticos quanto abióticos, como por exemplo, frente a variações de temperatura e umidade (KELSEY; SHAFIZADEH, 1980; ASCENSÃO, 2007).

5.1.2 Preparação dos extratos brutos

5.1.2.1 Extratos hidroetanólicos para investigação fitoquímica

A obtenção dos extratos brutos hidroetanólicos, preparados a partir das combinações de farmacógenos de partes aéreas (EAF) e de caules e raízes (ECR), rendeu 173,2 g e 293,0 g, respectivamente.

Uma alíquota de cada extrato bruto foi separada para reserva, sendo alíquotados 1,2 g do extrato EAF e 1,4 g do extrato ECR. O restante de cada extrato foi submetido ao particionamento.

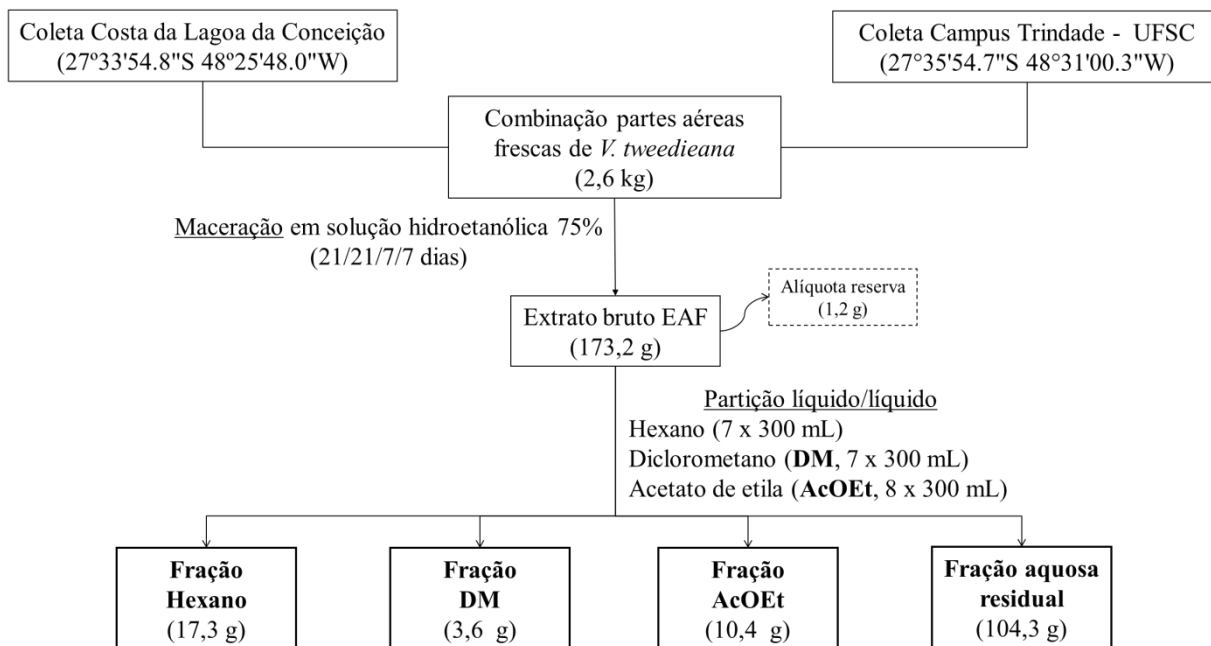
5.1.2.1.1 Particionamento dos extratos brutos

Os extratos brutos EAF (172,0 g) e ECR (291,6 g) foram submetidos à partição líquido/líquido conforme *item 4.2.1.2*.

O Fluxograma 1 apresenta os detalhes do processo de particionamento do extrato EAF. Foram obtidos 17,3 g, 3,6 g e 10,4 g para as frações hexano, DM e AcOEt, respectivamente, além da fração aquosa resultante de 104,3 g.

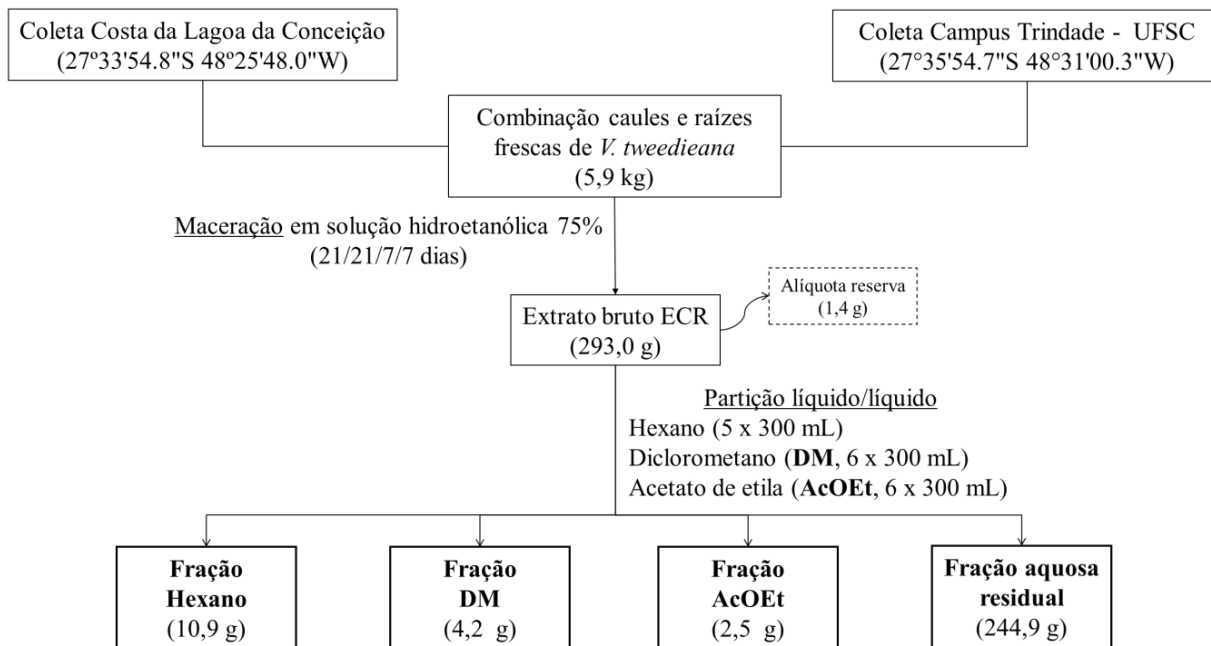
As etapas da partição do extrato ECR estão descritas no Fluxograma 2. Para o extrato ECR foram obtidos 10,9 g, 4,2 g e 2,5 g para as frações hexano, DM e AcOEt, respectivamente. A fração aquosa resultante obtida foi de 244,9 g.

Fluxograma 1 – Etapas do particionamento do extrato bruto hidroetanólico de partes aéreas (EAF) de *Vernonanthura tweedieana*.



DM: diclorometano; **AcOEt:** acetato de etila.

Fluxograma 2 – Etapas do particionamento do extrato bruto hidroetanólico de caules e raízes (ECR) de *Vernonanthura tweedieana*.

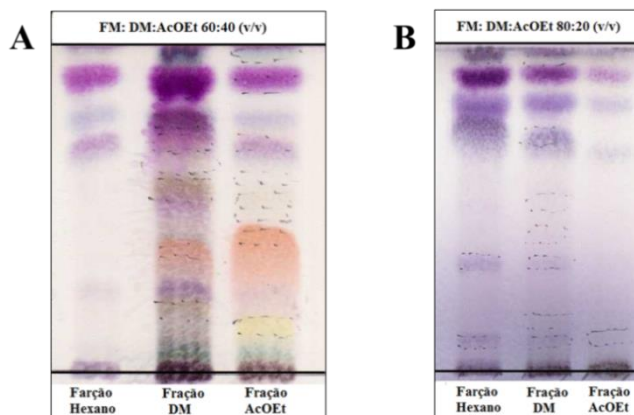


DM: diclorometano; **AcOEt:** acetato de etila.

Na análise cromatográfica por CCD das frações orgânicas obtidas do particionamento dos extratos EAF e ECR (Figura 10A-B) foi possível observar, após revelação com anisaldeído sulfúrico, a presença de manchas de coloração roxa ($R_f=0,65$ a $0,96$) predominantes no extrato ECR. Já para o extrato EAF, foi também evidenciada a presença de manchas de coloração alaranjada ($R_f=0,41$) e amarela ($R_f=0,14$), além de manchas de coloração marrom ($R_f=0,19$ e $R_f=0,58$).

Manchas de coloração roxa são alusivas a esteroides e terpenoides. As manchas de coloração alaranjada e amarelas, observadas no extrato EAF, são indicativas da presença de flavonoides, enquanto as manchas de coloração marrom a castanho sugerem a presença de lactonas sesquiterpênicas (KELSEY et al., 1973; WAGNER; BLADT, 2001; ZANON, 2006; KOCH; BASAR; RICHTER, 2008).

Figura 10 – Análise por cromatografia em camada delgada das frações orgânicas da partição dos extratos brutos de partes aéreas (EAF) e caules e raízes (ECR) de *Vernonanthura tweedieana*.



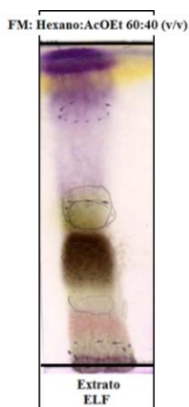
Cromatogramas das frações orgânicas da partição dos extratos brutos de partes aéreas (A) e caules e raízes (B) de *V. tweedieana*, revelados com anisaldeído sulfúrico. **FM**: fase móvel; **DM**: diclorometano; **AcOEt**: acetato de etila.

5.1.2.2 Extrato de lavagem foliar para pesquisa de LS

O extrato derivado da lavagem das folhas de *V. tweedieana* permitiu a obtenção de 1,7 g de extrato bruto (ELF). A análise cromatográfica em CCD do extrato ELF (Figura 11) revelou a presença de manchas de coloração marrom ($R_f=0,35$ e $0,46$) após revelação com

anissaldeído sulfúrico, sendo indicativas da possível presença de lactonas sesquiterpênicas no extrato.

Figura 11 – Análise por cromatografia em camada delgada do extrato bruto de lavagem foliar (ELF) de *Vernonanthura tweedieana*.



Cromatograma do extrato bruto de lavagem foliar (ELF) de *V. tweedieana*, revelado com anissaldeído sulfúrico. **FM**: fase móvel; **AcOEt**: acetato de etila.

5.2 FRACIONAMENTO PRELIMINAR DOS EXTRATOS BRUTOS

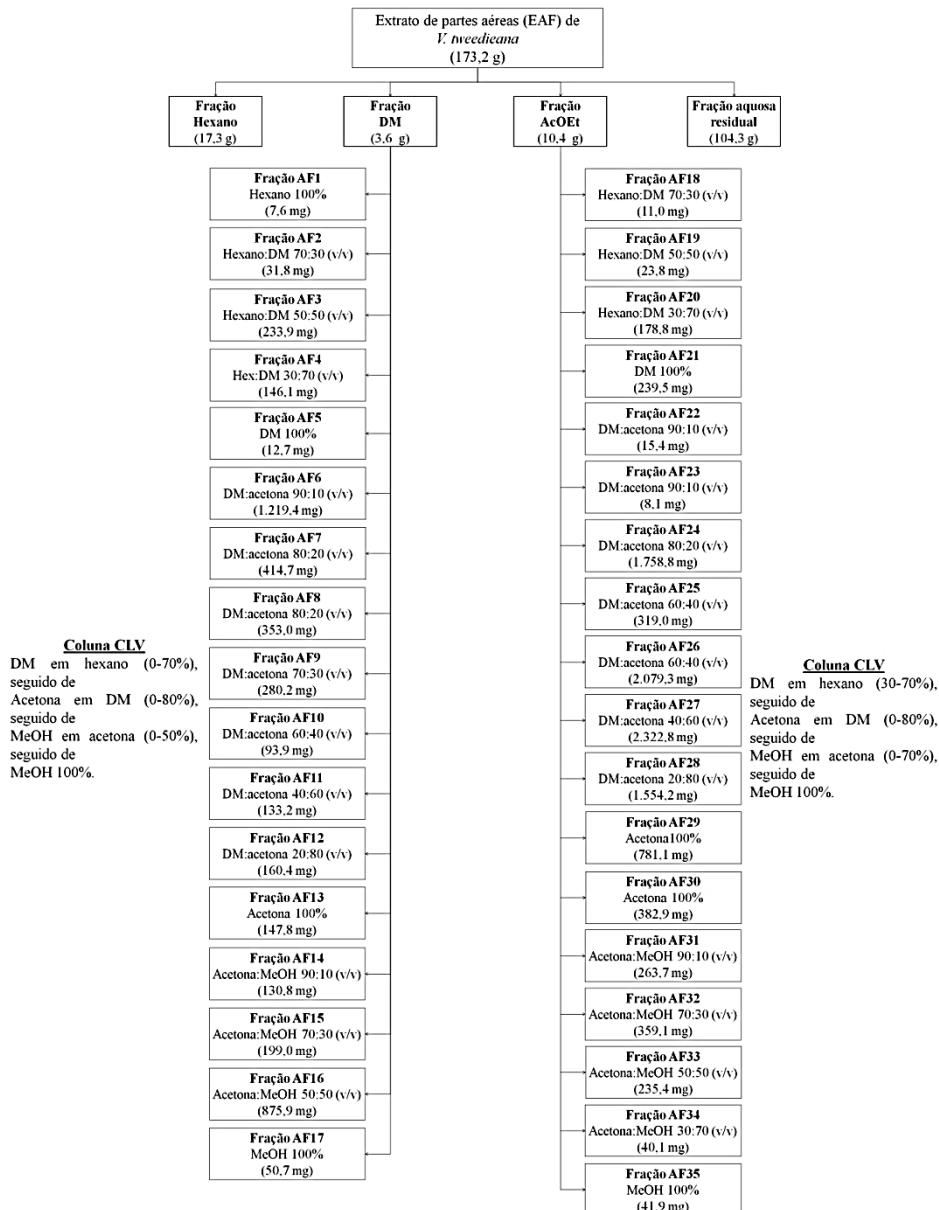
As frações orgânicas DM e AcOEt dos extratos EAF e ECR, além do extrato ELF, foram submetidas a fracionamento por cromatografia líquida a vácuo (CLV), conforme *item 4.3.1*.

5.2.1 CLV das frações orgânicas dos extratos EAF e ECR

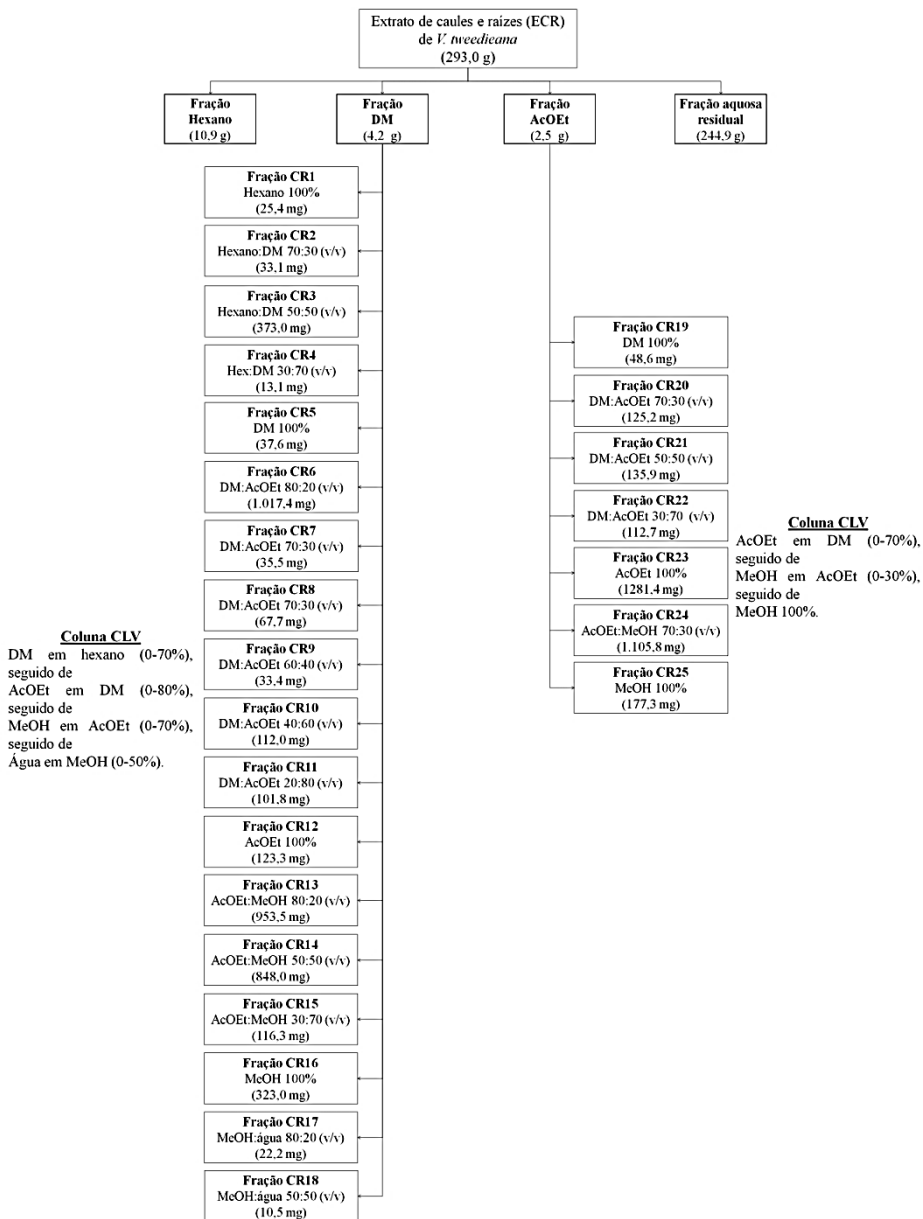
As frações DM (4,2 g) e AcOEt (2,5 g) do extrato EAF foram submetidas a CLV e os detalhes do fracionamento estão apresentados no Fluxograma 3. Foram obtidas para a fração DM, 17 novas subfrações, nomeadas de AF1 a AF17. Já para a fração AcOEt foram obtidas 18 subfrações, nomeadas de AF18 a AF35.

O fracionamento por CLV das frações DM (3,6 g) e AcOEt (10,4 g) do extrato ECR está detalhado no Fluxograma 4. Obteve-se para a fração DM, 18 novas subfrações nomeadas de CR1 a CR18. A fração AcOEt rendeu sete subfrações, nomeadas de CR19 a CR25.

Fluxograma 3 – Etapas do fracionamento cromatográfico das frações orgânicas do extrato bruto de partes aéreas (EAF) de *Vernonanthura tweedieana*.



Fluxograma 4 – Etapas do fracionamento cromatográfico das frações orgânicas do extrato bruto de caules e raízes (ECR) de *Vernonanthura tweedieana*.

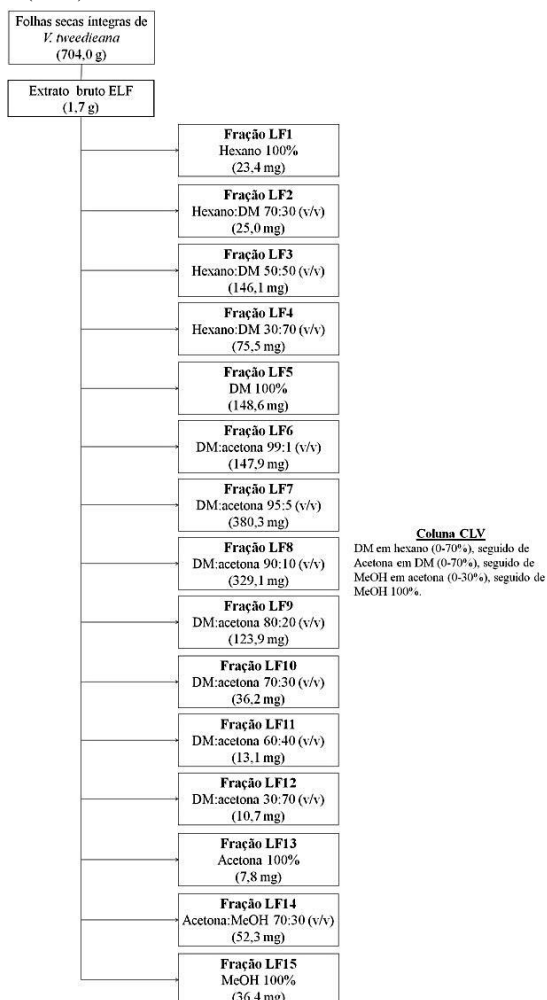


DM: diclorometano; AcOEt: acetato de etila; MeOH: metanol.

5.2.2 CLV do extrato ELF

O extrato de lavagem foliar (ELF, 1,7 g) foi também fracionado por CLV, e os detalhes desse processo estão apresentados no Fluxograma 5. Obtiveram-se 15 subfrações, as quais foram denominadas de LF1 a LF15.

Fluxograma 5 – Etapas do fracionamento cromatográfico do extrato bruto de lavagem foliar (ELF) de *Vernonanthura tweedieana*.



DM: diclorometano; **AcOEt:** acetato de etila; **MeOH:** metanol.

5.3 PURIFICAÇÃO E ISOLAMENTO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

As diferentes subfrações derivadas do fracionamento preliminar por CLV das frações orgânicas dos extratos EAF e ECR, e do extrato bruto ELF de *V. tweedieana* foram submetidas a consecutivos processos de fracionamento cromatográfico, conforme *itens 4.4.1; 4.4.2 e 4.4.3*. Estas etapas permitiram a purificação e caracterização de 11 diferentes substâncias, denominadas de VT1 a VT11.

5.3.1 Investigação fitoquímica dos extratos EAF e ECR

5.3.1.1 Fracionamento das frações DM e AcOEt do extrato EAF

Das 11 substâncias identificadas, quatro denominadas VT1 a VT4, foram obtidas a partir do extrato de partes aéreas (EAF), sendo que VT1 foi purificada de subfrações de CLV da fração DM. As outras substâncias, VT2 e VT3 em mistura e VT4 foram obtidas de subfrações de CLV da fração AcOEt. Além destas, purificou-se novamente a substância VT1 a partir da fração AcOEt do extrato EAF.

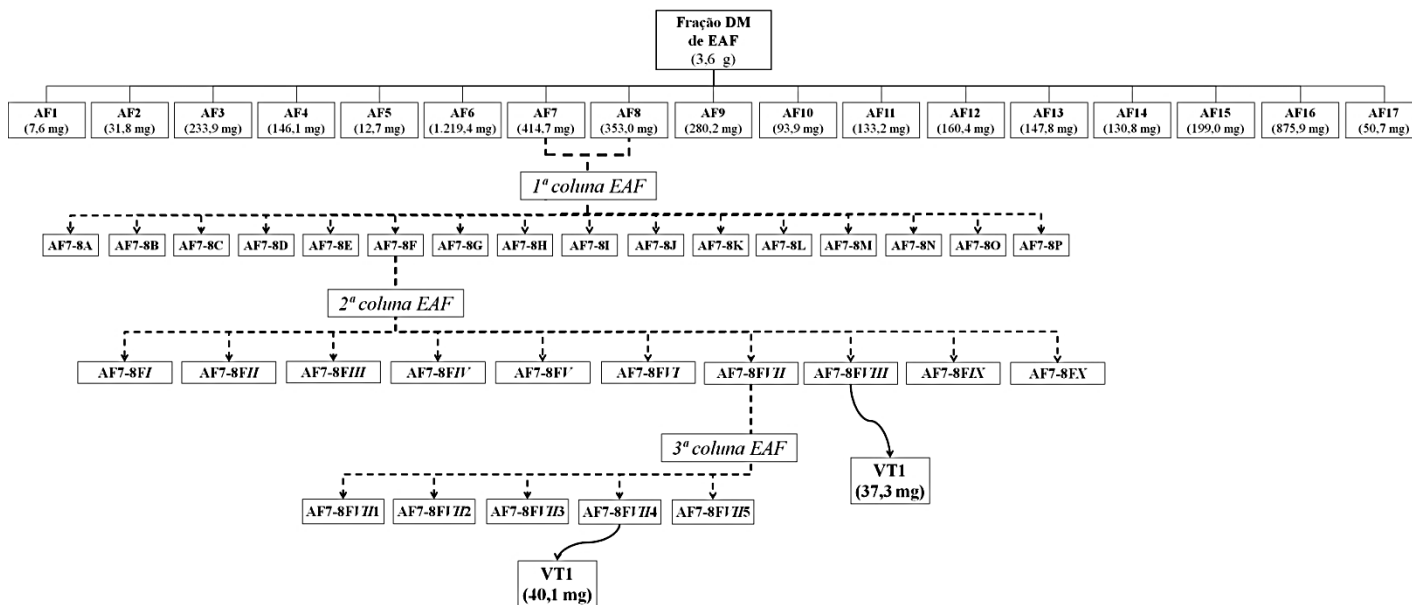
Os Fluxogramas 6 e 7 apresentam as etapas envolvidas no fracionamento das subfrações da fração DM e AcOEt, respectivamente, para a purificação das quatro substâncias, VT1 a VT4.

5.3.1.2 Fracionamento da fração DM e AcOEt do extrato ECR

Foram purificadas outras seis substâncias derivadas do extrato ECR, denominadas VT5 a VT10. Das subfrações da CLV da fração DM foram obtidas duas substâncias, VT5 e VT6 em mistura. Já para as subfrações de CLV da fração AcOEt obtiveram-se quatro substâncias, VT7, VT8 e VT9 em mistura, e VT10. Além destas, purificou-se também da fração AcOEt de ECR a substância VT4.

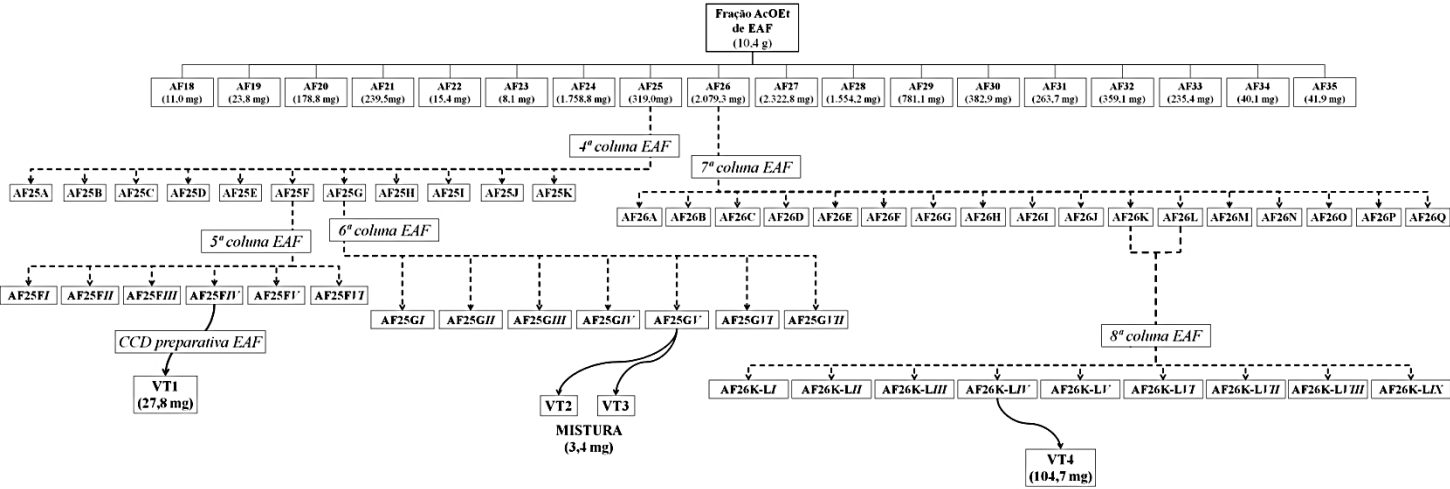
As etapas de purificação das substâncias VT5 a VT10 estão apresentadas nos Fluxogramas 8 e 9, que descrevem o fracionamento das subfrações da fração DM e AcOEt, respectivamente.

Fluxograma 6 – Etapas do fracionamento cromatográfico da fração DM do extrato bruto de partes aéreas (EAF) de *Vernonanthura tweediana*.



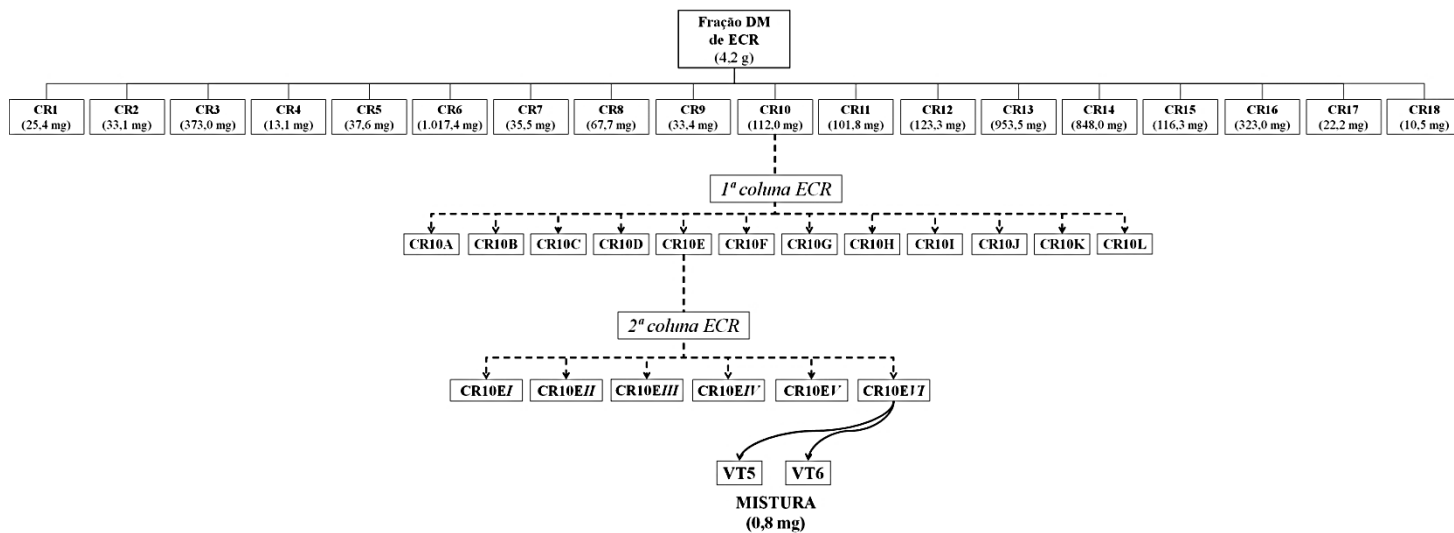
DM: diclorometano.

Fluxograma 7 – Etapas do fracionamento cromatográfico da fração AcOEt do extrato bruto de partes aéreas (EAF) de *Vernonanthura tweedieana*.



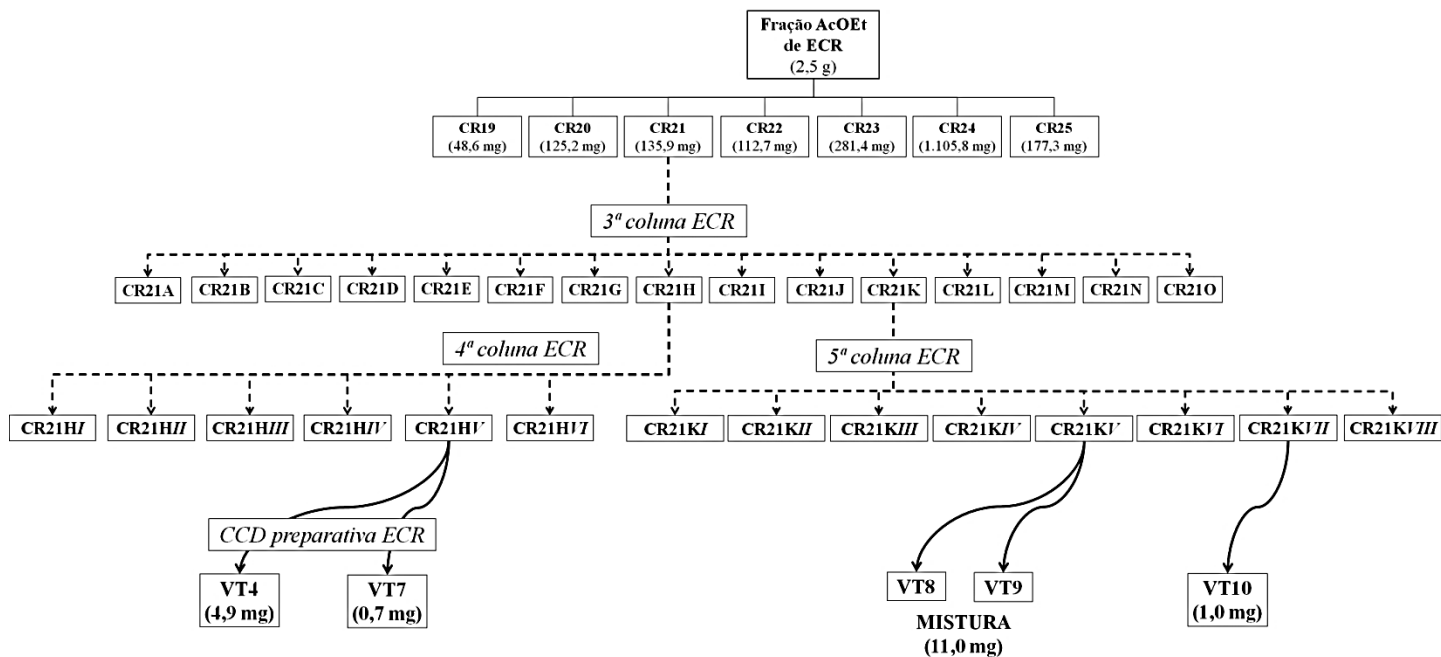
AcOEt: acetato de etila.

Fluxograma 8 – Etapas do fracionamento cromatográfico da fração DM do extrato bruto de caules e raízes (ECR) de *Vernonanthura tweediana*.



DM: diclorometano.

Fluxograma 9 – Etapas do fracionamento cromatográfico da fração AcOEt do extrato bruto de caules e raízes (ECR) de *Vernonanthura tweedieana*.



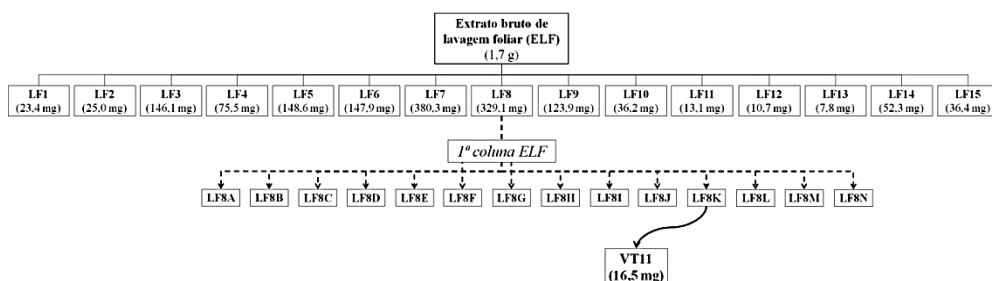
AcOEt: acetato de etila.

5.3.2 Pesquisa de LS do extrato ELF

O fracionamento cromatográfico do extrato de lavagem foliar (ELF, 1,7 g) de *V. tweedieana* permitiu a obtenção de 15 subfrações, denominadas LF1 a LF15. Destas, a subfração LF8 foi submetida a processo de purificação até o isolamento da substância VT11.

O Fluxograma 10 apresenta as etapas envolvidas na purificação da substância VT11, também presente no extrato ELF.

Fluxograma 10 – Etapas do fracionamento cromatográfico do extrato bruto de lavagem foliar (ELF) de *Vernonanthura tweedieana*.

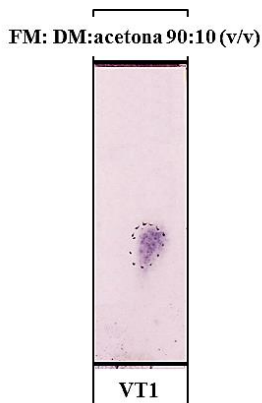


5.4 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL

5.4.1 Substância VT1 (Cafeato de etila)

Foi obtida na forma de pó amarelado (105,2 mg). Na análise por CCD, empregando eluente composto por DM:acetona 90:10 (v/v) observou-se mancha ($R_f=0,28$) de coloração amarela sob luz visível, extinção (254 nm) roxa e fluorescência (366 nm) azul. Após revelação com anisaldeído sulfúrico, apresentou coloração roxa-acinzentada, conforme ilustrado na Figura 12.

Figura 12 - Análise por cromatografia em camada delgada da substância VT1 (cafeato de etila) de *Vernonanthura tweedieana*.



Cromatograma da substância VT1 (cafeato de etila) de *V. tweedieana*, revelado com anisaldeído sulfúrico. **FM**: fase móvel; **DM**: diclorometano.

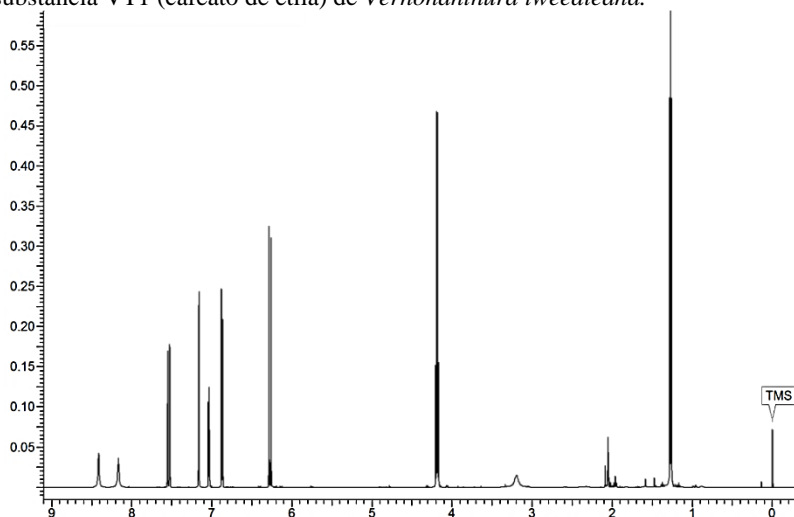
A análise de ^1H RMN (Figura 13) mostra dois sinais de duplete em 7,54 (1H, H-7) e 6,27 (1H, H-8) ppm, com $J=15,9$ Hz, indicativo de ligação dupla *trans* (Figura 14). Foram observados outros três sinais sugestivos de H de anel aromático (Figura 15), sendo dois dupletos em δ 7,16 (1H, $J=2,0$, H-2) e em δ 6,87 (1H, $J=8,2$, H-5), além de um duplete de duplete δ 7,04 (1H, $J=8,2$; 2,0, H-6). Os valores de J destes três hidrogênios sugerem ser substituintes do mesmo anel, com acoplamento entre si, estando o H δ 7,04 *dd* em posição *orto* em relação a δ 6,87 *d* e *meta* em relação a δ 7,16 *d*.

Evidenciou-se a presença de uma cadeia etilada, considerando a presença dos sinais em δ 1,27 (3H, H-2') na forma de tripleto ($J=7,2$) e δ 4,18 (2H, H-1') na forma de quadruplete ($J=7,2$), conforme ilustrado na Figura 16.

O mapa de correlações HSQC (Figura 17) permitiu identificar a presença dos carbonos olefínicos da ligação dupla *trans* em 145,2 (C-7) e 115,8 (C-8) ppm, bem como os carbonos aromáticos em δ 115,2 (C-2), δ 116,3 (C-5) e δ 122,3 (C-6).

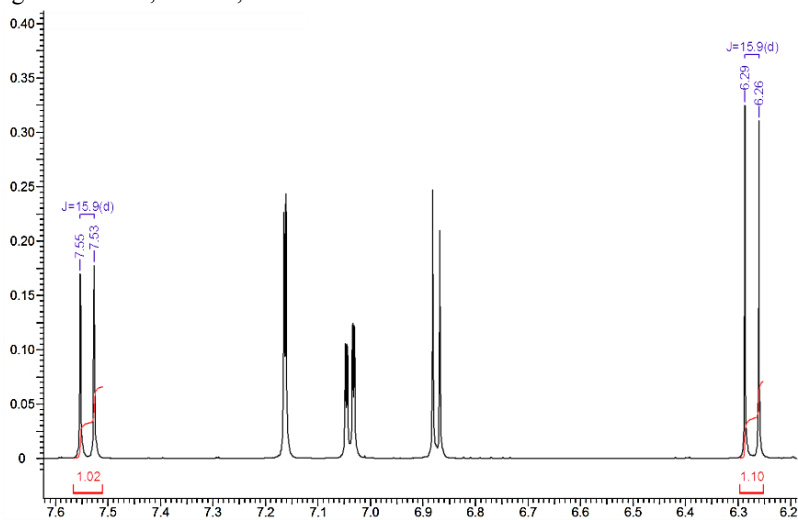
Também é possível observar os carbonos sp^3 em δ 14,7 (C-2'), característico de metila terminal, e em δ 60,5 (C-1'), indicativo de CH_2 vizinho a elemento eletronegativo.

Figura 13 – Espectro de ^1H RMN (600 MHz, TMS, acetona- d_6) para a substância VT1 (cafeato de etila) de *Vernonanthura tweediana*.



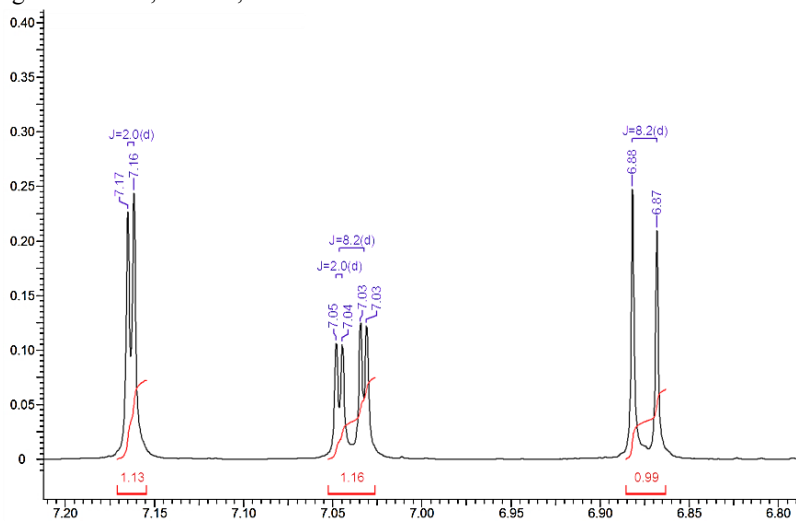
Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Figura 14 – Espectro de ^1H RMN (600 MHz, TMS, acetona- d_6) para a substância VT1 (cafeato de etila) de *Vernonanthura tweediana*, ampliado na região entre δ 6,20 e δ 7,60.



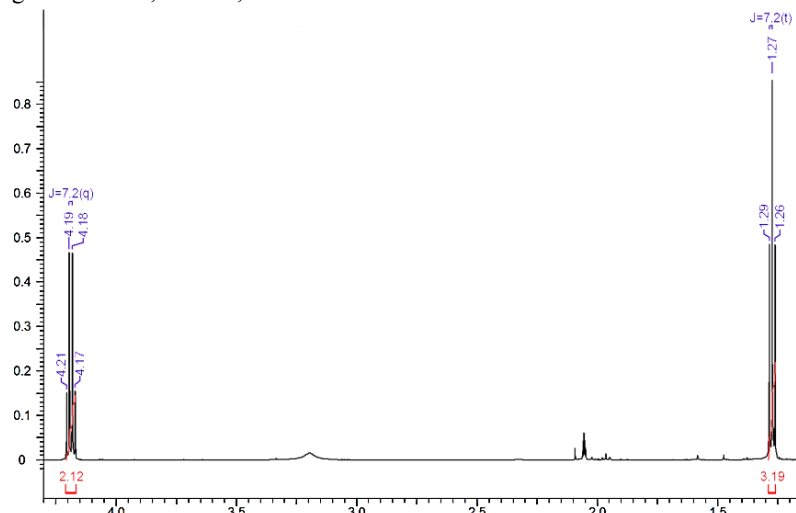
Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Figura 15 – Espectro de ^1H RMN (600 MHz, TMS, acetona- d_6) para a substância VT1 (cafeato de etila) de *Vernonanthura tweedieana*, ampliado na região entre δ 6,80 e δ 7,20.



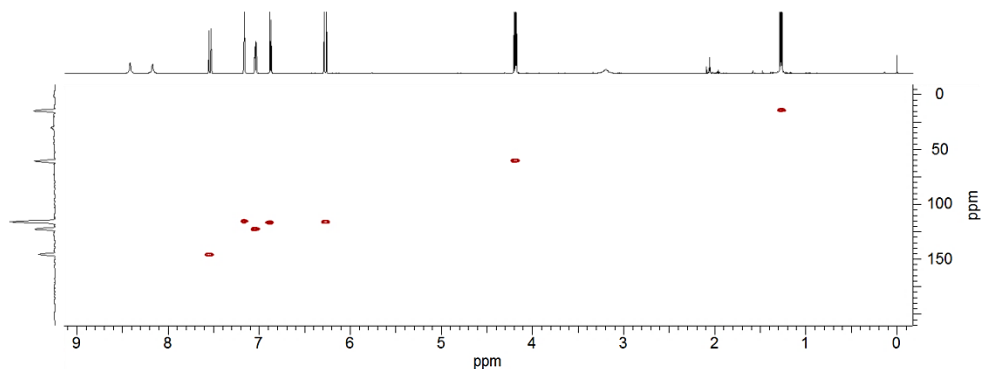
Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Figura 16 – Espectro de ^1H RMN (600 MHz, TMS, acetona- d_6) para a substância VT1 (cafeato de etila) de *Vernonanthura tweedieana*, ampliado na região entre δ 1,20 e δ 4,20.



Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Figura 17 – Mapa de correlação HSQC (600 MHz ^1H e 125 MHz ^{13}C , TMS, acetona- d_6) para a substância VT1 (cafeato de etila) de *Vernonanthura tweedieana*.



Na análise de HMBC (Figura 18), é possível observar as correlações dos hidrogênios olefinicos δ 7,54 *d* e δ 6,27 *d* com um carbono carbonílico em 167,4 (C-9) ppm, indicativo de éster. Esta carbonila que também tem correlação com os hidrogênios do metileno em δ 60,5, sugerindo se tratar de éster etílico. Ainda é possível observar a presença de outros três carbonos quaternários, em 127,5 (C-1) ppm, típico de carbono sp^2 aromático, e em 146,4 (C-3) e 148,7 (C-4) ppm, indicando carbonos aromáticos oxigenados.

Figura 18 – Mapa de correlação HMBC (600 MHz ^1H e 125 MHz ^{13}C , TMS, acetona- d_6) para a substância VT1 (cafeato de etila) de *Vernonanthura tweedieana*.

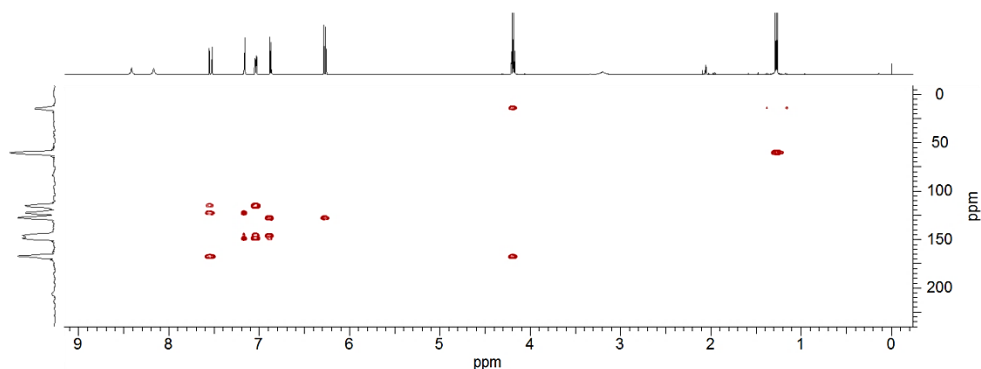
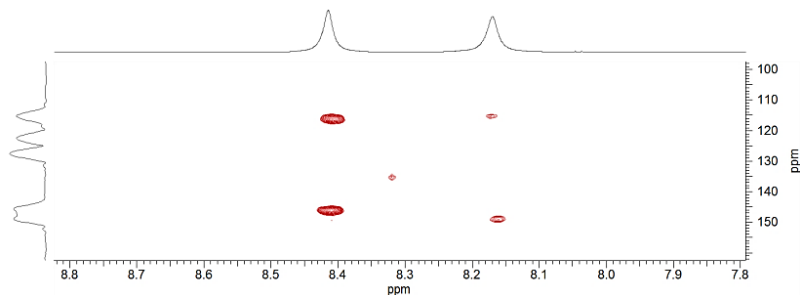


Figura 19 – Mapa de correlação HMBC (600 MHz ^1H e 125 MHz ^{13}C , TMS, acetona- d_6) para a substância VT1 (cafeato de etila) de *Vernonanthura tweediana*, ampliado na região entre δ 7,80 e δ 8,80 para ^1H , e entre δ 100 e δ 160 para ^{13}C .



Os sinais de simpleto largo em δ 8,17 (1H, OH-3) e δ 8,41 (1H, OH-4), por não apresentarem correlação com carbonos no experimento de HSQC sugerem se tratar de hidroxilas.

As correlações destes hidrogênios com carbonos do anel aromático, observado no mapa de HMBC, indica que estas hidroxilas são também substituintes do anel (Figura 19).

Os dados obtidos de ^1H RMN e ^{13}C RMN (derivados dos experimentos bidimensionais) foram comparados com a literatura, e os dados estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Dados de ^1H RMN e ^{13}C RMN para a substância VT1 (cafeato de etila) de *Vernonanthura tweediana*, e dados comparativos da literatura.

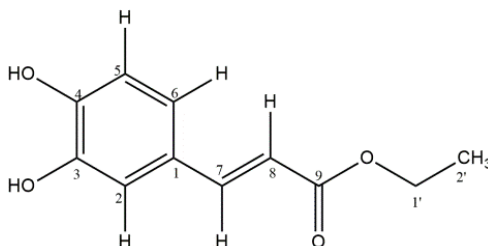
Posição	VT1		(UWAI et al., 2008)		(ARAÚJO, 2011)	
	δ ^1H mult. (J Hz)	δ ^{13}C	δ ^1H mult. (J Hz)	δ ^{13}C	δ ^1H mult. (J Hz)	δ ^{13}C
1	-	127,5	-	127,6	-	126,6
2	7,16 d (2,0)	115,2	7,16 d (2,0)	115,2	7,08 d (1,8)	114,0
3	-	146,4	-	146,2	-	145,6
4	-	148,7	-	148,6	-	148,4
5	6,87 d (8,2)	116,3	6,87 d (7,8)	116,3	6,82 d (8,4)	114,1
6	7,04 dd (8,2; 2,0)	122,3	7,03 dd (8,3; 2,0)	122,5	6,96 dd (8,1; 1,8)	121,8
7	7,54 d (15,9)	145,2	7,53 d (16,1)	145,5	7,56 d (15,6)	145,6
8	6,27 d (15,9)	115,8	6,27 d (16,1)	115,7	6,28 d (15,6)	115,4
9	-	167,4	-	167,4	-	168,3
OH-3	8,17 sl	-	8,29 sl	-	-	-
OH-4	8,41 sl	-	8,29 sl	-	-	-
1'	4,18 q (7,2)	60,5	4,17 q (7,3)	60,5	4,23 q	60,4
2'	1,27 t (7,2) (600 MHz ^1H , 125 MHz ^{13}C , acetona- d_6)	14,7	1,25 t (7,3) (400 MHz ^1H , 100 MHz ^{13}C , acetona- d_6)	14,6	1,25 t (300 MHz ^1H , 75 MHz ^{13}C , CD $_3$ OD)	13,5

A partir desses dados foi possível determinar que a substância VT1 corresponde ao derivado etoxilado do ácido cafeico, o cafeato de etila, conforme ilustrado na Figura 20.

Sua fórmula molecular é $C_{11}H_{12}O_4$, de peso molecular calculado 208,0736 g/mol, e com índice de insaturação de 6 (BUSKÜHL, 2007; UWAI et al., 2008; ARAÚJO, 2011; XIANG et al., 2011; FALCAO et al., 2013).

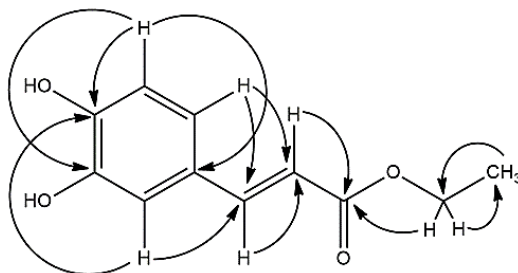
Algumas das correlações entre $^1H-^{13}C$ observadas no mapa de HMBC para a substância VT1 estão apresentadas na Figura 21.

Figura 20 – Estrutura molecular da substância VT1 (cafeato de etila) de *Vernonanthura tweedieana*.



Fonte: adaptado de Uwai et al. (2008) e Falcao et al. (2013).

Figura 21 – Correlações a longa distância entre $^1H-^{13}C$ (HMBC) da substância VT1 (cafeato de etila) de *Vernonanthura tweedieana*.



5.4.2 Substâncias VT2 (Naringenina) e VT3 (Crisoeriol)

As substâncias VT2 (naringenina) e VT3 (crisoeriol) foram elucidadas em mistura (3,4 mg). Por esse motivo, a elucidação estrutural

será discutida separadamente para cada substância, embora os espectros e mapas de correlação bidimensionais apresentados sejam comuns às duas.

A Figura 22 mostra o espectro de ^1H RMN das substâncias, sendo possível observar a presença de sinais desblindados na região entre 6,0 e 7,0 ppm, indicativo de hidrogênios ligados a carbono sp^2 , mais especialmente de anel aromático.

Para a substância VT2, o espectro de ^1H RMN mostra dois sinais de duplete em δ 5,96 (1H, $J=2,1$, H-8) e δ 5,95 (1H, $J=2,1$, H-6) característico de hidrogênios *meta* substituídos de anel aromático. Além desses, foram observados três hidrogênios na forma de duplete de duplete, em δ 5,45 ($J=12,9$; 3,0, H-2), δ 3,17 ($J=17,1$; 12,9, H-3a) e δ 2,74 ($J=17,1$; 3,0, H-3b). A constante de 17,1 Hz entre os dois últimos, característica de acoplamento geminal, indica que compõem um metileno, e que pelas demais constantes de acoplamento mostram-se vicinais ao H em 5,45 ppm (Figuras 23 e 24).

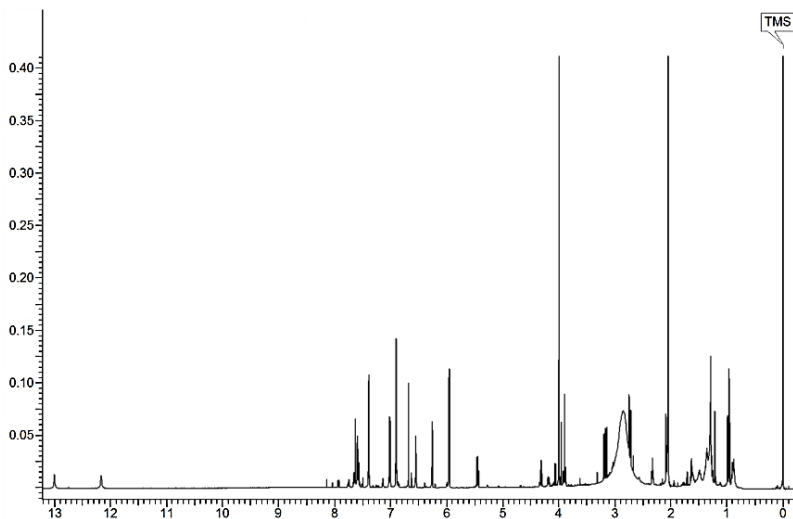
Foram observados dois sinais de duplete, cada um integrando para dois H, em δ 7,39 ($J=8,5$, H-2' e H-6') e em δ 6,90 ($J=8,5$, H-3' e H-5') sugerindo H simétricos, substituintes de anel aromático (Figura 25).

A análise do experimento de HSCQ (Figura 26) confirmou a existência do metileno formado pelos H δ 3,17 *dd* e δ 2,74 *dd*, cujo carbono está em 43,5 (C-3) ppm. Além disso, observa-se carbono em δ 80,0 (C-2) para o metino de H 5,54 *dd* ppm, indicando estar ligado a elemento eletronegativo (oxigênio).

Os demais carbonos hidrogenados confirmam se tratar de carbonos de anel aromático, sendo observados em δ 96,4 (C-6), δ 95,9 (C-8), δ 129,0 (C-2' e C-6') e δ 116,4 (C-3' e C-5').

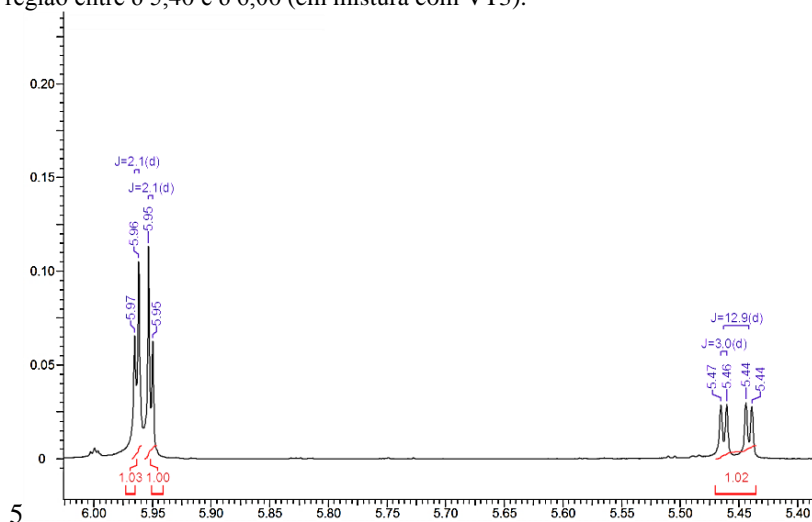
O mapa de correlações HMBC (Figura 27) mostrou sete carbonos quaternários, sendo um em δ 197,2 (C-4), típico de carbonila de cetona cíclica, quatro deles sugestivos de carbonos sp^2 oxigenados em anel aromático estando em δ 166,8 (C-5), δ 161,8 (C-7), δ 164,5 (C-9) e δ 158,7 (C-4'), além de dois outros em 103,2 (C-10) e 130,7 (C-1') ppm. Este último carbono correlacionando com os H em δ 3,17 *dd* e δ 5,45 *dd*, e os H em δ 3,17 *dd* e δ 2,74 *dd* correlacionado com o carbono carbonílico sugerem um esqueleto de flavanona.

Figura 22 – Espectro de ^1H RMN (600 MHz, TMS, acetona- d_6) para as substâncias VT2 (naringenina) e VT3 (crisoeriol) de *Vernonanthura tweedieana*.



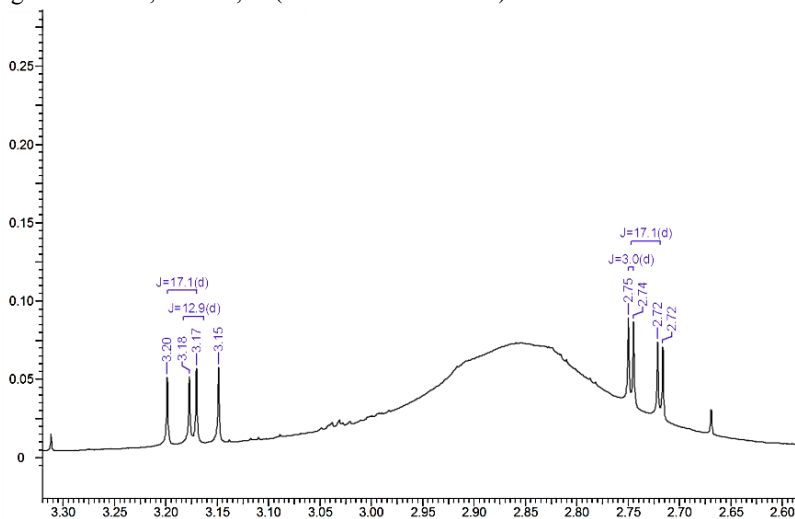
Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS - δ 0,00.

Figura 23 – Espectro de ^1H RMN (600 MHz, TMS, acetona- d_6) para a substância VT2 (naringenina) de *Vernonanthura tweedieana*, ampliado na região entre δ 5,40 e δ 6,00 (em mistura com VT3).



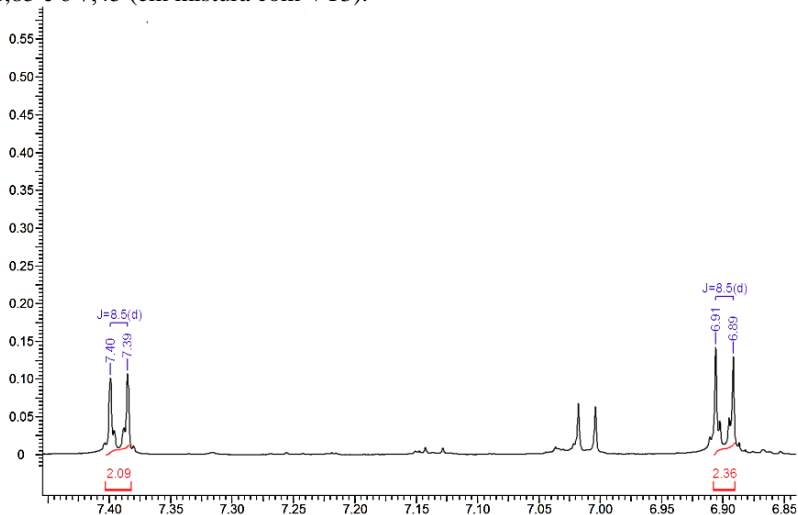
Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Figura 24 – Espectro de ^1H RMN (600 MHz, TMS, acetona- d_6) para a substância VT2 (naringenina) de *Vernonanthura tweedieana*, ampliado na região entre δ 2,60 e δ 3,30 (em mistura com VT3).



Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Figura 25 – Espectro de ^1H RMN (600 MHz) em acetona- d_6 para a substância VT2 (naringenina) de *Vernonanthura tweedieana*, ampliado na região entre δ 6,85 e δ 7,45 (em mistura com VT3).



Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Figura 26 – Mapa de correlação HSQC (600 MHz ^1H e 125 MHz ^{13}C , TMS, acetona- d_6) para as substâncias VT2 (naringenina) e VT3 (crisoeriol) de *Vernonanthura tweediana*.

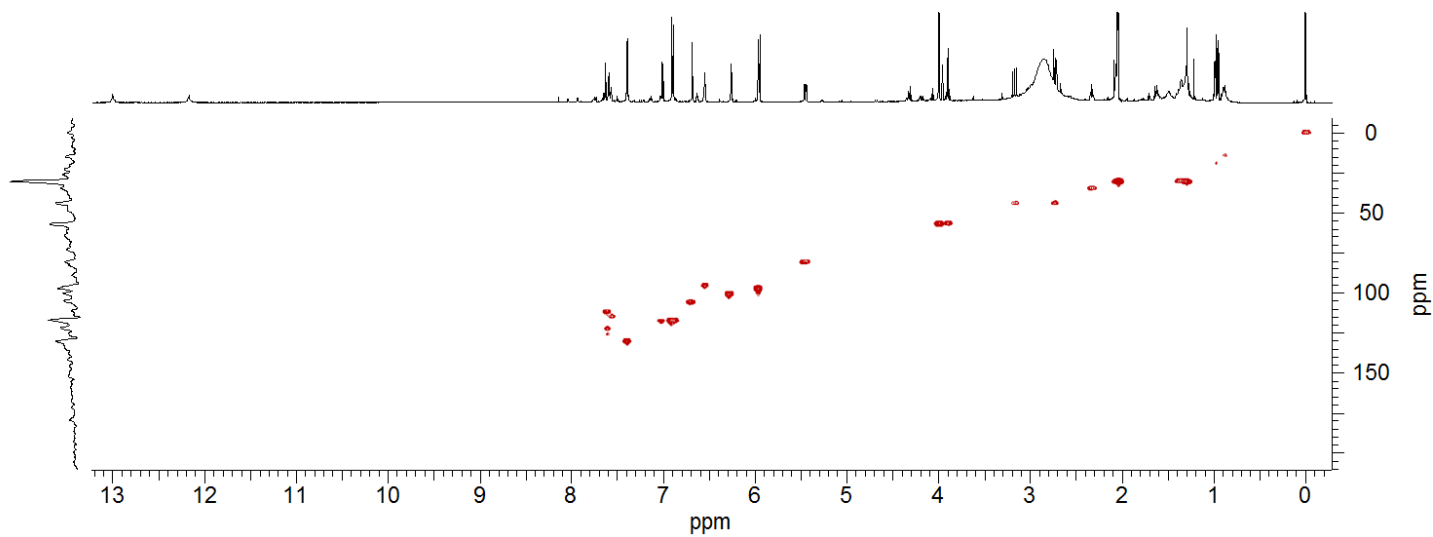
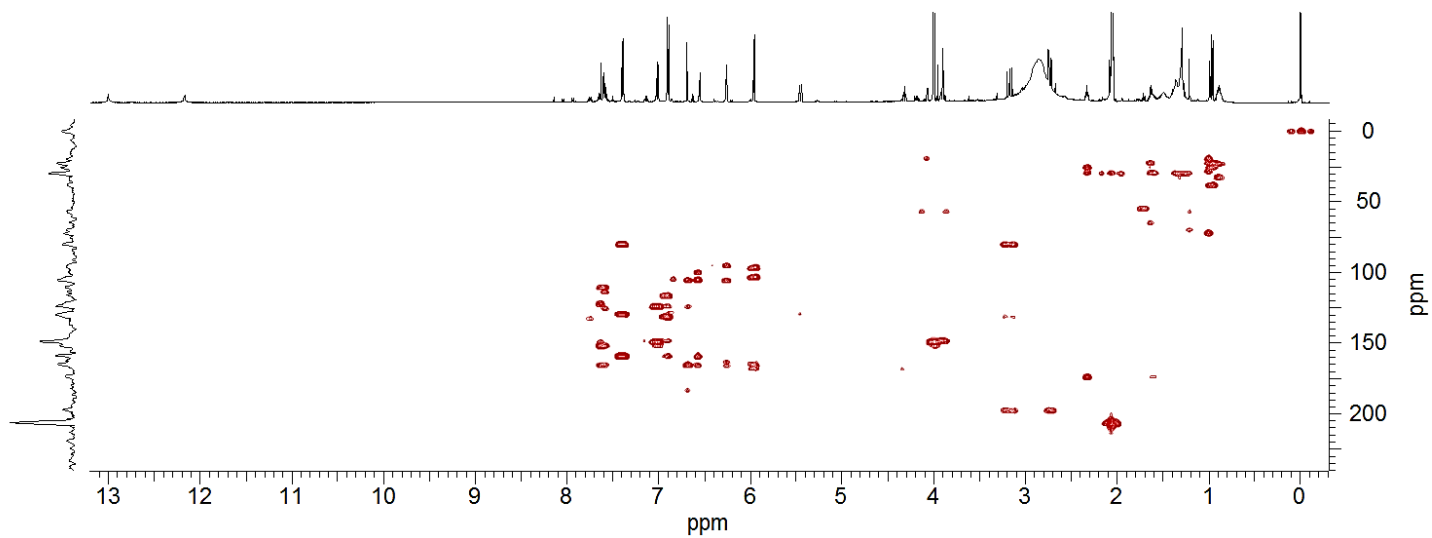


Figura 27 – Mapa de correlação HMBC (600 MHz ^1H e 125 MHz ^{13}C , TMS, acetona- d_6) para as substâncias VT2 (naringenina) e VT3 (crisoeriol) de *Vernonanthura tweediana*.



Para a substância VT3, a análise do espectro de ^1H RMN mostrou dois sinais de duplete em δ 6,55 (1H, $J=2,0$, H-8) e δ 6,26 (1H, $J=2,0$, H-6) também típicos de H *meta* substituídos de anel aromático. Mostra um simpleto em 6,69 (1H, H-3), cujo valor mais desblindado sugere hidrogênio olefínico (Figura 28).

Observam-se três H característicos de anel aromático (Figura 29), sendo dois dupletos em δ 7,63 (1H, $J=2,1$, H-2') e em δ 7,01 (1H, $J=8,3$, H-5'), e um duplete de duplete δ 7,60 (1H, $J=8,3$; 2,1, H-6'). As constantes de acoplamento desses H sugerem anel aromático trissubstituído, dispostos em posição *orto* o H δ 7,60 *dd* em relação a δ 7,01 *d* e em *meta* em relação a δ 7,63 *d*.

A Figura 30 mostra um sinal de simpleto em 4,00 (3H, H-1'') ppm, sugerindo uma metila ligada a oxigênio, típico de radical metoxi.

O mapa de correlação de HSCQ (Figura 26) confirmou a existência de um carbono olefínico em 104,5 (C-3) ppm além dos carbonos sp^2 de aromáticos δ 99,7 (C-6), δ 94,7 (C-8), δ 110,7 (C-2'), δ 116,4 (C-5') e δ 121,4 (C-6').

Os dados de HMBC (Figura 27) mostram a presença de um segundo carbono olefínico em 164,9 (C-2) ppm, de um carbono carbonílico em δ 182,9 (C-4) indicando cetona α,β -insaturada.

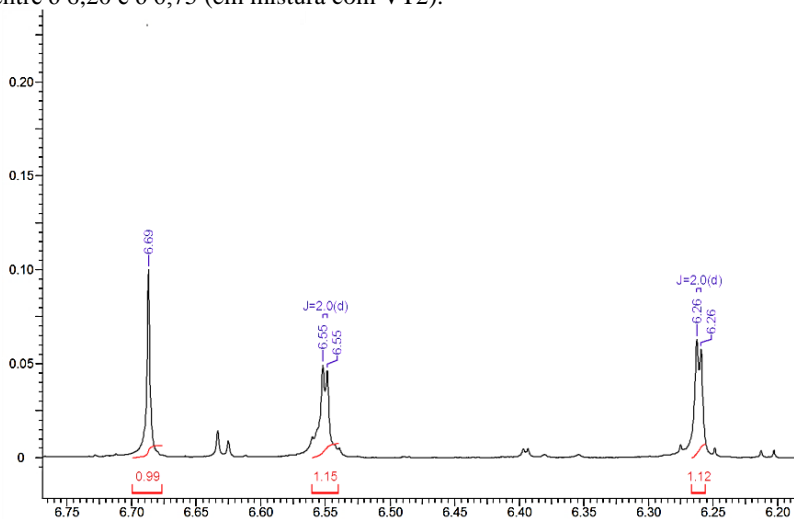
Foram observados quatro carbonos quaternários em δ 163,3 (C-5), δ 165,0 (C-7), δ 151,3 (C-4') e δ 148,8 (C-3'), este correlacionando com os hidrogênios do radical metoxi (indicando assim sua posição com substituinte).

Observam-se dois sinais de simpleto em δ 13,00 e δ 12,17, sugestivos de hidroxilas em queladas a carbonila. A ausência de correlações destes sinais com carbonos confirma a hipótese de se tratarem de hidroxilas.

Por não se observar correlações das hidroxilas com ^{13}C no experimento bidimensional de HMBC, torna-se difícil a determinação de qual das substâncias cada OH pertence. Entretanto, a partir da comparação com os dados de literatura é possível atribuir a hidroxila em 12,17 (OH-5) ppm à substância VT2 (naringenina) e a hidroxila 13,00 (OH-5) ppm à substância VT3 (crisoeriol).

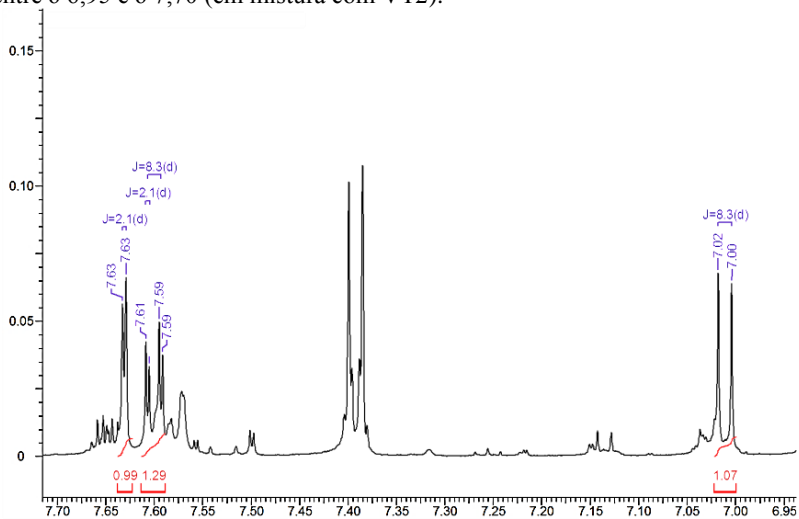
Os dados obtidos de ^1H RMN e ^{13}C RMN para a substância VT2 estão apresentados com os dados comparativos da literatura na Tabela 2.

Figura 28 – Espectro de ^1H RMN (600 MHz, TMS, acetona- d_6) para a substância VT3 (crisoeriol) de *Vernonanthura tweedieana*, ampliado na região entre δ 6,20 e δ 6,75 (em mistura com VT2).



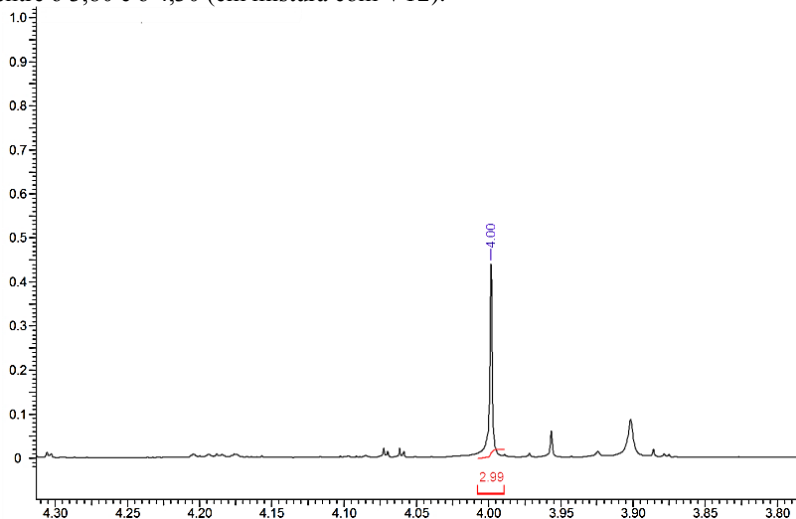
Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Figura 29 – Espectro de ^1H RMN (600 MHz, TMS, acetona- d_6) para a substância VT3 (crisoeriol) de *Vernonanthura tweedieana*, ampliado na região entre δ 6,95 e δ 7,70 (em mistura com VT2).



Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Figura 30 – Espectro de ^1H RMN (600 MHz, TMS, acetona- d_6) para a substância VT3 (crisoeriol) de *Vernonanthura tweedieana*, ampliado na região entre δ 3,80 e δ 4,30 (em mistura com VT2).



Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

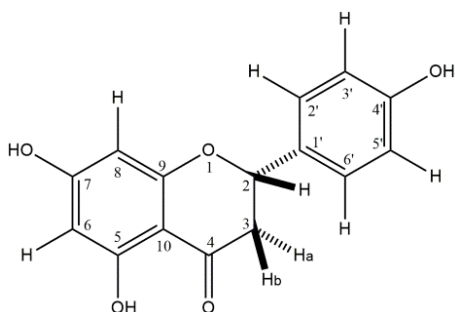
Tabela 2 – Dados de ^1H RMN e ^{13}C RMN para a substância VT2 (naringenina) de *Vernonanthura tweedieana*, e dados comparativos da literatura.

Posição	VT2		(FATOPE et al., 2003)		(SELENSKI; PETTUS, 2006)	
	δ ^1H mult. (J Hz)	δ ^{13}C	δ ^1H mult. (J Hz)	δ ^{13}C	δ ^1H mult. (J Hz)	δ ^{13}C
1	-	-	-	-	-	-
2	5,45 <i>dd</i> (12,9; 3,0)	80,0	5,45 <i>d</i> (13,0)	79,0	5,44-5,48 <i>m</i>	80,0
3a	3,17 <i>dd</i> (17,1; 12,9)	43,5	3,17 <i>dd</i> (17,0; 13,0)	42,6	3,15-3,22 <i>m</i>	43,6
3b	2,74 <i>dd</i> (17,1; 3,0)		2,70 <i>d</i> (17,0)		2,70-2,5 <i>m</i>	
4	-	197,2	-	196,3	-	197,4
5	-	166,8	-	164,4	-	167,3
6	5,95 <i>d</i> (2,1)	96,4	5,96 <i>s</i>	95,9	5,95 <i>s</i>	96,8
7	-	161,8	-	166,4	-	164,5
8	5,96 <i>d</i> (2,1)	95,9	5,96 <i>s</i>	95,9	5,94 <i>s</i>	95,9
9	-	164,5	-	163,5	-	165,4
10	-	103,2	-	102,3	-	103,3
1'	-	130,7	-	128,1	-	130,9
2'	7,39 <i>d</i> (8,5)	129,0	7,40 <i>d</i> (7,6)	129,9	7,39 <i>d</i> (9,0)	129,1
3'	6,90 <i>d</i> (8,5)	116,4	6,91 <i>d</i> (7,6)	115,3	6,90 <i>d</i> (9,0)	116,3
4'	-	158,7	-	157,8	-	158,8
5'	6,90 <i>d</i> (8,5)	116,4	6,91 <i>d</i> (7,6)	115,3	6,90 <i>d</i> (9,0)	116,3
6'	7,39 <i>d</i> (8,5)	129,0	7,40 <i>d</i> (7,6)	129,9	7,39 <i>d</i> (9,0)	129,1
OH-5	12,17 <i>s</i>	-	-	-	12,19 <i>s</i>	-
	(600 MHz ^1H , 125 MHz ^{13}C , acetona- d_6)		(400 MHz ^1H , 100 MHz ^{13}C , acetona- d_6)		(400 MHz ^1H , 100 MHz ^{13}C , acetona- d_6)	

Pode-se determinar com estes dados que a substância VT2 trata-se da flavanona naringenina ou 5,7,4'-trihidroxi-flavanona, ilustrada na Figura 31.

Sua fórmula molecular é $C_{15}H_{12}O_5$ e peso molecular calculado de 272,0685 g/mol. O grau de insaturação é de 10 (ABE; SATO; SAKAMURA, 1987; FATOPE et al., 2003; SELENSKI; PETTUS, 2006; PENSO et al., 2014)

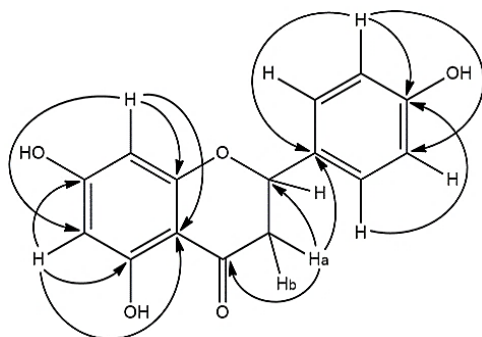
Figura 31 – Estrutura molecular da substância VT2 (naringenina) de *Vernanthura tweedieana*.



Fonte: adaptado de Ibrahim et al. (2014) e Penso et al. (2014).

A Figura 32 ilustra as principais correlações entre $^1H-^{13}C$ observadas do experimento de HMBC para a substância VT2 (naringenina).

Figura 32 – Correlações a longa distância entre $^1H-^{13}C$ (HMBC) da substância VT2 (naringenina) de *Vernanthura tweedieana*.



Os dados obtidos de ^1H RMN e ^{13}C RMN para a substância VT3 estão apresentados com os dados comparativos da literatura na Tabela 3.

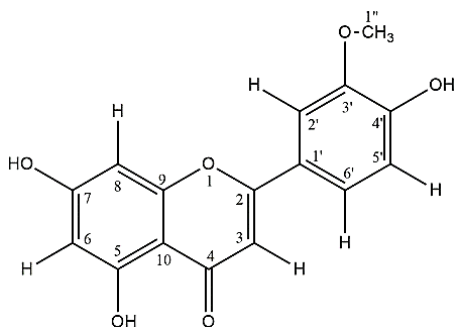
Tabela 3 – Dados de ^1H RMN e ^{13}C RMN para a substância VT3 (crisoeriol) de *Vernonanthura tweedieana*, e dados comparativos da literatura.

Posição	VT3		(AHMED, 2014)	(KHALIFA; YOUSSEF, 2001)	
	δ ^1H <i>mult.</i> (J Hz)	δ ^{13}C	δ ^1H <i>mult.</i> (J Hz)	δ ^1H <i>mult.</i> (J Hz)	δ ^{13}C
1	-	-	-	-	-
2	-	164,9	-	-	164,2
3	6,69 <i>s</i>	104,5	6,69 <i>s</i>	6,82 <i>s</i>	106,8
4	-	182,9	-	-	181,9
5	-	163,3	-	-	161,5
6	6,26 <i>d</i> (2,0)	99,7	6,25 <i>d</i> (2,1)	6,19 <i>d</i> (2,1)	98,9
7	-	165,0	-	-	163,7
8	6,55 <i>d</i> (2,0)	94,7	6,55 <i>d</i> (2,1)	6,49 <i>d</i> (2,1)	94,1
9	-	158,7	-	-	157,4
10	-	105,2	-	-	103,3
1'	-	123,6	-	-	121,6
2'	7,63 <i>d</i> (2,1)	110,7	7,63 <i>d</i> (2,1)	7,54 <i>d</i> (2,3)	110,2
3'	-	148,8	-	-	150,8
4'	-	151,3	-	-	148,1
5'	7,01 <i>d</i> (8,3)	116,4	7,00 <i>d</i> (8,3)	6,93 <i>d</i> (8,9)	115,8
6'	7,60 <i>dd</i> (8,3; 2,1)	121,4	7,60 <i>dd</i> (8,3; 2,1)	7,54 <i>dd</i> (8,9; 2,3)	120,4
1'' (OCH ₃)	4,00 <i>s</i>	56,6	4,00 <i>s</i>	3,95 <i>s</i>	56,0
OH-5	13,00 <i>s</i>	-	13,01 <i>s</i>	12,9 <i>s</i>	-
	(600 MHz ^1H , 125 MHz ^{13}C , acetona- <i>d</i> 6)		(300 MHz ^1H , DMSO- <i>d</i> 6)	(300 MHz ^1H , 75 MHz ^{13}C , CD ₃ OD)	

A partir dos dados determina-se que a substância VT3 trata-se da flavona crisoeriol ou 5,7,4'-trihidroxi-3'-metoxi-flavona (Figura 33).

Com fórmula molecular C₁₆H₁₂O₆, peso molecular calculado de 300,0634 g/mol, e grau de insaturação de 11 (LIN; KONG, 2006; BENTAMENE et al., 2008; AHMED, 2014).

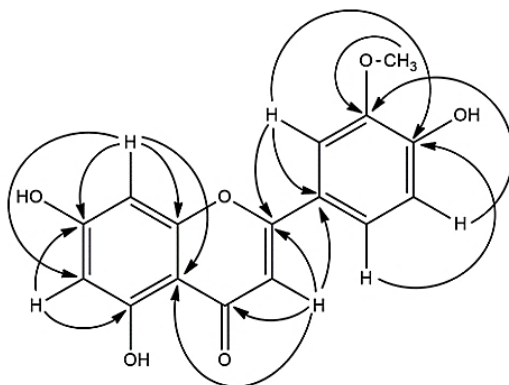
Figura 33 – Estrutura molecular da substância VT3 (crisoeriol) de *Vernonanthura tweedieana*.



Fonte: adaptado de Khalifa e Youssef (2001) e Lin e Kong (2006).

A Figura 34 ilustra as principais correlações entre ^1H - ^{13}C observadas do experimento de HMBC para a substância VT3 (crisoeriol).

Figura 34 – Correlações a longa distância entre ^1H - ^{13}C (HMBC) da substância VT3 (crisoeriol) de *Vernonanthura tweedieana*.



5.4.3 Substância VT4 (Eriodictiol)

Purificada na forma de pó amarelado um total de 109,6 mg. A análise por CCD de fase reversa, empregando eluente composto por MeOH:água 70:30 (v/v) mostrou uma mancha ($R_f=0,64$) de coloração

amarela sob luz visível, extinção (254 nm) e fluorescência (366 nm) roxa. Após revelação com anisaldeído sulfúrico, apresentou coloração alaranjada, conforme ilustrado na Figura 35.

Figura 35 - Análise por cromatografia em camada delgada da substância VT4 (eriodictiol) de *Vernonanthura tweedieana*.



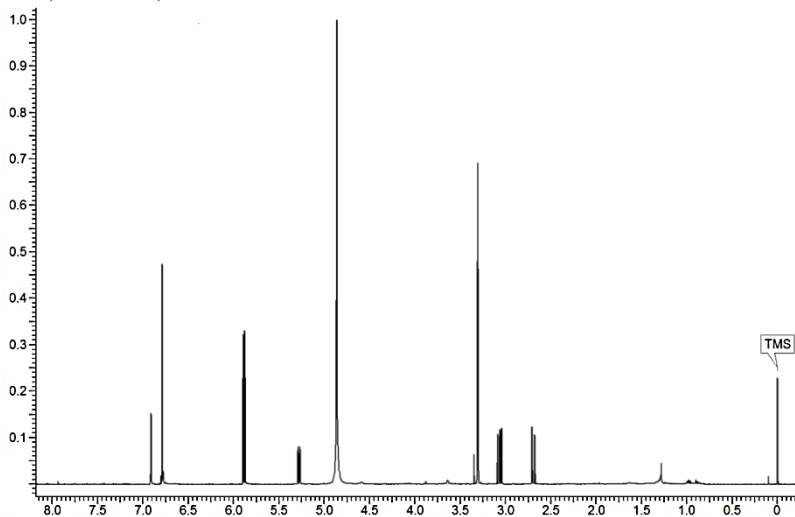
Cromatograma da substância VT4 (eriodictiol) de *V. tweedieana*, revelado com anisaldeído sulfúrico. **FM**: fase móvel; **MeOH**: metanol.

A análise do espectro de ^1H RMN da substância VT4 (Figura 36) mostrou dois sinais de duplete em δ 5,90 (1H, $J=2,2$, H-8) e δ 5,88 (1H, $J=2,2$, H-6) como sinais característicos de hidrogênios *meta* substituídos de anel aromático. Observa-se duplete de duplete em 5,28 (1H, $J=12,8$; 3,0, H-2), cujo valor de deslocamento químico mais desblindado sugere proximidade a elemento eletronegativo (Figura 37).

É possível observar outros dois hidrogênios na forma de duplete de duplete, em δ 3,06 ($J=17,2$; 12,8, H-3a) e δ 2,69 ($J=17,2$; 3,0, H-3b). O valor de J de 17,1 Hz entre estes hidrogênio é indicativo de acoplamento geminal, sugerindo um metileno. As demais constantes mostram um acoplamento vicinal destes hidrogênios com o H em 5,45 ppm (Figura 38).

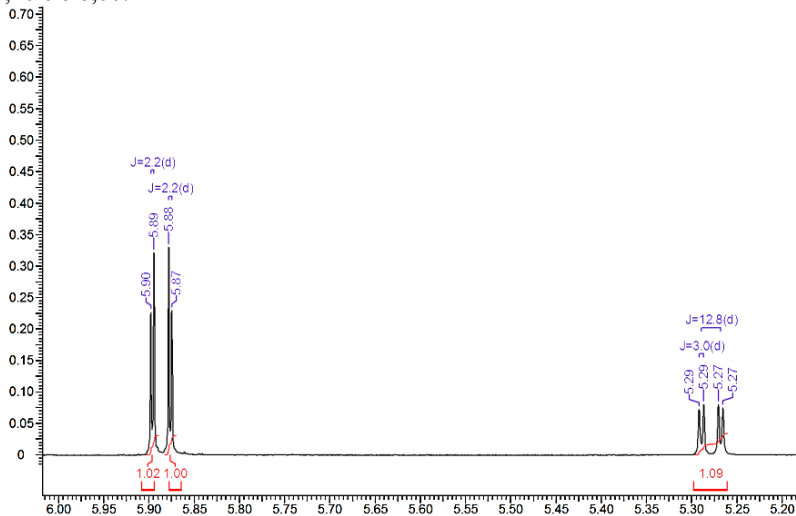
Observam-se mais três hidrogênios indicativos de anel aromático (Figura 39) na forma de multipletos em δ 6,91 (1H, H-2'), δ 6,78 (1H, H-5') e δ 6,79 (1H, H-6').

Figura 36 – Espectro de ^1H RMN (600 MHz, TMS, CD_3OD) para a substância VT4 (eriodictiol) de *Vernonanthura tweedieana*.



Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Figura 37 – Espectro de ^1H RMN (600 MHz, TMS, CD_3OD) para a substância VT4 (eriodictiol) de *Vernonanthura tweedieana*, ampliado na região entre δ 5,20 e δ 6,00.



Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Figura 38 – Espectro de ^1H RMN (600 MHz, TMS, CD_3OD) para a substância VT4 (eriodictiol) de *Vernonanthura tweedieana*, ampliado na região entre δ 2,60 e δ 3,20.

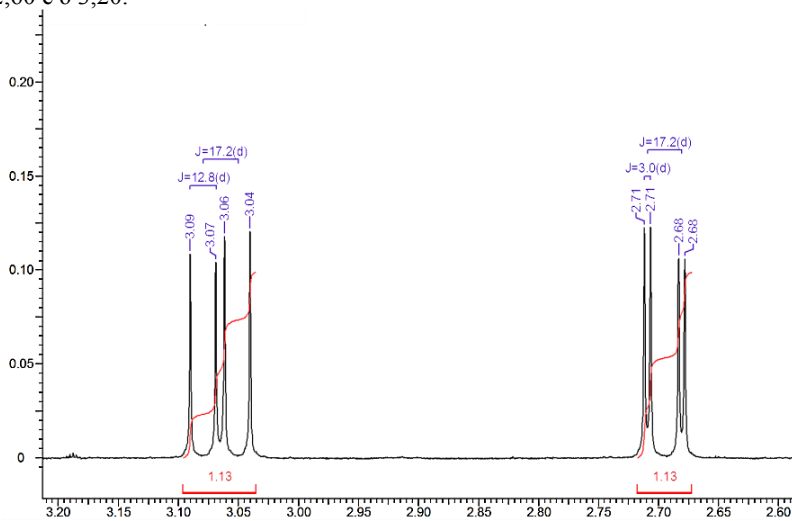
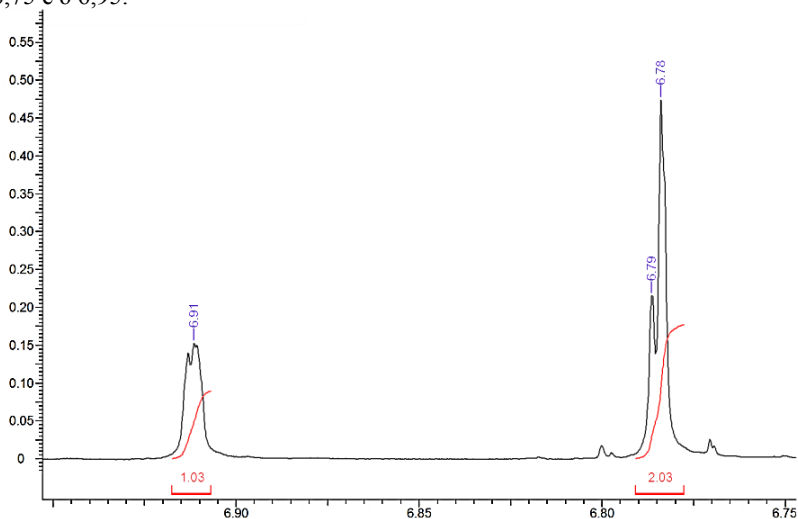


Figura 39 – Espectro de ^1H RMN (600 MHz, TMS, CD_3OD) para a substância VT4 (eriodictiol) de *Vernonanthura tweedieana*, ampliado na região entre δ 6,75 e δ 6,95.



A análise do mapa de correlações de HSCQ (Figura 40) evidencia a presença de um metileno formado pelos H δ 3,06 *dd* e δ 2,69 *dd*, de carbono em δ 44,2 (C-3).

Foi possível observar, também, um carbono em 80,7 (C-2) ppm, formando um metino de H em 5,28 *dd* ppm, indicando proximidade a elemento eletronegativo (oxigênio). Confirmou-se a existência de carbonos sp^2 hidrogenados, típicos de carbonos de anel aromático, em δ 97,2 (C-6), δ 96,2 (C-8), δ 114,7 (C-2'), δ 116,6 (C-5') e em δ 119,2 (C-6').

O experimento de HMBC (Figura 41) mostrou oito carbonos quaternários, sendo um carbono carbonílico em δ 197,8 (C-4), típico de cetona cíclica, cinco carbonos sp^2 oxigenados em anel aromático estando em δ 165,6 (C-5), δ 168,6 (C-7), δ 164,9 (C-9), δ 146,1 (C-3') e δ 158,7 (C-4'), bem como dois outros em δ 103,5 (C-10) e δ 131,8 (C-1').

As correlações ente 1H - ^{13}C do metileno (δ 3,06 *dd* e δ 2,69 *dd*) e do metino (5,28 *dd*), e de seus hidrogênios com carbono carbonílico sugerem, novamente, um esqueleto de flavanona.

Figura 40 – Mapa de correlação HSQC (600 MHz 1H e 125 MHz ^{13}C , TMS, CD_3OD) para as substâncias VT4 (eriodictiol) de *Vernonanthura tweedieana*.

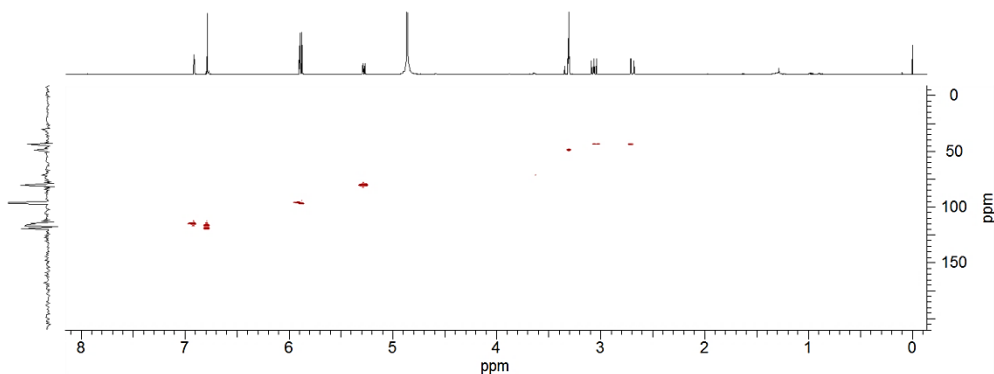
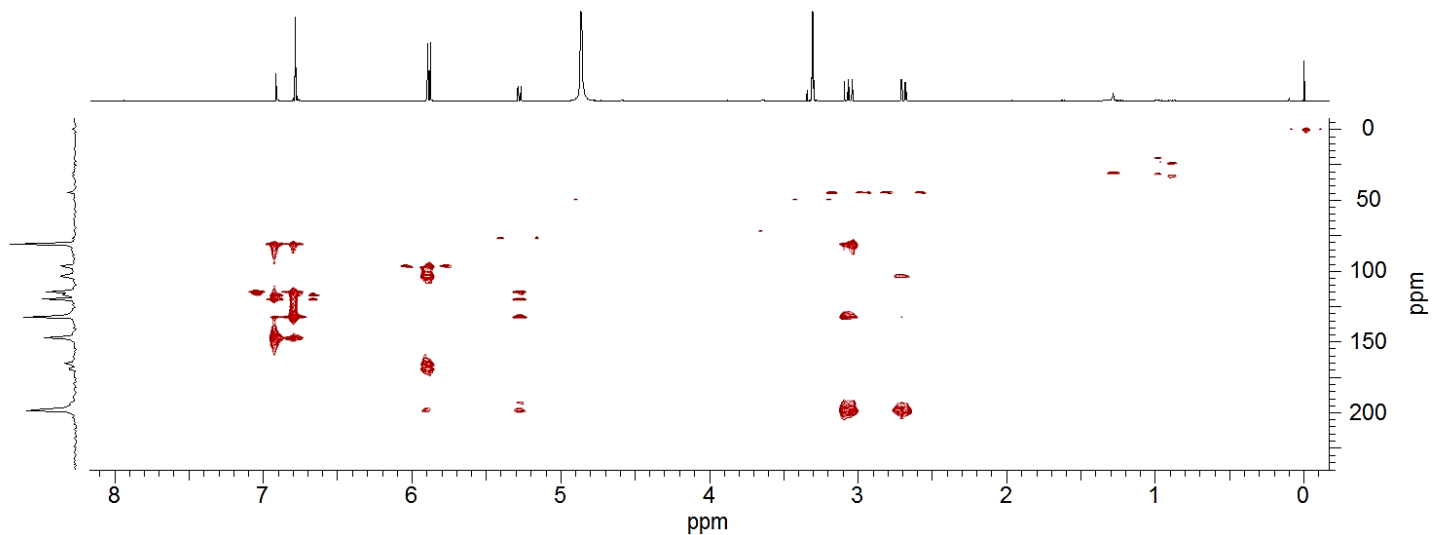


Figura 41 – Mapa de correlação HMBC (600 MHz ^1H e 125 MHz ^{13}C , TMS, CD_3OD) para as substâncias VT4 (eriodictiol) de *Vernonanthura tweedieana*.



Os dados de ^1H RMN e ^{13}C RMN obtidos para a substância VT4 foram comparados com a literatura, e os dados estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Dados de ^1H RMN e ^{13}C RMN para a substância VT4 (eriodictiol) de *Vernonanthura tweedieana*, e dados comparativos da literatura.

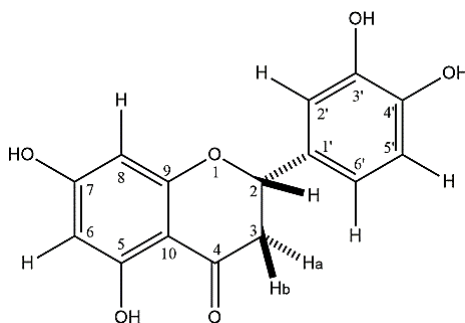
Posição	VT4		(HUANG et al., 2014)		(JÚNIOR et al., 2008)	
	δ ^1H <i>mult. (J Hz)</i>	δ ^{13}C	δ ^1H <i>mult. (J Hz)</i>	δ ^{13}C	δ ^1H <i>mult. (J Hz)</i>	δ ^{13}C
1	-	-	-	-	-	-
2	5,28 <i>dd</i> (12,8; 3,0)	80,7	5,36 <i>dd</i> (12,9; 2,9)	79,9	5,17 <i>dd</i> (12,5; 3,0)	80,4
3a	3,06 <i>dd</i> (17,2; 12,8)		2,69 <i>dd</i> (17,4; 2,9)		2,96 <i>dd</i> (17,0; 12,5)	
3b	2,69 <i>dd</i> (17,2; 3,0)	44,2	2,69 <i>dd</i> (17,4; 2,9)	43,4	2,61 <i>dd</i> (17,0; 3,0)	44,0
4	-	197,8	-	197,3	-	197,7
5	-	165,6	-	165,1	-	165,4
6	5,88 <i>d</i> (2,2)	97,2	5,91 <i>d</i> (2,1)	96,7	5,79 <i>d</i> (2,0)	97,0
7	-	168,6	-	167,7	-	168,3
8	5,90 <i>d</i> (2,2)	96,2	5,93 <i>d</i> (2,1)	95,8	5,80 <i>d</i> (2,0)	96,2
9	-	164,9	-	164,8	-	164,8
10	-	103,5	-	103,8	-	103,3
1'	-	131,8	-	131,2	-	131,7
2'	6,91 <i>m</i>	114,7	7,01 <i>s</i>	114,6	6,83 <i>sl</i>	114,7
3'	-	146,1	-	146,1	-	146,4
4'	-	147,1	-	146,5	-	146,8
5'	6,78 <i>m</i>	116,6	6,84 <i>s</i>	115,9	6,68-6,71 <i>m</i>	116,2
6'	6,79 <i>m</i> (600 MHz ^1H , 125 MHz ^{13}C , CD_3OD)	119,2	6,84 <i>s</i> (400 MHz ^1H , 100 MHz ^{13}C , CD_3OD)	119,0	6,68-6,71 <i>m</i> (500 MHz ^1H , 75 MHz ^{13}C , CD_3OD)	119,2

A partir dessas informações foi possível sugerir que a substância VT4 trata-se da flavanona eriodictiol ou 5,7,3',4'-tetrahydroxi-flavanona (Figura 42). Seu peso molecular calculado é 288,0634 g/mol, fórmula molecular de $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_6$, e grau de insaturação de 10 (MIYAKE; YAMAMOTO; OSAWA, 1997; ZANON, 2006; JÚNIOR et al., 2008; IVANOVA; BABKIN, 2011; OLENNIKOV; TANKHAEVA; PARTILKHAEV, 2012)

O eriodictiol já foi previamente purificado a partir das folhas *V. tweedieana* (ZANON, 2006). Entretanto, é a primeira vez que esta flavanona está sendo reportada para os caules e raízes da espécie.

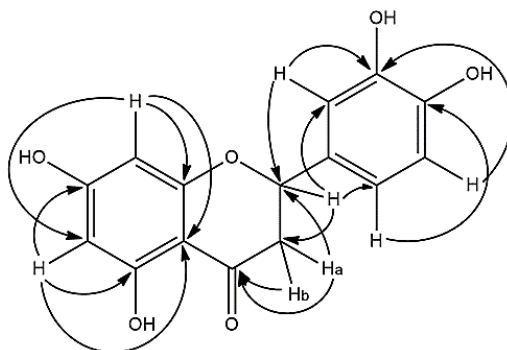
Na Figura 43 estão ilustradas algumas as principais correlações entre ^1H - ^{13}C observadas do experimento de HMBC para a substância VT4 (eriodictiol).

Figura 42 – Estrutura molecular da substância VT4 (eriodictiol) de *Vernonanthura tweedieana*.



Fonte: adaptado de Huang et al. (2014) e Júnior et al. (2008).

Figura 43 – Correlações a longa distância entre ^1H - ^{13}C (HMBC) da substância VT4 (eriodictiol) de *Vernonanthura tweedieana*.

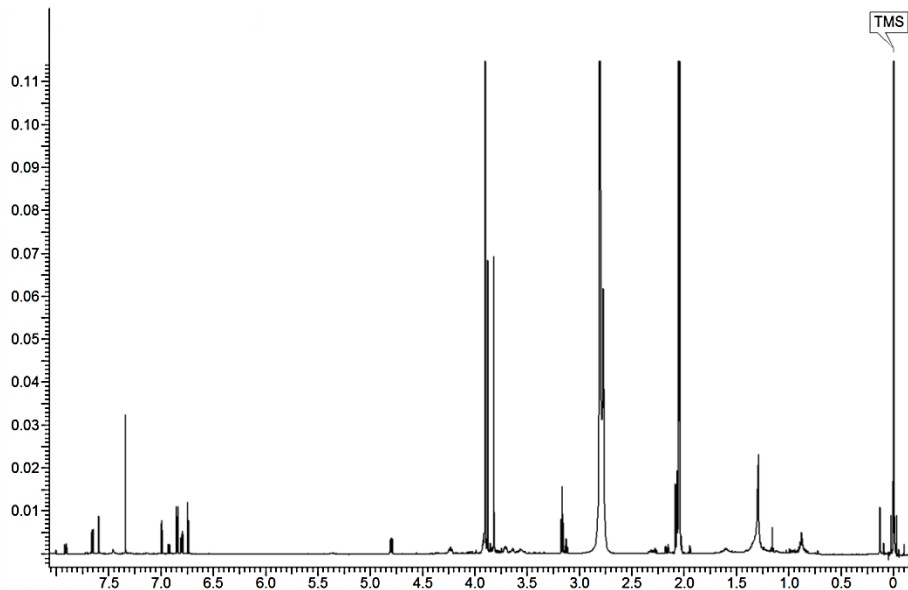


5.4.4 Substâncias VT5 (3-hidroxi-1-[4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil]-propan-1-ona) e VT6 (Evofolina B)

As substâncias VT5 (3-hidroxi-1-[4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil]-propan-1-ona) e VT6 (evofolina B) foram elucidadas em mistura (0,8 mg). A elucidação estrutural será discutida para cada substância separadamente, entretanto, os espectros e mapas de correlação bidimensionais apresentados são comuns às duas.

A Figura 44 apresenta o espectro de ^1H RMN para as substâncias, pode-se observar sinais em região desblindada entre 6,70 e 7,70 ppm, indicando a presença de hidrogênios aromáticos.

Figura 44 – Espectro de ^1H RMN (600 MHz, TMS, acetona- d_6) para as substâncias VT5 (3-hidroxi-1-[4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil]-propan-1-ona) e VT6 (evofolina B) de *Vernonanthura tweediana*.



Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Para a substância VT5 (3-hidroxi-1-[4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil]-propan-1-ona) foram observados no espectro de ^1H RMN sinal de duplo de duplo em 3,17 (2H, $J=6,2$, H-8) ppm, indicando ligação com carbono sp^3 . Sinal em δ 3,91 (8H), cuja análise indica dois tipos de sinais: um simpleto de integração para seis hidrogênios (OCH_3 -5 e OCH_3 -6), característico de metoxila, sugerindo dois radicais simétricos; e um multipeto (2H, H-9) indicando metileno próximo a elemento eletronegativo (Figura 45).

Observou-se, também, sinal de hidrogênio simpleto em δ 7,34 (2H, H-2 e H-6), indicando H simétrico de anel aromático (Figura 46).

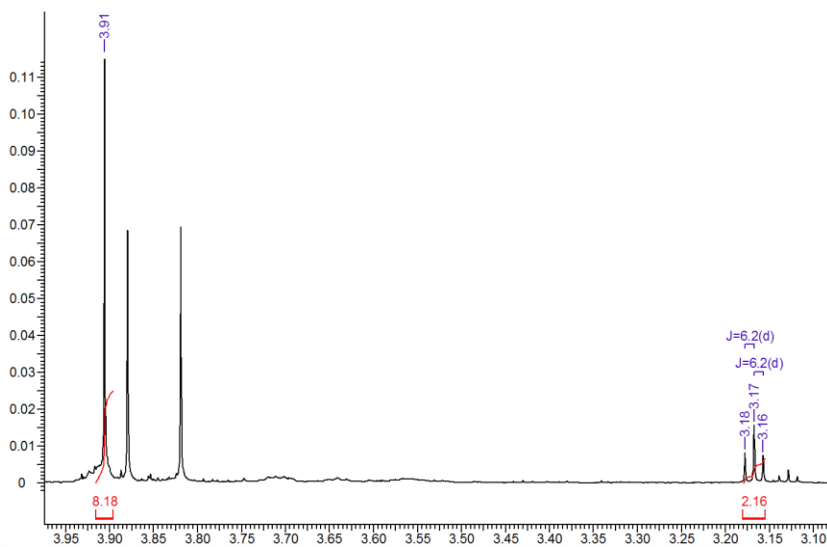
A análise do mapa de HSQC (Figura 47) mostra sinais de carbono aromático em 107,0 (C-2 e C-6) ppm, dois sinais característicos

de carbono de CH₂ em δ 41,8 (C-8) e δ 58,6 (C-9), além de carbonos confirmando grupo metoxila em δ 3,91 (OCH₃).

Os dados de HMBC (Figura 48) mostram sinais de cinco carbonos, sendo um carbono carbonílico em δ 198,2 (C-7), três carbonos oxigenados de anel aromático em δ 148,5 (C-3 e C-5) e δ 142,0 (C-4), além de carbono em 129,3 ppm.

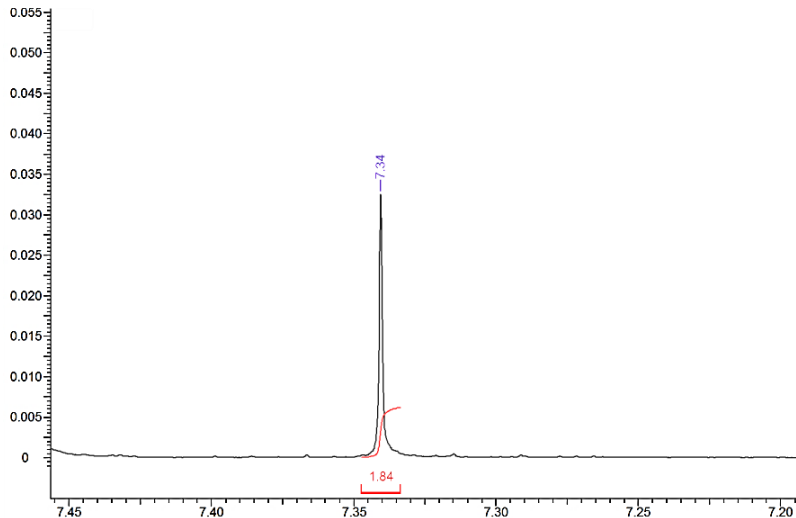
As correlações ¹H-¹³C dos hidrogênios dos metilenos e dos H aromáticos com a carbonila indica uma cadeia alifática ligada ao anel aromático por meio de um grupo cetona.

Figura 45 – Espectro de ¹H RMN (600 MHz, TMS, acetona-d₆) para a substância VT5 (3-hidroxi-1-[4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil]-propan-1-ona) de *Vernonanthura tweediana*, ampliado na região entre δ 3,10 e δ 3,10 (em mistura com VT8).



Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Figura 46 – Espectro de ^1H RMN (600 MHz) em acetona- d_6 para a substância VT5 (3-hidroxi-1-[4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil]-propan-1-ona) de *Vernonanthura tweedieana*, ampliado na região entre δ 7,20 e δ 7,45 (em mistura com VT6).



Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Figura 47 – Mapa de correlação HSQC (600 MHz ^1H e 125 MHz ^{13}C , TMS, acetona- d_6) para as substâncias VT5 (3-hidroxi-1-[4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil]-propan-1-ona) e VT6 (evofolina B) de *Vernonanthura tweedieana*.

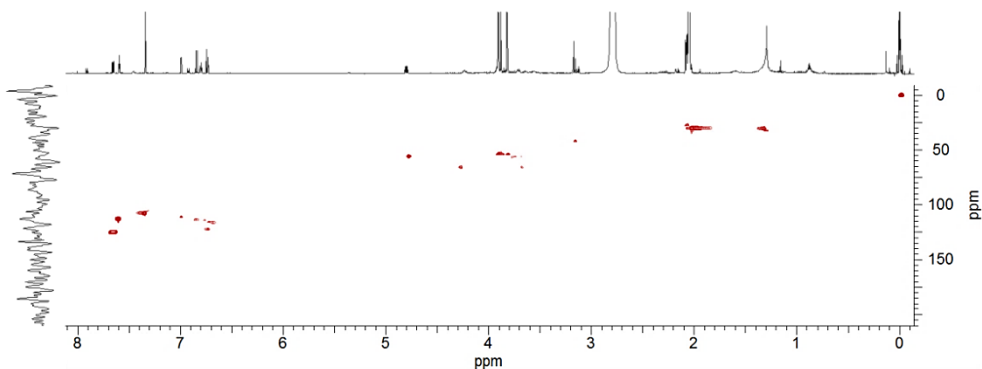
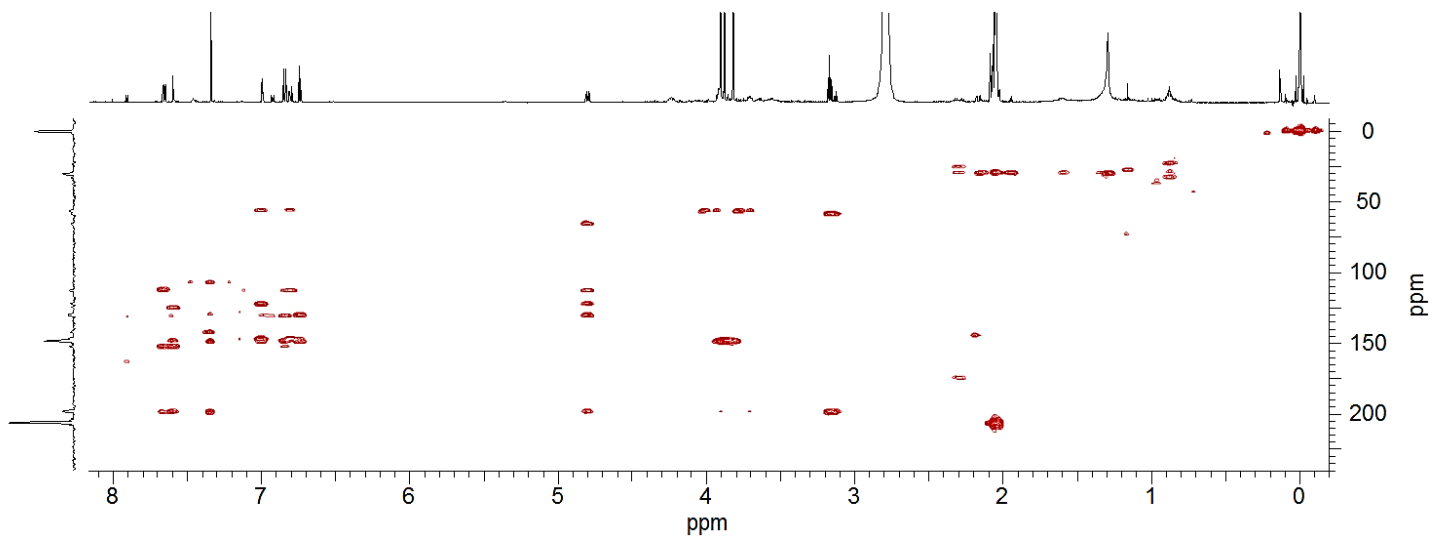


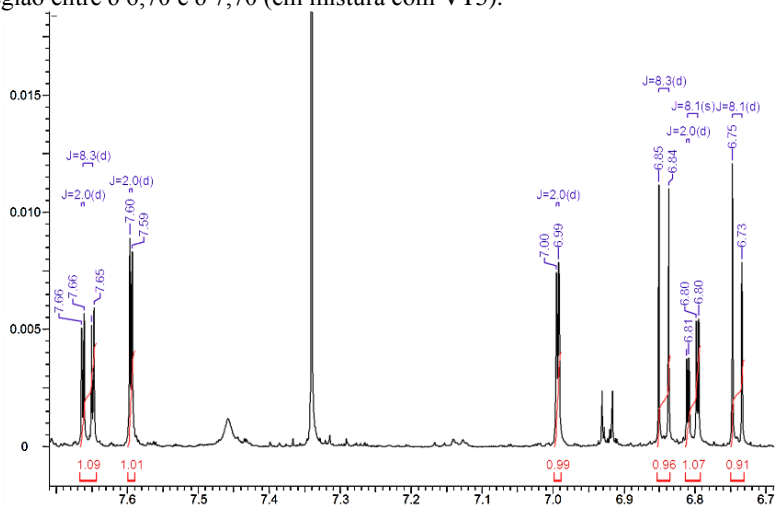
Figura 48 – Mapa de correlação HMBC (600 MHz ^1H e 125 MHz ^{13}C , TMS, acetona- d_6) para as substâncias VT5 (3-hidroxi-1-[4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil]-propan-1-ona) e VT6 (evofolina B) de *Vernonanthura tweedieana*.



O espectro de ^1H RMN mostra para a substância VT6 dois conjuntos de sinais de hidrogênios típicos de anel aromático (Figura 49). Um conjunto formado por dois dupletos em δ 7,60 (1H, $J=2,0$, H-2) e em δ 6,84 (1H, $J=8,3$, H-5), e um dupleto de dupleto δ 7,66 (1H, $J=8,3$; 2,0, H-6). As constantes de acoplamento sugerem anel aromático trissubstituído, sendo o H δ 7,66 *dd* em posição *orto* referente ao H em δ 6,84 *d*, e em *meta* em relação a δ 7,60 *d*. O segundo conjunto, também característico de anel aromático trissubstituído, apresenta hidrogênio δ 6,80 *dd* (1H, $J=8,1$; 2,0, H-6') em posição *orto* em relação ao H em δ 6,74 *d* (1H, $J=8,1$, H-5'), e em posição *meta* em relação a δ 6,99 *d* (1H, $J=2,0$, H-2'). Observam-se sinais em δ 4,80 *dd* (1H, $J=8,5$; 5,2, H-8), δ 4,23 *m* (1H, H-9a) e em δ 3,71 *m* (1H, H-9b), característico de H ligados a carbono sp^3 , sugerindo presença de um metino e um metileno (Figura 50). A Figura 51 mostra dois sinais de simpleto em 3,88 (3H, OCH_3 -3) e 3,82 (3H, OCH_3 -3') ppm, sugerindo grupos metoxila.

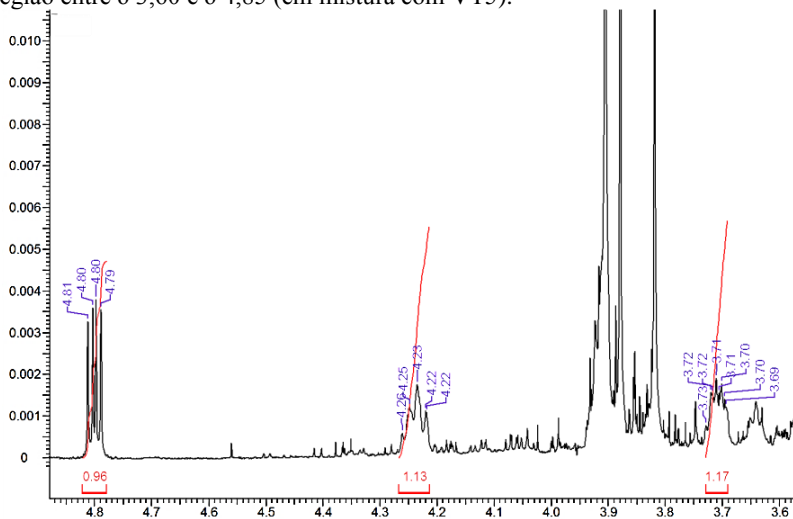
Os dados de HSQC (Figura 47) confirmam metileno de carbono em δ 65,5 (C-9), sugerindo proximidade a oxigênio, e de metino com carbono em 55,9 (C-8) ppm. A análise de HMBC (Figura 48) mostra correlação destes grupamentos com carbonila em δ 198,2 (C-7). A correlação de alguns dos H aromáticos com o carbono carbonílico indica que os anéis estejam ligados por um grupamento cetônico.

Figura 49 – Espectro de ^1H RMN (600 MHz, TMS, acetona- d_6) para a substância VT6 (evofolina B) de *Vernonanthura tweedieana*, ampliado na região entre δ 6,70 e δ 7,70 (em mistura com VT5).



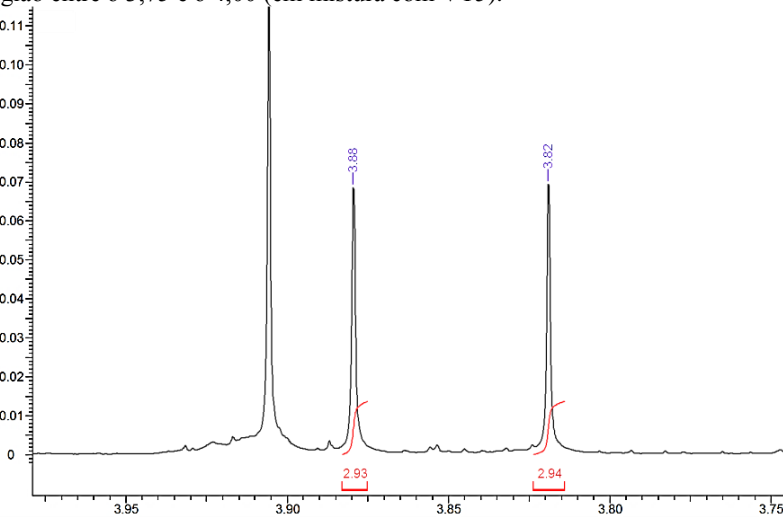
Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Figura 50 – Espectro de ^1H RMN (600 MHz, TMS, acetona- d_6) para a substância VT6 (evofolina B) de *Vernonanthura tweedieana*, ampliado na região entre δ 3,60 e δ 4,85 (em mistura com VT5).



Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Figura 51 – Espectro de ^1H RMN (600 MHz, TMS, acetona- d_6) para a substância VT6 (evofolina B) de *Vernonanthura tweedieana*, ampliado na região entre δ 3,75 e δ 4,00 (em mistura com VT5).



Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Os dados de ^1H RMN e ^{13}C RMN obtidos para a substância VT5 foram comparados com a literatura, e as informações estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Dados de ^1H RMN e ^{13}C RMN para a substância VT5 (3-hidroxi-1-[4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil]-propan-1-ona) de *Vernonanthura tweedieana*, e dados comparativos da literatura.

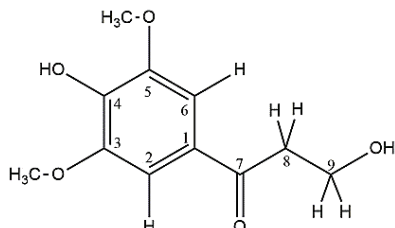
Posição	VT5		(ZHU et al., 2012)		(JONES et al., 2000)	
	δ ^1H mult. (J Hz)	δ ^{13}C	δ ^1H mult. (J Hz)	δ ^{13}C	δ ^1H mult. (J Hz)	δ ^{13}C
1	-	129,3	-	129,3	-	127,8
2	7,34 s	107,0	7,34 s	106,9	7,34 s	115,5
3	-	148,5	-	49,0	-	149,1
4	-	142,0	-	-	-	152,9
5	-	148,5	-	49,0	-	112,4
6	7,34 s	107,0	7,34 s	106,9	7,34 s	124,6
7	-	198,2	-	99,6	-	199,0
8	3,17 d (6,2)	41,8	3,19 t (6,1)	59,1	3,16	42,0
9	3,91 m	58,6	3,96 t (6,1)	41,5	3,91 m	66,3
3-OCH ₃	3,91 s	56,9	3,92 s	56,6	3,90 s	56,9
5-OCH ₃	3,91 s	56,9	3,92 s	56,6	3,90 s	56,9
	(600 MHz ^1H , 125 MHz ^{13}C , acetona-d ₆)		(400 MHz ^1H , 100 MHz ^{13}C , CD ₃ OD)		(500 MHz ^1H , 125 MHz ^{13}C , acetona-d ₆)	

A partir das informações é possível inferir que a substância VT5 corresponde ao fenilpropanoide 3-hidroxi-1-[4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil]-propan-1-ona (Figura 52).

Apresenta fórmula molecular $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_5$, peso molecular calculado de 226,0841 g/mol e grau de insaturação 5 (JONES et al., 2000; LACRET et al., 2012; ZHU et al., 2012).

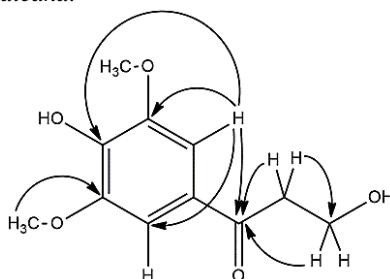
As principais correlações entre ^1H - ^{13}C observadas do mapa de HMBC para a substância VT5 estão ilustradas na Figura 53.

Figura 52 – Estrutura molecular da substância VT5 (3-hidroxi-1-[4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil]-propan-1-ona) de *Vernonanthura tweedieana*.



Fonte: adaptado de Lacrete et al. (2012) e Zhu et al. (2012).

Figura 53 – Correlações a longa distância entre ^1H - ^{13}C (HMBC) da substância VT5 (3-hidroxi-1-[4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil]-propan-1-ona) de *Vernonanthura tweedieana*.



Os dados de ^1H RMN e ^{13}C RMN obtidos para a substância VT6 foram comparados com a literatura, conforme apresentados na Tabela 6.

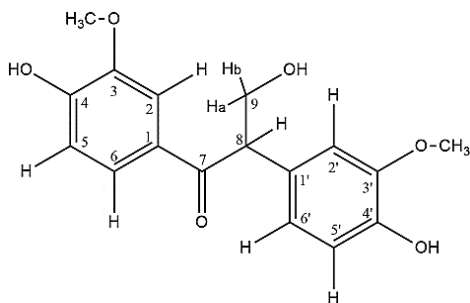
Tabela 6 – Dados de ^1H RMN e ^{13}C RMN para a substância VT6 (evofolina B) de *Vernonanthura tweedieana*, e dados comparativos da literatura.

Posição	VT6		(WILAIRAT et al., 2006)		(WU; YEH; WU, 1995)	
	δ ^1H mult. (J Hz)	δ ^{13}C	δ ^1H mult. (J Hz)	δ ^{13}C	δ ^1H mult. (J Hz)	δ ^{13}C
1	-	130,5	-	129,1	-	131,3
2	7,60 <i>d</i> (2,0)	112,3	7,54 <i>d</i> (1,9)	110,5	7,58 <i>d</i> (2,0)	112,3
3	-	148,2	-	146,9	-	148,2
4	-	152,1	-	150,5	-	152,2
5	6,84 <i>d</i> (8,3)	115,3	6,84 <i>d</i> (8,8)	113,9	6,83 <i>d</i> (8,3)	115,3
6	7,66 <i>dd</i> (8,3; 2,0)	124,5	7,53 <i>dd</i> (8,8; 1,9)	124,5	7,64 <i>dd</i> (8,3; 2,0)	124,5
7	-	198,2	-	198,6	-	198,0
8	4,80 <i>dd</i> (8,5; 5,2)	55,9	4,66 <i>dd</i> (8,2; 5,0)	55,5	4,79 <i>dd</i> (8,4; 5,2)	55,8
9a	4,23 <i>m</i>	65,5	4,22 <i>d</i> (11,3; 8,4)	65,3	4,22 <i>dd</i> (10,4; 8,4)	65,6
9b	3,71 <i>m</i>		3,82-3,89 <i>m</i>		3,69 <i>dd</i> (10,4; 5,2)	
1'	-	129,9	-	128,4	-	129,9
2'	6,99 <i>d</i> (2,0)	112,8	6,71 <i>d</i> (1,9)	110,1	6,98 <i>d</i> (2,0)	112,8
3'	-	148,5	-	145,1	-	148,5
4'	-	146,6	-	146,6	-	146,7
5'	6,74 <i>d</i> (8,1)	115,9	6,86 <i>d</i> (8,0)	111,0	6,72 <i>d</i> (8,1)	116,0
6'	6,80 <i>dd</i> (8,1; 2,0)	121,9	6,80 <i>dd</i> (8,0; 1,9)	121,5	6,79 <i>dd</i> (8,1; 2,0)	121,9
3-OCH₃	3,88 <i>s</i>	56,3	3,90 <i>s</i>	55,9	3,86 <i>s</i>	56,2
3'-OCH₃	3,82 <i>s</i>	56,4	3,84 <i>s</i>	55,9	3,81 <i>s</i>	56,2
	(600 MHz ^1H , 125 MHz ^{13}C , acetona- <i>d</i> 6)		(300 MHz ^1H , 75 MHz ^{13}C , CDCl ₃)		(- - acetona- <i>d</i> 6)	

Assim foi possível confirmar que a substância VT6 deve corresponder ao fenilpropanoide evofolina B (Figura 54).

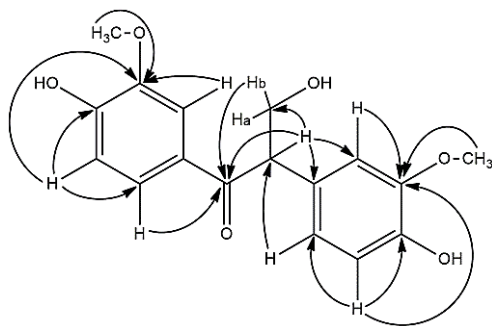
A evofolina B possui fórmula molecular $C_{17}H_{18}O_6$, peso molecular calculado de 318,1103 g/mol e grau de insaturação 9 (WU; YEH; WU, 1995; WILAIRAT et al., 2006; LACRET et al., 2012; LUO et al., 2013). As principais correlações entre 1H - ^{13}C observadas do mapa de HMBC para a substância VT8 (evofolina B) estão ilustradas na Figura 55.

Figura 54 – Estrutura molecular da substância VT6 (evofolina B) de *Vernanthura tweediana*.



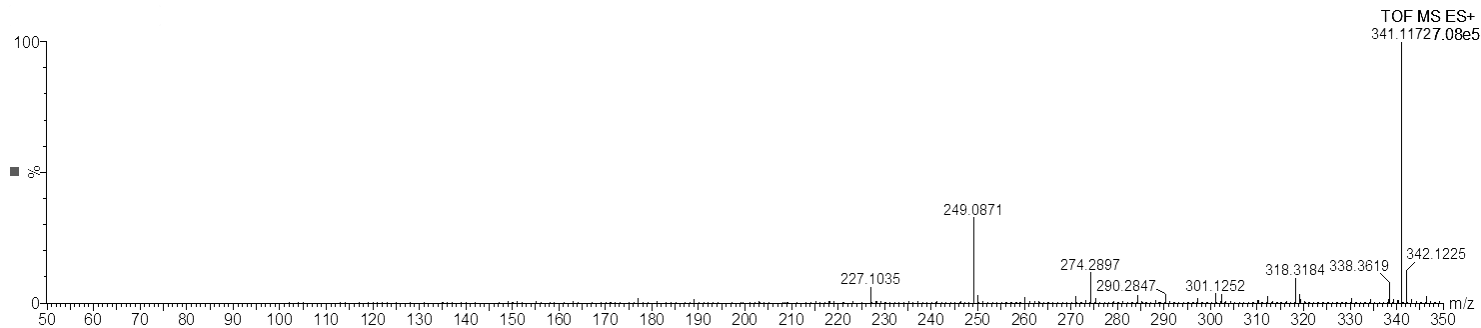
Fonte: adaptado de Lacret et al. (2012) e Luo et al. (2013).

Figura 55 – Correlações a longa distância entre 1H - ^{13}C (HMBC) da substância VT6 (evofolina B) de *Vernanthura tweediana*.



A análise de EM ESI-Q-TOF confirmou se tratar da mistura dos fenilpropanoides 3-hidroxi-1-[4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil]-propan-1-ona e evofolina B, uma vez que se observa a presença do íon molecular para ambas as substâncias, na forma de aduto com sódio, respectivamente, $m/z=249,0871 [M+Na]^+$ e $m/z=341,1173 [M+Na]^+$ (Figura 56).

Figura 56 – Espectro de massas ESI-Q-TOF para as substâncias VT5 (3-hidroxi-1-[4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil]-propan-1-ona) e VT6 (evofolina B) de *Vernonanthura tweedieana*.



Espectro de massas de alta resolução ESI-Q-TOF (modo positivo) para as substâncias VT5 (3-hidroxi-1-[4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil]-propan-1-ona) e VT6 (evofolina B). Eixo Y: intensidade (%); Eixo X: relação carga/massa (m/z).

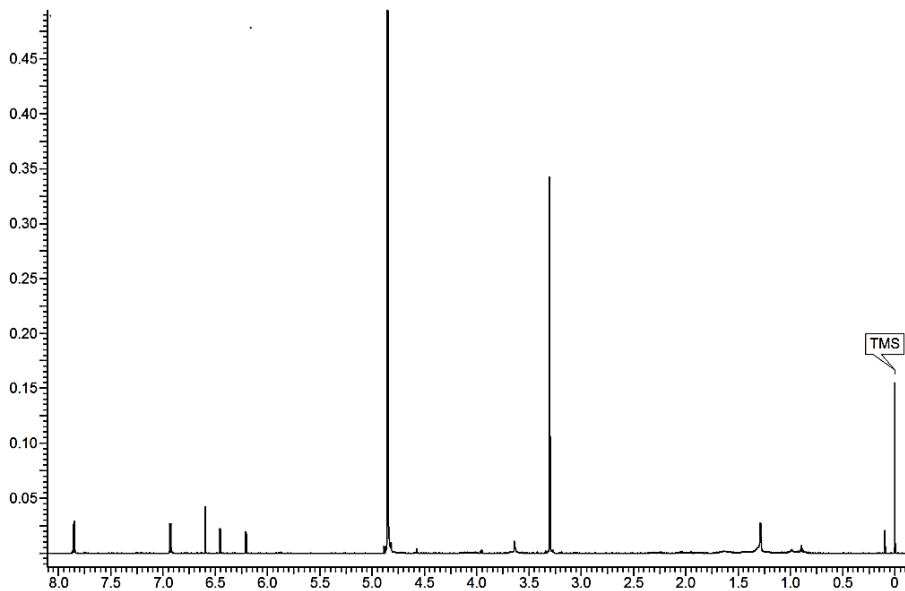
5.4.5 Substância VT7 (Apigenina)

A substância VT7 (apigenina) foi isolada na forma de pó amarelado (0,7 mg).

A Figura 57 mostra o espectro de ^1H RMN para a substância VT7. A análise do espectro de ^1H RMN mostrou dois sinais de duplete em δ 6,46 (1H, $J=2,1$, H-8) e δ 6,21 (1H, $J=2,1$, H-6), característicos de hidrogênios *meta* substituídos de anel aromático. Observa-se, também um simpleto em 6,60 (1H, H-3), cujo valor mais desblindado sugere se tratar hidrogênio olefínico (Figura 58).

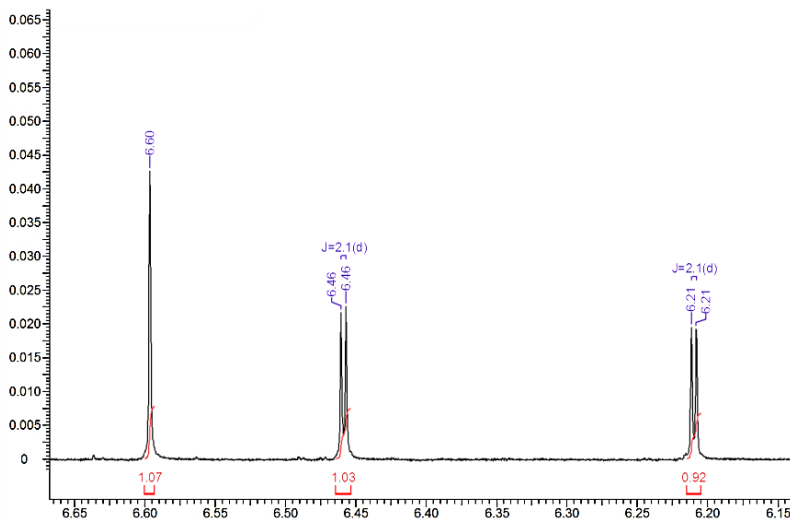
Foram observados dois sinais de hidrogênios típicos de anel aromático (Figura 59), na forma de duplete, em δ 7,85 (2H, $J=8,9$, H-2' e H-6') e em δ 6,93 (2H, $J=8,9$, H-3' e H-5'). A integração e forma dos sinais sugerem se tratar de hidrogênios simétricos de anel aromático tetrasubstituído.

Figura 57 – Espectro de ^1H RMN (600 MHz, TMS, CD_3OD) para a substância VT7 (apigenina) de *Vernonanthera tweedieana*.



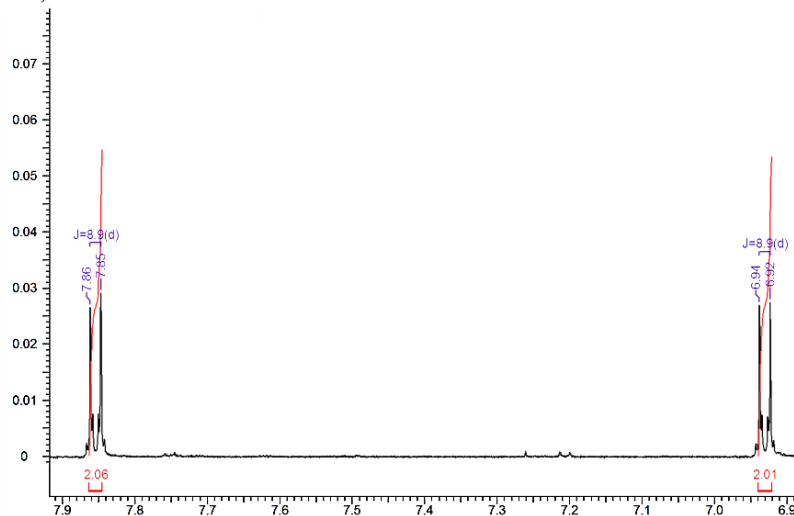
Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Figura 58 – Espectro de ^1H RMN (600 MHz, TMS, CD_3OD) para a substância VT7 (apigenina) de *Vernonanthura tweedieana*, ampliado na região entre δ 6,15 e δ 6,65.



Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Figura 59 – Espectro de ^1H RMN (600 MHz, TMS, CD_3OD) para a substância VT7 (apigenina) de *Vernonanthura tweedieana*, ampliado na região entre δ 6,90 e δ 7,90.



Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Figura 60 – Mapa de correlação HSQC (600 MHz ^1H e 125 MHz ^{13}C , TMS, CD_3OD) para a substância VT7 (apigenina) de *Vernonanthura tweediana*. 126

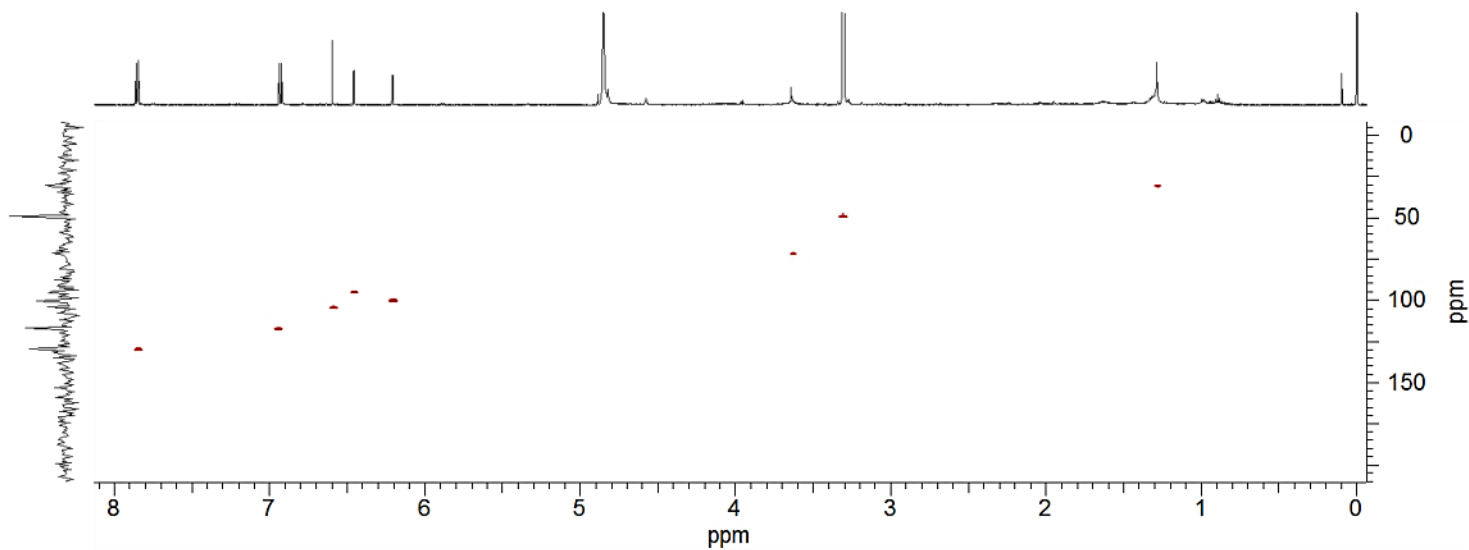
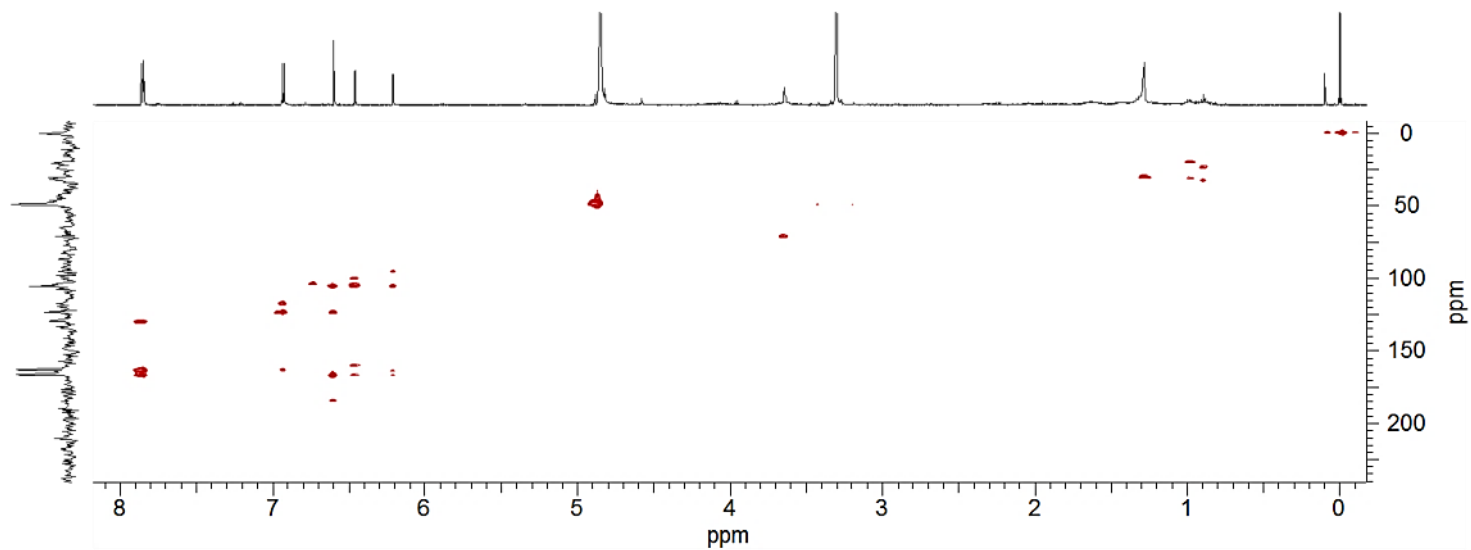


Figura 61 – Mapa de correlação HMBC (600 MHz ^1H e 125 MHz ^{13}C , TMS, CD_3OD) para a substância VT7 (apigenina) de *Vernonanthura tweediana*.



O mapa de correlações de HSCQ (Figura 60) confirmou um carbono olefínico em 102,9 (C-3) ppm além dos carbonos sp^2 de anel aromático, em δ 100,2 (C-6), δ 95,0 (C-8), δ 129,6 (C-2' e C-6') e δ 117,1 (C-3' e C-5'), estes dois últimos sinais mostrando se tratar de anel aromático simétrico.

Os dados de HMBC (Figura 61) mostram a presença de um segundo carbono olefínico em 166,3 (C-2) ppm, um carbono carbonílico em δ 183,9 (C-4) indicando cetona cíclica α,β -insaturada. Foram observados outros carbonos quaternários em δ 163,2 (C-5), δ 166,1 (C-7), δ 159,5 (C-9), δ 162,7 (C-4'), indicando carbonos oxigenados, além de carbono em δ 105,3 (C-10). A análise dos dados indica se tratar de um esqueleto de flavona.

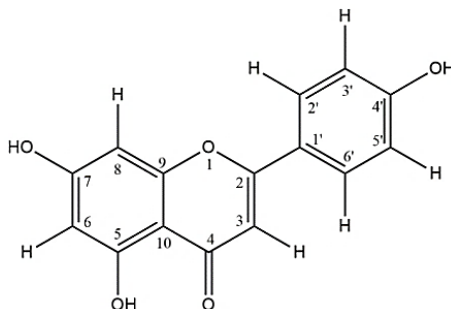
Os dados obtidos de 1H RMN e ^{13}C RMN para a substância VT7 estão apresentados com os dados comparativos da literatura na Tabela 7.

Tabela 7 – Dados de 1H RMN e ^{13}C RMN para a substância VT7 (apigenina) de *Vernonanthura tweedieana*, e dados comparativos da literatura.

Posição	VT7		(KIM et al., 2014)		(WEI et al., 2013)	
	δ 1H mult. (J Hz)	δ ^{13}C	δ 1H mult. (J Hz)	δ ^{13}C	δ 1H mult. (J Hz)	δ ^{13}C
1	-	-	-	-	-	-
2	-	166,3	-	163,8	-	165,0
3	6,60 s	102,9	6,72 s	102,8	6,55 s	102,9
4	-	183,9	-	181,7	-	182,7
5	-	163,2	-	165,2	-	161,6
6	6,21 d (2,1)	100,2	6,45 d (2,1)	99,2	6,27 d (1,7)	99,2
7	-	166,1	-	161,4	-	164,4
8	6,46 d (2,1)	95,0	6,16 d (2,1)	94,2	6,46 d (1,7)	94,2
9	-	159,5	-	157,5	-	158,1
10	-	105,3	-	105,3	-	104,4
1'	-	123,3	-	121,2	-	122,1
2'	7,85 d (8,9)	129,6	7,89 d (8,8)	128,5	7,82 d (8,6)	128,3
3'	6,93 d (8,9)	117,1	6,92 d (8,8)	116,1	6,95 d (8,6)	115,9
4'	-	162,7	-	161,5	-	161,1
5'	6,93 d (8,9)	117,1	6,92 d (8,8)	116,1	6,95 d (8,6)	115,9
6'	7,85 d (8,9)	129,6	7,89 d (8,8)	128,5	7,82 d (8,6)	128,3
	(600 MHz 1H , 125 MHz ^{13}C , CD ₃ OD)		(500 MHz 1H , 120 MHz ^{13}C , CD ₃ OD)		(500 MHz 1H , 125 MHz ^{13}C , CDCl ₃)	

A partir dessas informações pode-se concluir que a substância VT7 trata-se da flavona apigenina ou 5,7,4'-trihidroxi-flavona (Figura 62). Sua fórmula molecular é C₁₅H₁₀O₅, peso molecular calculado de 270,0528 g/mol e grau de insaturação igual a 11 (WEI et al., 2013; KIM et al., 2014; SCOGNAMIGLIO et al., 2014; SHI et al., 2014).

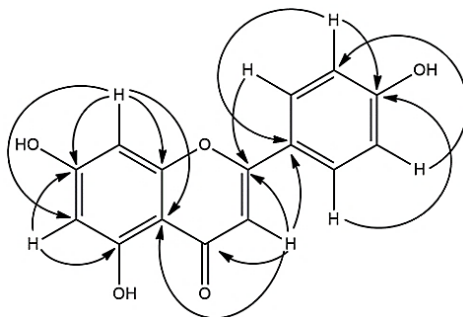
Figura 62 – Estrutura molecular da substância VT7 (apigenina) de *Vernonanthura tweedieana*.



Fonte: adaptado de Kim et al. (2014) e Shi et al. (2014).

As principais correlações entre ^1H - ^{13}C observadas do mapa de HMBC para a substância VT7 (apigenina) estão ilustradas na Figura 63.

Figura 63 – Correlações a longa distância entre ^1H - ^{13}C (HMBC) da substância VT7 (apigenina) de *Vernonanthura tweedieana*.



5.4.6 Substâncias VT8 (Ácido cafeico) e VT9 (Ácido protocatecuico)

As substâncias VT8 (ácido cafeico) e VT9 (ácido protocatecuico) foram elucidadas em mistura (11,0 mg). Os espectros e mapas de correlação bidimensionais apresentados são comuns às duas, apesar de a elucidação estrutural ser discutida separadamente para cada substância.

Análise do espectro de ^1H RMN (Figura 64) mostra, para a substância VT8, dois sinais de duplete em 7,55 (1H, H-7) e 6,27 (1H, H-8) ppm, com constante de acoplamento de 15,9 Hz, indicativo de ligação dupla *trans*. Foram observados outros três sinais sugestivos de H de anel

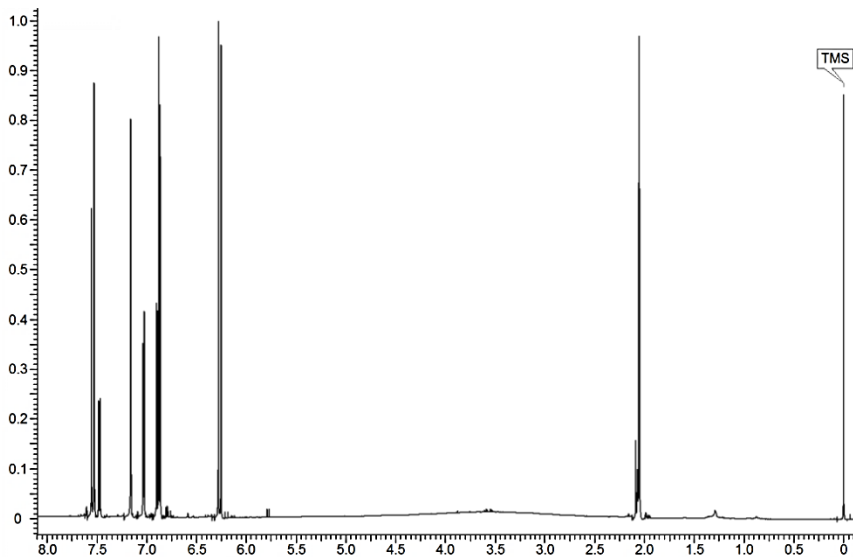
aromático, sendo dois dupletos, em δ 7,16 (1H, $J=2,0$, H-2) e outro em δ 6,87 (1H, $J=8,2$, H-5), além de um duplete de duplete δ 7,03 (1H, $J=8,2$; 2,0, H-6) (Figura 65). Os valores de J destes três hidrogênios sugerem um anel aromático trissubstituído, em que o H δ 7,03 *dd* está em posição *orto* em relação à δ 6,87 *d*, e *meta* em relação a δ 7,16 *d*.

Avaliando-se o espectro de ^1H RMN em relação à intensidade dos sinais, observa-se que a mistura apresenta proporção de VT8:VT9 2:1.

Os dados do experimento de HSQC (Figura 66) mostram os sinais dos carbonos olefínicos da ligação dupla *trans* em 146,1 (C-7) e 115,9 (C-8) ppm, além dos carbonos aromáticos em δ 115,2 (C-2), δ 116,4 (C-5) e δ 122,5 (C-6).

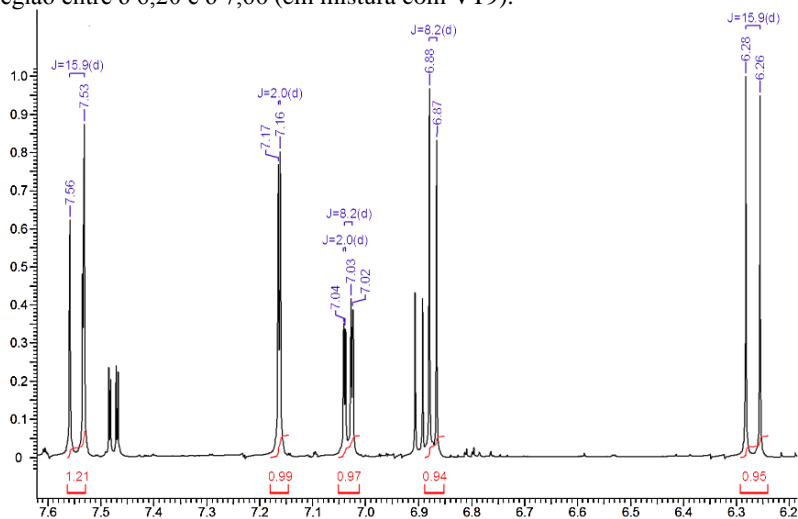
Na análise das correlações de HMBC (Figura 67) é possível observar as correlações dos hidrogênios olefínicos δ 7,54 *d* e δ 6,27 *d* com um carbono carbonílico em 168,3 (C-9) ppm, indicativo de um grupamento de ácido carboxílico. Ainda é possível observar a presença de outros três carbonos quaternários, em 146,4 (C-3) e 148,7 (C-4) ppm, indicando carbonos aromáticos oxigenados, e em 127,5 (C-1) ppm, típico de carbono sp^2 aromático.

Figura 64 – Espectro de ^1H RMN (600 MHz, TMS, acetona- d_6) para as substâncias VT8 (ácido cafeico) e VT9 (ácido protocatecuico) de *Vernanthura tweedieana*.



Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Figura 65 – Espectro de ^1H RMN (600 MHz, TMS, acetona- d_6) para a substância VT8 (ácido cafeico) de *Vernonanthura tweediana*, ampliado na região entre δ 6,20 e δ 7,60 (em mistura com VT9).



Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Figura 66 – Mapa de correlação HSQC (600 MHz ^1H e 125 MHz ^{13}C , TMS, acetona- d_6) para as substâncias VT8 (ácido cafeico) e VT 9 (ácido protocatecuico) de *Vernonanthura tweediana*.

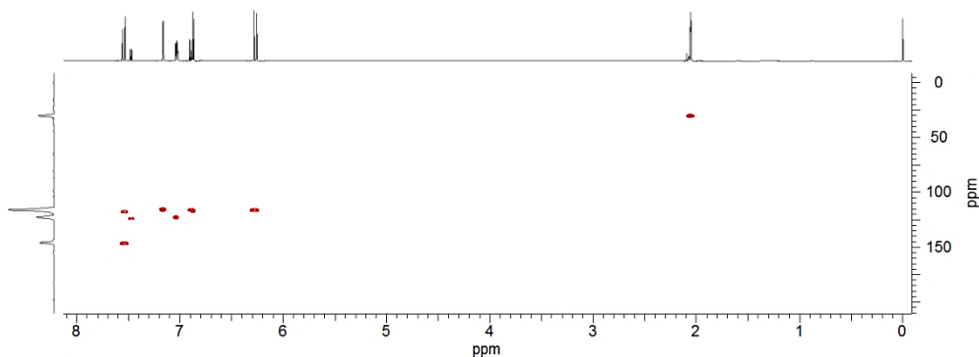
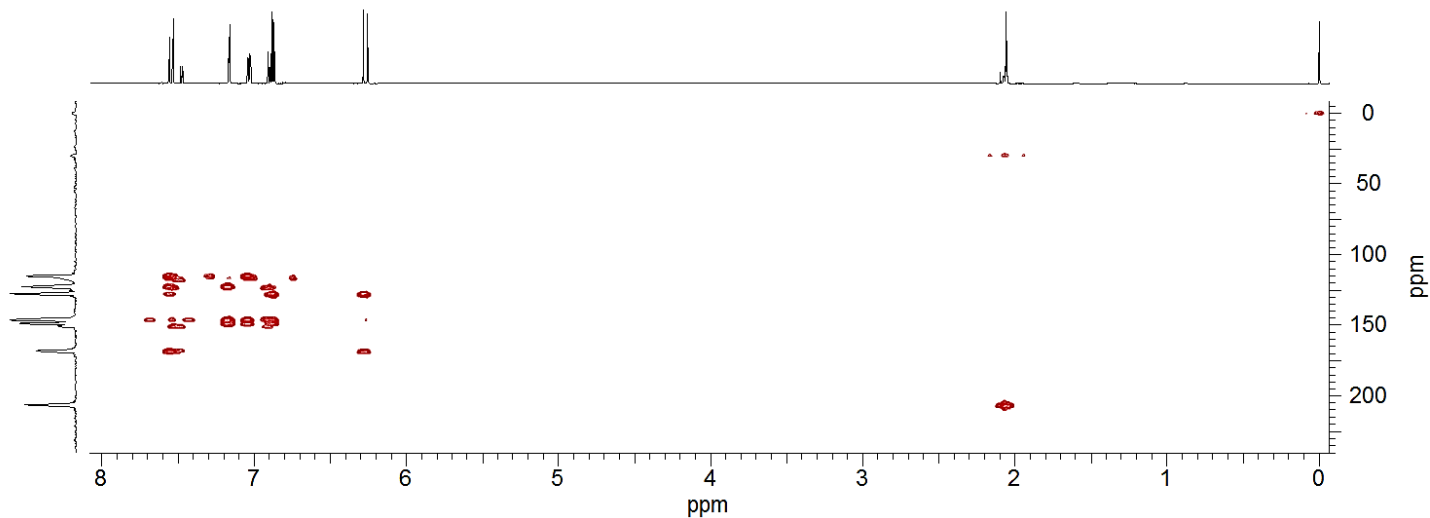


Figura 67 – Mapa de correlação HMBC (600 MHz ^1H e 125 MHz ^{13}C , TMS, acetona- d_6) para as substâncias VT8 (ácido cafeico) e VT9 (ácido protocatecuico) de *Vernonanthura tweediana*.



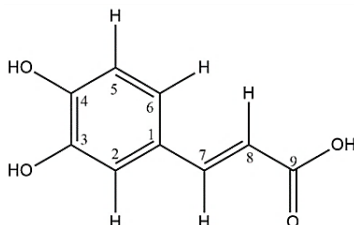
Os dados obtidos de ^1H RMN e ^{13}C RMN para a substância VT8 (ácido cafeico) estão apresentados com os dados comparativos da literatura na Tabela 8.

Tabela 8 – Dados de ^1H RMN e ^{13}C RMN para a substância VT8 (ácido cafeico) de *Vernonanthurra tweedieana*, e dados comparativos da literatura.

Posição	VT8		(LEE et al., 2012)		(SHI et al., 2014)	
	δ ^1H mult. (J Hz)	δ ^{13}C	δ ^1H mult. (J Hz)	δ ^{13}C	δ ^1H mult. (J Hz)	δ ^{13}C
1	-	127,6	-	126,7	-	125,7
2	7,16 d (2,0)	115,2	7,03 d (2,3)	113,9	7,02 d (1,8)	115,1
3	-	146,3	-	145,6	-	145,7
4	-	148,7	-	148,2	-	148,4
5	6,87 d (8,2)	116,4	6,78 d (8,2)	115,3	6,76 d (7,8)	115,4
6	7,03 dd (8,2; 2,0)	122,5	6,93 dd (8,2; 2,3)	121,6	6,97 dd (7,8; 1,8)	121,4
7	7,55 d (15,9)	146,1	7,52 d (15,8)	145,6	7,43 d (16,2)	144,9
8	6,27 d (15,9)	115,9	6,23 d (15,8)	114,5	6,16 d (16,2)	115,8
9	-	168,3	-	169,8	-	168,0
	(600 MHz ^1H , 125 MHz ^{13}C , acetona- d_6)		(500 MHz ^1H , 125 MHz ^{13}C , CD_3OD)		(600 MHz ^1H , 150 MHz ^{13}C , DMSO- d_6)	

Apesar de estes dados serem obtidos em solvente diferente aos encontrados na literatura, a semelhança dos deslocamentos observados da substância VT8 com aqueles encontrados na literatura permite confirmar que VT8 corresponde ao ácido cafeico (Figura 68). Sua fórmula molecular é $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$, peso molecular calculado de 180,0423 g/mol, e grau de insaturação igual a 6 (LEE et al., 2012; KIM et al., 2014; NGUYEN et al., 2014; SHI et al., 2014).

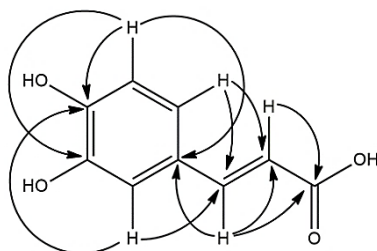
Figura 68 – Estrutura molecular da substância VT8 (ácido cafeico) de *Vernonanthurra tweedieana*.



Fonte: adaptado de Nguyen et al. (2014) e Lee et al. (2012).

As principais correlações entre ^1H - ^{13}C identificadas do mapa de HMBC para a substância VT8 (ácido cafeico) são ilustradas na Figura 69.

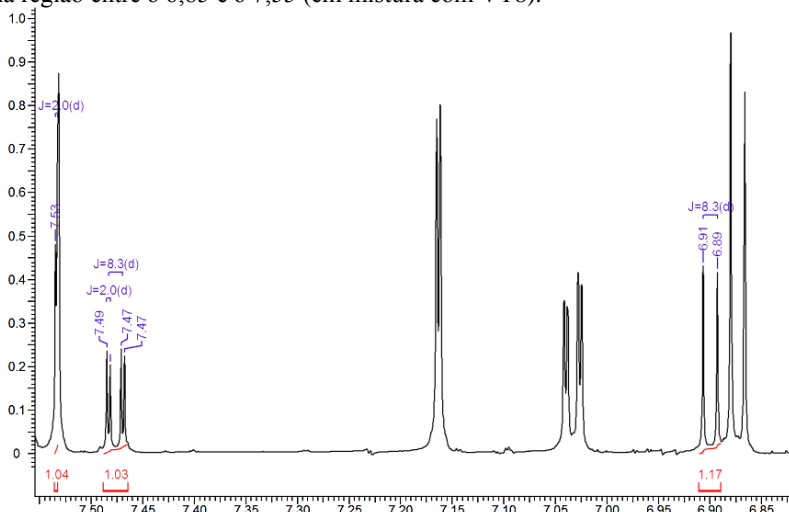
Figura 69 – Correlações a longa distância entre ^1H - ^{13}C (HMBC) da substância VT8 (ácido cafeico) de *Vernonanthura tweedieana*.



Para a substância VT9 (ácido protocatecuico), foram observados três sinais sugestivos de hidrogênios de anel aromático (Figura 70), sendo dois dupletos, em δ 7,53 (1H, $J=2,0$, H-2) e em δ 6,90 (1H, $J=8,3$, H-5), e um dupleto de dupleto em δ 7,48 (1H, $J=8,3$; 2,0, H-6).

Os valores de constante de acoplamento destes três hidrogênios sugerem ser substituintes do mesmo anel aromático, com acoplamento entre si, estando o hidrogênio em δ 7,48 *dd* em posição *orto* em relação à δ 6,90 *d*, e em posição *meta* em relação à δ 7,53 *d*.

Figura 70 – Espectro de ^1H RMN (600 MHz, TMS, acetona- d_6) para a substância VT9 (ácido protocatecuico) de *Vernonanthura tweedieana*, ampliado na região entre δ 6,85 e δ 7,55 (em mistura com VT8).



Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

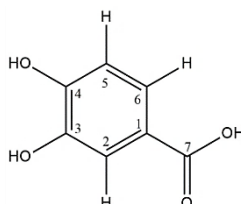
Os dados de HSQC (Figura 66) mostram três carbonos aromáticos, em δ 117,6 (C-2), δ 115,8 (C-5) e δ 123,7 (C-6). No experimento de HMBC (Figura 67) é possível observar correlações dos H aromáticos com um carbono carbonílico em 167,7 (C-7) ppm, possivelmente de ácido carboxílico. Foram ainda observados três carbonos quaternários, em δ 123,2 (C-1), δ 145,5 (C-3) e δ 150,6 (C-4), estes dois últimos típicos de carbonos aromáticos oxigenados, por estar em região mais desblindada. O conjunto de dados sugere se tratar de um ácido aromático dissustituído. Os dados de ^1H RMN e ^{13}C RMN para a substância VT9 (ácido protocatecuico) estão apresentados com dados comparativos da literatura na Tabela 9.

Tabela 9 – Dados de ^1H RMN e ^{13}C RMN para a substância VT9 (ácido protocatecuico) de *Vernonanthura tweedieana*, e dados comparativos da literatura.

Posição	VT9		(LIAO et al., 2014)		(ZHANG et al., 2011)	
	δ ^1H mult. (J Hz)	δ ^{13}C	δ ^1H mult. (J Hz)	δ ^{13}C	δ ^1H mult. (J Hz)	δ ^{13}C
1	-	123,2	-	123,2	-	121,7
2	7,53 d (2,0)	117,6	7,52 d (1,9)	117,5	7,31 d (2,0)	116,8
3	-	145,5	-	145,7	-	144,9
4	-	150,6	-	150,8	-	150,6
5	6,90 d (8,3)	115,8	6,89 d (8,3)	115,8	6,75 d (8,0)	115,2
6	7,48 dd (8,3; 2,0)	123,7	7,47 dd (8,3; 1,9)	123,7	7,26 dd (8,0; 2,0)	123,0
7	-	167,7	-	167,8	-	168,1
	(600 MHz ^1H , 125 MHz ^{13}C , acetona-d ₆)		(500 MHz ^1H , 125 MHz ^{13}C , CD ₃ OD)		(400 MHz ^1H , 100 MHz ^{13}C , DMSO-d ₆)	

A partir desses dados é possível confirmar que a substância VT9 corresponde ao ácido protocatecuico (Figura 71). Sua fórmula molecular é $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_4$, peso molecular calculado de 154,0266 g/mol, e grau de insaturação igual a 5 (ZHANG et al., 2011; LEE et al., 2012; LIAO et al., 2014; NGUYEN et al., 2014).

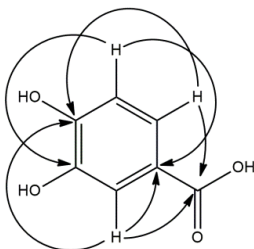
Figura 71 – Estrutura molecular da substância VT9 (ácido protocatecuico) de *Vernonanthura tweedieana*.



Fonte: adaptado de Liao et al. (2014) e Nguyen et al. (2014).

A Figura 72 ilustra as principais correlações entre ^1H - ^{13}C observadas do mapa de HMBC para a substância VT9 (ácido protocatecuico).

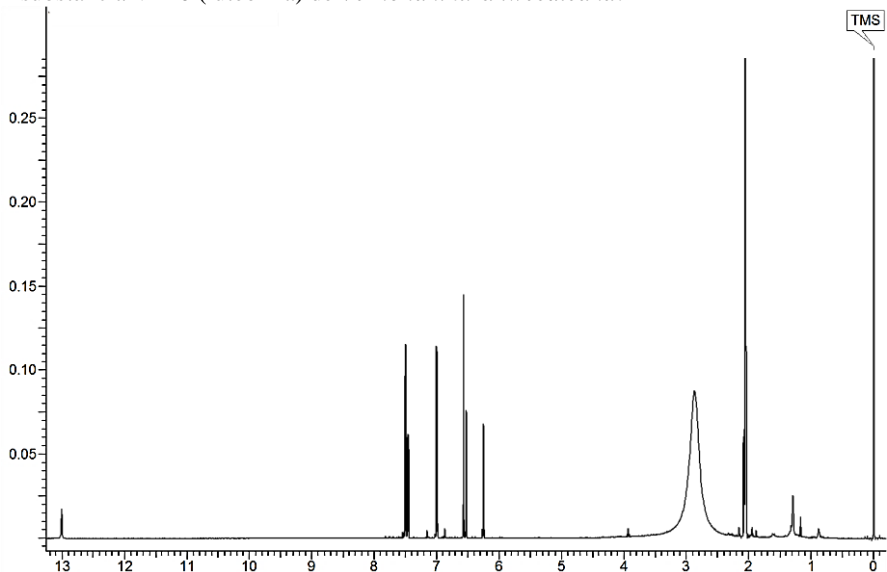
Figura 72 – Correlações a longa distância entre ^1H - ^{13}C (HMBC) da substância VT9 (ácido protocatecuico) de *Vernonanthura tweedieana*.



5.4.7 Substância VT10 (Luteolina)

Isolada na forma de pó amarelado (1,0 mg) a substância VT10 apresenta, no espectro de ^1H RMN, sinais típicos de hidrogênios de anel aromático (Figura 73).

Figura 73 – Espectro de ^1H RMN (600 MHz, TMS, acetona- d_6) para a substância VT10 (luteolina) de *Vernonanthura tweedieana*.



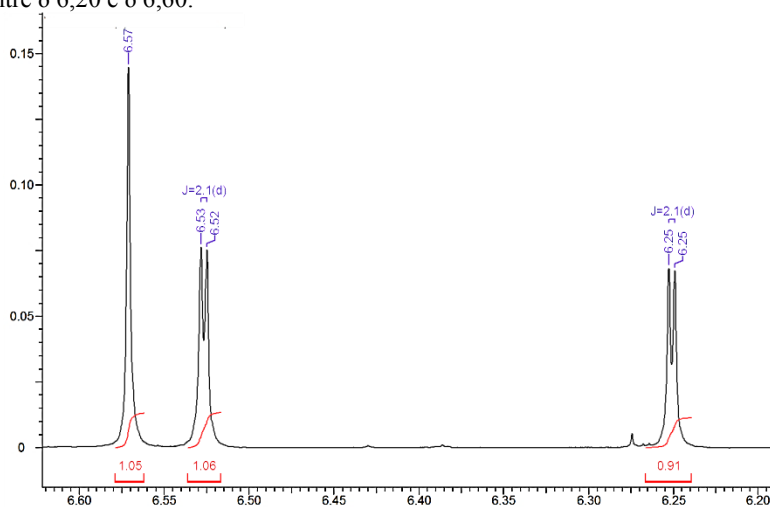
Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Observam-se dois sinais de duplete em δ 6,53 (1H, $J=2,1$, H-8) e δ 6,25 (1H, $J=2,1$, H-6) característicos de hidrogênios *meta* substituídos de anel aromático. O espectro de ^1H RMN também mostra um simpleto em 6,57 (1H, H-3), indicando hidrogênio olefínico devido ao seu deslocamento químico para região mais desblindada (Figura 74).

Observam-se três H característicos de anel aromático (Figura 75), sendo dois dupletos, em δ 7,50 (1H, $J=2,3$, H-2') e em δ 7,00 (1H, $J=8,4$, H-5'), além de um duplete de duplete em δ 7,46 (1H, $J=8,4; 2,3$, H-6'). De acordo com os valores de J desses H, o H em δ 7,46 *dd* está disposto em posição *orto* em relação ao H em δ 7,00 *d*, e em posição *meta* em relação ao H em δ 7,50 *d*.

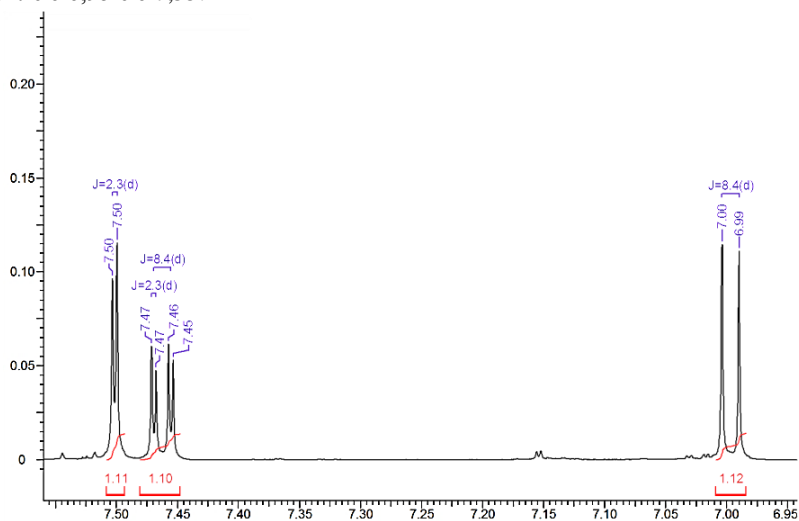
O mapa de correlação de HSCQ (Figura 76) confirmou a existência de um carbono olefínico em 104,2 (C-3) ppm e dos carbonos aromáticos em δ 99,6 (C-6), δ 94,7 (C-8), δ 114,1 (C-2'), δ 116,6 (C-5') e δ 120,1 (C-6'). Os dados do experimento de HMBC (Figura 77) mostram um segundo carbono olefínico em 165,3 (C-2) ppm, um carbono carbonílico em δ 182,9 (C-4), que juntamente com os carbonos olefínicos indica novamente um cetona cíclica α,β -insaturada. Foram observados outros cinco carbonos quaternários em δ 163,3 (C-5), δ 164,9 (C-7), δ 158,9 (C-4'), δ 146,6 (C-3') e δ 150,2 (C-4'), além de um carbono em 105,3 (C-10) ppm, sugerindo esqueleto de flavona.

Figura 74 – Espectro de ^1H RMN (600 MHz, TMS, acetona- d_6) para a substância VT10 (luteolina) de *Vernonanthura tweedieana*, ampliado na região entre δ 6,20 e δ 6,60.



Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Figura 75 – Espectro de ^1H RMN (600 MHz, TMS, acetona- d_6) para a substância VT10 (luteolina) de *Vernonanthura tweedieana*, ampliado na região entre δ 6,95 e δ 7,55.



Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Figura 76 – Mapa de correlação HSQC (600 MHz ^1H e 125 MHz ^{13}C , TMS, acetona- d_6) para a substância VT10 (luteolina) de *Vernonanthura tweedieana*.

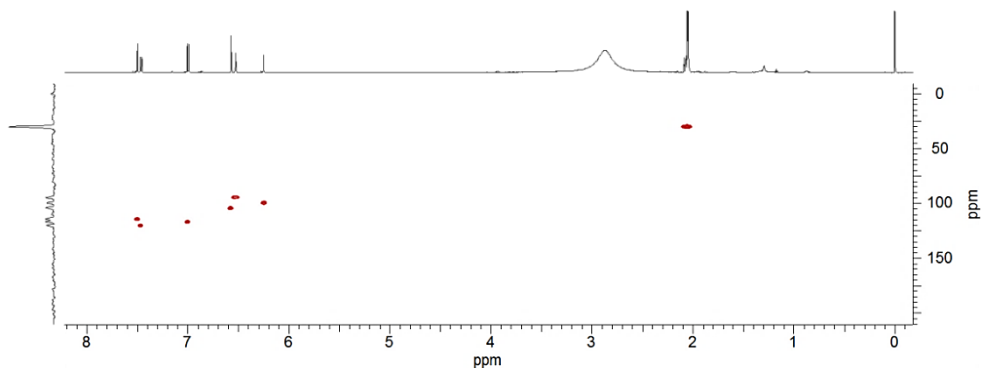
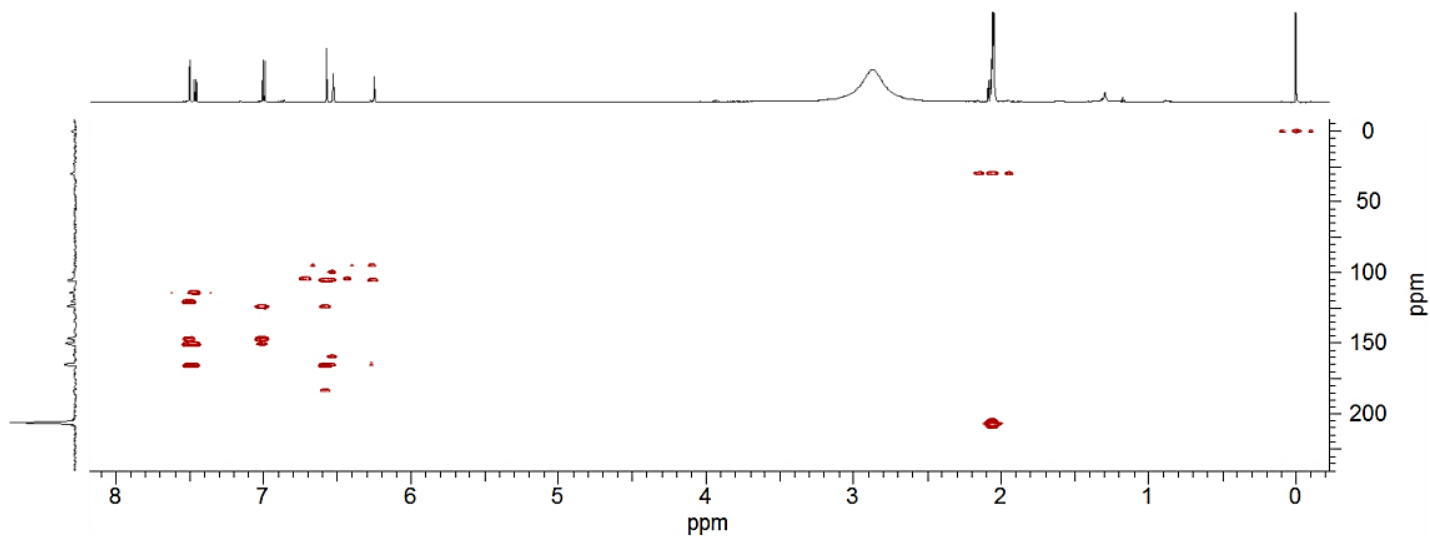


Figura 77 – Mapa de correlação HMBC (600 MHz ^1H e 125 MHz ^{13}C , TMS, acetona- d_6) para a substância VT10 (luteolina) de *Vernonanthura tweediana*.



A Tabela 10 mostra os dados obtidos de ^1H RMN e ^{13}C RMN para a substância VT10 (luteolina) e os dados comparativos da literatura.

Tabela 10 – Dados de ^1H RMN e ^{13}C RMN para a substância VT10 (luteolina) de *Vernonanthura tweedieana*, e dados comparativos da literatura.

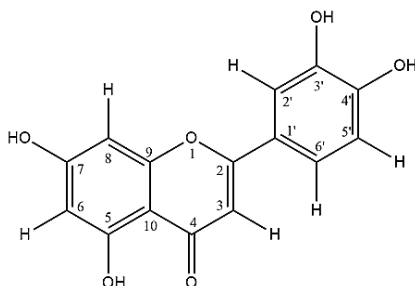
Posição	VT10		(KOBAYASHI et al., 2013)		(LOIZZO et al., 2007)	
	$\delta^1\text{H}$ <i>mult. (J Hz)</i>	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ <i>mult. (J Hz)</i>	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ <i>mult. (J Hz)</i>	$\delta^{13}\text{C}$
1	-	-	-	-	-	-
2	-	165,3	-	165,1	-	164,0
3	6,57 <i>s</i>	104,2	6,57 <i>s</i>	104,2	6,65 <i>s</i>	102,7
4	-	182,9	-	183,0	-	182,1
5	-	163,3	-	163,4	-	161,6
6	6,25 <i>d</i> (2,1)	99,6	6,51 <i>d</i> (1,5)	99,6	6,18 <i>d</i> (2,0)	98,6
7	-	164,9	-	164,8	-	164,6
8	6,53 <i>d</i> (2,1)	94,7	6,24 <i>d</i> (1,5)	94,6	6,43 <i>d</i> (2,0)	94,0
9	-	158,9	-	158,8	-	157,4
10	-	105,3	-	105,3	-	103,8
1'	-	123,7	-	123,8	-	121,6
2'	7,50 <i>d</i> (2,3)	114,1	7,49 <i>d</i> (2,2)	114,1	7,39 <i>d</i> (2,2)	113,5
3'	-	146,6	-	146,4	-	145,9
4'	-	150,2	-	150,0	-	149,8
5'	7,00 <i>d</i> (8,4)	116,6	6,99 <i>d</i> (8,3)	116,6	6,88 <i>d</i> (7,6)	116,2
6'	7,46 <i>dd</i> (8,4; 2,3)	120,1	7,47 <i>dd</i> (8,3; 2,2)	120,1	7,40 <i>dd</i> (7,8; 2,2)	119,1
OH-5	13,00 <i>s</i> (600 MHz ^1H , 125 MHz ^{13}C , acetona- <i>d</i> 6)	-	(500 MHz ^1H , 125 MHz ^{13}C , acetona- <i>d</i> 6)	-	(400 MHz ^1H , 100 MHz ^{13}C , DMSO- <i>d</i> 6)	-

A partir das informações pode-se confirmar que a substância VT10 trata-se da flavona luteolina ou 5,7,3',4'-tetra-hidroxi-flavona (Figura 78).

Sua fórmula molecular é $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$, peso molecular calculado de 286,0477 g/mol, e grau de insaturação igual a 11 (LOIZZO et al., 2007; YING et al., 2009; KOBAYASHI et al., 2013; SCOGNAMIGLIO et al., 2014; SHI et al., 2014)

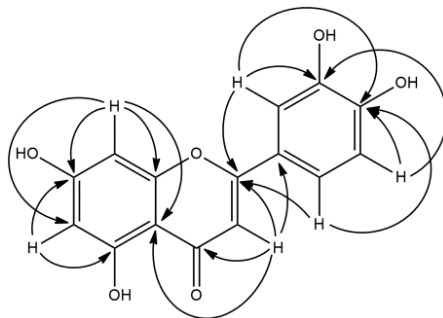
A Figura 79 apresenta as principais correlações entre ^1H - ^{13}C observadas do mapa de HMBC para a substância VT10 (luteolina).

Figura 78 – Estrutura molecular da substância VT10 (luteolina) de *Vernonanthura tweedieana*.



Fonte: adaptado de Kobayashi et al. (2013) e Shi et al. (2014).

Figura 79 – Correlações a longa distância entre ^1H - ^{13}C (HMBC) da substância VT10 (luteolina) de *Vernonanthura tweedieana*.

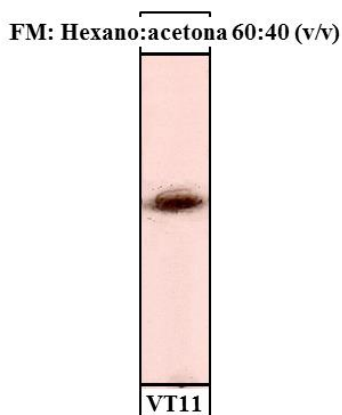


5.4.8 Substância VT11 (Glaucolídeo A)

A substância VT11 foi isolada na forma de um óleo viscoso de coloração esbranquiçada (16,5 mg). Na análise em CCD, empregando eluente hexano:acetona 60:40 (v/v), a substância apresentou extinção (254 nm) roxa, mas não foi visualizar fluorescência (366 nm). Após revelação com anisaldeído sulfúrico, apresentou-se como uma mancha de coloração marrom ($R_f=0,57$), conforme ilustrado na Figura 80.

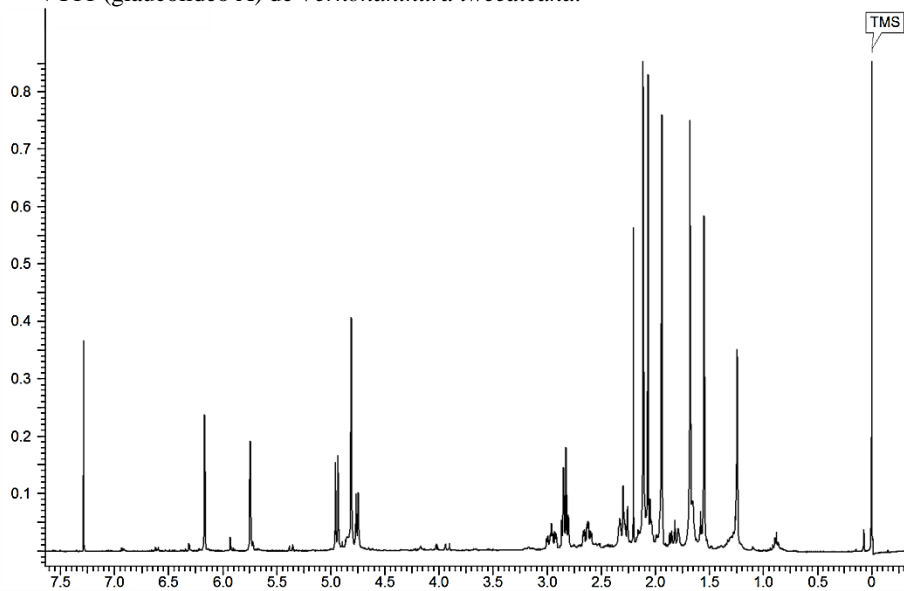
O espectro de RMN ^1H obtido à temperatura ambiente da substância VT11 apresentou sinais alargados, dificultando sua interpretação. Desse modo, as análises de RMN ^1H e bidimensionais foram desenvolvidas em temperatura reduzida, a 263 K (-10,1 °C), mostrando a maior parte dos sinais melhor resolvidos. A Figura 81 apresenta a visão geral do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância VT11 em temperatura reduzida.

Figura 80 - Análise por cromatografia em camada delgada da substância VT11 (glaucolídeo A) de *Vernonanthura tweedieana*.



Cromatograma da substância VT11 (glaucolídeo A) de *V. tweedieana*, revelado com anisaldeído sulfúrico. **FM**: fase móvel.

Figura 81 – Espectro de ^1H RMN (400 MHz, TMS, CDCl_3) para a substância VT11 (glaucolídeo A) de *Vernonanthura tweedieana*.



A análise do espectro de ^1H RMN mostrou a presença de multipletos em δ 6,17 (1H, H-3'a) e δ 5,75 (1H, H-3'b) indicando hidrogênios olefínicos, ligados a carbonos sp^2 (Figura 82). Foram observados de sinal de simpleto largo em δ 4,81 (2H, H-13a,b) e dupletos em δ 4,95 (1H, $J=9,5$, H-6) e δ 4,76 (1H, $J=8,3$, H-8), indicam hidrogênios próximos a elemento eletronegativo (oxigênio) (Figura 83).

Observaram-se sinais simpleto em δ 1,55 (3H, H-14) e δ 1,68 (3H, H-15) característicos de metilas (CH_3), e simpletos em δ 1,94 (3H, H-4'), δ 2,07 (3H, H-2'') e δ 2,11 (3H, H-2''') que indicam metilas ligadas a carbonos sp^2 (Figura 84).

A análise do experimento bidimensional de HSQC (Figura 85) confirmou a existência de um metileno formado pelos hidrogênios em δ 4,81 *sl* com seu carbono em δ 54,9 (C-13) estando ligado ao oxigênio. Foi possível confirmar também o CH_2 formado pelos hidrogênios olefínicos δ 6,17 *m* e δ 5,75 *m* cujo carbono sp^2 está em δ 128,0 (C-3').

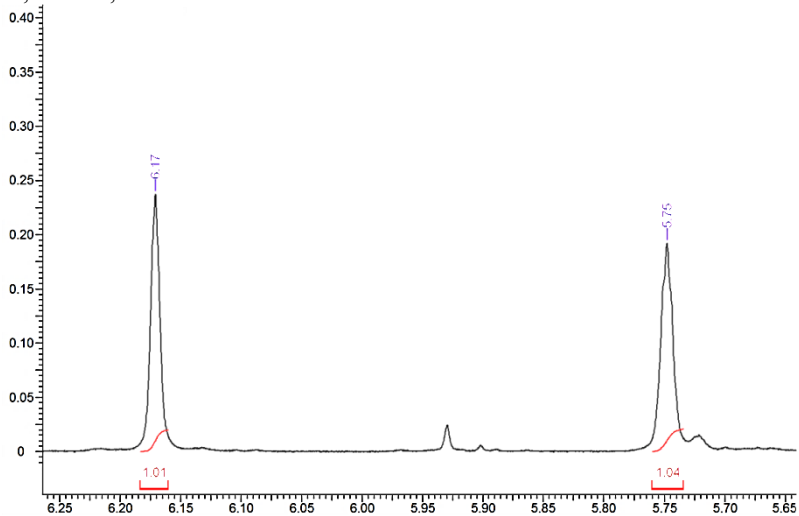
Além desses, foram identificados outros três grupos CH_2 com carbonos sp^3 em δ 32,6 (C-2), δ 40,0 (C-9) e δ 31,4 (C-3). Com a análise foi possível identificar sinais de hidrogênio sobrepostos aos sinais de CH_3 . Foram observados os sinais em δ 2,96 *ddd* (1H, $J=17,3$; 12,7; 4,8, H-2a) e em δ 2,31 *m* (1H, H-2b); outros dois H em δ 2,63 *ddd* (1H, $J=14,0$; 13,5; 4,8, H-3a) e δ 1,66 *m* (1H, H-3a); e os sinais em δ 2,84 *dd* (1H, $J=16,2$; 8,3, H-9a) e δ 2,28 *d* (1H, $J=16,2$, H-9b) correspondem ao CH_2 de carbono δ 40,0. O valor de J menor (8,3 Hz) do H em δ 2,84 deste último CH_2 sugere acoplamento com o H do metino em δ 4,76 *d* (com mesmo valor de J), de carbono em δ 64,3 (C-8).

Foi possível identificar um terceiro metino, de H em δ 2,84 *d* (1H, $J=9,5$, H-5) e carbono em δ 58,5 (C-5), cujo valor de J sugere acoplamento com o CH de H em δ 4,95 *d* (1H, $J=9,5$, H-6) de carbono em δ 80,7 (C-6), indicando serem CH vicinais.

Os dados de HMBC (Figura 86) confirmam a existência de 23 carbonos para a molécula. Foi observada a presença de quatro carbonos carbonílicos de grupamentos éster, em δ 166,2 (C-1'), δ 169,5 (C-12), δ 169,8 (C-1'') e δ 170,4 (C-1'''). Para a carbonila em δ 166,2, foram observadas correlações com os hidrogênios olefínicos (δ 4,81 *sl*) e os H da metila em δ 1,94 *s*, estes últimos que também correlacionam com um segundo carbono olefínico em δ 134,4 (C-2'), indicando se tratar do radical metacrilóiloxi.

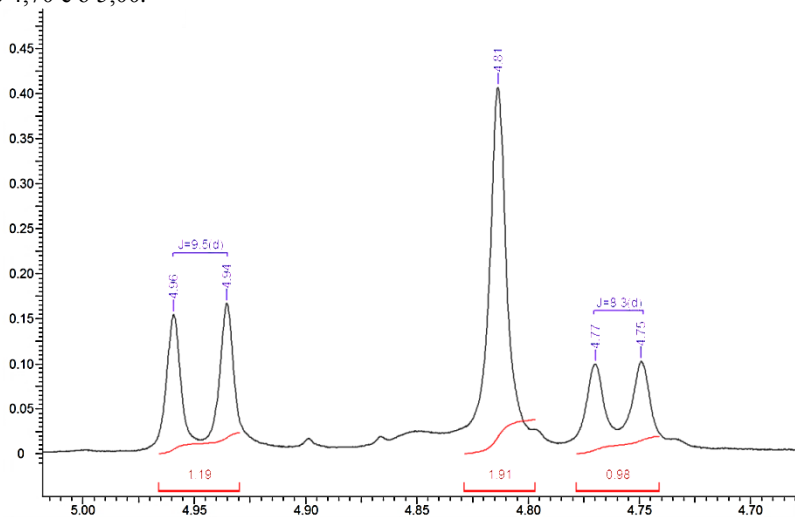
As carbonilas em δ 170,4 e δ 169,8 apresentam correlação com os hidrogênios de CH_3 em δ 2,07 *s* e δ 2,11 *s*, respectivamente, indicando a presença de dois radicais acetoxi.

Figura 82 – Espectro de ^1H RMN (400 MHz, TMS, CDCl_3) para a substância VT11 (glaucólido A) de *Vernonanthura tweedieana*, ampliado na região entre δ 5,65 e δ 6,25.



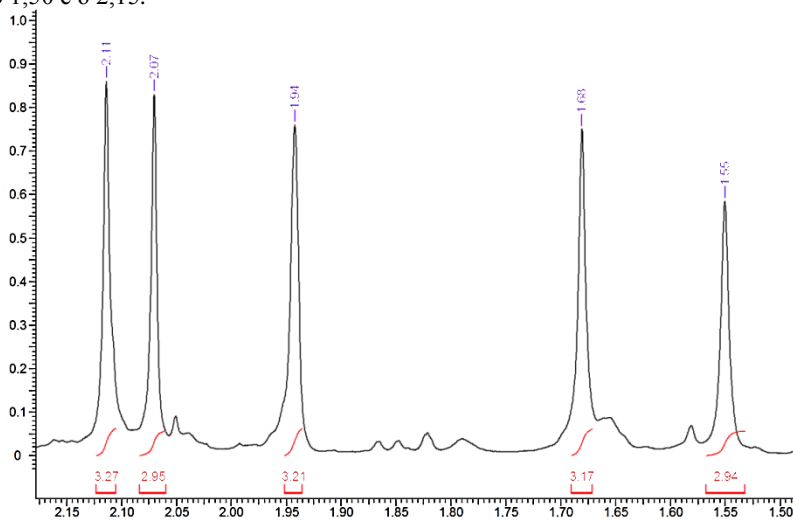
Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Figura 83 – Espectro de ^1H RMN (400 MHz, TMS, CDCl_3) para a substância VT11 (glaucólido A) de *Vernonanthura tweedieana*, ampliado na região entre δ 4,70 e δ 5,00.



Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Figura 84 – Espectro de ^1H RMN (400 MHz, TMS, CDCl_3) para a substância VT11 (glaucólídeo A) de *Vernonanthura tweedieana*, ampliado na região entre δ 1,50 e δ 2,15.



Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Figura 85 – Mapa de correlação HSQC (400 MHz ^1H e 100 MHz ^{13}C , TMS, CDCl_3) para a substância VT11 (glaucólídeo A) de *Vernonanthura tweedieana*.

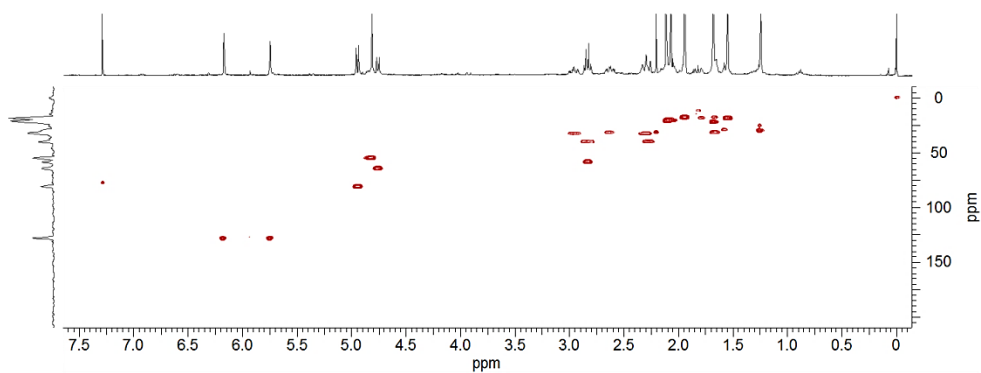
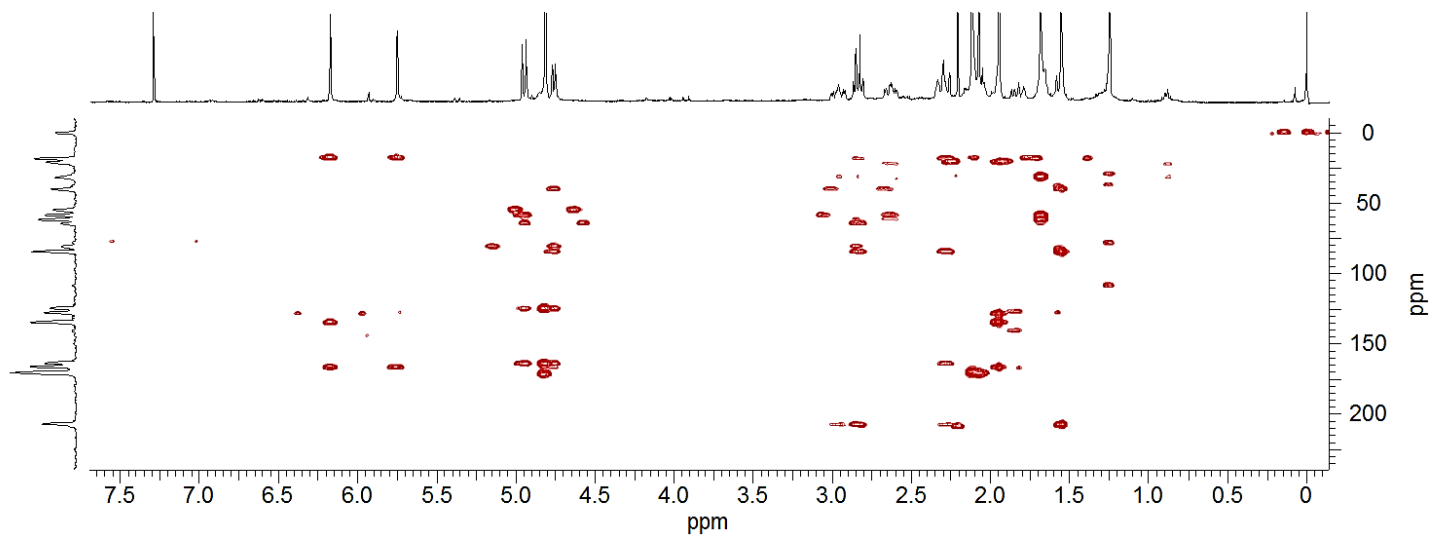


Figura 86 – Mapa de correlação HMBC (400 MHz ^1H e 100 MHz ^{13}C , TMS, CDCl_3) para a substância VT11 (glaucolídeo A) de *Vernonanthura tweediana*.



Para a carbonila em 169,5 ppm, foram observadas correlações com os hidrogênios em δ 4,81 *m*. Estes hidrogênios também revelaram correlações com outros dois carbonos sp^2 característicos, sugerindo a existência de um anel γ -lactônico α,β -insaturado. O anel lactônico contém, além da carbonila (δ 169,5) o α -carbono em δ 124,6 (C-11), β -carbono em δ 163,6 (C-7) e o γ -carbono em δ 80,7 (C-6). Foi possível observar, também, outros três carbonos quaternários, sendo uma quinta carbonila em δ 206,7 (C-1) e dois carbonos sp^3 próximos a oxigênio, em 61,5 (C-4) e 84,4 (C-10) ppm.

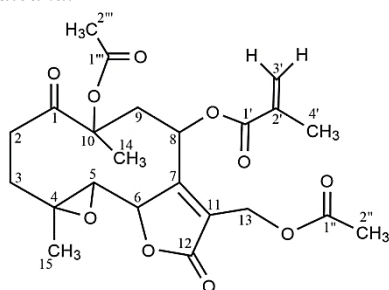
Os dados observados de 1H RMN e ^{13}C RMN para a substância VT11, juntamente com os dados da literatura, estão apresentadas na Tabela 11.

Tabela 11 – Dados de 1H RMN e ^{13}C RMN para a substância VT11 (glaucolídeo A) de *Vernonanthura tweedieana*, e dados comparativos da literatura.

Posição	VT11		(BARDÓN et al., 1990)		(BOHLMANN; CZERSON, 1978)
	δ 1H mult. (J Hz)	δ ^{13}C	δ 1H mult. (J Hz)	δ ^{13}C	δ 1H mult. (J Hz)
1	-	206,7	-	207,7	-
2a	2,96 <i>ddd</i> (17,3; 12,7; 4,8)		2,93 <i>ddd</i> (17,0; 11,5; 5,0)		1,98 <i>dl</i> (15,0)
2b	2,31 <i>m</i>	32,6	2,50 <i>m</i>	33,3	2,41 <i>ddd</i> (15,0; 12,0; 3,0)
3a	2,63 <i>ddd</i> (14,0; 13,5; 4,8)	31,4	2,50 <i>m</i>		2,18 <i>ddd</i> (15,0; 12,0; 3,0)
3b	1,66 <i>m</i>		1,70 ~	32,5	1,32 <i>dl</i> (15,0)
4	-	61,5	-	61,0	-
5	2,84 <i>d</i> (9,5)	58,5	2,74 <i>d</i> (9,5)	59,5	2,26 <i>d</i> (9,5)
6	4,95 <i>d</i> (9,5)	80,7	4,89 <i>d</i> (9,5)	81,1	4,73 <i>dl</i> (9,5)
7	-	163,6	-	162,8	-
8	4,76 <i>d</i> (8,3)	64,3	4,93 <i>d</i> (7,5)	64,5	4,92 <i>dl</i> (7,5)
9a	2,84 <i>dd</i> (16,2; 8,3)		2,82 <i>dd</i> (15,5; 7,5)		1,97 <i>dd</i> (16,0; 7,5)
9b	2,28 <i>d</i> (16,2)	40,0	2,41 <i>dl</i> (15,5)	41,9	2,52 <i>d</i> (16,0)
10	-	84,4	-	84,5	-
11	-	124,6	-	126,0	-
12	-	169,5	-	169,4	-
13a	4,81 <i>sl</i>		4,90 <i>dd</i> (13,1)		4,93 <i>dl</i> (12,5)
13b	4,81 <i>sl</i>	54,9	4,83 <i>dd</i> (13,1)	55,3	4,77 <i>dl</i> (12,5)
14	1,55 <i>s</i>	18,7	1,67 <i>s</i>	19,1	1,47 <i>s</i>
15	1,68 <i>s</i>	22,5	1,61 <i>s</i>	19,1	1,50 <i>s</i>
1'	-	166,2	-	166,3	-
2'	-	134,4	-	135,2	-
3'a	6,17 <i>m</i>		6,16 <i>tl</i> (1,0)		5,99 <i>sl</i>
3'b	5,75 <i>m</i>	128,0	5,69 <i>tl</i> (1,0)	127,2	5,22 <i>sl</i>
4'	1,94 <i>s</i>	18,1	1,96 <i>q</i> (1,0)	17,8	1,72 <i>sl</i>
1''	-	170,4	-	170,6	-
2''	2,07 <i>s</i>	20,8	2,07 <i>s</i>	20,8	1,65 <i>s</i>
1'''	-	169,8	-	169,9	-
2'''	2,11 <i>s</i>	21,0	2,06 <i>s</i>	20,5	1,73 <i>s</i>
	(400 MHz 1H , 100 MHz ^{13}C , $CDCl_3$)		(270 MHz 1H , 67 MHz ^{13}C , $CDCl_3$)		(270 MHz 1H , 100, C_6D_6)

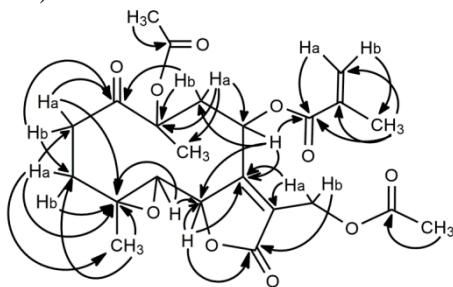
A partir destes dados é possível confirmar que a substância VT11 corresponde a lactona sesquiterpênica, glaucolídeo A (Figura 87), cuja fórmula molecular é $C_{23}H_{28}O_{10}$ e peso molecular calculado 464,1682 g/mol, e com grau de insaturação de dez (ABDEL-BASET et al., 1971; PADOLINA et al., 1974; BOHLMANN; CZERSON, 1978; CATALÁN et al., 1988; BARDÓN et al., 1990; CARTAGENA et al., 2007). A Figura 88 mostra algumas das correlações entre $^1H-^{13}C$ da substância VT11, identificadas a partir do experimento de HMBC.

Figura 87 – Estrutura molecular da substância VT11 (glaucolídeo A) de *Vernanthura tweediana*.



Fonte: adaptado de Padolina et al. (1974) e Bohlmann e Czerson (1978).

Figura 88 – Correlações a longa distância entre $^1H-^{13}C$ (HMBC) da substância VT11 (glaucolídeo A) de *Vernanthura tweediana*.

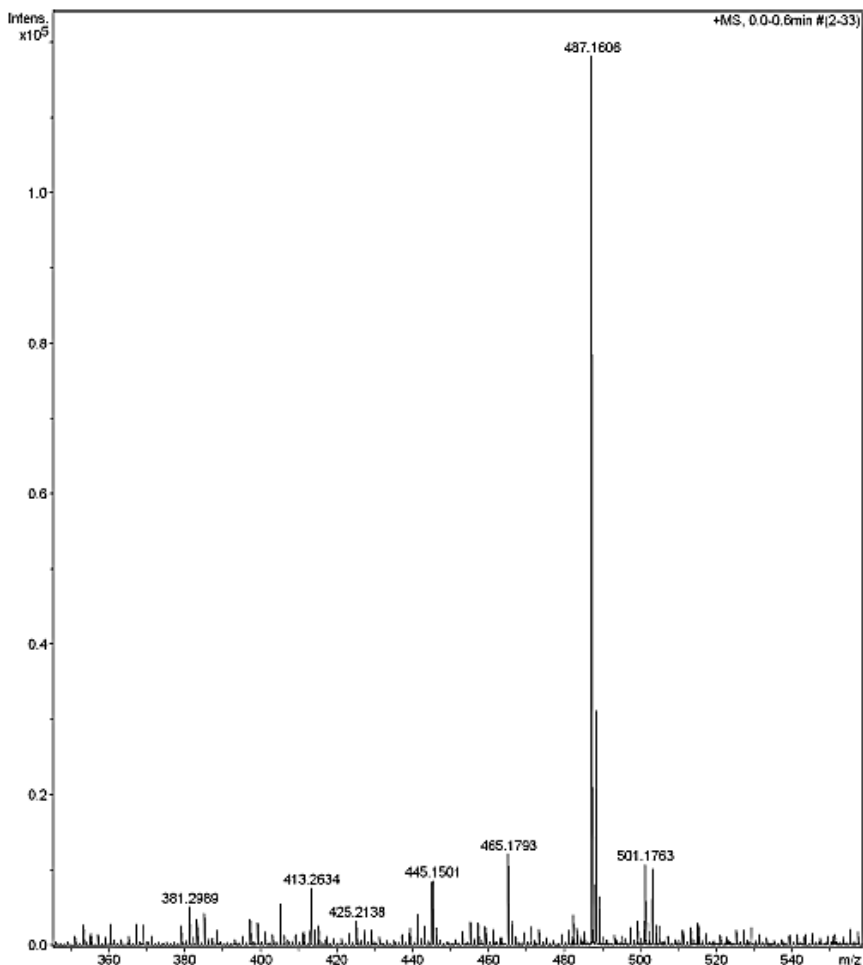


Bastante incidente em espécies do gênero *Vernonia* (ABDEL-BASET et al., 1971; PADOLINA et al., 1974; MABRY et al., 1975b; JAKUPOVIC et al., 1985), o glaucolídeo A também já foi identificado para as espécies de *Vernanthura* como em *V. pinguis*, *V. chamaedrys*, *V. phosphorica*, *V. squamulosa* (CATALÁN et al., 1986; CATALÁN et al., 1988; BORKOSKY et al., 1997; KOTOWICZ et al., 1998; IGUAL et al., 2013).

Borkosky e colaboradores (BORKOSKY et al., 2009) demonstraram atividade moluscicida ($LD_{50}=38,18 \mu\text{g/ml}$) para o glaucolídeo A contra *Biomphalaria peregriana*.

A análise de EM ESI-Q-TOF confirma se tratar do glaucolídeo A, uma vez que é possível observar a presença de íon molecular na forma de aduto com sódio $m/z=487,1606 [M+Na]^+$ (Figura 89).

Figura 89 – Espectro de massas ESI-Q-TOF da substância VT11 (glaucolídeo A) de *Vernonanthura tweedieana*.



Espectro de massas de alta resolução ESI-Q-TOF (modo positivo) da substância VT1. Eixo Y: intensidade (10^5); Eixo X: relação carga/massa (m/z).

5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA *in vitro*

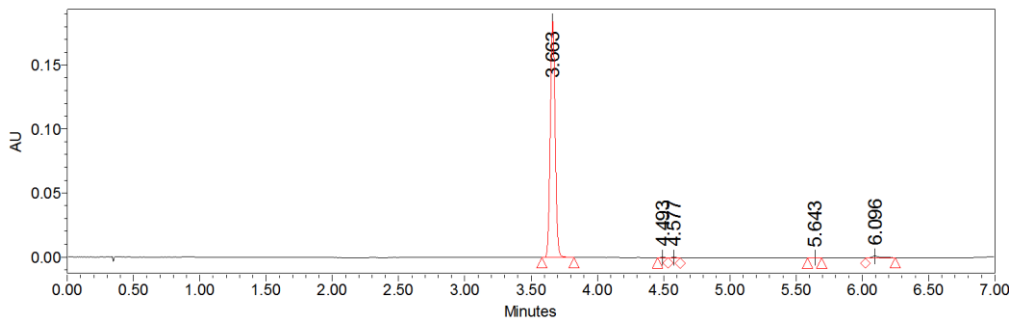
A substância VT4 (eriodictiol), componente majoritário encontrado na investigação fitoquímica da *V. tweedieana* foi avaliada biologicamente em ensaios *in vitro*.

Antes da avaliação da atividade biológica a substância foi analisada quanto ao teor de pureza por cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE).

5.5.1 Análise de pureza por cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE)

O cromatograma derivado da análise por CLUE, apresentado na Figura 90, mostrou que o tempo de retenção para o eriodictiol (VT4) nas condições analisadas foi de 3,663 minutos.

Figura 90 – Cromatograma da substância VT4 (eriodictiol) de *Vernonanthura tweedieana* por CLUE-DAD.



Cromatograma adquirido em comprimento de onda de 287 nm; Eixo Y: intensidade; Eixo X: tempo de retenção (minutos).

Foram detectados outros picos indicativos de impureza, nos tempos de retenção de 4,493; 4,577; 5,643 e 6,096 minutos. As áreas de todos os picos foram integradas e a porcentagem de cada pico foi calculada.

Os dados para a análise de pureza estão apresentados no Quadro 3. A avaliação de pureza indicou uma pureza maior que 98% para o eriodictiol.

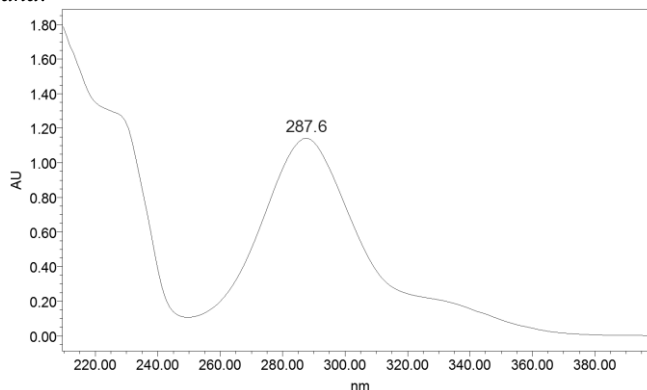
Quadro 3 – Valores de tempo de retenção, área do pico e porcentagem de área para a substância VT4 (eriodictiol) de *Vernonanthura tweedieana*.

Pico	Tempo de retenção (minutos)	Área do pico	Porcentagem de área
1	3,663	473072	98,15
2	4,493	858	0,18
3	4,577	999	0,21
4	5,643	696	0,14
5	6,096	6373	1,32

A porcentagem dos picos foi calculada considerando a área de cada pico em relação à somatória das áreas obtidas nos quatro picos.

O espectro de varredura no UV entre 200 a 400 nm da substância VT4 (eriodictiol) mostrou uma banda com máximo de absorção em 287 nm e uma banda menos intensa na região próxima a 330 nm (Figura 91).

Figura 91 – Espectro de UV da substância VT4 (eriodictiol) de *Vernonanthura tweedieana*.



Espectro de varredura no ultravioleta (UV) entre os comprimentos de onda de 200 a 400 nm; Eixo Y: absorbância; Eixo X: comprimento de onda (nm).

Este perfil no UV da substância VT4 é característico daqueles apresentados por flavanonas, cujos máximos de absorção ocorrem entre 240 e 285 nm para banda II e entre 300 e 400 nm para a banda I. Devido à ausência da dupla ligação entre C-2 e C-3 em flavanonas e dihidroflavonois, não há contribuição do grupo cinamoil para a absorção no espectro de UV, havendo pouca ou nenhuma conjugação entre os anéis A e B. Por isso, apresentam a banda II, associada à absorção do sistema

benzoil, mais intensa que a banda I, esta última, aparecendo como um “ombro” da banda II (ZUANAZZI; MONTANHA, 2007; DA CUNHA, 2013; ÁSSIMOS, 2014).

5.5.2 Avaliação das atividades leishmanicida e tripanocida

A substância VT4 (eriodictiol) foi avaliada quanto as atividade leishmanicida e tripanocida. A substância foi investigada inicialmente quanto à porcentagem de inibição de crescimento para as células acometidas por *L. amazonensis* e *T. cruzi*.

Os valores de porcentagem de inibição de crescimento para a substância VT4, bem como para os controles positivos, estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 – Valores de porcentagem de inibição de crescimento para a substância VT4 (eriodictiol) de *Vernonanthura tweedieana* para as atividades leishmanicida e tripanocida.

Substância	Porcentagem de inibição de crescimento	
	<i>Leishmania amazonensis</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
Eriodictiol (VT4)(50 µM)	S.A.	22,65 (± 3,95)
Anfotericina (1 µM)	82,82 (± 4,24)	-
Benznidazol (15 µM)	-	56,96 (± 4,84)

Resultados expressos como média (± desvio padrão); S.A.: sem atividade.

Embora não se tenha observada a capacidade de inibição de crescimento de *L. amazonensis* e *T. cruzi* para o eriodictiol, relatos na literatura indicam sua atividade leishmanicida e tripanocida.

Segundo Tasdemir e colaboradores (2006) o eriodictiol apresentou atividade contra *L. donovani* (IC₅₀=10,4±5,3 µg/mL), *T. brucei rhodesiense* (IC₅₀=24,3±2,3 µg/mL) e *T. cruzi* (IC₅₀=14,5±3,8 µg/mL). Já em estudo realizado por Salem e Werbovets (2005), demonstrou-se atividade contra *L. donovani* (IC₅₀=25,0±4,4 µg/mL) e *T. brucei brucei* (IC₅₀=25-50 µg/mL). O eriodictiol também se mostrou ativo contra *T. brucei* (IC₅₀=14,3±1,6 µg/mL) em estudo realizado por Van Baren e colaboradores (2006).

A utilização de estratégias que promovam o direcionamento seletivo da substância às células alvo, como por exemplo, com o desenvolvimento de formulações farmacêuticas, seria uma alternativa muito útil para melhorar as atividades leishmanicida e tripanocida, assim como favorecer a seletividade.

6 CONCLUSÕES

- Foram identificadas 11 substâncias a partir da espécie *Vernonanthura tweedieana* (Baker) H. Rob..
 - A partir do extrato hidroetanólico de partes aéreas foram isolados como componentes majoritários o cafeato de etila (VT1), purificado das frações diclorometano e acetato de etila, e o eriodictiol (VT4), purificado da fração acetato de etila. Foram obtidos ainda da fração acetato de etila os componentes minoritários naringenina (VT2) e crisoeriol (VT3), em mistura.
 - No extrato hidroetanólico de caules e raízes foram obtidos os componentes minoritários 3-hidroxi-1-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)propan-1-ona (VT5) e evofolina B (VT6) em mistura, a partir da fração diclorometânica; e da fração acetato de etila, obtidos o eriodictiol (VT4), a apigenina (VT7), os ácido cafeico (VT8) e ácido protocatecuico (VT9) em mistura, e a luteolina (VT10).
 - A partir do extrato acetônico da lavagem foliar, preparado para a investigação de lactonas sesquiterpênicas, foi isolada a lactona sesquiterpênica glaucolídeo A (VT11).
- A técnica de lavagem foliar mostrou-se eficiente para a extração de lactona sesquiterpênica, sendo o glaucolídeo A (VT11) purificado facilmente em poucas etapas.
- Com exceção do eriodictiol, já anteriormente reportado para *V. tweedieana*, as demais substâncias estão sendo relatadas pela primeira vez para a espécie.
- A flavanona eriodictiol não apresentou atividade leishmanicida (frente a *Leishmania amazonensis*), e apresentou fraca atividade tripanocida (frente a *Trypanosoma cruzi*) com porcentagem de inibição de crescimento de 22,65%.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

A classificação das espécies da família Asteraceae entre tribos, considerando a morfologia, não é uma questão totalmente resolvida. A quimiotaxonomia, que se baseia na avaliação da ocorrência restrita de metabólitos secundários em determinados grupos de plantas pode ser de grande importância, uma vez que a análise dos principais constituintes destas espécies e a avaliação das informações químicas geradas podem contribuir para a resolução dos problemas de classificação intrafamiliar (ALVARENGA et al., 2001; VON POSER; MENTZ, 2007).

O conhecimento da composição química vegetal é de grande importância, já que a existência de um padrão comum no metabolismo secundário pode prover evidências mais corretas de parentesco e similaridade morfológica entre as espécies, e a descoberta de novos compostos pode contribuir como marcadores taxonômicos (GURIB-FAKIM, 2006; VON POSER; MENTZ, 2007).

A classificação do gênero *Vernonanthura* ainda permanece contraditória e estudos fitoquímicos podem ser usados para auxiliar na compreensão da sua estrutura taxonômica. Em termos químicos, a comparação entre o perfil fitoquímico de diferentes espécies de *Vernonanthura* pode corroborar para solução quanto à taxonomia desta tribo (IGUAL et al., 2013).

As lactonas sesquiterpênicas são os metabólitos secundários mais estudados na família Asteraceae, podendo ser utilizadas como marcadores taxonômicos e fitoquímicos para os diferentes membros da família (SEAMAN, 1982; EMERENCIANO et al., 1986; EMERENCIANO et al., 1987; DA COSTA; TERFLOTH; GASTEIGER, 2005; ARAÚJO et al., 2007).

Entende-se marcador químico como um constituinte ou classe de compostos químicos presente no insumo vegetal, idealmente a própria substância ativa, que preferencialmente seja responsável, ao menos em parte, pelo efeito terapêutico, sendo usado no controle de qualidade da matéria-prima, das preparações intermediárias e dos medicamentos fitoterápicos (LIST; SCHMIDT, 1989; BRASIL, 2004).

O glaucolídeo A, caracterizado pela primeira vez na espécie *Vernonanthura tweediana*, mostra-se uma possível substância a ser empregada como marcador químico e taxonômico para a espécie.

Além desta, o eriodictiol como componente majoritário também pode se revelar uma substância promissora a ser utilizada com marcador para *V. tweediana*. Neste contexto, tem-se como perspectiva futura

para este trabalho estabelecer cromatograficamente, por CLUE, o eriodictiol como marcador químico de controle de qualidade de droga vegetal para a espécie *V. tweedieana*.

O estabelecimento de marcadores químicos é indispensável para o planejamento e monitoramento de ações de transformação tecnológicas e para estudos de estabilidade de produtos intermediário e final, quando se trata de medicamentos fitoterápicos (SONAGLIO et al., 2007).

A transformação do material vegetal para um produto tecnicamente elaborado, intermediário ou acabado, implica na utilização de operações de transformação tecnológica, que devem visar à preservação da integridade química e farmacológica do vegetal, garantindo a constância de sua ação biológica, segurança e utilização, além da valorização de seu potencial terapêutico (TOLEDO et al., 2003).

Modificações moleculares de produtos naturais, com vista a aumentar a atividade ou seletividade e reduzir os efeitos colaterais ou toxicidade, tem sido uma crescente nos últimos anos. Revelam-se uma excelente ferramenta para o aprimoramento dos constituintes ativos até o desenvolvimento de uma alternativa terapêutica para o tratamento das diferentes enfermidades que acometem a humanidade (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998; CORDELL, 2000; MONTANARI; BOLZANI, 2001; BARREIRO, 2002; VIEGAS JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Segundo Lago e colaboradores (2014), devido às suas propriedades anti-inflamatória e antioxidante, os flavonoides mostram-se candidatos prováveis a serem avaliados para o tratamento de doenças inflamatórias, incluindo doenças pulmonares. Entretanto, apesar dos diversos testes em modelos experimentais, relacionando os flavonoides à inibição de citocinas associadas com a regulação de fatores de transcrição, são necessários mais estudos acerca dos efeitos específicos de flavonóides sobre mecanismos moleculares nas doenças pulmonares.

A flavanona eriodictiol possui propriedades anti-inflamatórias, sendo estas relacionadas à inibição da ativação do NF- κ B induzida por lipopolissacarídeo, resultante da inibição da degradação do inibidor de κ B- α e da fosforilação de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK). Parte do efeito pode ser também devido à inibição das enzimas xantina oxidase e ciclo-oxigenases 1 e 2, redução dos níveis de mTNF- α , inibição da prostaglandina E₂, inibição da produção de óxido nítrico, e à redução dos níveis de mRNA, interleucina-6 e interleucina-

1 β (XAGORARI et al., 2001; TAKANO-ISHIKAWA; GOTO; YAMAKI, 2006; ZHANG et al., 2006; LEE, 2011; LEE et al., 2013).

Considerando a utilização popular da espécie *V. tweedieana* para o tratamento de doenças respiratórias, outra perspectiva é a investigação da atividade anti-inflamatória para o eriodictiol (componente majoritário), em modelos *in vivo* de inflamação pleural.

Outra perspectiva futura para o trabalho é o desenvolvimento de estudos para a avaliação das atividades biológicas *in vitro* da lactona sesquiterpênica, glaucolídeo A.

Ainda, mais análises fitoquímicas podem ser desenvolvidas no intuito de explorar as demais frações de *V. tweedieana* não investigadas neste trabalho, especialmente, para a fração aquosa derivada do particionamento de cada combinação de farmacógenos.

Por fim, uma parte dos resultados obtidos no desenvolvimento de estudo não está sendo divulgada em função de se estabelecer a proteção intelectual sobre estas informações, almejando-se como perspectiva um futuro pedido de patente.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-BASET, Z.H.; SOUTHWICK, L.; PADOLINA, W.G.; YOSHIOKA, H.; MABRY, T.J.; JONES, S.B. Sesquiterpene lactones: a survey of 21 United States taxa from the genus *Vernonia* (Compositae). **Phytochemistry**, v. 10, n. 9, p. 2201-2204, 1971.
- ABE, N.; SATO, H.; SAKAMURA, S. Antifungal stress compounds from adzuki bean, *Vigna angularis*, treated with *Cephalosporium gregatum* type B. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 51, n. 2, p. 349-353, 1987.
- ABEGAZ, B.M.; KEIGE, A.W.; DIAZ, J.D.; HERZ, W. Sesquiterpene lactones and other constituents of *Vernonia* species from Ethiopia. **Phytochemistry**, v. 37, n. 1, p. 191-196, 1994.
- AHMAD, I. Phytochemical and biological studies of *Euphorbia serpens*, *Euphorbia granulata* (Euphorbiaceae) and *Vernonia cinerascens* (Compositae). **Tese de Doutorado**, Faculdade de Farmácia, Universidade Bahauddin Zakariya, Multan, Paquistão, 2009.
- AHMED, A.H. New flavone from the aerial parts of *Bougainvillea glabra*. **International Journal of Computational Engineering Research**, v. 4, n. 10, p. 2250-3005, 2014.
- ALEXANDRE, R.F.; BAGATINI, F.; SIMÕES, C.M.O. Interações entre fármacos e medicamentos fitoterápicos à base de ginkgo ou ginseng. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 1, p. 117-126, 2008.
- ALVARENGA, S.A.V.; FERREIRA, M.J.P.; EMERENCIANO, V.P.; CABROL-BASS, D. Chemosystematic studies of natural compounds isolated from Asteraceae: characterization of tribes by principal component analysis. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 56, n. 1, p. 27-37, 2001.
- ALVES, N.D.C.; SANTOS, T.C.; RODRIGUES, C.R.; CASTRO, H.C.; LIRA, L.M.; DORNELAS, C.B.; CABRAL, L.M. Avaliação da adequação técnica de indústrias de medicamentos fitoterápicos e officinais do estado do Rio de Janeiro. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, n. Sup., p. 745-753, 2008.
- ALVIM, N.A.T.; FERREIRA, M.A.; CABRAL, I.E.; ALMEIDA FILHO, A.J. The use of medicinal plants as a therapeutical resource: from the influences of the professional formation to the ethical and legal implications of its

applicability as an extension of nursing care practice. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 14, n. 3, p. 316-323, 2006.

ARAÚJO, E.D.L.; RANDAU, K.P.; XAVIER, H.S.; FERREIRA, C.P.; PIMENTEL, R.M.D.M. Padronização farmacognóstica das raízes de *Acanthospermum hispidum* DC.(Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 88, n. 4, p. 159-162, 2007.

ARAÚJO, E.M.P.D. Técnicas espectroscópicas e quimiométricas como ferramentas na confirmação da estrutura de substâncias isoladas de produtos naturais ou obtidas por síntese. **Tese de Doutorado**, Instituto de Química, Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador/BA, Brasil, 2011.

ASCENSÃO, L. Estruturas secretoras em plantas. Uma abordagem morfo-anatômica. *in* FIGUEIREDO, A. C.; BARROSO, J. G.; PEDRO, L. G. **Potencialidades e Aplicações das Plantas Aromáticas e Medicinais** 3ª ed., Lisboa, Portugal, Editora da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa - Centro de Biotecnologia Vegetal, p. 19-28, 2007.

ÁSSIMOS, A.A. Avaliação da concentração e dos tipos de flavonoides na própolis utilizando métodos quimiométricos de classificação e calibração. **Dissertação de Mestrado**, Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte/MG, Brasil, 2014.

BAKER, J.G. Fascículo Compositae: I. Vernoniaceae. *in* VON MARTIUS, C. F. P.; EICHLER, A. G. **Flora brasiliensis**, v. 6, parte II, p. 99, 1873.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191-203, 2006.

BALUNAS, M.J.; KINGHORN, A.D. Drug discovery from medicinal plants. **Life sciences**, v. 78, n. 5, p. 431-441, 2005.

BARBASTEFANO, V. Atividade antiulcerogênica de extratos brutos, frações semi-purificadas e substância ativa de duas espécies do gênero *Vernonia*: *Vernonia polyanthes* e *Vernonia ferruginea*. **Tese de Doutorado**, Instituto de Biologia, Departamento de Fisiologia e Biofísica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP, Brasil, 2007.

BARBASTEFANO, V.; COLA, M.; LUIZ-FERREIRA, A.; FARIAS-SILVA, E.; HIRUMA-LIMA, C.A.; RINALDO, D.; VILEGAS, W.; SOUZA-BRITO, A.R.M. *Vernonia polyanthes* as a new source of antiulcer drugs. **Fitoterapia**, v. 78, n. 7, p. 545-551, 2007.

BARDÓN, A.; BORKOSKY, S.; YBARRA, M.I.; MONTANARO, S.; CARTAGENA, E. Bioactive plants from Argentina and Bolivia. **Fitoterapia**, v. 78, n. 3, p. 227-231, 2007.

BARDÓN, A.; CATALÁN, C.A.N.; GUTIÉRREZ, A.B.; HERZ, W. Glaucolides and related sesquiterpene lactones from *Vernonia incana*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 1, p. 313-315, 1990.

BARREIRO, E.J. Estratégia de simplificação molecular no planejamento racional de fármacos: a descoberta de novo agente cardioativo. **Química Nova**, v. 25, n. 6/B, p. 1172-1180, 2002.

BARRETT, M.P.; BURCHMORE, R.J.S.; STICH, A.; LAZZARI, J.O.; FRASCH, A.C.; CAZZULO, J.J.; KRISHNA, S. The trypanosomiasis. **The Lancet**, v. 362, n. 9394, p. 1469-1480, 2003.

BAZON, J.N.; LOPES, J.L.C.; VICHNEWSKI, W.; DIAS, D.A.; NAGAMITI, K.; CUNHA, W.R.; HERZ, W. Cadinanolides and other constituents from *Vernonia fruticulosa* and *Vernonanthura discolor*. **Phytochemistry**, v. 44, n. 8, p. 1535-1536, 1997.

BELLIK, Y.; BOUKRAË, L.; ALZHRANI, H.A.; BAKHOTMAH, B.A.; ABDELLAH, F.; HAMMOUDI, S.M.; IGUER-OUADA, M. Molecular mechanism underlying anti-inflammatory and anti-allergic activities of phytochemicals: an update. **Molecules**, v. 18, n. 1, p. 322-353, 2012.

BENNETT, R.N.; WALLSGROVE, R.M. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. **New Phytologist**, v. 127, n. 4, p. 617-633, 1994.

BENTAMENE, A.; BAZ, M.; BOUCHEHAM, R.; BENAYACHE, S.; CRECHE, J.; BENAYACHE, F. Flavonoid aglycones from *Centaurea sphaerocephala*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 44, n. 2, p. 234-235, 2008.

BOHLMANN, F.; CZERSON, H. A new glaucolide derivative from *Erlangea remifolia*. **Phytochemistry**, v. 17, n. 7, p. 1190-1191, 1978.

BOHLMANN, F.; ZDERO, C.; KING, R.M.; ROBINSON, H. Further hirsutinolides from *Vernonia polyanthes*. **Phytochemistry**, v. 22, n. 12, p. 2863-2864, 1983.

BORKOSKY, S.; BARDÓN, A.; CATALÁN, C.A.N.; DÍAZ, J.G.; HERZ, W. Diterpenes from *Vernonanthura amplexicaulis*. **Phytochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1477-1479, 1995.

BORKOSKY, S.; BARDÓN, A.; CATALÁN, C.A.N.; DÍAZ, J.G.; HERZ, W. Glaucolides, hirsutinolides and other sesquiterpene lactones from *Vernonanthura pinguis*. **Phytochemistry**, v. 44, n. 3, p. 465-470, 1997.

BORKOSKY, S.; DE LEÓN, S.P.; JUÁREZ, G.; SIERRA, M.G.; BARDÓN, A. Molluscicidal sesquiterpene lactones from species of the tribe Vernonieae (Compositae). **Chemistry & Biodiversity**, v. 6, n. 4, p. 513-519, 2009.

BRAGA, F.G.; BOUZADA, M.L.M.; FABRI, R.L.; MATOS, M.O.; MOREIRA, F.O.; SCIO, E.; COIMBRA, E.S. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 396-402, 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, Ministério da Saúde. **Resolução RDC nº 48 de 16 de março de 2004**. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos, D.O.U. - Diário Oficial da União, 18 de março de 2004, 2004.

BRASIL. **Ministério da Saúde - Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos** Brasília, Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, 2009.

BROCHINI, C.B.; LAGO, J.H.G. Aplicação de técnicas cromatográficas e espectrométricas como ferramentas de auxílio na identificação de componentes de óleos voláteis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 2, p. 266-270, 2007.

BROSS-WALCH, N.; KÜHN, T.; MOSKAU, D.; ZERBE, O. Strategies and tools for structure determination of natural products using modern methods of NMR spectroscopy. **Chemistry & Biodiversity**, v. 2, n. 2, p. 147-177, 2005.

BUSKÜHL, H. Avaliação *in vitro* do mecanismo de ação citotóxica de lactonas sesquiterpênicas e outras substâncias isoladas de *Vernonia*

scorpioides (LAM) Pers. **Dissertação de Mestrado**, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Mestrado Acadêmico em Ciências Farmacêuticas, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí/SC, Brasil, 2007.

CABRERA, A.L.; KLEIN, R.M. Fascículo Compostas: 3. Tribo Vernonieae. in REITZ, R. **Flora Ilustrada Catarinense**, Itajaí/SC, Brasil, Herbário "Barbosa Rodrigues", p. 324-327, 1980.

CALIXTO, J.B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1, p. 131-134, 2005.

CALIXTO, J.B.; SIQUEIRA JUNIOR, J.M. Desenvolvimento de medicamentos no Brasil: desafios. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 78, n. 1, p., 2008.

CARTAGENA, E.; COLOM, O.Á.; NESKE, A.; VALDEZ, J.C.; BARDÓN, A. Effects of plant lactones on the production of biofilm of *Pseudomonas aeruginosa*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 55, n. 1, p. 22-25, 2007.

CARVALHO, J.C.T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. in SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 6ª ed., Porto Alegre/Florianópolis, Brasil, Editora da UFRGS/Editora da UFSC, p. 519-535, 2007.

CARVALHO, M.G.; COSTA, P.M.; SANTOS ABREU, H. Flavanones from *Vernonia diffusa*. **Journal Brazilian Chemical Society** v. 10, n. 2, p. 163-166, 1999.

CATALÁN, C.A.N.; DE IGLESIAS, D.I.A.; KAVKA, J.; SOSA, V.E.; HERZ, W. Sesquiterpene lactones and other constituents of *Vernonia mollissima* and *Vernonia squamulosa*. **Journal of Natural Products**, v. 49, n. 2, p. 351-353, 1986.

CATALÁN, C.A.N.; DE IGLESIAS, D.I.A.; KAVKA, J.; SOSA, V.E.; HERZ, W. Glaucolides and related sesquiterpene lactones from *Vernonia chamaedrys*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 1, p. 197-202, 1988.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais.

Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

CHATURVEDI, D. Sesquiterpene lactones: structural diversity and their biological activities. In-Opportunity, Challenges and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry. **Research Signpost**, v. 2011, n., p. 313-334, 2011.

CHINOU, I. Primary and secondary metabolites and their biological activity. *in* WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M.; SHERMA, J.; KOWALSKA, T. **Thin layer chromatography in phytochemistry**, Chromatographic Science Series, New York, CRC Press LLC, 99, p. 59-76, 2008.

COOK, N.C.; SAMMAN, S. Flavonoids - chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 7, n. 2, p. 66-76, 1996.

CORDELL, G.A. Changing strategies in natural products chemistry. **Phytochemistry**, v. 40, n. 6, p. 1585-1612, 1995.

CORDELL, G.A. Biodiversity and drug discovery - a symbiotic relationship. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 463-480, 2000.

COUTINHO, M.A.S.; MUZITANO, M.F.; COSTA, S.S. Flavonoides: potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 3, p. 241-256, 2009.

CRAGG, G.M.; GROTHAUS, P.G.; NEWMAN, D.J. Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. **Chemical Reviews**, v. 109, n. 7, p. 3012-3043, 2009.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T.M.; LEWIS, N.G. Natural products (secondary metabolites). *in* BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville, Maryland, American Society of Plant Physiologists, p. 1250-1318, 2000.

CUSHNIE, T.P.T.; LAMB, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, n. 5, p. 343-356, 2005.

DA COSTA, F.B.; TERFLOTH, L.; GASTEIGER, J. Sesquiterpene lactone-based classification of three Asteraceae tribes: a study based on self-organizing

neural networks applied to chemosystematics. **Phytochemistry**, v. 66, n. 3, p. 345-353, 2005.

DA CUNHA, C.P. Contribuição na investigação fitoquímica de *Glycine max* (soja) e *Dipteryx odorata* (cumaru) – otimização de análise cromatográfica e caracterização estrutural de flavonoides **Dissertação de Mestrado**, Instituto de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica/RJ, Brasil, 2013.

DAVIES, N.M.; YÁÑEZ, J.A. **Flavonoid Pharmacokinetics: Methods of Analysis, Preclinical and Clinical Pharmacokinetics, Safety, and Toxicology**, Hoboken, New Jersey, Estados Unidos, John Wiley & Sons, 2012.

DEL CORRAL, S.; DIAZ-NAPAL, GEORGINA N. ; ZARAGOZA, M.; CARPINELLA, M.C.; RUIZ, G.; PALACIOS, S.M. Screening for extracts with insect antifeedant properties in native plants from central Argentina. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 13, n. 5, p. 498-505, 2014.

DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica** 2ª ed., São Paulo, Brasil, Editora Unesp, 2002.

DIAS, J.F.G.; VIRTUOSO, S.; DAVET, A.; CUNICO, M.M.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G.; AUER, C.G.; GRIGOLETTI-JÚNIOR, A.; OLIVEIRA, A.B.; FERRONATO, M.L. Atividade antibacteriana e antifúngica de extratos etanólicos de *Aster lanceolatus* Willd., Asteraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 1, p. 83-87, 2006.

DÍAZ, G.; NOGUEIRA, M.A.; OLGUÍN, C.F.A.; SOMENSI, A.; VIDOTTI, G.J. Estudo fitoquímico e biológico de *Vernonia tweediana* Baker (Asteraceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 1, p. 56, 2008.

DUARTE, M.R.; CHELLA, L. Caracteres anatômicos de folha de *Vernonanthura tweediana* (Baker) H. Rob., Asteraceae. **Visão Acadêmica**, v. 15, n. 1, p. 5-14, 2014.

EMERENCIANO, V.D.P. A evolução de lactonas sesquiterpênicas em angiospermas. **Dissertação de Mestrado**, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo/SP, Brasil, 1983.

EMERENCIANO, V.D.P.; AUXILIADORA, M.; KAPLAN, C.; GOTTLIEB, O.R.; BONFANTI, M.R.D.M.; FERREIRA, Z.S.; COMEGNO, L.M.A. Evolution of sesquiterpene lactones in Asteraceae. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 14, n. 6, p. 585-589, 1986.

EMERENCIANO, V.D.P.; FERREIRA, Z.S.; KAPLAN, M.A.C.; GOTTLIEB, O.R. A chemosystematic analysis of tribes of Asteraceae involving sesquiterpene lactones and flavonoids. **Phytochemistry**, v. 26, n. 12, p. 3103-3115, 1987.

FALCAO, R.A.; DO NASCIMENTO, P.L.A.; DE SOUZA, S.A.; DA SILVA, T.M.G.; DE QUEIROZ, A.C.; DA MATTA, C.B.B.; MOREIRA, M.S.A.; CAMARA, C.A.; SILVA, T. Antileishmanial phenylpropanoids from the leaves of *Hyptis pectinata* (L.) Poit. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, n. 460613, p. 1-7, 2013.

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

FALKENBERG, M.B.; SANTOS, R.I.; SIMÕES, C.M.O. Introdução à análise fitoquímica. in SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 6ª ed., Porto Alegre/Florianópolis, Brasil, Editora da UFRGS/Editora da UFSC, p. 229-246, 2007.

FATOPÉ, M.O.; AL-BURTOMANI, S.K.S.; OCHEI, J.O.; ABDULNOUR, A.O.; AL-KINDY, S.M.Z.; TAKEDA, Y. Muscanone: a 3-O-(1", 8", 14"-trimethylhexadecanyl) naringenin from *Commiphora wightii*. **Phytochemistry**, v. 62, n. 8, p. 1251-1255, 2003.

FEASEY, N.; WANSBROUGH-JONES, M.; MABEY, D.C.; SOLOMON, A.W. Neglected tropical diseases. **British Medical Bulletin**, v. 93, n. 1, p. 179-200, 2010.

FLANN, C., (2015). **Global Compositae Checklist**, *Vernonanthura tweedieana*, Acessado em: 31/01/2015, 2015, disponível em: <http://dixon.iplantcollaborative.org/CompositaeWeb/default.aspx?Page=NameDetails&TabNum=0&NameId=5d1ec75e-5cf6-46c5-959f-3716ad7da95f>.

GARCIA, E.N.; CAMARGO, A.; PUTZKE, J.; KÖHLER, A. Levantamento florístico e fitossociológico em área de Centre de Pesquisa de Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil. **Caderno de Pesquisa, série Biológica**, v. 25, n. 3, p. 6-26, 2013.

GASPER, A.L.; UHLMANN, A.; SEVEGNANI, L.; LINGNER, D.V.; RIGOR-JÚNIOR, M.J.; VERDI, M.; STIVAL-SANTOS, A.; DREVECK, S.; SOBRAL, M.; VIBRANS, A.C. Inventário florístico florestal de Santa Catarina: espécies da floresta estacional decidual. **Rodriguésia**, v. 64, n. 3, p. 427-443, 2013.

GAUTAM, R.; JACHAK, S.M. Recent developments in anti-inflammatory natural products. **Medicinal Research Reviews**, v. 29, n. 5, p. 767-820, 2009.

GENARO, O.; REIS, A.B. Leishmaniose tegumentar americana. *in* NEVES, D. P.; MELO, A. L. D.; LINARD, P. M.; VITOR, R. W. A. **Parasitologia Humana** 11ª ed., São Paulo/SP, Brasil, Atheneu, p. 47-64, 2005.

GIORDANO, O.S.; GUERREIRO, E.; PESTCHANKER, M.J.; GUZMAN, J.; PASTOR, D.; GUARDIA, T. The gastric cytoprotective effect of several sesquiterpene lactones. **Journal of Natural Products**, v. 53, n. 4, p. 803-809, 1990.

GONZÁLEZ-COLOMA, A.; REINA, M.; SÁENZ, C.; LACRET, R.; RUIZ-MESIA, L.; ARÁN, V.J.; SANZ, J.; MARTÍNEZ-DÍAZ, R.A. Antileishmanial, antitrypanosomal, and cytotoxic screening of ethnopharmacologically selected Peruvian plants. **Parasitology Research**, v. 110, n. 4, p. 1381-1392, 2012.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 1, p. 1-93, 2006.

GYAPONG, J.O.; GYAPONG, M.; YELLU, N.; ANAKWAH, K.; AMOFAH, G.; BOCKARIE, M.; ADJEI, S. Integration of control of neglected tropical diseases into health-care systems: challenges and opportunities. **The Lancet**, v. 375, n. 9709, p. 160-165, 2010.

HARBORNE, J.B. **Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis**, 3ª ed., Londres, Reino Unido, Chapman and Hall Publication, 1998.

HARVEY, A.L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 19, p. 894-901, 2008.

HEINRICH, M.; BARNES, J.; GIBBONS, S.; WILLIAMSON, E.M. **Fundamentals of pharmacognosy and phytotherapy**, Churchill Livingstone, 2012.

HEINZMANN, B.M.; BARROS, F.M.C. Potencial das plantas nativas brasileiras para o desenvolvimento de fitomedicamentos tendo como exemplo *Lippia alba* (Mill.) NE Brown (Verbenaceae). **Saúde, Santa Maria**, v. 33, n. 1, p. 43-48, 2007.

HOET, S.; OPPERDOES, F.; BRUN, R.; ADJAKIDJÉ, V.; QUETIN-LECLERCQ, J. *In vitro* antitrypanosomal activity of ethnopharmacologically selected Beninese plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, n. 1, p. 37-42, 2004.

HOTEZ, P.J.; BOTTAZZI, M.E.; FRANCO-PAREDES, C.; AULT, S.K.; PERIAGO, M.R. The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: a review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 9, p. e300, 2008.

HOTEZ, P.J.; MOLYNEUX, D.H.; FENWICK, A.; KUMARESAN, J.; SACHS, S.E.; SACHS, J.D.; SAVIOLI, L. Control of neglected tropical diseases. **New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 10, p. 1018-1027, 2007.

HUANG, Y.-H.; ZENG, W.-M.; LI, G.-Y.; LIU, G.-Q.; ZHAO, D.-D.; WANG, J.; ZHANG, Y.-L. Characterization of a new sesquiterpene and antifungal activities of chemical constituents from *Dryopteris fragrans* (L.) Schott. **Molecules**, v. 19, n. 1, p. 507-513, 2014.

IBRAHIM, M.; AMBREEN, S.; HUSSAIN, A.I.; HUSSAIN, N.; IMRAN, M.; ALI, B.; SUMRRA, S.H.; YOUSUF, M.; REHMANI, F.S. Phytochemical Investigation on *Eucalyptus globulus* Labill. **Asian Journal of Chemistry**, v. 26, n. 4, p. 1011-1014, 2014.

IGUAL, M.O.; MARTUCCI, M.E.P.; DA COSTA, F.B.; GOBBO-NETO, L. Sesquiterpene lactones, chlorogenic acids and flavonoids from leaves of *Vernonia polyanthes* Less (Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 51, n., p. 94-97, 2013.

IPNI, (2015). **International Plant Names Index**, *Vernonanthura tweediana*, Acessado em: 31/01/2015, 2015, disponível em:

http://www.ipni.org/ipni/idPlantNameSearch.do?id=1122963-2&back_page=%2Fipni%2FeditSimplePlantNameSearch.do%3Ffind_wholeName%3Dvernonanthura%2Btweedieana%26output_format%3Dnrmal.

IVANOVA, S.Z.; BABKIN, V.A. Polyphenolic compounds from *Larix gmelinii* phloem. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 47, n. 1, p. 124-125, 2011.

JAKUPOVIC, J.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; SCHUSTER, A.; ZDERO, C.; BOHLMANN, F.; KING, R.M.; ROBINSON, H.; PICKARDT, J. Hirsutinolides, glaucolides and sesquiterpene lactone from *Vernonia* species. **Phytochemistry**, v. 25, n. 1, p. 145-158, 1985.

JONES, A.J.; GRKOVIC, T.; SYKES, M.L.; AVERY, V.M. Trypanocidal activity of marine natural products. **Marine Drugs**, v. 11, n. 10, p. 4058-4082, 2013.

JONES, L.; BARTHOLOMEW, B.; LATIF, Z.; SARKER, S.D.; NASH, R.J. Constituents of *Cassia laevigata*. **Fitoterapia**, v. 71, n. 5, p. 580-583, 2000.

JÚNIOR, G.M.V.; DE M, S.; MARCOS, C.; CAVALHEIRO, A.J.; LAGO, J.H.G.; CHAVES, M.H. Phenolic derivatives from fruits of *Dipteryx lacunifera* Ducke and evaluation of their antiradical activities. **Helvetica Chimica Acta**, v. 91, n. 11, p. 2159-2167, 2008.

KAYSER, O.; KIDERLEN, A.F.; CROFT, S.L. Natural products as potential antiparasitic drugs. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 26, n. Part G, p. 779-848, 2002.

KEELEY, S.C.; FORSMAN, Z.H.; CHAN, R. A phylogeny of the “evil tribe” (Vernonieae: Compositae) reveals Old/New World long distance dispersal: Support from separate and combined congruent datasets (*trnL-F*, *ndhF*, ITS). **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 44, n. 1, p. 89-103, 2007.

KELSEY, R.G.; MORRIS, M.S.; BHADANE, N.R.; SHAFIZADEH, F. Sesquiterpene lactones of *Artemisia*: TLC analysis and taxonomic significance. **Phytochemistry**, v. 12, n. 6, p. 1345-1350, 1973.

KELSEY, R.G.; SHAFIZADEH, F. Glandular trichomes and sesquiterpene lactones of *Artemisia nova* (Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 8, n. 4, p. 371-377, 1980.

KHALIFA, A.A.; YOUSSEF, D.T.A. Methoxylated flavonoids from *Tanacetum santolinoides* (DC.). **Bulletin of Pharmaceutical Sciences (Assiut University)**, v. 24, n. 2, p. 145-151, 2001.

KHAN, M.K.; HUMA, Z.-E.; DANGLES, O. A comprehensive review on flavanones, the major citrus polyphenols. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 33, n. 1, p. 85-104, 2014.

KIM, A.R.; JIN, Q.; JIN, H.-G.; KO, H.J.; WOO, E.-R. Phenolic compounds with IL-6 inhibitory activity from *Aster yomena*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 37, n., p. 845-851, 2014.

KOBAYASHI, R.; ITOU, T.; HANAYA, K.; SHOJI, M.; HADA, N.; SUGAI, T. Chemo-enzymatic transformation of naturally abundant naringin to luteolin, a flavonoid with various biological effects. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 92, n., p. 14-18, 2013.

KOCH, A.; BASAR, S.; RICHTER, R. Secondary Metabolites - Isoprenoids. TLC of Mono- and Sesquiterpenes. in WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M.; SHERMA, J.; KOWALSKA, T. **Thin layer chromatography in phytochemistry**, Chromatographic Science Series, New York, CRC Press/ Llc, 99, p. 451-480, 2008.

KOTOWICZ, C.; BARDÓN, A.; CATALÁN, C.A.N.; CERDA-GARCÍA-ROJAS, C.M.; JOSEPH-NATHAN, P. Glaucolides and hirsutinolides from *Vernonanthura squamulosa*. **Phytochemistry**, v. 47, n. 3, p. 425-428, 1998.

LACRET, R.; VARELA, R.M.; MOLINILLO, J.M.; NOGUEIRAS, C.; MACÍAS, F.A. Tectonoelins, new norlignans from a bioactive extract of *Tectona grandis*. **Phytochemistry Letters**, v. 5, n. 2, p. 382-386, 2012.

LAGO, J.H.G.; TOLEDO-ARRUDA, A.C.; MERNAK, M.; BARROSA, K.H.; MARTINS, M.A.; TIBÉRIO, I.F.C.; PRADO, C.M. Structure-activity association of flavonoids in lung diseases. **Molecules**, v. 19, n. 3, p. 3570-3595, 2014.

LANA, M.D.; TAFURI, W.L. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. in NEVES, D. P.; MELO, A. L. D.; LINARD, P. M.; VITOR, R. W. A. **Parasitologia Humana** 11ª ed., São Paulo/SP, Brasil, Atheneu, p. 85-108, 2005.

LAPA, A.J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; GODINHO, R.O.; NOGUEIRA, T.C.M.L. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. in

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 6ª ed., Porto Alegre/Florianópolis, Brasil, Editora da UFRGS/Editora da UFSC, p. 247-262, 2007.

LEE, E.; JEONG, K.-W.; SHIN, A.; JIN, B.; JNAWALI, H.N.; JUN, B.-H.; LEE, J.-Y.; HEO, Y.-S.; KIM, Y. Binding model for eriodictyol to Jun-N terminal kinase and its anti-inflammatory signaling pathway. **BMB Reports**, v. 46, n. 12, p. 594-599, 2013.

LEE, J.K. Anti-inflammatory effects of eriodictyol in lipopolysaccharide-stimulated raw 264.7 murine macrophages. **Archives of Pharmacal Research**, v. 34, n. 4, p. 671-679, 2011.

LEE, S.Y.; KIM, K.H.; LEE, I.K.; LEE, K.H.; CHOI, S.U.; LEE, K.R. A new flavonol glycoside from *Hylomecon vernalis*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 35, n. 3, p. 415-421, 2012.

LEITÃO, F.; LEITÃO, S.G.; DA FONSECA-KRUEL, V.S.; SILVA, I.M.; MARTINS, K. Medicinal plants traded in the open-air markets in the State of Rio de Janeiro, Brazil: an overview on their botanical diversity and toxicological potential. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, n. 2, p. 225-247, 2014.

LIAO, C.-R.; KUO, Y.-H.; HO, Y.-L.; WANG, C.-Y.; YANG, C.-S.; LIN, C.-W.; CHANG, Y.-S. Studies on cytotoxic constituents from the leaves of *Elaeagnus oldhamii* Maxim. in non-small cell lung cancer A549 cells. **Molecules**, v. 19, n. 7, p. 9515-9534, 2014.

LIN, Y.; KONG, L. Studies on the chemical constituents of *Desmodium styracifolium* (Osbeck) Merr. **Asian Journal of Traditional Medicines**, v. 1, n. 1, p. 34-37, 2006.

LIST, P.H.; SCHMIDT, P.C. **Phytopharmaceutical Technology** Londres, Reino Unido, Heyden & Son Limited, 1989.

LOIZZO, M.R.; SAID, A.; TUNDIS, R.; RASHED, K.; STATTI, G.A.; HUFNER, A.; MENICHINI, F. Inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) by flavonoids isolated from *Ailanthus excelsa* (Roxb)(Simaroubaceae). **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 1, p. 32-36, 2007.

LOQUETE, T.; SOMENSI, A.; HOSS, I.; BRAUN, G.; OLGUIN, C.D.F.A. **Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial da espécie *Vernonia tweediana* Baker (Assa-peixe)**. XVI Encontro de Química da Região Sul (16-SBQSul). Blumenau/SC. v., p., 2008.

LUO, Q.; WANG, S.-M.; LU, Q.; LUO, J.; CHENG, Y.-X. Identification of compounds from the water soluble extract of *Cinnamomum cassia* barks and their inhibitory effects against high-glucose-induced mesangial cells. **Molecules**, v. 18, n. 9, p. 10930-10943, 2013.

MABRY, T.J.; ABDEL-BASET, Z.; PADOLINA, W.G.; JONES JR, S.B. Systematic implications of flavonoids and sesquiterpene lactones in species of *Vernonia*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 2, n. 3, p. 185-192, 1975a.

MABRY, T.J.; ABDEL-BASET, Z.; PADOLINA, W.G.; JONES, S.B. Systematic implications of flavonoids and sesquiterpene lactones in species of *Vernonia*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 2, n. 3, p. 185-192, 1975b.

MAIA, A.I.V.; TORRES, M.C.M.; PESSOA, O.D.L.; MENEZES, J.E.S.A.; COSTA, S.M.O.; NOGUEIRA, V.L.R.; MELO, V.M.M.; SOUZA, E.B.; CAVALCANTE, M.G.B.; ALBUQUERQUE, M.R.J.R. Volatile leaf oils of *Vernonia remotiflora* and *Vernonia brasiliiana*: chemical composition and biological activity. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 584-586, 2010.

MANZANO, P.; MIRANDA, M.; ORELLANA, T.; QUIJANO, M. Studies of the volatile compounds present in leaves, stems and flowers of *Vernonanthura patens* (Kunth) H. Rob. **International Journal of Organic Chemistry**, v. 4, n. 5, p. 314-318, 2014.

MANZANO, P.I.; MIRANDA, M.; PAYROL, J.A.; SILVA, M.; STERNER, O.; PERALTA, E.L. Pentacyclic triterpenoids with antimicrobial activity from the leaves of *Vernonanthura patens* (Asteraceae). **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 25, n. 7, p. 539-543, 2013.

MARINHO, M.A.O. Citotaxonomia de espécies da tribo Vernonieae Cass. (Asteraceae bercht. & j. Presl) ocorrentes em Pernambuco. **Dissertação de Mestrado**, Departamento de Biologia, Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife/PE, Brasil, 2014.

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

MENDONÇA, C.B.F.; ESTEVES, R.L.; GONÇALVES-ESTEVES, V. Palinotaxonomia de espécies de *Lepidaploa* (Cass.) Cass. (Vernoniinae - Compositae) ocorrentes no sudeste do Brasil. **Brazilian Journal of Botany**, v. 30, n. 1, p. 71-88, 2007.

MENDONÇA, C.B.F.; GONÇALVES-ESTEVES, V.; ESTEVES, R.L.; NUNES, A.D. Palynotaxonomy of *Vernonanthura* H. Rob.(Vernonieae, Asteraceae) species from southeast Brazil. **Brazilian Journal of Botany**, v. 32, n. 4, p. 647-662, 2009.

MERFORT, I. Review of the analytical techniques for sesquiterpenes and sesquiterpene lactones. **Journal of Chromatography A**, v. 967, n. 1, p. 115-130, 2002.

MICHALICK, M.S.M.; GENARO, O. Leishmaniose visceral americana. in NEVES, D. P.; MELO, A. L. D.; LINARD, P. M.; VITOR, R. W. A. **Parasitologia Humana** 11^a ed., São Paulo/SP, Brasil, Atheneu, p. 67-83, 2005.

MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T.C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacological Reviews**, v. 52, n. 4, p. 673-751, 2000.

MILLS, S.; BONE, K. **Principles and practice of phytotherapy** Modern herbal medicine, Churchill Livingstone, 2000.

MIYAKE, Y.; YAMAMOTO, K.; OSAWA, T. Isolation of eriocitrin (eriodictyol 7-rutinoside) from lemon fruit (*Citrus limon* BURM. f.) and its antioxidative activity. **Food Science and Technology International, Tokyo**, v. 3, n. 1, p. 84-89, 1997.

MONTANARI, C.A.; BOLZANI, V.D.S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001.

MONTANHA, J.A.; MOELLERKE, P.; BORDIGNON, S.A.L.; SCHENKEL, E.P.; ROEHE, P.M. Antiviral activity of brazilian plant extracts. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 23, n. 2, p. 183-186, 2004.

MOREIRA, G.L. A tribo Vernonieae Cass. (Asteraceae) na Serra Dourada, Goiás, Brasil. **Dissertação de Mestrado**, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal, Universidade Federal de Goiás, Goiânia/GO, Brasil, 2013.

MRAZEK, M.F.; MOSSIALOS, E. Stimulating pharmaceutical research and development for neglected diseases. **Health Policy**, v. 64, n. 1, p. 75-88, 2003.

NAKAJIMA, J.; LOEUILLE, B.; HEIDEN, G.; DEMATTEIS, M.; HATTORI, E.K.O.; MAGENTA, M.A.G.; RITTER, M.R.; MONDIN, C.A.; ROQUE, N.; FERREIRA, S.C.; BORGES, R.A.X.; SOARES, P.N.; ALMEIDA, G.; SCHNEIDER, A.; SANCHO, G.; SAAVEDRA, M.M.; LIRO, R.M.; PEREIRA, A.C.M.; MORAES, M.D.; SILVA, G.A.R.; MEDEIROS, J.D.; LORENCINI, T.S.; TELES, A.M.; MONGE, M.; SINISCALCHI, C.M.; SOUZA-BUTURI, F.O.; BRINGEL JR., J.B.A.; CARNEIRO, C.R.; PASINI, E.; OLIVEIRA, C.T., Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (2015a). **Lista de Espécies da Flora do Brasil**, Asteraceae, Acessado em: 03/02/2015, 2015, disponível em: <http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB55>.

NAKAJIMA, J.; LOEUILLE, B.; HEIDEN, G.; DEMATTEIS, M.; HATTORI, E.K.O.; MAGENTA, M.A.G.; RITTER, M.R.; MONDIN, C.A.; ROQUE, N.; FERREIRA, S.C.; BORGES, R.A.X.; SOARES, P.N.; ALMEIDA, G.; SCHNEIDER, A.; SANCHO, G.; SAAVEDRA, M.M.; LIRO, R.M.; PEREIRA, A.C.M.; MORAES, M.D.; SILVA, G.A.R.; MEDEIROS, J.D.; LORENCINI, T.S.; TELES, A.M.; MONGE, M.; SINISCALCHI, C.M.; SOUZA-BUTURI, F.O.; BRINGEL JR., J.B.A.; CARNEIRO, C.R.; PASINI, E.; OLIVEIRA, C.T., Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (2015b). **Lista de Espécies da Flora do Brasil**, Asteraceae, Tribo Vernonieae, Acessado em: 03/02/2015, 2015, disponível em: <http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB101557>.

NEERMAN, M.F. Sesquiterpene lactones: a diverse class of compounds found in essential oils possessing antibacterial and antifungal properties. **International Journal of Aromatherapy**, v. 13, n. 2, p. 114-120, 2003.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 7, p. 1022-1037, 2003.

NGUYEN, P.-H.; ZHAO, B.T.; LEE, J.H.; KIM, Y.H.; MIN, B.S.; WOO, M.H. Antithrombotic phenolics from the stems of *Parthenocissus tricuspidata* possess anti-inflammatory effect. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 35, n. 6, p. 1763-1768, 2014.

ODONNE, G.; HERBETTE, G.; EPARVIER, V.; BOURDY, G.; ROJAS, R.; SAUVAIN, M.; STIEN, D. Antileishmanial sesquiterpene lactones from *Pseudelephantopus spicatus*, a traditional remedy from the *Chayahuita Amerindians* (Peru). Part III. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 875-879, 2011.

OGASAWARA, H.A.; ROQUE, N. Flora da Bahia: Asteraceae – Subtribo Vernoniinae **Sitientibus série Ciências Biológicas**, v. 15, n., p. 1-24, 2015.

OLENNIKOV, D.N.; TANKHAEVA, L.M.; PARTILKHAEV, V.V. Chemical study of *Caragana spinosa* seeds. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 48, n. 1, p. 114-117, 2012.

OLGUIN, C.D.F.A.; HAMERSKI, L.; PERCIO, M.F.; SOMENSI, A. Avaliação do potencial biológico alelopático dos extratos fracionados da raiz da *Vernonia tweediana* Baker. **Revista Varia Scientia**, v. 5, n. 10, p. 137-143, 2005.

OLIVEIRA, E.M.S.; COUTO, R.O.; PINTO, M.V.; MARTINS, J.L.R.; COSTA, É.A.; CONCEIÇÃO, E.C.; PAULA, J.R.; BARA, M.T.F. Influence of spray-dryer operating variables on the quality of *Vernonanthura ferruginea* (Less.) H. Rob. extracts with antiulcer potential. **Journal of Pharmacy Research**, v. 4, n. 10, p. 3251-3255, 2011.

OLIVEIRA, E.M.S.; FREITAS, S.L.; MARTINS, F.S.; COUTO, R.O.; PINTO, M.V.; PAULA, J.R.; CONCEIÇÃO, E.C.; BARA, M.T.F. Isolation and quantitative HPLC-PDA analysis of lupeol in phytopharmaceutical intermediate products from *Vernonanthura ferruginea* (Less.) H. Rob. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 1041-1045, 2012.

PADOLINA, W.G.; YOSHIOKA, H.; NAKATANI, N.; MABRY, T.J.; MONTI, S.A.; DAVIS, R.E.; COX, P.J.; SIM, O.A.; WATSON, W.H.; WU, I.B. Glaucolide-A and -B, new germacranolide-type sesquiterpene lactones from *Vernonia* (Compositae). **Tetrahedron**, v. 30, n. 10, p. 1161-1170, 1974.

PAUL, A.T.; GOHIL, V.M.; BHUTANI, K.K. Modulating TNF- α signaling with natural products. **Drug Discovery Today**, v. 11, n. 15/16, p. 725-732, 2006.

PELISSARI, D.M.; CECHINEL, M.P.; SOUSA-GOMES, M.L.D.; LIMA JÚNIOR, F.E.F.D. Tratamento da leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar americana no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 20, n. 1, p. 107-110, 2011.

PENGELLY, A. **The constituents of medicinal plants** An introduction to the chemistry and therapeutics of herbal medicine, 2^a ed., Cambridge, Estados Unidos, CABI Publishing: Wallingford, Oxfordshire, 2004.

PENSO, J.; CORDEIRO, K.C.F.; DA CUNHA, C.R.M.; DA SILVA CASTRO, P.F.; MARTINS, D.R.; LIÃO, L.M.; ROCHA, M.L.; DE OLIVEIRA, V. Vasorelaxant activity of 7- β -O-glycosides biosynthesized from flavonoids. **European Journal of Pharmacology**, v. 733, n., p. 75-80, 2014.

PÉREZ-AMADOR, M.C.; OCOTERO, V.M.; BENÍTEZ, S.P.; JIMÉNEZ, F.G. *Vernonia patens* Kunth, an Asteraceae species with phototoxic and pharmacological activity. **Phyton (Buenos Aires)**, v. 77, n., p. 275-282, 2008.

PETRI, R.D.; PLETSCH, M.U.; ZEIFERT, M.; SCHWEIGERT, I.D. Efeito de extratos hidroetanólicos de *Vernonia tweedieana* e *Vernonia cognata* sobre imunidade de camundongos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 89, n. 2, p. 139-141, 2008.

PHILLIPSON, J.D. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 56, n. 3, p. 237-243, 2001.

PHILLIPSON, J.D. Phytochemistry and pharmacognosy. **Phytochemistry**, v. 68, n. 22, p. 2960-2972, 2007.

PICMAN, A.K. Biological activities of sesquiterpene lactones. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 14, n. 3, p. 255-281, 1986.

PINTO, E.G.; ANTONIAZZI, M.M.; JARED, C.; TEMPONE, A.G. Antileishmanial and antitrypanosomal activity of the cutaneous secretion of *Siphonops annulatus*. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 20, n. 50, p. 1-8, 2014.

POLLORA, G.C.; BARDÓN, A.; CATALÁN, C.A.N.; GRIFFIN, C.L.; HERZ, W. Elephantopus-type sesquiterpene lactones from a second *Vernonanthura* species, *Vernonanthura lipoensis*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, n. 6, p. 619-625, 2004.

PORTILLO, A.; VILA, R.; FREIXA, B.; FERRO, E.; PARELLA, T.; CASANOVA, J.; CAÑIGUERAL, S. Antifungal sesquiterpene from the root of *Vernonanthura tweedieana*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 1, p. 49-52, 2005.

QURESHI, N.A.; RAHMAN, H.U.; ALI, A.; NASEERULLAH, S.A.A.S.; KHAN, I. *In vitro* evaluation of the anti-leishmanial activity of *Euphorbia helioscopia* stem extract in comparison with synthetic drug amphotericin B. **Asian Journal of Natural & Applied Sciences Vol.**, v. 3, n. 3, p. 12-17, 2014.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, n. 5, p. 603-613, 2001.

REDONDA-MARTÍNEZ, R.; VILLASEÑOR, J.L.; TERRAZAS, T. Trichome diversity in the Vernonieae (Asteraceae) of Mexico I: *Vernonanthura* and *Vernonia* (Vernoniinae). **The Journal of the Torrey Botanical Society**, v. 139, n. 3, p. 235-247, 2012.

RISSE, W.E.; SCARMINIO, I.S.; MOREIRA, E.G. Antinociceptive and acute toxicity evaluation of *Vernonia condensata* Baker leaves extracted with different solvents and their mixtures. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 48, n., p. 811-816, 2010.

ROBINSON, H. A new genus *Vernonanthura* (Vernonieae, Asteraceae). **Phytologia (USA)**, v. 73, n. 2, p. 65-76, 1992.

ROBINSON, H. Generic and subtribal classification of American Vernonieae. **Smithsonian Contributions to Botany**, v., n. 89, p. 1-116, 1999.

ROCHA-GRACIA, R.D.C.; ARROYO, M.M.H.; ZARAÍN, P.L.; CARLOS, B.H.; ROMERO, H.S.; PORTUGAL, E.C.; PÉREZ, M.T.Z.; LÓPEZ-OLGUÍN, J.F. Antibacterial activity of crude extracts from Mexican plants against methicillin-resistant *Staphylococcus*. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 61, p. 13202-13218, 2013.

ROCHA, L.; ALMEIDA, J.; MACEDO, R.; BARBOSA-FILHO, J. A review of natural products with antileishmanial activity. **Phytomedicine**, v. 12, n. 6, p. 514-535, 2005.

RODRIGUEZ, E.; TOWERS, G.H.N.; MITCHELL, J.C. Biological activities of sesquiterpene lactones. **Phytochemistry**, v. 15, n. 11, p. 1573-1580, 1976.

ROSSATO, M.F.; TREVISAN, G.; WALKER, C.I.B.; KLAFKE, J.Z.; DE OLIVEIRA, A.P.; VILLARINHO, J.G.; ZANON, R.B.; ROYES, L.F.F.; ATHAYDE, M.L.; GOMEZ, M.V. Eriodictyol: a flavonoid antagonist of the TRPV1 receptor with antioxidant activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 81, n. 4, p. 544-551, 2011.

SALEM, M.M.; WERBOVETZ, K.A. Antiprotozoal Compounds from *Psorothamnus p olydenius*. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 1, p. 108-111, 2005.

SALLES-DE-MELO, M.R.C.; DE LUCENA, R.M.; SEMIR, J.; DE CARVALHO, R.; PEREIRA, R.D.C.A.; BENKO-ISEPPON, A.M. Karyological features and cytotaxonomy of the tribe Vernonieae (Asteraceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 285, n. 3-4, p. 189-199, 2010.

SANTANA, P.I.M.; GARCÍA, M.; MENDIOLA, J.; FERNÁNDEZ-CALIENES, A.; ORELLANA, T.; MIRANDA, M.; PERALTA, E.; MONZOTE, L. *In vitro* anti-protozoal assessment of *Vernonanthura patens* extracts. **PharmacologyOnLine**, v. 1, n., p. 1-6, 2014.

SANTANA, P.M.; MARTÍNEZ, M.M.; ROBLES, C.P.; PAYROL, J.A.; OSORIO, M.S.; SANTANDER, V.H. Aislamiento y caracterización de la fracción hexánica de las hojas de *Vernonanthura patens* (Kunth) H. Rob. con actividad antifúngica. **Revista Cubana de Farmacia**, v. 46, n. 3, p. 352-358, 2012.

SANTANA, P.M.; MIRANDA, M.; PAYROL, J.A.; SILVA, M.; HERNÁNDEZ, V.; PERALTA, E. Gas chromatography-mass spectrometry study from the leaves fractions obtained of *Vernonanthura patens* (Kunth) H. Rob. **International Journal of Organic Chemistry**, v. 3, n., p. 105-109, 2013.

SANTOS JÚNIOR, H.M.; OLIVEIRA, D.F.; CARVALHO, D.A.; PINTO, J.M.A.; CAMPOS, V.A.C.; MOURÃO, A.R.B.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V. Evaluation of native and exotic brazilian plants for anticancer activity. **Journal of Natural Medicines**, v. 64, n. 2, p. 231-238, 2010.

SANTOS, R.I.D. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. *in* SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 6ª ed., Porto Alegre/Florianópolis, Editora da UFRGS/Editora da UFSC, p. 403-434, 2007.

SAÚDE-GUIMARÃES, D.A.; FARIA, A.R. Substâncias da natureza com atividade anti-*Trypanosoma cruzi*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 455-465, 2007.

SCHMIDT, T.J. Structure-activity relationships of sesquiterpene lactones. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 33, n., p. 309-392, 2006.

SCHWENDE, H.; FITZKE, E.; AMBS, P.; DIETER, P. Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1, 25-dihydroxyvitamin D3. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 59, n. 4, p. 555-561, 1996.

SCOGNAMIGLIO, M.; FIUMANO, V.; D'ABROSCA, B.; ESPOSITO, A.; CHOI, Y.H.; VERPOORTE, R.; FIORENTINO, A. Chemical interactions between plants in mediterranean vegetation: the influence of selected plant extracts on *Aegilops geniculata* metabolome. **Phytochemistry**, v. 106, n., p. 69-85, 2014.

SEAMAN, F.C. Sesquiterpene lactones as taxonomic characters in the Asteraceae. **The Botanical Review**, v. 48, n. 2, p. 121-594, 1982.

SELENSKI, C.; PETTUS, T.R.R. (±)-Diinsininone: made nature's way. **Tetrahedron**, v. 62, n. 22, p. 5298-5307, 2006.

SHI, G.; XU, M.; DUAN, W.; FANG, L.; LIU, W.; WANG, X.; ZHANG, Y. Chemical constituents from *Trichosanthis pericarpium*. **Asian Journal of Chemistry**, v. 26, n. 15, p. 4626-4630, 2014.

SILVEIRA, R.R.; FOGLIO, M.; GONTIJO, J. Effect of the crude extract of *Vernonia polyanthes* Less. on blood pressure and renal sodium excretion in unanesthetized rats. **Phytomedicine**, v. 10, n. 2, p. 127-131, 2003.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n. 1, p. 35-40, 2002.

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. in SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 6ª ed., Porto Alegre/Florianópolis, Brasil, Editora da UFRGS/Editora da UFSC, p. 467-495, 2007.

SKALICKA-WOZNIAK, K.; WIDELSKI, J.; GLOWNIAK, K. Plant materials in modern pharmacy and methods of their investigations. *in* WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M.; SHERMA, J.; KOWALSKA, T. **Thin layer chromatography in phytochemistry**, Chromatographic Science Series, New York, CRC Press/Llc, 99, p. 15-35, 2008.

SOARES, P.N. Taxonomia de *Acilepidopsis*, *Chrysolaena*, *Echinocoryne*, *Stenocephalum* e *Vernonanthura* (Vernonieae, Asteraceae) de Minas Gerais, Brasil. **Mestre**, Dissertação, Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Biologia, Uberlândia/MG, Brasil, 2012.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G.G.; PETROVICK, P.R.; BASSANI, V.L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. *in* SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 6ª ed., Porto Alegre/Florianópolis, Brasil, Editora da UFRGS/Editora da UFSC, p. 289-326, 2007.

SOUSA, F.C.F.; MELO, C.T.V.; CITÓ, M.C.O.; FÉLIX, F.H.C.; VASCONCELOS, S.M.M.; FONTELES, M.M.F.; BARBOSA-FILHO, J.M.; VIANA, G.S.B. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: Uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 642-654, 2008.

STRAPASSON, R.L.B. Estudo químico e farmacológico das cascas do tronco de *Gochnatia polymorpha* ssp. *floccosa* (ASTERACEAE). **Dissertação de Mestrado**, Curso de Pós-Graduação em Química, Departamento de Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba/PR, 2010.

TAKANO-ISHIKAWA, Y.; GOTO, M.; YAMAKI, K. Structure-activity relations of inhibitory effects of various flavonoids on lipopolysaccharide-induced prostaglandin E₂ production in rat peritoneal macrophages: comparison between subclasses of flavonoids. **Phytomedicine**, v. 13, n. 5, p. 310-317, 2006.

TASDEMIR, D.; KAISER, M.; BRUN, R.; YARDLEY, V.; SCHMIDT, T.J.; TOSUN, F.; RÜEDI, P. Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: *in vitro*, *in vivo*, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 4, p. 1352-1364, 2006.

THEPLANTLIST.ORG, (2015). **The Plant List**, a working list of all plant species, *Vernonanthura tweedieana*, versão 1.1, Acessado em: 31/01/2015, 2015, disponível em: <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/gcc-29788>.

TOLEDO, A.C.O.; HIRATA, L.L.; BUFFON, M.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Revista Lecta**, v. 21, n. 1/2, p. 7-13, 2003.

TOYANG, N.J.; VERPOORTE, R. A review of the medicinal potentials of plants of the genus *Vernonia* (Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 146, n. 3, p. 681-723, 2013.

TREVISAN, G.; ROSSATO, M.F.; WALKER, C.I.B.; KLAFKE, J.Z.; ROSA, F.; OLIVEIRA, S.M.; TONELLO, R.; GUERRA, G.P.; BOLIGON, A.A.; ZANON, R.B. Identification of the plant steroid α -spinasterol as a novel transient receptor potential vanilloid 1 antagonist with antinociceptive properties. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 343, n. 2, p. 258-269, 2012.

TROPICOS.ORG, (2015). **Nomenclatural and specimen database of the Missouri Botanical Garden**, *Vernonanthura tweedieana*, Acessado em: 31/01/2015, 2015, disponível em: <http://www.tropicos.org/Name/2740084>.

UCHIYAMA, N. Antichagasic activities of natural products against *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Health Science**, v. 55, n. 1, p. 31-39, 2009.

UWAI, K.; OSANAI, Y.; IMAIZUMI, T.; KANNO, S.-I.; TAKESHITA, M.; ISHIKAWA, M. Inhibitory effect of the alkyl side chain of caffeic acid analogues on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW264. 7 macrophages. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 16, p. 7795-7803, 2008.

VALVERDE, A.L.; CARDOSO, G.L.C.; PEREIRA, N.A.; SILVA, A.J.R.; KUSTER, R.M. Analgesic and antiinflammatory activities of vernonioside B2 from *Vernonia condensata*. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 3, p. 263-264, 2001.

VAN BAREN, C.; ANAO, I.; LIRA, P.D.L.; DEBENEDETTI, S.; HOUGHTON, P.; CROFT, S.; MARTINO, V. Triterpenic acids and flavonoids from *Satureja parvifolia*. Evaluation of their antiprotozoal activity. **Zeitschrift Fur Naturforschung C**, v. 61, n. 3/4, p. 189, 2006.

VAN WYK, B.-E.; WINK, M. **Medicinal plants of the world: an illustrated scientific guide to important medicinal plants and their uses**, Timber press, 2004.

VEGA, A.J.; DEMATTEIS, M. The transfer of *Vernonia perangusta* to the genus *Vernonanthura* (Vernonieae, Asteraceae) and the correct name for *Vernonanthura phosphorica*. **Phytotaxa**, v. 8, n., p. 46-50, 2010.

VEGA, Á.J.; DEMATTEIS, M. Nuevas combinaciones y tipificaciones en el género *Vernonanthura* (Vernonieae, Asteraceae). **Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica**, v. 46, n. 3-4, p. 369-374, 2011.

VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: cura segura. **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V.D.S.; BARREIRO, E.J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VIEIRA, P.C.; FERNANDES, J.B.; ANDREI, C.C. Plantas inseticidas. *in* SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 6ª ed., Porto Alegre/Florianópolis, Brasil, Editora da UFRGS/Editora da UFSC, p. 903-918, 2007.

VON POSER, G.L.; MENTZ, L.A. Diversidade biológica e sistemas de classificação. *in* SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 6ª ed., Porto Alegre/Florianópolis, Brasil, Editora da UFRGS/Editora da UFSC, p. 75-89, 2007.

WAGNER, G.J. Secreting glandular trichomes: more than just hairs. **Plant Physiology**, v. 96, n. 3, p. 675-679, 1991.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**, 2ª ed, Springer Verlag, 2001.

WEI, X.-H.; YANG, S.-J.; LIANG, N.; HU, D.-Y.; JIN, L.-H.; XUE, W.; YANG, S. Chemical constituents of *Caesalpinia decapetala* (Roth) Alston. **Molecules**, v. 18, n. 1, p. 1325-1336, 2013.

WHO. World Health Organization. **Global plan to combat neglected tropical diseases, 2008–2015**. 2007.

WHO, World Health Organization. (2015). **Neglected tropical diseases**, Acessado em: 09/01/2015, 2015, disponível em: http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/.

WILAIRAT, R.; KIJJOA, A.; PINTO, M.; JOSÉ NASCIMENTO, M.S.; SILVA, A.M.; EATON, G.; HERZ, W. Constituents of *Schisandra verruculosa* and their cytotoxic effect on human cancer cell lines. **Pharmaceutical Biology**, v. 44, n. 6, p. 411-415, 2006.

WU, T.-S.; YEH, J.-H.; WU, P.-L. The heartwood constituents of *Tetradium glabrifolium*. **Phytochemistry**, v. 40, n. 1, p. 121-124, 1995.

XAGORARI, A.; PAPAPETROPOULOS, A.; MAUROMATIS, A.; ECONOMOU, M.; FOTSIS, T.; ROUSSOS, C. Luteolin inhibits an endotoxin-stimulated phosphorylation cascade and proinflammatory cytokine production in macrophages. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 296, n. 1, p. 181-187, 2001.

XIANG, M.; SU, H.; HU, J.; YAN, Y. Isolation, identification and determination of methyl caffeate, ethyl caffeate and other phenolic compounds from *Polygonum amplexicaule* var. *sinense*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 9, p. 1685-1691, 2011.

YING, L.; JIN-HE, J.; YAN, Z.; YE-GAO, C. Chemical constituents of *Dendrobium aurantiacum* var. *denneanum*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 45, n. 4, p. 525-527, 2009.

YUNES, R.A.; PEDROSA, R.C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 147-152, 2001.

ZANON, R.B. Metabólitos secundários em *Vernonia tweediana* Baker. **Dissertação de Mestrado**, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria/RS, Brasil, 2006.

ZANON, R.B.; PEREIRA, D.F.; BOSCHETTI, T.K.; SANTOS, M.; ATHAYDE, M.L. Fitoconstituintes isolados da fração em diclorometano das folhas de *Vernonia tweediana* Baker. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 226-229, 2008.

ZHANG, H.; SHAO, Y.; BAO, J.; BETA, T. Phenolic compounds and antioxidant properties of breeding lines between the white and black rice. **Food Chemistry**, v. 172, n., p. 630-639, 2015.

ZHANG, J.M.; SHI, X.F.; MA, Q.H.; HE, F.J.; FAN, B.; WANG, D.D.; LIU, D.Y. Chemical constituents from pine needles of *Cedrus deodara*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 47, n. 2, p. 272-274, 2011.

ZHANG, S.; WON, Y.-K.; ONG, C.-N.; SHEN, H.-M. Anti-cancer potential of sesquiterpene lactones: bioactivity and molecular mechanisms. **Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents**, v. 5, n. 3, p. 239-249, 2005.

ZHANG, X.; HUNG, T.M.; PHUONG, P.T.; NGOC, T.M.; MIN, B.-S.; SONG, K.-S.; SEONG, Y.H.; BAE, K. Anti-inflammatory activity of flavonoids from *Populus davidiana*. **Archives Pharmacal Research**, v. 29, n. 12, p. 1102-1108, 2006.

ZHANG, Z.; LIAO, L.; MOORE, J.; WU, T.; WANG, Z. Antioxidant phenolic compounds from walnut kernels (*Juglans regia* L.). **Food Chemistry**, v. 113, n. 1, p. 160-165, 2009.

ZHU, J.X.; REN, J.; QIN, J.J.; CHENG, X.R.; ZENG, Q.; ZHANG, F.; YAN, S.K.; JIN, H.Z.; ZHANG, W.D. Phenylpropanoids and lignanoids from *Euonymus acanthocarpus*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 35, n. 10, p. 1739-1747, 2012.

ZIDORN, C. Plant chemosystematics. in WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M.; SHERMA, J.; KOWALSKA, T. **Thin layer chromatography in phytochemistry**, Chromatographic Science Series, New York, CRC PressI Llc, 99, p. 77-101, 2008.

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