

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

ESTUDO FITOQUÍMICO E DE BIOATIVIDADE DE *Calea pinnatifida* (R. Br.) Less. E *Calea uniflora* Less. (ASTERACEAE)

Tamires Cardoso Lima de Carvalho

Florianópolis
2016

Tamires Cardoso Lima de Carvalho

ESTUDO FITOQUÍMICO E DE BIOATIVIDADE DE *Calea pinnatifida* (R. Br.) Less. E *Calea uniflora* Less. (ASTERACEAE)

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Maique Weber Biavatti

Florianópolis
2016

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

Carvalho, Tamires Cardoso Lima de
Estudo fitoquímico e de bioatividade de *Calea pinnatifida* (R. Br.) Less. e *Calea uniflora* Less. (Asteraceae) / Tamires Cardoso Lima de Carvalho ; orientadora, Maíque Weber Biavatti - Florianópolis, SC, 2016.

301 p.

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

Inclui referências

1. Farmácia. 2. *Calea*. 3. Asteraceae. 4. Fitoquímica. 5. Leishmanicida e tripanocida. I. Biavatti, Maíque Weber . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Farmácia. III. Título.

ESTUDO FITOQUÍMICO E DE BIOATIVIDADE DE *Calea pinnatifida* (R. Br.) Less. E *Calea uniflora* Less. (ASTERACEAE)

POR

Tamires Cardoso Lima de Carvalho

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelo(a) Orientador(a) e membros da banca examinadora, composta pelos Professores Doutores:

Banca Examinadora:

Prof(a). Dr(a). Francinete Ramos Campos (UFPR – Membro Titular)

Prof(a). Dr(a). Patrícia de Aguiar Amaral (UNESC– Membro Titular)

Prof(a). Dr(a). Inês Maria Costa Brighente (UFSC – Membro Titular)

Prof(a). Dr(a). Lilian Sibelle Campos Bernardes (UFSC – Membro Titular)

Prof(a). Dr(a). Miriam de Barcellos Falkenberg (UFSC – Membro Titular)

Prof(a). Dr(a). Maique Weber Biavatti (UFSC – Orientador(a))

Prof(a). Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC

Florianópolis, 08 de Junho de 2016

Dedico este trabalho aos meus pais Antônio (*in memoriam*) e Inês, ao meu amado esposo Mazinho e aos meus sobrinhos Ruan e Yan, pessoas queridas que acrescentam uma dimensão e sentido especial à minha vida e, sem as quais, esse momento não valeria a pena.

AGRADECIMENTOS

Ensinamento

*Minha mãe achava estudo a coisa mais fina do mundo. Não é.
A coisa mais fina do mundo é o sentimento.*

*Aquele dia de noite, o pai fazendo serão, ela falou comigo:
"Coitado, até essa hora no serviço pesado".*

*Arrumou pão e café, deixou tacho no fogo com água quente.
Não me falou em amor. Essa palavra de luxo.*

Adélia Prado

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para que fosse possível a realização e conclusão desse trabalho:

– A **Deus**, autor da vida e da inteligência humana. Àquele que foi meu pai nos momentos de alegria, o caminho nos momentos de incertezas e o meu refúgio nos momentos necessários.

– Ao meu pai **Antônio** (*in memoriam*), onde quer que ele esteja, espero que se sinta orgulhoso vendo mais essa conquista. Apesar de o senhor estar distante fisicamente, ainda sinto a força do seu apoio e amor integral. O senhor é e sempre será o meu maior ídolo e o meu melhor exemplo!

– À minha mãe **Inês**, pelo seu zelo incansável e amor incondicional. Esse período longe da senhora foi bastante árduo, no entanto, possível graças à certeza de que sempre me aguardava com muito amor. A senhora é para mim o ontem, o hoje e o sempre!

– Ao meu esposo **Gilmar** (Mazinho), pois através de seu infinito amor você tornou-me vencedora dessa conquista. O seu desvelo, dedicação, equilíbrio emocional, companheirismo e apoio incondicional tornaram as coisas mais fáceis, os caminhos mais claros e os medos mais amenos. Sou uma incansável aprendiz ao seu lado. Agradeço e te amo muito!

– Ao meu irmão **Douglas** e, sobretudo, a minha irmã **Aninha** que sempre me cobriu de apoio, carinho, compreensão e palavras de incentivo. Apesar das brigas e de possuímos personalidades tão díspares, seu apoio foi fundamental nessa etapa de minha vida.

– Aos meus “amados, idolatrados, salve-salve” sobrinhos **Ruan e Yan**, pois o nascimento de vocês foi e continua sendo um júbilo para a minha vida. Madrinha ama muito os dois!

– A todos os primos e tios, especialmente a **Deta, Neguinha e Érica** pela cumplicidade, amizade, apoio nos momentos difíceis e pela certeza de que estão sempre aqui para mim. Tenho um carinho muito especial por vocês!

– Às minhas avós **Maria e Mariá** pelo modelo de simplicidade, idoneidade e amor à família. Vocês duas são um verdadeiro exemplo de mulheres batalhadoras e guerreiras.

– À toda a família Dantas, em especial a minha sogra **Dôra** pelo acolhimento, paciência e amor maternal. Vocês, indubitavelmente, são minha segunda família.

– Aos amigos de longa data **Laiane, Luciana, Clara e Carlos** por fazerem parte da minha vida, pelo apoio incondicional, pelos risos, pela força, pela esperança, enfim, pela amizade verdadeira que nos uniu e que certamente nunca irá morrer.

– A minha orientadora Dra. **Maique Weber Biavatti** pelo carinho, aprendizado, incentivo e contribuição no meu engrandecimento pessoal e profissional. Obrigada pela confiança em mim depositada, por abraçar esse projeto junto comigo e por tornar, na medida do possível, minha caminhada mais suave.

– A todos os professores do PGFAR, sobretudo, aos professores Dr. **Alexandre Onofre, Flávio Reginatto, Lilian Bernardes, Miriam Falkenberg, Louis Sandjo e Eloir Schenkel**. Admiro muito todos vocês como pesquisadores e, principalmente, como pessoas!

– A todos os amigos que fiz ao longo do doutorado, especialmente, aos dos laboratórios de **Farmacognosia, Central Analítica e Química Farmacêutica**. Gostaria de agradecer pontualmente e de forma muito especial a algumas amigas que estiveram ao meu lado incondicionalmente durante esses quatro anos. É difícil lembrar-me de alguma situação onde vocês não se fizeram presentes na minha vida: **Taty, Ana Vieira, Ana Philippus, Vanessa, Rafa** (princesa), **Dani e Narjara**. Poderia enumerar vários motivos pelos quais tenho a

agradecer a vocês, mas nenhum é capaz de mensurar realmente a minha gratidão e admiração profissional e pessoal. Por isso, sou grata apenas por Deus ter colocado pessoas tão iluminadas como vocês em minha vida. Como dizem os versos da composição de Hermínio Bello de Carvalho e Capiba: *“Amigo é feito casa que se faz aos poucos, e com paciência pra durar pra sempre”*.

– Aos amigos e colegas que já passaram pelo laboratório e, que agora, estão aí espalhados pelo Brasil e pelo mundo, cada um seguindo o seu caminho.

– Ao professor Dr. **Fernando Batista da Costa** e a MSc. **Rosana Casoti**, da USP-RP, pelas análises de massas e por terem me recebido com tanto carinho durante a minha ida a Ribeirão Preto.

– Ao professor Dr. **Andersson Barison** e aos MSc. **Alan Diego Conceição Santos** e **Lívia Dutra**, da UFPR, que gentilmente contribuíram para a realização das análises de RMN.

– À professora Dra. **Francinete Campos**, da UFPR, pela realização de algumas análises de espectrometria de massas.

– Ao professor Dr. **Mário Steindel** e a Dra. **Milene H. Moraes** pela realização dos ensaios biológicos.

– Ao secretário do PGFAR **Bruno Farias**, uma das primeiras pessoas que tive contato antes de chegar a Florianópolis, por toda a atenção e presteza.

– À banca examinadora pela presença e, especialmente, pelas preciosas contribuições.

– À **UFSC**, **CNPq** e **CAPES** pelo apoio financeiro durante a realização do doutorado.

“As nuvens mudam sempre de posição, mas são sempre nuvens no céu. Assim devemos ser todo dia, mutantes, porém, leais com o que pensamos e sonhamos; lembre-se, tudo se desmancha no ar, menos os pensamentos”

Paulo Beleki

Tamires Cardoso Lima de Carvalho. Estudo fitoquímico e de bioatividade de *Calea pinnatifida* (R. Br.) Less. e *Calea uniflora* Less. (Asteraceae). [Tese de Doutorado]. Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina. Orientadora: Dra. Maique Weber Biavatti, 2016.

RESUMO

O gênero *Calea* L. (Heliantheae, Asteraceae) contém aproximadamente 125 espécies distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais do Novo Mundo. Esse gênero tem sido descrito na literatura por apresentar várias propriedades biológicas, tais como atividade anti-inflamatória, citotóxica, leishmanicida, antifúngica, antihipertensiva e hipoglicemiante. A espécie *Calea uniflora* Less., conhecida popularmente como “arnica-da-praia”, é empregada na medicina popular devido às suas propriedades anti-inflamatórias; e a espécie *C. pinnatifida* (R. Br.) Less., conhecida vulgarmente como “quebra-tudo” e “olina”, é utilizada popularmente no tratamento de distúrbios estomacais, e como amebicida e giardicida. Tendo em vista o potencial terapêutico do táxon *Calea*, o presente trabalho teve como objetivos isolar e identificar os principais constituintes químicos presentes nas folhas de *C. uniflora* e *C. pinnatifida*, bem como avaliar o potencial leishmanicida e tripanocida dos compostos isolados. Os compostos foram obtidos através de sucessivos procedimentos cromatográficos (Cromatografia Líquida a Vácuo, Cromatografia em Coluna, Cromatografia em Camada Delgada Preparativa, Cromatografia Líquida de Média Pressão e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência); e a elucidação estrutural foi realizada com base em técnicas espectroscópicas (Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C , Infravermelho) e espectrométricas (Espectrometria de Massas de Alta Resolução), determinação do ponto de fusão e comparação com dados publicados na literatura. Da espécie *C. pinnatifida* foram isolados e identificados cinco cromenos (eupatoriocromeno, metileupatoriocromeno, encocalinol, etil encocalol e 12-hidroxi-encocalina), um aldeído fenólico (vanilina), quatro derivados do ácido hidroxi-cinâmico (cafeato de etila, ácido 3,4-di-*O-E*-cafeoilquinico, ácido 3,5-di-*O-E*-cafeoilquinico e ácido 4,5-di-*O-E*-cafeoilquinico), um diterpeno (fitol) e uma lactona sesquiterpênica inédita na literatura (11,13-diidroxi-calaxina). Da espécie *C. uniflora* foram isolados e caracterizados treze metabólitos secundários: noreugenina, ácido cafeico, cafeato de etila, uma mistura de butefina+orobol, α -hidroxi-

buteína, buteína-4'-*O*-β-glicopiranosídeo, quercetina-3-*O*-β-glicopiranosídeo, ácido 3,5-di-*O-E*-cafeoilquínico, desacetileupaserrina, 2α-hidroxi-8β-2',3',5'-trihidroxi-angeloiloxi-costunolídeo, 2α-hidroxi-8β-3'-hidroxi-2',5'-epoxi-angeloiloxi-costunolídeo e ovatifolina. Adicionalmente, os compostos isolados foram avaliados frente às formas amastigotas intracelulares de *Leishmania amazonensis* e *Trypanosoma cruzi*. A lactona 11,13-diidroxi-calaxina foi o composto mais bioativo contra *L. amazonensis* (CI₅₀ = 8,3 μM) e *T. cruzi* (CI₅₀ = 5,3 μM). O cafeato de etila e a mistura de buteína+orobol também demonstraram interessante efeito tripanocida, com valores de CI₅₀ de 18,3 e 26,5 μM, respectivamente. O teste de citotoxicidade foi realizado frente à linhagem celular TPH-1, e os valores de CC₅₀ foram calculados para aqueles compostos que apresentaram percentagem de inibição sobre o crescimento dos parasitas > 50%. Os valores de CC₅₀ variaram de 15,6 a 236,7 μM, sendo que o cafeato de etila foi o composto mais seletivo, com índice de seletividade (IS) igual a 12,95.

Palavras-chave: Asteraceae. *Calea*. Fitoquímica. Leishmanicida. Tripanocida.

Tamires Cardoso Lima de Carvalho. Estudo fitoquímico e de bioatividade de *Calea pinnatifida* (R. Br.) Less. e *Calea uniflora* Less. (Asteraceae). [Tese de Doutorado]. Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina. Orientadora: Dra. Maique Weber Biavatti, 2016.

ABSTRACT

The genus *Calea* L. (Heliantheae, Asteraceae) contains about 125 species and is distributed essentially in tropical and subtropical regions of the New World. This genus has been reported in the literature to possess several biological properties, including anti-inflammatory, cytotoxic, leishmanicidal, antifungal, antihypertensive and hypoglycemic activities. *Calea uniflora* Less., popularly known as "arnica-da-praia", is used in folk medicine due to its anti-inflammatory properties; and *C. pinnatifida* (R. Br.) Less., commonly known as "quebra-tudo" and "olina", is popularly used for treatment of stomach disorders and as amebicidal and giardicidal. In view of the therapeutic potential of taxon *Calea*, this study aimed to isolate and identify the main chemical constituents present in the leaves from *C. uniflora* and *C. pinnatifida*, as well as to evaluate the leishmanicidal and trypanocidal potential of isolated compounds. Compounds were obtained by successive chromatographic methods (Vacuum Liquid Chromatography, Column Chromatography, Preparative Thin-Layer Chromatography, Medium Pressure Liquid Chromatography and High Performance Liquid Chromatography); and structural elucidation was based on spectroscopic (Nuclear Magnetic Resonance ^1H and ^{13}C , infrared) and spectrometric techniques (High Resolution Mass Spectrometry), physical data and comparison with published data. From the *C. pinnatifida* species were isolated and identified five chromenes (eupatoriochromene, methyleupatoriochromene, enecalinalol, ethyl enecalol and 12-hydroxy-enecalin), one phenolic aldehyde (vanillin), four hydroxycinnamic acid derivatives (ethyl caffeate, 3,4-*O-E*-dicaffeoylquinic acid, 3,5-*O-E*-dicaffeoylquinic acid and 4,5-*O-E*-dicaffeoylquinic acid), one diterpene (phytol) and one new sesquiterpene lactone (11,13-dihydroxy-calaxin). From *C. uniflora* were isolated and characterized thirteen secondary metabolites: noreugenin, caffeic acid, ethyl caffeate, a mixture of butein+orobol, α -hydroxy-butein, butein-4'-*O*- β -glucopyranoside, quercetin-3-*O*- β -glucopyranoside, 3,5-*O-E*-dicaffeoylquinic acid, desacetylupaserrin, 2 α -hydroxy-8 β -2',3',5'-trihydroxy-angeloyloxycostunolide, 2 α -hydroxy-

8 β -3'-hydroxy-2',5'-epoxy-angeloyloxycostunolide and ovatifolin. Additionally, isolated compounds were tested against intracellular amastigotes of *Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. The sesquiterpene lactone 11,13-dihydroxy-calaxin was the most bioactive compound against *L. amazonensis* (IC₅₀ = 8.3 μ M) and *T. cruzi* (IC₅₀ = 5.3 μ M). Ethyl caffeate and the mixture butein+orobol also demonstrated interesting trypanocidal effect, exhibiting IC₅₀ values of 18.3 and 26.5 μ M, respectively. The cytotoxicity test was performed against macrophage-like THP-1 cells and the CC₅₀ values were calculated for those compounds which showed percentage of parasite growth inhibition > 50%. The CC₅₀ values ranged from 15.6 to 236.7 μ M, and ethyl caffeate was the most selective compound, with a selectivity index (SI) of 12.95.

Keywords: Asteraceae. *Calea*. Phytochemistry. Leishmanicidal. Trypanocidal.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição geográfica do gênero <i>Calea</i> no mundo.	53
Figura 2 – <i>Calea pinnatifida</i> (R. Br.) Less.	87
Figura 3 – Estruturas químicas dos principais constituintes do óleo essencial de <i>C. pinnatifida</i> (R. Br.) Less.	88
Figura 4 – Estruturas químicas dos compostos isolados das partes aéreas de <i>C. pinnatifida</i> (R. Br.) Less.	88
Figura 5 – <i>Calea uniflora</i> Less.	90
Figura 6 – Estruturas químicas dos compostos isolados das partes aéreas de <i>C. uniflora</i> Less.	91
Figura 7 – Estruturas químicas dos compostos isolados das partes subterrâneas de <i>C. uniflora</i> Less.	91
Figura 8 – Principais classes de lactonas sesquiterpênicas.	95
Figura 9 – Isômeros da classe dos germacranolídeos.	95
Figura 10 – Estruturas básicas de algumas classes de flavonoides encontradas no gênero <i>Calea</i>	97
Figura 11 – Estruturas básicas das principais classes de compostos não flavonoides encontrados em <i>Calea</i>	98
Figura 12 – Esqueletos estruturais possíveis para os benzopiranos.	99
Figura 13 – Esquema dos procedimentos experimentais empregados na obtenção e particionamento dos extratos brutos das folhas de <i>C. uniflora</i> e <i>C. pinnatifida</i>	106
Figura 14 – Fluxograma resumindo os procedimentos cromatográficos realizados com a espécie <i>C. pinnatifida</i> e os respectivos compostos isolados das frações hexano, diclorometano e acetato de etila.	109
Figura 15 – Fluxograma resumindo os procedimentos cromatográficos realizados com a espécie <i>C. uniflora</i> e os respectivos compostos isolados das frações diclorometano e acetato de etila.	110
Figura 16 – CCDA em sílica gel de algumas frações contendo os compostos CPT1, CPT2, CPT3, CPT4 e CPT6. Fase móvel: hexano-acetona 9:1 e 8:2, respectivamente. Detecção: anisaldeído sulfúrico/aquecimento.	111
Figura 17 – CCDA em sílica gel dos compostos CPT8 (A) e CPT9 (B). Fase móvel: CHCl ₃ -AcOEt 75:25 e 70:30, respectivamente. Detecção: anisaldeído sulfúrico/aquecimento.	113
Figura 18 – CCDA em fase reversa dos compostos CPT11 e CPT12. Fase móvel: H ₂ O-MeOH (60:40). Detecção: anisaldeído sulfúrico/aquecimento.	114

Figura 19 – CCDA em sílica gel de CUT2, CUT5, CUT6, CUT7 (A) e CUT8 (B). Fase móvel: CH ₂ Cl ₂ -AcOEt (70:30). Detecção: anisaldeído sulfúrico/aquecimento.	116
Figura 20 – CCDA em sílica gel de CUT3 e CUT4 (A). Fase móvel: CH ₂ Cl ₂ -MeOH (85:15). CCDA em fase reversa dos compostos CUT10 (B) e CUT12 (C). Fase móvel: H ₂ O-MeOH (50:50). Detecção: anisaldeído sulfúrico/aquecimento.	118
Figura 21 – Esquema colorimétrico utilizado na triagem dos compostos testados.	120
Figura 22 – Cromatogramas ($\lambda = 214, 254$ e 325 nm) do extrato bruto e frações orgânicas (diclorometano, acetato e metanol), respectivamente, de <i>C. pinnatifida</i> obtidos por UHPLC-UV-DAD (Fase móvel: H ₂ O-ACN, com gradiente de eluição; coluna ACE C18, 150 x 3 mm, 3 μ m; vazão da fase móvel 0,4 mL/min).	124
Figura 23 – Cromatogramas ($\lambda = 214, 254$ e 325 nm) do extrato bruto e frações orgânicas (diclorometano, acetato e metanol), respectivamente, de <i>C. uniflora</i> obtidos por UHPLC-UV-DAD (Fase móvel: H ₂ O-ACN, com gradiente de eluição; coluna ACE C18, 150 x 3 mm, 3 μ m; vazão da fase móvel 0,4 mL/min).	124
Figura 24 – Cromatogramas de íons totais (TIC) do extrato bruto de <i>C. pinnatifida</i> obtidos a partir das análises por UHPLC-DAD-MS nos modos de ionização negativo (acima) e positivo (abaixo).	125
Figura 25 – Cromatogramas de íons totais (TIC) do extrato bruto de <i>C. uniflora</i> obtidos a partir das análises por UHPLC-DAD-MS nos modos de ionização negativo (acima) e positivo (abaixo).	128
Figura 26 – Estrutura química do composto CPT1 (eupatoriocromeno).	130
Figura 27 – Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) do composto CPT1 (eupatoriocromeno).	131
Figura 28 – Mapa de correlação HSQC (400 MHz, CDCl ₃) do composto CPT1 (eupatoriocromeno).	132
Figura 29 – Mapa de correlação HMBC (400 MHz, CDCl ₃) do composto CPT1 (eupatoriocromeno).	132
Figura 30 – Representação de algumas correlações HMBC do composto CPT1 (eupatoriocromeno).	132
Figura 31 – Estrutura química do composto CPT2 (metileupatoriocromeno).	134
Figura 32 – Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) do composto CPT2 (metileupatoriocromeno).	136
Figura 33 – Espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) do composto CPT2 (metileupatoriocromeno).	136

Figura 34 – Mapa de correlação HSQC (400 MHz, CDCl ₃) do composto CPT2 (metileupatoriocromeno).	137
Figura 35 – Mapa de correlação HMBC (400 MHz, CDCl ₃) do composto CPT2 (metileupatoriocromeno).	137
Figura 36 – Representação de algumas correlações HMBC do composto CPT2 (metileupatoriocromeno).	137
Figura 37 – Estrutura química do composto CPT3 (encecalinol).	138
Figura 38 – Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) do composto CPT3 (encecalinol).	140
Figura 39 – Mapa de correlação HSQC (400 MHz, CDCl ₃) do composto CPT3 (encecalinol).	141
Figura 40 – Mapa de correlação HMBC (400 MHz, CDCl ₃) do composto CPT3 (encecalinol).	141
Figura 41 – Representação de algumas correlações HMBC do composto CPT3 (encecalinol).	141
Figura 42 – Estrutura química do composto CPT4 (etil encecalol)... ..	142
Figura 43 – Espectro de RMN de ¹ H (600 MHz, CDCl ₃) de CPT4 (etil encecalol).	144
Figura 44 – Mapa de correlação HSQC (600 MHz, CDCl ₃) do composto CPT4 (etil encecalol).	145
Figura 45 – Mapa de correlação HMBC (600 MHz, CDCl ₃) do composto CPT4 (etil encecalol)... ..	145
Figura 46 – Representação de algumas correlações HMBC do composto CPT4 (etil encecalol).	145
Figura 47 – Estrutura química do composto CPT5 (12-hidroxi-encecalina).	147
Figura 48 – Espectro de RMN de ¹ H (600 MHz, CDCl ₃) de CPT5 (12-hidroxi-encecalina).	148
Figura 49 – Mapa de correlação HSQC (600 MHz, CDCl ₃) do composto CPT5 (12-hidroxi-encecalina).	149
Figura 50 – Mapa de correlação HMBC (600 MHz, CDCl ₃) do composto CPT5 (12-hidroxi-encecalina)... ..	149
Figura 51 – Representação de algumas correlações HMBC do composto CPT5 (12-hidroxi-encecalina).	149
Figura 52 – Estrutura química do composto CPT6 (fitol).	151
Figura 53 – Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) do composto CPT6 (fitol).	153
Figura 54 – Comparação do sinal de RMN de H-2 (esquerda – espectro experimental; direita – simulador FOMSC3).	153
Figura 55 – Mapa de correlação HSQC (400 MHz, CDCl ₃) do composto CPT6 (fitol).	154

Figura 56 – Mapa de correlação HMBC (400 MHz, CDCl ₃) do composto CPT6 (fitol).	154
Figura 57 – Representação de algumas correlações HMBC do composto CPT6 (fitol).	154
Figura 58 – Estrutura química do composto CPT7 (vanilina).	156
Figura 59 – Espectro de RMN de ¹ H (600 MHz, CDCl ₃) do composto CPT7 (vanilina).	157
Figura 60 – Mapa de correlação HSQC (600 MHz, CDCl ₃) do composto CPT7 (vanilina).	158
Figura 61 – Mapa de correlação HMBC (600 MHz, CDCl ₃) do composto CPT7 (vanilina).	158
Figura 62 – Representação de algumas correlações HMBC do composto CPT7 (vanilina).	158
Figura 63 – Estrutura química do composto CPT8 (11,13-diidroxi-calaxina).	159
Figura 64 – Espectro de IV do composto CPT8 (11,13-diidroxi-calaxina).	162
Figura 65 – Espectro de massas de alta resolução (modo varredura) do composto CPT8 (11,13-diidroxi-calaxina) obtido por ESI(-)-HRMS.	163
Figura 66 – Perfil de fragmentação do composto CPT8 (11,13-diidroxi-calaxina) por ESI(-)-MS ²	163
Figura 67 – Proposta de fragmentação do composto CPT8 (11,13-diidroxi-calaxina) [ESI(-)-HRMS].	164
Figura 68 – Espectro de RMN de ¹ H (600 MHz, CDCl ₃) do composto CPT8 (11,13-diidroxi-calaxina).	164
Figura 69 – Mapa de correlação COSY (600 MHz, CDCl ₃) do composto CPT8 (11,13-diidroxi-calaxina).	165
Figura 70 – Mapa de correlação HSQC (600 MHz, CDCl ₃) do composto CPT8 (11,13-diidroxi-calaxina).	165
Figura 71 – Mapa de correlação HMBC (600 MHz, CDCl ₃) do composto CPT8 (11,13-diidroxi-calaxina).	165
Figura 72 – Representação de algumas correlações HMBC do composto CPT8 (11,13-diidroxi-calaxina).	166
Figura 73 – Estrutura química do composto CPT9 (cafeato de etila).	167
Figura 74 – Espectro de RMN de ¹ H (600 MHz, acetona- <i>d</i> ₆) do composto CPT9 (cafeato de etila).	169
Figura 75 – Mapa de correlação HSQC (600 MHz, acetona- <i>d</i> ₆) do composto CPT9 (cafeato de etila).	169
Figura 76 – Mapa de correlação HMBC (600 MHz, acetona- <i>d</i> ₆) do composto CPT9 (cafeato de etila).	170

Figura 77 – Representação de algumas correlações HMBC do composto CPT9 (cafeato de etila).	170
Figura 78 – Estrutura química do composto CPT10 (ácido 3,5-di- <i>O-E</i> -cafeoilquínico).	171
Figura 79 – Espectro de RMN de ¹ H (600 MHz, MeOD- <i>d</i> ₄) do composto CPP10 (ácido 3,5-di- <i>O-E</i> -cafeoilquínico).	173
Figura 80 – Mapa de correlação HSQC (600 MHz, MeOD- <i>d</i> ₄) do composto CPT10 (ácido 3,5-di- <i>O-E</i> -cafeoilquínico).	174
Figura 81 – Mapa de correlação HMBC (600 MHz, MeOD- <i>d</i> ₄) do composto CPT10 (ácido 3,5-di- <i>O-E</i> -cafeoilquínico).	174
Figura 82 – Representação de algumas correlações HMBC do composto CPT10 (ácido 3,5-di- <i>O-E</i> -cafeoilquínico).	174
Figura 83 – Estrutura química do composto CPT11 (3,4-di- <i>O-E</i> -cafeoilquínico).	176
Figura 84 – Estrutura química do composto CPT12 (4,5-di- <i>O-E</i> -cafeoilquínico).	177
Figura 85 – Perfil de fragmentação do isômero 3,4-diACQ obtido por ESI(-)-MS ²	178
Figura 86 – Perfil de fragmentação do isômero 4,5-diACQ obtido por ESI(-)-MS ²	179
Figura 87 – Proposta de fragmentação do ácido 3,4-di- <i>O-E</i> -cafeoilquínico [ESI(-)-HRMS].	180
Figura 88 – Estrutura química do composto CUT1 (ácido cafeico). ...	181
Figura 89 – Espectro de RMN de ¹ H (600 MHz, MeOD- <i>d</i> ₄) do composto CUT1 (ácido cafeico).	182
Figura 90 – Mapa de correlação HSQC (600 MHz, MeOD- <i>d</i> ₄) do composto CUT1 (ácido cafeico).	183
Figura 91 – Mapa de correlação HMBC (600 MHz, MeOD- <i>d</i> ₄) do composto CUT1 (ácido cafeico).	183
Figura 92 – Representação de algumas correlações HMBC do composto CUT1 (ácido cafeico).	183
Figura 93 – Estrutura química do composto CUT2 (noreugenina). ...	184
Figura 94 – Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, acetona- <i>d</i> ₆) do composto CUT2 (noreugenina).	186
Figura 95 – Mapa de correlação HSQC (400 MHz, acetona- <i>d</i> ₆) do composto CUT2 (noreugenina).	186
Figura 96 – Mapa de correlação HMBC (400 MHz, acetona- <i>d</i> ₆) do composto CUT2 (noreugenina).	187
Figura 97 – Representação de algumas correlações HMBC do composto CUT2 (noreugenina).	187
Figura 98 – Estrutura química do composto CUT3-1 (buteína).	188

Figura 99 – Estrutura química do composto CUT3-2 (orobol).	188
Figura 100 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, MeOD- d_4) da amostra CUT3 (buteína e orobol).	190
Figura 101 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, MeOD- d_4) na região de 7,62-6,18 ppm.	190
Figura 102 – Mapa de correlação HSQC (400 MHz, MeOD- d_4) da amostra CUT3 (buteína e orobol).	191
Figura 103 – Mapa de correlação HMBC (400 MHz, MeOD- d_4) da amostra CUT3 (buteína e orobol).	191
Figura 104 – Representação de algumas correlações HMBC do composto CUT3-1 (buteína).	191
Figura 105 – Representação de algumas correlações HMBC do composto CUT3-2 (orobol).	192
Figura 106 – Estrutura química do composto CUT4 (α -hidroxi-buteína).	194
Figura 107 – Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, MeOD- d_4) do composto CUT4 (α -hidroxi-buteína).	196
Figura 108 – Espectro de RMN de ^{13}C (600 MHz, MeOD- d_4) do composto CUT4 (α -hidroxi-buteína).	196
Figura 109 – Mapa de correlação HSQC (600 MHz, MeOD- d_4) do composto CUT4 (α -hidroxi-buteína).	197
Figura 110 – Mapa de correlação HMBC (600 MHz, MeOD- d_4) do composto CUT4 (α -hidroxi-buteína).	197
Figura 111 – Representação de algumas correlações HMBC do composto CUT4 (α -hidroxi-buteína).	197
Figura 112 – Estrutura química do composto CUT5 (desacetileupaserrina).	199
Figura 113 – Espectro de massas de alta resolução do composto CUT5 (desacetileupaserrina) obtido por ESI(+)-HRMS.	201
Figura 114 – Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, acetona- d_6) do composto CUT5 (desacetileupaserrina).	202
Figura 115 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (600 MHz, acetona- d_6) na região de 5,63-1,57 ppm.	202
Figura 116 – Comparação do sinal de RMN de ^1H de H-7 (esquerda – espectro experimental; direita – simulador FOMSC3).	203
Figura 117 – Mapa de correlação COSY (600 MHz, acetona- d_6) do composto CUT5 (desacetileupaserrina).	203
Figura 118 – Espectro de NOE (600 MHz, acetona- d_6) do composto CUT5 (desacetileupaserrina) irradiado em 3,24 ppm.	204
Figura 119 – Espectro de NOE (600 MHz, acetona- d_6) do composto CUT5 (desacetileupaserrina) irradiado em 5,89 ppm.	204

Figura 120 – Mapa de correlação HSQC (600 MHz, acetona- d_6) do composto CUT5 (desacetileupaserrina).	205
Figura 121 – Mapa de correlação HMBC (600 MHz, acetona- d_6) do composto CUT5 (desacetileupaserrina).	205
Figura 122 – Representação de algumas correlações HMBC do composto CUT5 (desacetileupaserrina).	205
Figura 123 – Estrutura química do composto CUT6 (2 α -hidroxi-8 β -2',3',5'-trihidroxi-angeloiloxi-costunolídeo).	207
Figura 124 – Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, acetona- d_6) do composto CUT6 (2 α -hidroxi-8 β -2',3',5'-trihidroxi-angeloiloxi-costunolídeo).	209
Figura 125 – Mapa de correlação HSQC (600 MHz, acetona- d_6) do composto CUT6 (2 α -hidroxi-8 β -2',3',5'-trihidroxi-angeloiloxi-costunolídeo).	210
Figura 126 – Mapa de correlação HMBC (600 MHz, acetona- d_6) do composto CUT6 (2 α -hidroxi-8 β -2',3',5'-trihidroxi-angeloiloxi-costunolídeo).	210
Figura 127 – Representação de algumas correlações HMBC do composto CUT6 (2 α -hidroxi-8 β -2',3',5'-trihidroxi-angeloiloxi-costunolídeo).	210
Figura 128 – Estrutura química do composto CUT7 (2 α -hidroxi-8 β -3'-hidroxi-2',5'-epoxi-angeloiloxi-costunolídeo).	212
Figura 129 – Espectro de massas de alta resolução do composto CUT7 (2 α -hidroxi-8 β -3'-hidroxi-2',5'-epoxi-angeloiloxi-costunolídeo) obtido por [ESI(+)-HRMS].	214
Figura 130 – Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, acetona- d_6) do composto CUT7 (2 α -hidroxi-8 β -3'-hidroxi-2',5'-epoxi-angeloiloxi-costunolídeo).	215
Figura 131 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (600 MHz, acetona- d_6) na região de 5,25-3,23 ppm.	215
Figura 132 – Mapa de correlação HSQC (600 MHz, acetona- d_6) do composto CUT7 (2 α -hidroxi-8 β -3'-hidroxi-2',5'-epoxi-angeloiloxi-costunolídeo).	216
Figura 133 – Mapa de correlação HMBC (600 MHz, acetona- d_6) do composto CUT7 (2 α -hidroxi-8 β -3'-hidroxi-2',5'-epoxi-angeloiloxi-costunolídeo).	216
Figura 134 – Representação de algumas correlações HMBC do composto CUT7 (2 α -hidroxi-8 β -3'-hidroxi-2',5'-epoxi-angeloiloxi-costunolídeo).	216
Figura 135 – Estrutura química do composto CUT8 (ovatifolina).	218

Figura 136 – Espectro de massas de alta resolução do composto CUT8 (ovatifolina) obtido por [ESI(+)-HRMS].	220
Figura 137 – Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, acetona- d_6) do composto CUT8 (ovatifolina).	221
Figura 138 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (600 MHz, acetona- d_6) na região de 4,98-1,66 ppm.	221
Figura 139 – Mapa de correlação COSY (600 MHz, acetona- d_6) do composto CUT8 (ovatifolina).	222
Figura 140 – Mapa de correlação HSQC (600 MHz, acetona- d_6) do composto CUT8 (ovatifolina).	222
Figura 141 – Mapa de correlação HMBC (600 MHz, acetona- d_6) do composto CUT8 (ovatifolina).	222
Figura 142 – Representação de algumas correlações HMBC de CUT8 (ovatifolina).	223
Figura 143 – Estrutura química do composto CUT11 (buteína-4'- O - β -glicopiranosídeo).	224
Figura 144 – Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, MeOD- d_4) do composto CUT11 (buteína-4'- O - β -glicopiranosídeo).	226
Figura 145 – Mapa de correlação HSQC (600 MHz, MeOD- d_4) do composto CUT11 (buteína-4'- O - β -glicopiranosídeo).	227
Figura 146 – Mapa de correlação HMBC (600 MHz, MeOD- d_4) do composto CUT11 (buteína-4'- O - β -glicopiranosídeo).	227
Figura 147 – Representação de algumas correlações HMBC do composto CUT11 (buteína-4'- O - β -glicopiranosídeo).	227
Figura 148 – Estrutura química do composto CUT12 (quercetina-3- O - β -glicopiranosídeo).	229
Figura 149 – Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, MeOD- d_4) do composto CUT12 (quercetina-3- O - β -glicopiranosídeo).	231
Figura 150 – Mapa de correlação HSQC (600 MHz, MeOD- d_4) do composto CUT12 (quercetina-3- O - β -glicopiranosídeo).	232
Figura 151 – Mapa de correlação HSQC (600 MHz, MeOD- d_4) do composto CUT12 (quercetina-3- O - β -glicopiranosídeo).	232
Figura 152 – Representação de algumas correlações HMBC do composto CUT12 (quercetina-3- O - β -glicopiranosídeo).	232

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Total de novos medicamentos aprovados no período de 1981-2014 e sua fonte de origem (Fonte: Newman & Cragg, 2016) ...	46
Tabela 2 – Esquema de eluição utilizado no fracionamento por CLV da fração diclorometano de <i>C. pinnatifida</i>	112
Tabela 3 – Esquema de eluição utilizado no fracionamento por CLV da fração acetato de etila de <i>C. pinnatifida</i>	112
Tabela 4 – Esquema de eluição utilizado no fracionamento por CLV da fração diclorometano de <i>C. uniflora</i>	115
Tabela 5 – Esquema de eluição utilizado no fracionamento por CLV da fração acetato de etila de <i>C. uniflora</i>	117
Tabela 6 – Rendimentos das extrações das folhas de <i>C. uniflora</i> e <i>C. pinnatifida</i>	121
Tabela 7 – Constituintes químicos identificados no extrato bruto de <i>C. pinnatifida</i> com correspondentes tempos de retenção (t_R), dados de espectrometria de massas e no UV obtidos a partir das análises por UHPLC-DAD-MS.	127
Tabela 8 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (400 e 100 MHz, CDCl_3) do eupatoriocromeno em comparação com dados da literatura.	133
Tabela 9 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (400 e 100 MHz, CDCl_3) do cromeno metileupatoriocromeno em comparação com dados da literatura.	138
Tabela 10 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (400 e 100 MHz, CDCl_3) do cromeno enecalinol em comparação com dados da literatura.	142
Tabela 11 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (600 e 150 MHz, CDCl_3) do cromeno etil enecalol em comparação com dados da literatura.	146
Tabela 12 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (600 e 150 MHz, CDCl_3) do cromeno 12-hidroxi-enecalina em comparação com dados da literatura.	150
Tabela 13 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (400 e 100 MHz, CDCl_3) do diterpeno fitol em comparação com dados da literatura. NO = sinal não observado.	155
Tabela 14 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (600 e 150 MHz, CDCl_3) do aldeído fenólico vanilina em comparação com dados da literatura. NO = sinal não observado.	159
Tabela 15 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (600 e 150 MHz, CDCl_3) do composto CPT8 (11,13-diidroxi-calaxina).	162
Tabela 16 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (600 e 150 MHz, acetona- d_6) do cafeato de etila em comparação com dados da literatura.	170

Tabela 17 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (MeOD- d_4) do ácido 3,5-di- <i>O</i> - <i>E</i> -cafeoilquínico em comparação com dados da literatura.	175
Tabela 18 – Fragmentos obtidos por ESI(-)-MS 2 para os isômeros 3,4-diACQ; 3,5-diACQ e 4,5-diACQ.	179
Tabela 19 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (600 e 100 MHz, MeOD- d_4) do ácido cafeico em comparação com dados da literatura.	184
Tabela 20 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (400 e 100 MHz, acetona- d_6) da cromona noreugenina em comparação com dados da literatura.	187
Tabela 21 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (400 e 100 MHz, MeOD- d_4) da chalcona buteína em comparação com dados da literatura.	192
Tabela 22 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (400 e 100 MHz, MeOD- d_4) da isoflavona orobol (isoluteolina) em comparação com dados da literatura.	193
Tabela 23 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (600 e 150 MHz, MeOD- d_4) da chalcona α -hidroxi-buteína em comparação com dados da literatura..	198
Tabela 24 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (600 e 150 MHz, acetona- d_6) da lactona desacetileupaserrina em comparação com dados da literatura.	206
Tabela 25 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (600 e 150 MHz, acetona- d_6) da lactona 2 α -hidroxi-8 β -2',3',5'-trihidroxi-angeloiloxi-costunolídeo em comparação com dados da literatura.	211
Tabela 26 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (600 e 150 MHz, acetona- d_6) da lactona 2 α -hidroxi-8 β -3'-hidroxi-2',5'-epoxi-angeloiloxi-costunolídeo em comparação com dados da literatura.	217
Tabela 27 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (600 e 150 MHz, acetona- d_6) da lactona ovatifolina em comparação com dados da literatura.	223
Tabela 28 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (600 e 150 MHz, MeOD- d_4) da chalcona buteína-4'- <i>O</i> - β -glicopiranosídeo em comparação com dados da literatura.....	228
Tabela 29 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (600 e 150 MHz, MeOD- d_4) da quercetina-3- <i>O</i> -glicopiranosídeo (isoquercitrina) em comparação com dados da literatura.	233
Tabela 30 – <i>Screening</i> leishmanicida e tripanocida dos compostos isolados de <i>C. uniflora</i> e <i>C. pinnatifida</i> frente às formas amastigotas intracelulares de <i>L. amazonensis</i> e <i>T. cruzi</i> , respectivamente.	235
Tabela 31 – Valores de CI $_{50}$, CC $_{50}$ e IS para os compostos 11,13-diidroxi-calaxina, ovatifolina, cafeato de etila e a mistura de buteína+orobol.	236

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Principais diferenças entre os MF e os PTF.	48
Quadro 2 – Classificação das subfamílias e tribos de Asteraceae segundo Bremer (1994).	50
Quadro 3 – Atividades biológicas descritas para os extratos, óleos essenciais e compostos isolados de <i>Calea</i>	55
Quadro 4 – Metabólitos secundários isolados do gênero <i>Calea</i>	56

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÔNIMOS

- HMBC – *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*
HSQC – *Heteronuclear Single Quantum Correlation*
COSY – *Correlation Spectroscopy*
NOE – *Nuclear Overhauser Effect*
HRMS – *High Resolution Mass Spectrometry*
HRFTMS – *High Resolution Fourier Transformation Mass Spectrometry*
IV – Infravermelho
KBr – Brometo de potássio
TIC – Cromatograma de Íons Totais
MeCr – Metacrilato
CAF – Cafeóila
ACAF – Ácido cafeico
ISOQ – Isoquercitrina
CAFET – Cafeato de etila
MEUP – Metileupatoriocromeno
ACQ – Ácido cafeoilquínico
AFQ – Ácido feruloilquínico
AQ – Ácido quínico
NOR – Noreugenina
a.C. – Antes de Cristo
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CC – Cromatografia em Coluna
CCDA – Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CCDP – Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
EUA – Estados Unidos da América
MS – Ministério da Saúde
CLMP – Cromatografia Líquida de Média Pressão
IBPM – Instituto Brasileiro de Plantas Medicinais
OMS – Organização Mundial de Saúde
RMN de ^{13}C – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono Treze
RMN de ^1H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
Rf – Fator de retenção
PNPIC – Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
PNPMF – Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
CINB – Código Internacional de Nomenclatura Botânica
DNP – *Dictionary of Natural Products*®
MF – Medicamentos Fitoterápicos
PTF – Produto Tradicional Fitoterápico

ppm – Partes por milhão
SUS – Sistema Único de Saúde
UV – Ultravioleta
CLUE-DAD – Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a Detector de Arranjo de Diodos
DMSO-*d*₆ – Dimetilsulfóxido deuterado
FID – *Free Induction Decay*
EM – Espectrometria de Massas
CLV – Cromatografia Líquida a Vácuo
p.f. – Ponto de fusão
LST – Lactonas sesquiterpênicas
t.a. – Temperatura ambiente
CDCl₃ – Clorofórmio deuterado
MeOD-*d*₄ – Metanol deuterado
AsterDB – *Asteraceae Data Base*
Hz – Hertz
PTFE – Politetrafluoretileno
J – Constante de acoplamento
s – Simpleto
sl – Simpleto largo
d – Duplete
dd – Duplo duplete
ddd – Duplo duplo duplete
dddd – Duplo duplo duplo duplete
qdd – Quádruplo duplo duplete
t – Tripleto
m – Multipleto
δ – Deslocamento químico em ppm
UPLC – *Ultra Performance Liquid Chromatography*
MHz – Mega Hertz
SBH – Soro bovino humano
FCFRP – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
USP – Universidade de São Paulo
PBS – Tampão Salino Fosfato
PMA – Forbol 12-miristato 13-acetato
NP-40 – Nonidet P-40
CPRG – Vermelho de clorofenol-β-*O*-D-galactopiranosídeo
MTT – Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina
CI₅₀ – Concentração capaz de inibir 50% do crescimento dos parasitas
CC₅₀ – Concentração citotóxica 50%

IDH – Índice de deficiência de hidrogênio

ESI(+)-EM – Espectro de massas obtido com ionização por *Electrospray* no modo positivo

ESI(-)-EM – Espectro de massas obtido com ionização por *Electrospray* no modo negativo

HRESIMS – *High Resolution Electrospray Ionization Mass Spectrometry*

IS – Índice de seletividade

TPH-1 – Linhagem celular de leucemia humana aguda monocítica

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	39
1 INTRODUÇÃO.....	41
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	45
2.1 PLANTAS MEDICINAIS.....	45
2.2 A FAMÍLIA ASTERACEAE.....	48
2.3 TRIBO HELIANTHEAE CASS.....	51
2.4 CONSIDERAÇÕES SOBRE O GÊNERO <i>Calea</i> L.....	52
2.5 <i>Calea pinnatifida</i> (R. BR.) LESS.....	86
2.6 <i>Calea uniflora</i> LESS.....	89
2.7 LACTONAS SESQUITERPÊNICAS (LST) E SEU POTENCIAL BIOLÓGICO.....	93
2.8 COMPOSTOS FENÓLICOS (FLAVONOIDES E NÃO FLAVONOIDES) E SEU POTENCIAL BIOLÓGICO E FARMACOLÓGICO.....	96
2.9 CROMENOS (BENZOPIRANOS E ATIVIDADES BIOLÓGICAS).....	98
3 OBJETIVOS.....	101
3.1 GERAL.....	101
3.2 ESPECÍFICOS.....	101
4 METODOLOGIA.....	103
4.1 ESPECIFICAÇÕES DOS REAGENTES E EQUIPAMENTOS...103	
4.1.1 Equipamentos utilizados.....	103
4.1.2 Métodos cromatográficos, solventes e reagentes empregados.....	103
4.1.3. Análise instrumental.....	104
4.2 COLETA DO MATERIAL VEGETAL.....	105
4.3 OBTENÇÃO E PARTICIONAMENTO DOS EXTRATOS BRUTOS.....	106
4.4 IMPRESSÃO DIGITAL METABÓLICA DAS ESPÉCIES <i>C. uniflora</i> E <i>C. pinnatifida</i> POR UHPLC-UV-ESI-MS E DESREPLICAÇÃO.....	107
4.5 FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DAS FRAÇÕES ORGÂNICAS.....	108
4.5.1 Isolamento de substâncias da fração hexano de <i>C. pinnatifida</i> (1ª coleta).....	111
4.5.2 Isolamento de substâncias da fração diclorometano de <i>C. pinnatifida</i> (2ª coleta).....	111

4.5.3. Isolamento de substâncias da fração acetato de etila de <i>C. pinnatifida</i> (2ª coleta).....	113
4.5.4 Isolamento de substâncias da fração diclorometano de <i>C. uniflora</i>	115
4.5.5. Isolamento de substâncias da fração acetato de etila de <i>C. uniflora</i>	116
4.6 ENSAIOS BIOLÓGICOS <i>in vitro</i> FRENTE ÀS FORMAS AMASTIGOTAS INTRACELULARES DE <i>Leishmania amazonensis</i> e <i>Trypanosoma cruzi</i>	118
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	121
5.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS E PARTICIONAMENTO LÍQUIDO-LÍQUIDO.....	121
5.2 IMPRESSÃO DIGITAL METABÓLICA DOS EXTRATOS E FRAÇÕES ORGÂNICAS DAS ESPÉCIES <i>C. uniflora</i> E <i>C. pinnatifida</i> E DESREPLICAÇÃO.....	122
5.3 IDENTIFICAÇÃO E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS.....	129
5.3.1 Investigação fitoquímica da espécie <i>C. pinnatifida</i>	129
5.3.1.1 Substância CPT1 (eupatoriocromeno).....	129
5.3.1.2 Substância CPT2 (metileupatoriocromeno).....	133
5.3.1.3 Substância CPT3 (encecalinol).....	138
5.3.1.4 Substância CPT4 (etil encecalol).....	142
5.3.1.5 Substância CPT5 (12-hidroxi-encecalina).....	146
5.3.1.6 Substância CPT6 (fitol).....	151
5.3.1.7 Substância CPT7 (vanilina).....	155
5.3.1.8 Substância CPT8 (11,13-diidróxi-calaxina).....	159
5.3.1.9 Substância CPT9 (cafeato de etila).....	167
5.3.1.10 Substância CPT10 (ácido 3,5-di- <i>O-E</i> -cafeoilquínico).....	171
5.3.1.11 Substâncias CPT11 e CPT12 (ácidos 3,4-di- <i>O-E</i> -cafeoilquínico e 4,5-di- <i>O-E</i> -cafeoilquínico, respectivamente).....	176
5.3.2 Investigação fitoquímica da espécie <i>C. uniflora</i>	178
5.3.2.1 Substância CUT1 (ácido cafeico).....	178
5.3.2.2 Substância CUT2 (noreugenina).....	184
5.3.2.3 Amostra CUT3 (mistura de buteína e orobol).....	188
5.3.2.4 Substância CUT4 (α -hidroxi-buteína).....	194
5.3.2.5 Substância CUT5 (desacetileupaserrina).....	198
5.3.2.6 Substância CUT6 (2 α -hidroxi-8 β -2',3',5'-trihidroxi-angeloiloxi-costunolídeo).....	207

5.3.2.7	Substância CUT7 (2 α -hidroxi-8 β -3'-hidroxi-2',5'-epoxi-angeloiloxi-costunolídeo).....	212
5.3.2.8	Substância CUT8 (ovatifolina).....	218
5.3.2.9	Substância CUT9 (cafeato de etila).....	224
5.3.2.10	Substância CUT10 (ácido 3,5-di- <i>O-E</i> -cafeoilquínico).....	224
5.3.2.11	Substância CUT11 (buteína-4'- <i>O</i> - β -glicopiranosídeo).....	224
5.3.2.12	Substância CUT12 (quercetina-3- <i>O</i> - β -glicopiranosídeo).....	229
5.3.3	Atividade leishmanicida e tripanocida dos compostos isolados.....	234
6	CONCLUSÕES.....	234
	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	241
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	243
	APÊNDICE 1 – Resumos apresentados em anais de congressos.....	295
	ANEXO 1 – Artigo publicado no periódico Brazilian Journal of Pharmacognosy no ano de 2015.....	297
	ANEXO 2 – Artigo publicado no periódico Natural Product Research no ano de 2015.....	299
	ANEXO 3 – Artigo aceito para publicação no periódico Journal of the Brazilian Chemical Society no ano de 2016.....	301

APRESENTAÇÃO

As plantas medicinais representam, indubitavelmente, uma das maiores fontes de substâncias bioativas que podem ser empregadas na terapêutica, devido, sobretudo, à grande complexidade e diversidade estrutural dos metabólitos produzidos. Há séculos, os recursos da flora vêm sendo utilizados pelo homem no tratamento de diferentes patologias, e muitas dessas substâncias ativas foram introduzidas na terapêutica, permanecendo até hoje como medicamentos (BRANDÃO et al., 2010; DUTRA et al., 2016). Uma análise envolvendo a aprovação de novos medicamentos revelou que aproximadamente 60% de todos os fármacos considerados apresentaram um produto natural envolvido no seu desenvolvimento (NEWMAN & CRAGG, 2012). Como exemplo de alguns medicamentos obtidos a partir de fontes vegetais pode-se citar os quimioterápicos paclitaxel e 3-*O*-angeloil ingenol, e o antimalárico artemisinina (FIDLER & GOLDBERG, 2014; MEDRADO et al., 2015; ONGUÉNÉ et al., 2013).

Diferentes espécies do gênero *Calea* são tradicionalmente utilizadas na medicina popular em diferentes países da América Central e Latina, incluindo o Brasil. As espécies *Calea uniflora* Less. (“arnica-da-praia”) e *C. pinnatifida* (R. Br.) Less. (“quebra-tudo”) são encontradas no Estado de Santa Catarina e são empregadas na medicina popular no tratamento de processos inflamatórios em geral e distúrbios estomacais, respectivamente (FERREIRA et al., 1980a; MORS; RIZZINI; PEREIRA, 2000; ZANK, 2011). Este trabalho apresentou como objetivo principal investigar a composição química dos extratos vegetais de *C. uniflora* e *C. pinnatifida*, bem como avaliar o potencial biológico dos compostos isolados, em parceria com o professor Dr. Mário Steindel, do laboratório de Protozoologia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Paralelamente, foram e/ou estão sendo desenvolvidos três estudos de atividade biológica envolvendo essas duas espécies, os quais se intitulam:

- ✓ Estudo do efeito anti-inflamatório da *Calea pinnatifida* utilizando-se o modelo de inflamação neutrofílica induzido pela carragenina, em camundongos (FINALIZADO) – Dissertação de Mestrado do aluno Bruno Matheus de Campos Facchin (Orientadora: Dra. Tânia Fröde; Programa de Pós-Graduação em Farmácia – UFSC);
- ✓ Estudo do efeito anti-inflamatório e antitumoral de *Calea uniflora* Less. utilizando-se o modelo de inflamação neutrofílica induzido pela carragenina, em camundongos (EM ANDAMENTO) –

Tese de Doutorado da aluna Júlia Salvan Rosa (Orientadora: Dra. Tânia Fröde; Programa de Pós-Graduação em Farmácia – UFSC);

✓ Investigação de compostos naturais e sintéticos quanto à atividade antimicobacteriana *in vitro* e determinação do seu mecanismo de ação (EM ANDAMENTO) – Tese de Doutorado da aluna Letícia Muraro Wildner (Orientadora: Dra. Maria Luiza Bazzo; Programa de Pós-Graduação em Farmácia – UFSC).

A apresentação escrita dos resultados do trabalho experimental da tese foi estruturada da forma clássica: Introdução, Revisão bibliográfica, Metodologia, Resultados e Discussão, Conclusões, Considerações finais e Perspectivas, Referências bibliográficas, Apêndices e Anexos. No apêndice 1 consta uma lista de todos os resumos apresentados em anais de congressos ao longo do doutorado. Nos anexos 1 e 2 estão dois manuscritos publicados, frutos desse trabalho, e no anexo 3 consta um manuscrito aceito para publicação. Abaixo, segue o título dos manuscritos publicados e aceito para publicação, bem como o periódico a que foram submetidos. Adicionalmente, também está em fase de redação um artigo de revisão sobre o uso tradicional, constituintes químicos e atividades biológicas do gênero *Calea*:

✓ “Chromenes from leaves of *Calea pinnatifida* (R. Br.) Less. and evaluation of their leishmanicidal activity” – Artigo publicado no periódico Brazilian Journal of Pharmacognosy no ano de 2015;

✓ “Evaluation of leishmanicidal and trypanocidal activities of phenolic compounds from *Calea uniflora* Less.” – Artigo publicado no periódico Natural Product Research no ano de 2015.

✓ “A new furanoheliangolide sesquiterpene lactone from *Calea pinnatifida* (R. Br.) Less. and evaluation of its trypanocidal and leishmanicidal activity” – Artigo submetido para publicação no periódico Journal of the Brazilian Chemical Society no ano de 2016.

✓ “The Genus *Calea* L. (Asteraceae): Traditional Uses, Phytochemistry and Biological Activities” – Artigo em fase de redação para posterior submissão ao periódico Phytochemistry Reviews.

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais é uma prática terapêutica generalizada e, provavelmente, tão antiga quanto à própria existência da humanidade. Durante muito tempo, o homem aprendeu a conhecer a ação polivalente das substâncias naturais, sobretudo, aquelas de origem vegetal, e a utilizar-se de suas propriedades sobre os diversos órgãos e tecidos do organismo humano (LEONTI, 2011; NEWMAN & CRAGG, 2016). Nos últimos anos, o interesse nas terapias alternativas e no uso medicinal dos produtos naturais, especialmente aqueles derivados de plantas, tem aumentado consideravelmente em todo o mundo (CRAGG & NEWMAN, 2013; DUTRA et al., 2016; LALL & KISHORE, 2014; TABASSUM & HAMDANI, 2014). Este aumento é observado sobretudo nos países desenvolvidos, como por exemplo nos Estados Unidos e em alguns países da Europa. Estima-se que o mercado mundial desta classe de medicamentos atinja cerca de 20 bilhões de dólares anualmente (DUTRA et al., 2016).

As plantas medicinais e seus derivados constituíram a base da terapêutica medicamentosa até meados do século XX, quando a síntese química, que teve início no final do século XIX, estreou uma fase de crescimento abrupto (CALIXTO, 2000). Atualmente, a utilização de espécies vegetais com fins medicinais tem ressurgido e está em constante expansão em nível mundial. A crescente busca por agentes terapêuticos derivados de plantas e outros produtos naturais pode ser justificada por diversos fatores, entre eles a relevância dos organismos vegetais como fonte de substâncias bioativas, o surgimento de doenças ainda sem tratamento adequado, a preferência da população por tratamentos “naturais”, a crescente validação científica das propriedades farmacológicas de espécies vegetais, e o crescimento do conhecimento científico acerca dos produtos fitoterápicos, uma alternativa terapêutica bem aceita e mais acessível à população (BRAZ FILHO, 2010; MISHRA & TIWARI, 2011; SOUZA-MOREIRA; SALGADO; PIETRO, 2010).

A abordagem etnobotânica ou etnofarmacológica é uma das estratégias mais utilizadas para investigar plantas medicinais. A mesma consiste em combinar informações adquiridas junto a comunidades locais, que fazem uso da flora medicinal, com estudos científicos. A convivência e o aprendizado com diferentes grupos étnicos aumentaram as chances de sucesso na descoberta de novas moléculas bioativas, trazendo inúmeras contribuições para o desenvolvimento da pesquisa em produtos naturais (ALBUQUERQUE et al., 2014; MEDEIROS et

al., 2013; SOUZA et al., 2013). Através da informação etnofarmacológica foram descobertos muitos compostos farmacologicamente ativos e que deram origem a fármacos fortemente empregados na terapêutica, a exemplo da digoxina (*Digitalis lanata* Ehrh.), morfina (*Papaver somniferum* L.), atropina (*Atropa belladonna* L.), paclitaxel (*Taxus brevifolia* Nutt.), quinina (*Cinchona officinalis*), entre outros.

No Brasil, a utilização de plantas com fins terapêuticos é derivada de diferentes civilizações e culturas, sobretudo, das influências indígena, europeia e africana (MARTINS et al., 2000). Nas últimas décadas, as plantas medicinais têm sido amplamente empregadas como remédios caseiros por uma grande parcela da população brasileira, o que em parte pode ser explicado pelo elevado custo dos medicamentos industrializados e também pelo aumento no número de dados sobre o uso das plantas presentes nas florestas tropicais (BRANDÃO et al., 2008; LUCENA; ARAÚJO; ALBUQUERQUE, 2007; TEKLEHAYAMANOT & GIDAY, 2007). Além de apresentar uma enorme biodiversidade, o Brasil também possui um amplo conhecimento tradicional acumulado por pessoas locais que têm acesso direto a natureza e aos produtos oriundos dessa diversidade biológica, fato que intensifica essa prática terapêutica (ALBAGLI, 2001; CARTAXO; SOUZA; DE ALBUQUERQUE, 2010).

Estima-se que do total de medicamentos consumidos atualmente, aproximadamente 60% sejam oriundos de produtos naturais ou derivados destes (NEWMAN & CRAGG, 2016). Além disso, cerca de 25% dos fármacos prescritos em todo o mundo são provenientes de espécies vegetais (ALVES et al., 2014) e mais de 100 países possuem regulamento para o uso de medicamentos a base de plantas medicinais (SAVOIA, 2012). Segundo projeções do Instituto Brasileiro de Plantas Medicinais (IBPM), o mercado de fitoterápicos movimentará em média, por ano, US\$ 500 milhões de dólares no Brasil.

A família botânica Asteraceae destaca-se entre as famílias com mais espécies empregadas na medicina popular. Esse grupo sistemático possui distribuição cosmopolita, sendo considerada a família de plantas mais representativa no Brasil (aproximadamente 250 gêneros) (EMERENCIANO et al., 2007; GUIMARÃES et al., 2012; SOUZA & LORENZI, 2008). Com aproximadamente 125 espécies neotropicais (ROQUE & CARVALHO, 2011), o gênero *Calea* L. é um dos maiores representantes da tribo Heliantheae. Várias espécies desse táxon são utilizadas com fins medicinais em diferentes países da América Latina, entre eles o Brasil, Colômbia, El Salvador, México e Venezuela. No que

se refere ao Brasil, vale destacar duas espécies comumente encontradas no Estado de Santa Catarina e empregadas na medicina popular para o tratamento de processos inflamatórios e afecções estomacais, no entanto, ainda não devidamente exploradas do ponto de vista químico e farmacológico: *Calea uniflora* Less. e *C. pinnatifida* (R. Br.) Less.

Tendo em vista o emprego medicinal popular das referidas espécies no Estado de Santa Catarina e em outros Estados do Brasil, e o pouco conhecimento sobre a quimiotaxonomia e comprovação científica dos seus potenciais terapêuticos; torna-se relevante investigar o perfil fitoquímico dos extratos dessas plantas, podendo, desse modo, contribuir para o conhecimento sistemático dos metabólitos secundários presentes nessas espécies e beneficiar a saúde da população que faz uso de substâncias provindas dessas plantas. Além disso, considerando a biodiversidade da flora brasileira, bem como o histórico e o potencial farmacológico de plantas da família Asteraceae, a exemplo das espécies *Solidago chilensis* Meyen. (ação anti-inflamatória, gastroprotetora e hipoglicêmica) (BARROS et al., 2016; SILVA et al., 2015) e *Artemisia annua* (atividade anti-inflamatória, antimalárica e antitumoral) (BRAZ FILHO, 2010), há uma grande expectativa de se descobrir novas substâncias bioativas em plantas medicinais nativas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 PLANTAS MEDICINAIS

As plantas medicinais representam, muitas vezes, o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. A utilização de espécies vegetais com finalidade profilática, terapêutica, curativa e paliativa é tão antiga quanto à própria existência do homem, e esse conhecimento milenar vem acompanhando a evolução dos povos ao longo dos séculos (ALVES et al., 2014; MACIEL; PINTO; VEIGA JR., 2002). Observando-se a história de diversas culturas antigas, a exemplo das civilizações chinesa, mesopotâmica, egípcia, entre outras, quanto ao uso de plantas medicinais; evidencia-se a engenhosidade do homem na utilização de plantas para o tratamento de uma ampla variedade de enfermidades e a importância dos conhecimentos que levaram à construção da base da medicina popular.

A primeira citação escrita sobre o uso de plantas como remédio pode ser encontrada na obra Pen Ts'ao ("A Grande Fitoterapia") do autor chinês Shen Nung, que data de cerca de 2.800 anos antes de Cristo (a.C.). No Egito, a partir de 2.000 a.C., os antigos papiros ratificavam que um grande número de médicos utilizava as plantas como remédio e considerava a doença como consequência de causas naturais, e não como resultado dos poderes de espíritos maléficos. Outros relatos também demonstravam que, desde 2.300 a.C., os assírios, hebreus e egípcios cultivavam várias ervas e traziam consigo inúmeras outras de suas expedições, criando diferentes classes de medicamentos com essas plantas (TOMAZZONI; NEGRELLE; CENTA, 2006).

Segundo Tomazzoni, Negrelle e Centa (2006), os registros da utilização de plantas medicinais no ocidente são mais recentes quando comparados ao oriente, datando do século V a.C. No início da era cristã, o grego Pedânio Dioscórides catalogou e ilustrou aproximadamente 600 plantas medicinais em sua obra denominada "De Matéria Médica", descrevendo o emprego terapêutico dessas espécies. Vale destacar que muitos dos nomes apresentados por esse médico grego ainda hoje são utilizados na botânica, sendo esta obra considerada a principal referência ocidental para a área de plantas medicinais até o Renascimento.

Os metabólitos secundários produzidos pelo reino vegetal constituem uma grande parcela da diversidade química conhecida e registrada na literatura. A complexidade e a variedade estrutural das micromoléculas (metabólitos secundários) sintetizadas pelas plantas e organismos marinhos ainda são inatingíveis por métodos experimentais, o que, provavelmente, é uma consequência direta de um mecanismo

evolutivo que levou um período de milhões de anos para acontecer; atingindo um refinamento elevado de formas de proteção e resistência às variações climáticas, ação antrópica, poluição e predadores (MONTANARI & BOLZANI, 2001; VIEGAS JR.; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Em 2016, Newman e Cragg demonstraram a importância dos produtos naturais como fonte para o desenvolvimento de novos fármacos nos últimos 34 anos. Esses autores contabilizaram um total de 1.562 novos medicamentos aprovados no período de Janeiro de 1981 a Dezembro de 2014. Desse número, 27% correspondiam a substâncias de origem totalmente sintética e, aproximadamente, 60% a substâncias de procedência natural ou derivadas desta. Neste percentual estão inclusos os compostos de origem vegetal, evidenciando a importância dos produtos naturais na descoberta de novas entidades químicas para o desenvolvimento de fármacos com finalidades terapêuticas (Tabela 1).

Tabela 1 – Total de novos medicamentos aprovados no período de 1981-2014 e sua fonte de origem (Fonte: Newman & Cragg, 2016).

Fonte de origem	Nº de novos fármacos aprovados	% de novos fármacos aprovados
Biológica (B)	250	16%
Vacina (V)	101	6%
Produto natural (N)	67	4%
Produto natural “botânico” (NB)	9	1%
Derivado de produto natural e geralmente modificado por semissíntese (ND)	320	21%
Totalmente sintético (S)	420	27%
Totalmente sintético com farmacóforo baseado em um produto natural (S*)	61	4%
Composto sintético com farmacóforo natural e que mimetiza substratos naturais (S*/NM)	162	10%
Composto obtido totalmente por síntese e que mimetiza substratos naturais (S/NM)	172	11%
Total	1.562	100%

O Brasil concentra uma grande proporção da biodiversidade do planeta, sendo considerado um dos 17 países megadiversos do mundo. Com exuberante diversidade biológica tanto em número de espécies quanto na variedade e complexidade de seus biomas, o ecossistema brasileiro detém cerca de 30% das florestas tropicais do globo e possui o maior número de espécies conhecidas da Terra (PIMENTEL et al., 2015; VALLI et al., 2013). Em números absolutos, aproximadamente 200.000 espécies já foram descritas, no entanto, estima-se que essa diversidade seja constituída por um número 6 a 10 vezes maior (MMA, 1998).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as plantas medicinais são definidas como sendo “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semissintéticos”. Já fitoterapia caracteriza-se pela “utilização de plantas medicinais em suas diferentes preparações farmacêuticas, sem a utilização de substâncias ativas isoladas, mesmo que estas sejam de origem vegetal” (BULLETIN OF THE WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998).

A fitoterapia foi reconhecida e tem sido incentivada pela OMS como recurso terapêutico para o tratamento de doenças desde 1978. Em 2014, essa organização atualizou o plano de estratégias sobre medicina tradicional 2014-2023, visando auxiliar as autoridades sanitárias a encontrar soluções que propiciem uma visão mais ampla a respeito da melhora da saúde e autonomia dos pacientes. Esse plano de estratégias possui duas metas principais: 1) Oferecer apoio aos Programas de Assistência a Saúde dos seus países membros para que aproveitem de forma racional a possível contribuição da medicina tradicional a saúde, bem-estar e a atenção centrada nas pessoas; 2) Promover a utilização segura e eficaz da medicina tradicional mediante a regulamentação de produtos, práticas e profissionais (OMS, 2014).

No Brasil, a política para a utilização de plantas como medicinais no serviço público de saúde foi estabelecida por meio de duas ações: a Portaria nº 971 de 03 de maio de 2006, a qual aprovou a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2006a); e o Decreto nº 5.813 de 22 de Junho de 2006, o qual sancionou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) no país (BRASIL, 2006b). Essas duas políticas objetivaram ampliar o acesso a opções de tratamento com produtos seguros, eficazes e de qualidade, de forma integrativa e complementar e não em substituição ao modelo convencional; e garantir

à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de fitoterápicos e plantas medicinais, promovendo o uso sustentável da biodiversidade e o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional, respectivamente.

Em 2014, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) atualizou a norma para o registro dos Medicamentos Fitoterápicos (MF) e aprovou a criação de uma nova categoria para a comercialização de fitoterápicos, a qual foi denominada de “Produto Tradicional Fitoterápico” (PTF) (RDC 26/2014). De acordo com essa resolução, serão enquadrados como MF aqueles que passarem por testes clínicos e não clínicos padronizados para avaliação da segurança e eficácia e, como PTF, aqueles registrados com base em literatura técnico-científica que demonstrarem uso seguro em seres humanos por, no mínimo, 30 anos. Os PTF não necessitam se submeter às análises dos MF, sendo imprescindível somente provas de caráter tradicional no que pese a segurança e eficácia desses produtos. O Quadro 1 traz as principais diferenças entre os MF e os PTF (ANVISA, 2014).

Quadro 1 – Principais diferenças entre os MF e os PTF.

Diferenças	Medicamento Fitoterápico (MF)	Produto Tradicional Fitoterápico (PTF)
Comprovação de segurança e eficácia/efetividade	Obtida por estudos clínicos	Obtida por demonstração de tempo de uso
Boas Práticas de Fabricação	Segue a RDC nº 17/2010	Segue a RDC nº 13/2013
Informações do fitoterápico para o consumidor final	Disponibilizadas na bula	Disponibilizadas no folheto informativo
Formas de obter a autorização de comercialização junto à ANVISA	Registro ou Registro Simplificado	Registro, Registro Simplificado ou Notificação

2.2 A FAMÍLIA ASTERACEAE

A família Asteraceae foi descrita inicialmente pelo filósofo grego Teofrasto 300 anos a.C. Em 1792, essa família foi primeiramente denominada por Dietrich Giseke pelo nome Compositae, porém, em 1822, por permissão do Código Internacional de Nomenclatura Botânica (CINB), a mesma passou a ser designada pelo nome de Asteraceae (KATINAS; GUTIÉRREZ; CRISCI, 2007).

Essa família possui distribuição cosmopolita, sendo considerada a maior família de plantas dentro das angiospermas eudicotiledôneas, com aproximadamente 25.000 espécies distribuídas em 1.100 gêneros (ALVARENGA et al., 2001; EMERENCIANO et al., 2007). No Brasil, especialmente na flora do cerrado, esse grupo de plantas é bastante representativo, estimando-se cerca de 250 gêneros e 2.000 espécies (EMERENCIANO et al., 2007; SOUZA & LORENZI, 2008).

Devido ao grande número de espécies e à diversidade morfológica e filogenética de Asteraceae, vários botânicos têm estabelecido sua própria classificação taxonômica para essa família (BAYER & STARR, 1998; FUNK et al., 2005; WAGENITZ, 1976; JANSEN et al., 1990), dificultando a delimitação das subfamílias, tribos e subtribos. Nos últimos anos, diversos estudos moleculares têm resultado em profundas revisões sistemáticas nessa família. De acordo com Bremer (1994), classificação mais amplamente adotada pelos pesquisadores, essa família compreende 17 tribos distribuídas em três subfamílias: Asteroideae (10 tribos), Cichorioideae (6 tribos) e Barnadesioideae (1 tribo) (Quadro 2). Entretanto, uma proposta mais recente de classificação reconhece 12 subfamílias e 28 tribos, um número muito superior aos comumente aceitos (PANERO & FUNK, 2008).

As plantas de Asteraceae são características por apresentar uma enorme diversidade de metabólitos secundários, tais como poliacetilenos (CHRISTENSEN & LAM, 1991; POLLO et al., 2013; POLYANSKAYA; KOROLYUK; TKACHEV, 2007), terpenoides (KHAN et al., 2010; MALDONADO et al., 2014a,b), cumarinas (MIYAZAKI et al., 2013; OLENNIKOV & KASHCHENKO, 2014), benzofuranos (ROMANO et al., 2008; TOYODA; YAOITA; KIKUCHI, 2006), alcaloides (BOSI et al., 2013; TIDJANI et al., 2013), flavonoides (AL-MUSAYEIB et al., 2014; BENYAHIA; BENAYACHE; BENAYACHE, 2014) e lactonas sesquiterpênicas (KASIM; UKPO; ODUKOYA, 2013; MERCADO et al., 2014; SALAPOVIC; GEIER; REZNICEK, 2013), sendo que estas duas últimas classes são reportadas na literatura como importantes marcadores quimiotaxonômicos dessa família (EMERENCIANO et al., 2007; SCOTTI et al., 2012; SEAMAN, 1982; VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005).

Quadro 2 – Classificação das subfamílias e tribos de Asteraceae segundo Bremer (1994).

Subfamília	Código	Tribo
Asteroideae	AST	Inuleae
		Plucheeae
		Gnaphalieae
		Calenduleae
		Astereae
		Anthemideae
		Senecioneae
		Helenieae
		Heliantheae
		Eupatorieae
Cichorioideae	CIC	Multisieae
		Cardueae
		Lactuceae
		Vernonieae
		Liabeae
		Arctoteae
Barnadesioideae	BAR	Barnadesieae

Código das subfamílias: AST= Asteroideae; CIC= Cichorioideae e BAR= Barnadesioideae.

Muitas espécies de Asteraceae têm sido o enfoque principal das pesquisas no âmbito da química e farmacologia de produtos naturais. Além de estabelecer o seu perfil fitoquímico, esses estudos objetivam a avaliação de suas atividades medicinais frente a diferentes alvos biológicos. Ao mesmo tempo, alguns desses estudos também têm propiciado a descoberta e o desenvolvimento de novos fármacos (DA COSTA et al., 2007), a exemplo da artemisinina, um potente agente antimalárico natural isolado da espécie *Artemisia annua* (BRAZ FILHO, 2010).

Segundo Monks e colaboradores (2002) são registradas mais de 1.000 espécies de Asteraceae em banco de dados etnomedicinais. Entre as inúmeras plantas dessa família empregadas na medicina popular, podemos citar as espécies do gênero *Lynchnophora*, conhecidas popularmente como “arnica”, as quais são amplamente usadas no tratamento da dor, reumatismo, picada de insetos e como anti-inflamatório (FERRARI et al., 2012; SAÚDE et al., 1998). Outro gênero importante na medicina caseira, sobretudo no Brasil, é o *Baccharis*, cujas espécies são conhecidas popularmente como “carqueja”. Várias espécies desse gênero são usadas com indicações populares para o tratamento de anemias, diabetes, hipertensão arterial, gastroenterites e hepatites (CAMPOS et al., 2016; MORAIS & CASTANHA, 2011; VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005).

2.3 TRIBO HELIANTHEAE CASS.

Também conhecida como a tribo do girassol, Heliantheae é a tribo mais numerosa e representativa na família Asteraceae, englobando aproximadamente 190 gêneros e 2.500 espécies. No Brasil, essa tribo também é a de maior representatividade, apresentando cerca de 60 gêneros e 75 espécies (JÚLIO & OLIVEIRA, 2009). Segundo Karis & Ryding (1994), os maiores gêneros da tribo Heliantheae são *Verbesina*, com aproximadamente 300 espécies, *Bidens* com 240, *Viguiera* com 180, *Wedelia* com 130 e *Calea* com 110.

Esse grupo monofilético possui distribuição cosmopolita, ocorrendo principalmente em regiões tropicais e subtropicais, com centro de diversificação nas Américas (CRONQUIST, 1981; MARTINS et al, 2006). Além disso, as espécies de Heliantheae possuem uma grande importância medicinal, econômica e ornamental; destacando-se as espécies dos gêneros *Bidens* e *Vernonia* como medicinais, e *Dahlia* e *Cosmos* como ornamentais (BARRETO et al., 2011; BORGES et al., 2013; BREMER, 1994; NEGRELLE & FORNAZZARI, 2007).

A maioria das espécies de Heliantheae consiste em ervas ou arbustos, embora existam alguns gêneros com plantas arbóreas. Suas folhas normalmente são trinervadas e arrançadas em pares opostos; os tricomas foliares são, em geral, multisseptados e com uma base multicelular; os capítulos podem ser discoides ou radiados; as anteras são curtamente calcaradas, enegrecidas ou de cor clara; ocorre

geralmente a presença de páleas no receptáculo; e os pigmentos florais, na maioria das vezes, são amarelos (KARIS & RYDING, 1994).

A tribo Heliantheae tem sido elemento de especulação durante muitos anos, devido, sobretudo, à sua ampla diversidade morfológica e química. Vários metabólitos secundários já foram isolados de espécies pertencentes a essa tribo, tais como lactonas sesquiterpênicas (CARTAGENA; MONTANARO; BARDON, 2008; KRETSCHMER et al., 2011), poliacetilenos (LI et al., 2008; PRIESTAP; BENNETT; QUIRKE, 2008), flavonoides (CHANG et al., 2007; LI et al., 2008; SCHILLING; PANERO; STORBECK, 1987), derivados do tiofeno (ABOUZID & ORIHARA, 2007), alquilamidas (CASADO et al., 2009), entre outros. Vale destacar que os poliacetilenos, as lactonas sesquiterpênicas e os flavonoides são descritos como importantes marcadores quimiotaxonômicos dessa tribo (CHRISTENSEN & LAM, 1991; EMERENCIANO et al., 2006; FERREIRA et al., 2005).

2.4 CONSIDERAÇÕES SOBRE O GÊNERO *Calea* L.

O gênero *Calea* L. pertence à família Asteraceae, tribo Heliantheae. Em trabalhos mais antigos, não havia um consenso acerca de qual subtribo incluía esse táxon, sendo o mesmo enquadrado nas subtribos Galinsoginae (OBER; QUIJANO; FISCHER, 1984; OBER; URBATSCH; FISCHER, 1985a) e Neurolaeninae (CASTRO; TAMAYO-CASTILLO; JAKUPOVIC, 1989; SCHMEDA-HIRSCHMA et al., 1986). Entretanto, atualmente, a classificação mais utilizada para esse gênero é aquela que o insere na subtribo Melampodiinae (PRUSKI & URBATSCH, 1988; PUEBLA et al., 2011).

Calea inclui aproximadamente 125 espécies que ocorrem em regiões tropicais e subtropicais do Novo Mundo, sendo que o maior número de espécies é registrado no Brasil (ROQUE & CARVALHO, 2011). No ano de 2010, Mondin e Bringel realizaram uma listagem das espécies de *Calea* existentes no Brasil, reconhecendo para esse gênero 53 espécies amplamente distribuídas na flora brasileira, principalmente, nos estados de Goiás (Distrito Federal), Bahia, Mato Grosso, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. A Figura 1 apresenta um mapa da distribuição geográfica do gênero *Calea* no mundo.

Figura 1 – Distribuição geográfica do gênero *Calea* no mundo.



Fonte: www.gbif.sibbr.gov.br (19/10/2014).

As plantas do gênero *Calea* são frequentemente confundidas com espécies dos gêneros *Aspilia* Thours e *Wedelia* Jacq. No entanto, *Wedelia* possui flores do raio pistiladas e pápus coroniforme; *Aspilia*, por sua vez, apresenta flores do raio neutras, constrição no ápice das cipselas e pápus geralmente aristado; enquanto, em *Calea*, as flores do raio, quando presentes, são pistiladas e o pápus é composto de páleas livres, uma característica diagnóstica para esse gênero (ROQUE & CARVALHO, 2011).

Várias espécies de *Calea* são tradicionalmente conhecidas e empregadas no âmbito da medicina popular em diferentes países da América Central e Latina. Informações etnofarmacológicas registram o uso popular de espécies desse táxon para o tratamento de problemas digestivos e afecções do estômago (FARAGO et al., 2006; VENDRUSCOLO; SIMÕES; MENTZ, 2005). A espécie *C. zacatechichi* é utilizada popularmente no México como colagoga, catártica, antidiarreica, psicotrópica (MAYAGOITIA; DIAZ; CONTRERAS, 1986) e no tratamento de várias desordens anti-inflamatórias, tais como reumatismo, edema e problemas respiratórios (VENEGAS-FLORES; SEGURA-COBOS; VAZQUEZ-CRUZ, 2002). *C. urticifolia* é empregada pela população salvadorenha no tratamento de úlceras pépticas e outros processos inflamatórios (CASTILLO et al., 1981), e *C. glomerata* é utilizada na medicina popular colombiana para o tratamento da hipertensão arterial (GUERRERO et al., 2002). Além dessas indicações, também são descritas para esse gênero ação antimicrobiana (CASTILLO et al., 1981), tripanocida e amebicida (FERREIRA et al., 1980a,b).

Em 1930, teve início o estudo do gênero *Calea* com a avaliação da atividade amebicida da espécie *C. pinnatifida* (MALHADO FILHO, 1930). Desde então, os extratos de diferentes representantes desse

gênero passaram a ter suas atividades farmacológicas e seu perfil fitoquímico pesquisados.

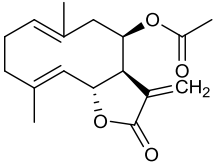
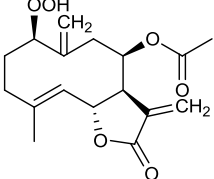
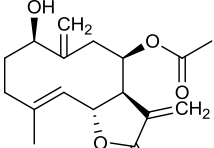
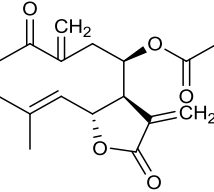
Apesar do número relativamente grande de representantes, poucas espécies desse gênero têm sido estudadas do ponto de vista farmacológico, destacando-se as espécies *C. urticifolia* (MATSUURA et al.; 2005; NAKAGAWA et al.; 2005; OHGUCHI et al., 2009; UMEMURA et al., 2008; USAMI; SAKAIDA; ADACHI, 2011) e *C. zacatechichi* (BORK et al., 1997; IINUMA et al., 2003; KOHLER et al., 2002; MAYAGOITIA; DIAZ; CONTRERAS, 1986; VENEGAS-FLORES; SEGURA-COBOS; VAZQUEZ-CRUZ, 2002; WU et al., 2011a). No Quadro 3 estão sumarizados os estudos de atividades biológicas já realizados com espécies de *Calea*. Na literatura há relatos de trabalhos com extratos brutos, óleos essenciais e compostos isolados, principalmente, lactonas sesquiterpênicas.

Vários estudos fitoquímicos têm sido conduzidos com diferentes espécies de *Calea*, demonstrando a presença de variadas classes de metabólitos secundários nesse táxon, tais como: derivados *p*-hidroxi-acetofenonas (CASTRO; TAMAYO-CASTILLO; JAKUPOVIC, 1989; DO NASCIMENTO & DE OLIVEIRA, 2014); cromenos, como o eupatoriocromeno e o precoceno II isolados das folhas de *C. serrata* (STEINBECK et al., 1997); cromanonas das espécies *C. cuneifolia* (LOURENÇO; GOKITHI; CAMILO, 1981) e *C. clauseniana* (DO NASCIMENTO & DE OLIVEIRA, 2014); flavonoides livres e heterosídeos, como a acacetina (OBER; FISCHER; PARODI, 1986; OBER & FISHER, 1987) e a quercetina-3-*O*-rutinosídeo (PUEBLA et al., 2011); e derivados do timol, tais como o 3-isobutiriloxi-timol isolado das raízes de *C. urticifolia* (BOHLMAN & JAKUPONIC, 1979). No entanto, as lactonas sesquiterpênicas são encontradas como componentes majoritários (OBER; FRONCZEK; FISCHER, 1985a, 1985b; OBER; URBATSCH; FISCHER 1985a; SCHMEDA-HIRSCHMAN et al., 1985; VICHNEWSKI; GOULART; HERZ, 1982), podendo ser usadas como marcadores quimiosistemáticos para esse gênero. No Quadro 4 estão representadas as estruturas químicas de diversos metabólitos secundários identificados em espécies de *Calea*, bem como o órgão vegetal e a espécie da qual foram isolados.

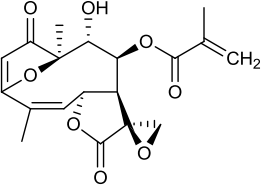
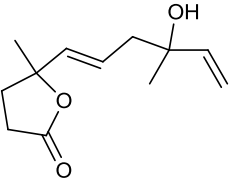
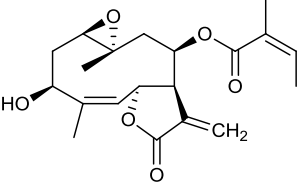
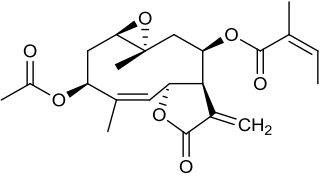
Quadro 1 – Atividades biológicas descritas para os extratos, óleos essenciais e compostos isolados de *Calea*.

Atividade biológica	Espécie	Extrato/Óleo/Composto	Referência
Antifúngica	<i>C. clematidea</i>	Óleo essencial	FLACH et al. (2002)
Citotóxica	<i>C. fruticosa</i>	Extrato	CARVALHO et al. (2013)
Antimicrobiana		Extrato	CARVALHO et al. (2014)
Antihipertensiva	<i>C. glomerata</i>	Extrato	GUERRERO et al. (2002)
Larvicida	<i>C. lantanooides</i>	Extrato	VICHNEWSKI; GOULART; HERZ (1982)
Leishmanicida e antimalárica	<i>C. montana</i>	Extrato	CÉLINE et al. (2009)
Antimicrobiana	<i>C. platylepis</i>	Extrato/benzofurano/sesquiterpeno/flavonoide	DO NASCIMENTO et al. (2004a)
Antifúngica		Óleo/monoterpeno	FLACH et al. (2002)
Anti-inflamatória	<i>C. prunifolia</i>	Acetofenona	GÓMEZ & GIL (2011)
Vasodilatadora		Flavonoide/ácido fenólico/diterpeno	PUEBLA et al. (2011)
Acaricida	<i>C. serrata</i>	Extrato	RIBEIRO et al. (2008)
		Óleo essencial/cromeno	RIBEIRO et al. (2011)
		Extrato	RIBEIRO et al. (2012)
Antitumoral	<i>C. urticifolia</i>		OHGUCHI et al. (2009)
Antioxidante			UMEMURA et al. (2008)
Antiadipogênica		Lactona sesquiterpênica	MATSUURA et al. (2005)
Citotóxica			NAKAGAWA et al. (2005)
Citotóxica			YAMADA et al. (2004)
Leishmanicida	<i>C. zacatechichi</i>	Lactona sesquiterpênica	WU et al. (2011a)
Anti-inflamatória		Extrato	VENEGAS-FLORES; SEGURA-COBOS; VAZQUEZ-CRUZ (2002)
Psicotrópica		Extrato	MAYAGOITIA; DIAZ; CONTRERAS (1986)
Antiplasmodial		Extrato/flavonoide	KOHLER et al. (2002)
Antidiarreica e antinociceptiva		Extrato	SALAGA et al. (2015; 2016)

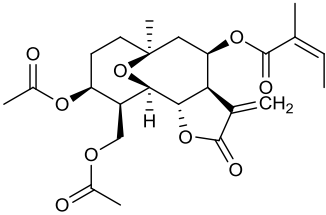
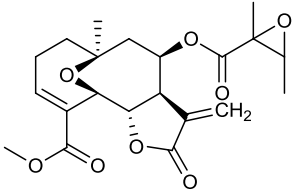
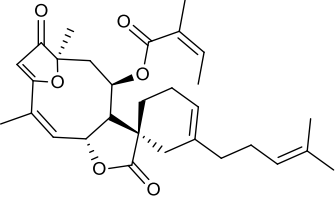
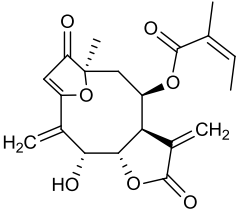
Quadro 2 – Metabólitos secundários isolados do gênero *Calea*.

Lactonas sesquiterpênicas	Espécie	Órgão vegetal	Referência
 <p>8β-Acetoxy-eupatolídeo [1]</p>	<i>C. clematidea</i>	Partes aéreas	SCHMEDA-HIRSCHMAN et al. (1985)
 <p>8β-Acetoxy-1β-peroxycostunolídeo [2]</p>			
 <p>8β-Acetoxy-1β-hidroxicostunolídeo [3]</p>			
 <p>8β-Acetoxy-anhidroverlotrina [4]</p>			

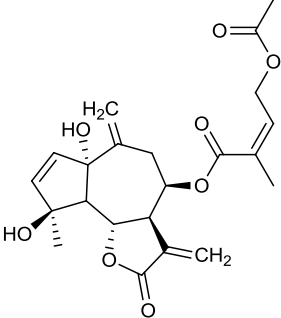
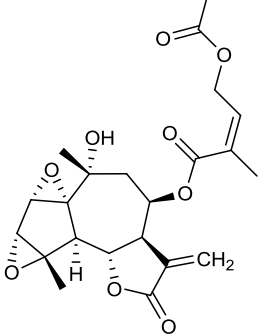
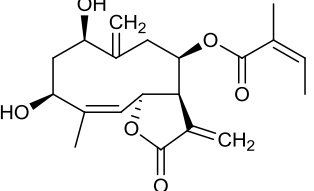
Quadro 4 (continuação) – Metabólitos secundários isolados do gênero *Calea*.

Lactonas sesquiterpênicas	Espécie	Órgão vegetal	Referência
 <p>9α-Hidroxi-11,13-diidro-11,13-epoxi-atrupliciolídeo-8β-metacrilato [5]</p>  <p>Crocinervolídeo [6]</p>	<p><i>C. crocinervosa</i></p>	<p>Partes aéreas</p>	<p>ORTEGA; LOPEZ; MALDONADO (1989)</p>
 <p>Leptocarpina [7]</p>  <p>3β-Acetoxi-leptocarpina [8]</p>	<p><i>C. divaricata</i></p>	<p>-</p>	<p>OBER; FRONCZEK; FISCHER (1985b)</p>

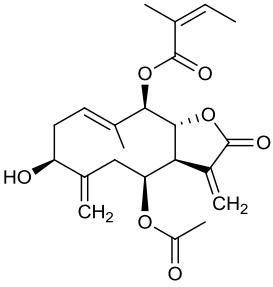
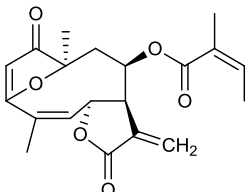
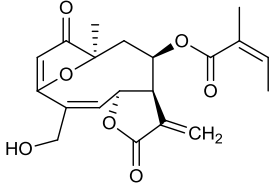
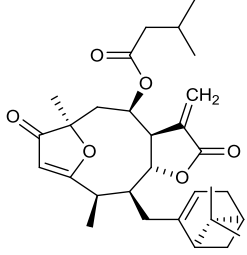
Quadro 4 (continuação) – Metabólitos secundários isolados do gênero *Calea*.

Lactonas sesquiterpênicas	Espécie	Órgão vegetal	Referência
 <p>3-Acetil-4-acetoxy-8-angeloiloxi-chapliatrina [9]</p>  <p>Calecharloide-8-O-[2',3'-epoxi-2'-metilbutirato] [10]</p>	<i>C. harleyi</i>	Partes aéreas	BOHLMANN et al. (1984)
 <p>Caleamircenolídeo [11]</p>  <p>8β-Angeloiloxi-isoatripliocídeo [12]</p>	<i>C. hymenolepis</i>	-	BOHLMANN et al. (1982c)

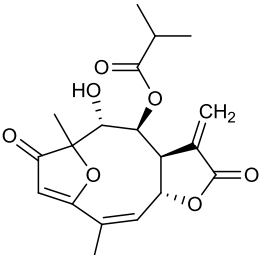
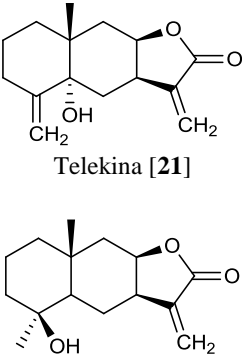
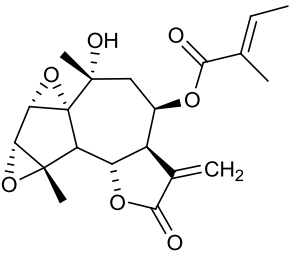
Quadro 4 (continuação) – Metabólitos secundários isolados do gênero *Calea*.

Lactonas sesquiterpênicas	Espécie	Órgão vegetal	Referência
 <p>Jamaicolídeo A [13]</p>			
 <p>Jamaicolídeo B [14]</p>	<i>C. jamaicensis</i>	-	OBER; FISCHER; PARODI (1986)
 <p>Jamaicolídeo C [15]</p>			

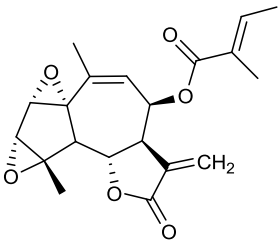
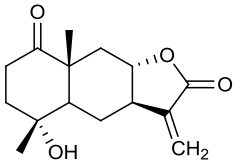
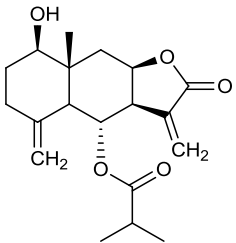
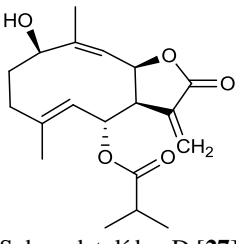
Quadro 4 (continuação) – Metabólitos secundários isolados do gênero *Calea*.

Lactonas sesquiterpênicas	Espécie	Órgão vegetal	Referência
 <p>Jamaicolídeo D [16]</p>	<p><i>C.</i> <i>jamaicensis</i></p>	<p>-</p>	<p>OBER; FISCHER; PARODI (1986)</p>
 <p>15-Desoxi-budleína A [17]</p>  <p>Budleína A [18]</p>	<p><i>C.</i> <i>lantanoides</i> <i>C. villosa</i></p>	<p>Partes aéreas -</p>	<p>VICHNEWSKI; GOULART; HERZ (1982) BOHLMANN et al. (1982e)</p>
 <p>5β-Mirtenil-4α,5-diidro-atrípliciólídeo-8-O-isovalerato [19]</p>	<p><i>C.</i> <i>rupicola</i></p>	<p>Partes aéreas</p>	<p>SCHMEDA-HIRSCHMANN et al. (1986)</p>

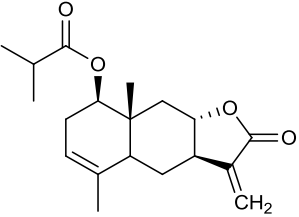
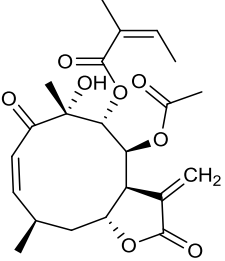
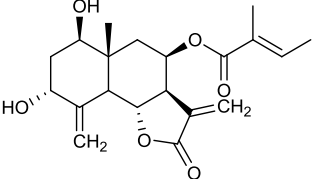
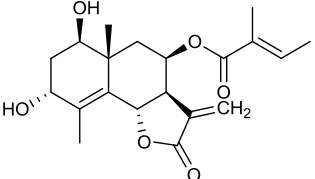
Quadro 4 (continuação) – Metabólitos secundários isolados do gênero *Calea*.

Lactonas sesquiterpênicas	Espécie	Órgão vegetal	Referência
 <p>9α-Hidroxi-atripliciolídeo-8-O-isobutirato [20]</p>	<p><i>C. rupicola</i></p>	<p>Partes aéreas</p>	<p>SCHMEDA- HIRSCHMANN et al. (1986)</p>
 <p>Telekina [21]</p> <p>Septupnolídeo [22]</p>	<p><i>C. septuplinervia</i></p>	<p>-</p>	<p>OBER & FISCHER (1987)</p>
 <p>Solidaginolídeo A [23]</p>	<p><i>C. solidaginea</i></p>	<p>-</p>	<p>OBER; URBATSCHI; FISCHER (1985c)</p>

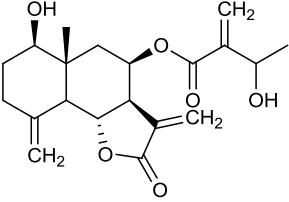
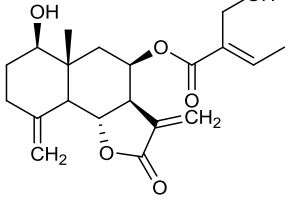
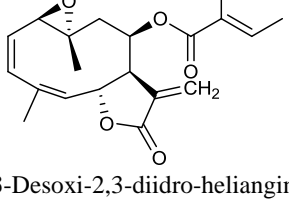
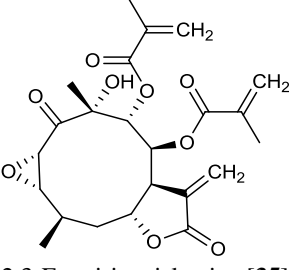
Quadro 4 (continuação) – Metabólitos secundários isolados do gênero *Calea*.

Lactonas sesquiterpênicas	Espécie	Órgão vegetal	Referência
 <p>Solidaginolídeo B [24]</p>	<p><i>C.</i> <i>solidaginea</i></p>	<p>-</p>	<p>OBER; URBATSCHI; FISCHER (1985c)</p>
 <p>Subcordatolídeo B [25]</p>	<p><i>C.</i> <i>subcordata</i></p>	<p>-</p>	<p>OBER; FRONCZEK; FISCHER (1984a)</p>
 <p>Subcordatolídeo C [26]</p>	<p><i>C.</i> <i>subcordata</i></p>	<p>-</p>	<p>OBER; FRONCZEK; FISCHER (1984b)</p>
 <p>Subcordatolídeo D [27]</p>	<p><i>C.</i> <i>subcordata</i></p>	<p>-</p>	<p>OBER; FRONCZEK; FISCHER (1987)</p>

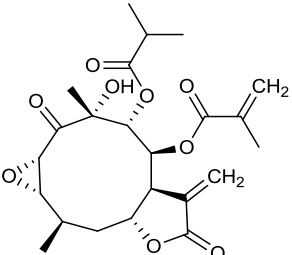
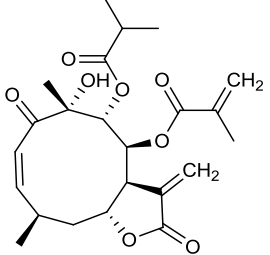
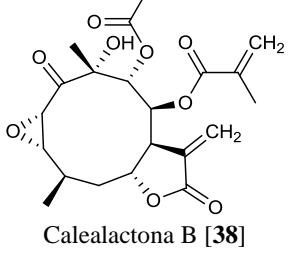
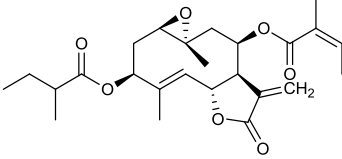
Quadro 4 (continuação) – Metabólitos secundários isolados do gênero *Calea*.

Lactonas sesquiterpênicas	Espécie	Órgão vegetal	Referência
 <p>Subcordatolídeo E [28]</p>	<p><i>C.</i> <i>subcordata</i></p>	<p>-</p>	<p>OBER; FRONCZEK; FISCHER (1987)</p>
 <p>Caleína A [29]</p>	<p><i>C. ternifolia</i> <i>C.</i> <i>zacatechichi</i></p>	<p>Folhas Folhas</p>	<p>LEE et al. (1982) WU et al. (2011a)</p>
 <p>Trichomatolídeo B [30]</p>  <p>Trichomatolídeo C [31]</p>	<p><i>C.</i> <i>trichomata</i></p>	<p>-</p>	<p>OBER; QUIJANO; FISCHER (1984)</p>

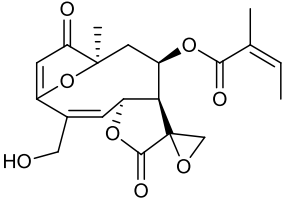
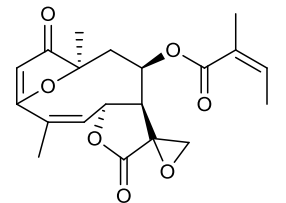
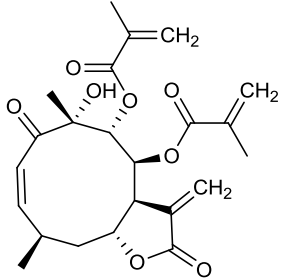
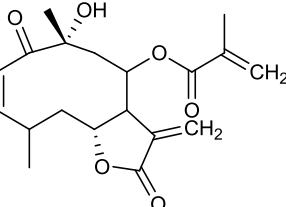
Quadro 4 (continuação) – Metabólitos secundários isolados do gênero *Calea*.

Lactonas sesquiterpênicas	Espécie	Órgão vegetal	Referência
 <p data-bbox="143 459 386 486">Trichomatolídeo D [32]</p>	<p data-bbox="456 625 570 678"><i>C.</i> <i>trichomata</i></p>	<p data-bbox="669 646 677 657">-</p>	<p data-bbox="796 595 913 707">OBER; QUIJANO; FISCHER (1984)</p>
 <p data-bbox="143 746 386 774">Trichomatolídeo E [33]</p>			
 <p data-bbox="109 1002 431 1058">3-Desoxi-2,3-diidro-heliangina [34]</p>			
 <p data-bbox="120 1345 408 1372">2,3-Epoxi-juanislamina [35]</p>	<p data-bbox="460 1193 566 1246"><i>C.</i> <i>urticifolia</i></p>	<p data-bbox="636 1209 706 1236">Folhas</p>	<p data-bbox="764 1150 944 1294">BORGES DEL CASTILLO et al. (1981) OHGUCHI et al. (2009)</p>

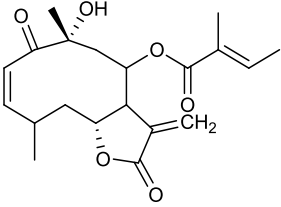
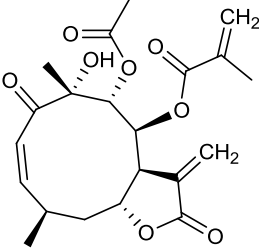
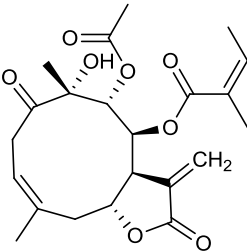
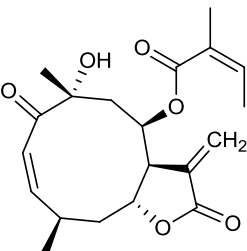
Quadro 4 (continuação) – Metabólitos secundários isolados do gênero *Calea*.

Lactonas sesquiterpênicas	Espécie	Órgão vegetal	Referência
 <p>2,3-Epoxi-calealactona A [36]</p>	<p><i>C. urticifolia</i></p>	<p>Folhas</p>	<p>OHGUCHI et al. (2009)</p>
 <p>Calealactona A [37]</p>			
 <p>Calealactona B [38]</p>			
 <p>8β-Angeloiloxi-3β-(3-metil-butirilóxi)-1β,10α-epoxi-1,10H-costunolídeo [39]</p>	<p><i>C. villosa</i></p>	<p>-</p>	<p>BOHLMANN et al. (1982e)</p>

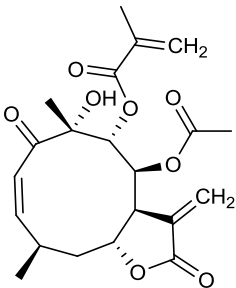
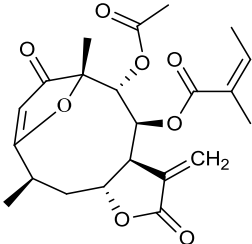
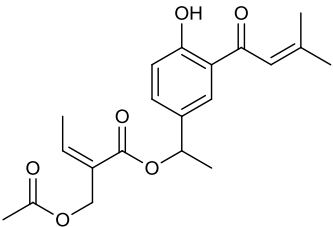
Quadro 4 (continuação) – Metabólitos secundários isolados do gênero *Calea*.

Lactonas sesquiterpênicas	Espécie	Órgão vegetal	Referência
 <p>11,13-Epoxi-11,13H-budleína A [40]</p>  <p>11,13-Epoxi-15-desoxi-budleína A [41]</p>	<i>C. villosa</i>	-	BOHLMANN et al. (1982e)
 <p>Juanislamina [42]</p>	<i>C. zacatechichi</i>	Folhas	BORGES DEL CASTILLO et al. (1981)
 <p>Caleína E [43]</p>	<i>C. zacatechichi</i>	Partes aéreas	MARTINEZ; ESQUIVEL; ORTEGA (1987)

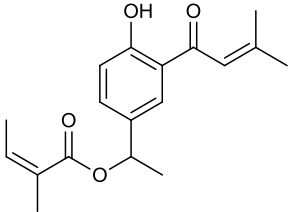
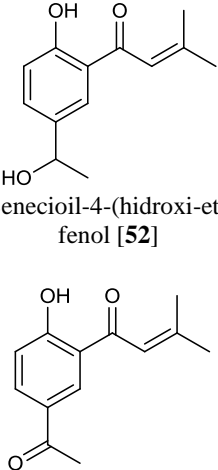
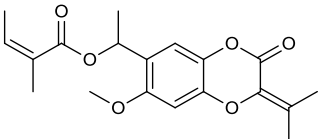
Quadro 4 (continuação) – Metabólitos secundários isolados do gênero *Calea*.

Lactonas sesquiterpênicas	Espécie	Órgão vegetal	Referência	
 <p data-bbox="266 464 412 488">Caleína F [44]</p>	<p data-bbox="524 344 654 395"><i>C.</i> <i>zacatechichi</i></p>	<p data-bbox="680 357 815 381">Partes aéreas</p>	<p data-bbox="860 312 999 424">MARTINEZ; ESQUIVEL; ORTEGA (1987)</p>	
 <p data-bbox="238 767 440 791">Calealactona C [45]</p>	<p data-bbox="524 946 654 997"><i>C.</i> <i>zacatechichi</i></p>	<p data-bbox="714 962 781 986">Folhas</p>	<p data-bbox="882 946 976 997">Wu et al. (2011a)</p>	
 <p data-bbox="232 1086 434 1110">Calealactona D [46]</p>				 <p data-bbox="232 1406 434 1430">Calealactona E [47]</p>

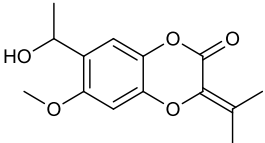
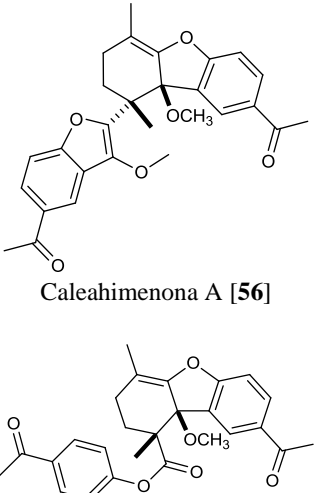
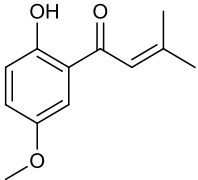
Quadro 4 (continuação) – Metabólitos secundários isolados do gênero *Calea*.

Lactonas sesquiterpênicas	Espécie	Órgão vegetal	Referência
 <p>Caleína D (Arucanolídeo) [48]</p>  <p>8β-Angeloiloxi-9α-acetoxi-caliculatolídeo [49]</p>	<p><i>C. zacatechichi</i></p>	<p>Folhas</p>	<p>Wu et al. (2011a)</p>
Derivados de acetofenonas e <i>p</i> -hidroxi-acetofenonas	Espécie	Órgão vegetal	Referência
 <p>2-Senecioil-4-(1-acetilsarracinoiloxi-etil)-fenol [50]</p>	<p><i>C. clauseniana</i> <i>C. cuneifolia</i></p>	<p>Partes subterrâneas Xilopódio</p>	<p>DO NASCIMENTO & DE OLIVEIRA (2014) LOURENÇO; GOKITHI; CAMILO (1981)</p>

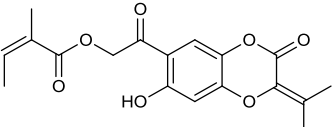
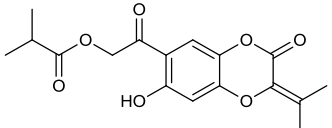
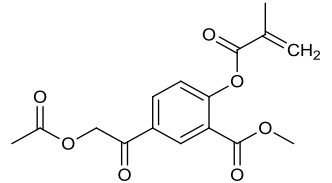
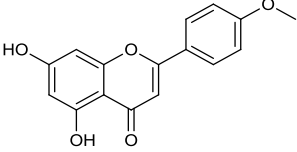
Quadro 4 (continuação) – Metabólitos secundários isolados do gênero *Calea*.

Derivados de acetofenonas e <i>p</i> -hidroxi-acetofenonas	Espécie	Órgão vegetal	Referência
 <p>2-Senecioil-4-(angeloiloxi-etil)-fenol [51]</p>	<p><i>C. clauseniana</i> <i>C. villosa</i></p>	<p>Partes subterrâneas Raízes</p>	<p>DO NASCIMENTO & DE OLIVEIRA (2014) BOHLMANN et al. (1982e)</p>
 <p>2-Senecioil-4-(hidroxi-etil)-fenol [52]</p> <p>2-Senecioil-4-acetil-fenol [53]</p>	<p><i>C. cuneifolia</i></p>	<p>Xilopódio</p>	<p>LOURENÇO; GOKITHI; CAMILO (1981)</p>
 <p>9-<i>O</i>-Angeloiloxi-diidrocalefoliona [54]</p>	<p><i>C. harleyi</i></p>	<p>Partes aéreas</p>	<p>BOHLMANN et al. (1984)</p>

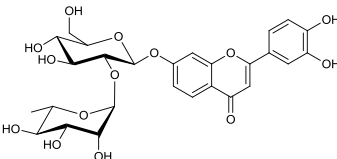
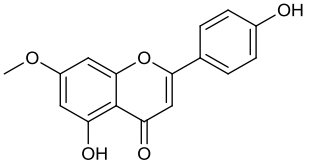
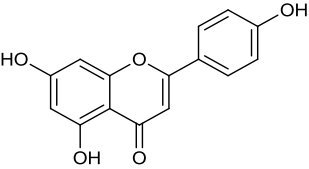
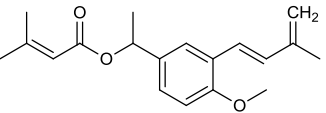
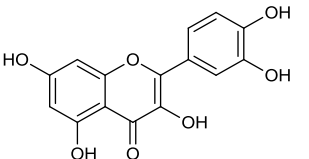
Quadro 4 (continuação) – Metabólitos secundários isolados do gênero *Calea*.

Derivados de acetofenonas e <i>p</i> -hidroxi-acetofenonas	Espécie	Órgão vegetal	Referência
 <p>9-<i>O</i>-Diidrocafeolona [55]</p>	<i>C. harleyi</i>	Partes aéreas	BOHLMANN et al. (1984)
 <p>Caleahimenona A [56]</p> <p>Caleahimenona B [57]</p>	<i>C. hymenolepis</i>	Raízes	BOHLMANN et al. (1982c)
 <p>2-Senecioil-4-<i>O</i>-metil-éter-hidroquinona [58]</p>	<i>C. prunifolia</i>	Partes aéreas	CASTRO; TAMAYO-CASTILLO; JAKUPOVIC (1989)

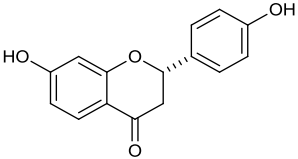
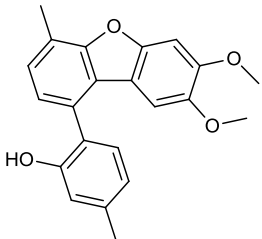
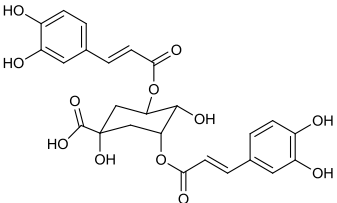
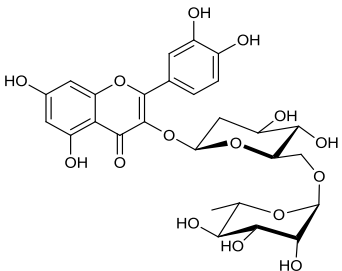
Quadro 4 (continuação) – Metabólitos secundários isolados do gênero *Calea*.

Derivados de acetofenonas e <i>p</i> -hidroxi-acetofenonas	Espécie	Órgão vegetal	Referência
 <p>9-<i>O</i>-Angeloiloxi-calefoliona [59]</p>  <p>9-<i>O</i>-Isobutiriloxi-calefoliona [60]</p>  <p>Caleteucrifolona [61]</p>	<i>C. teucrifolia</i>	Partes aéreas	BOHLMANN et al. (1981c)
Flavonoides e outros compostos fenólicos	Espécie	Órgão vegetal	Referência
 <p>Acacetina [62]</p>	<i>C. berteriana</i> <i>C. divaricata</i> <i>C. jamaicensis</i> <i>C. septuplinervia</i> <i>C. zacatechichi</i> <i>C. zacatechichi</i>	Folhas - - - Partes aéreas Partes aéreas	OBER; URBATSCH; FISCHER (1985b) OBER; FRONCZEK; FISCHER (1985b) OBER; FISHER; PARODI (1986) MARTINEZ; NAVEDA-DIAZ; JOSEPH-NATHAN (1988) OBER & FISHER (1987) HERZ & KUMAR (1980)

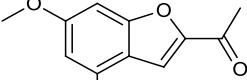
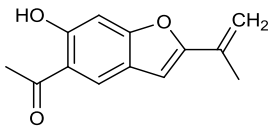
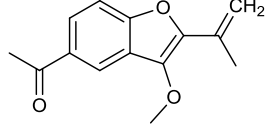
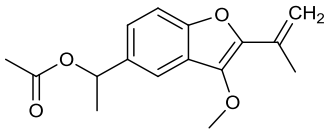
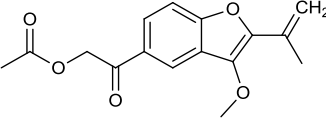
Quadro 4 (continuação) – Metabólitos secundários isolados do gênero *Calea*.

Flavonoides e outros compostos fenólicos	Espécie	Órgão vegetal	Referência
 <p>7-O-(α-L-ramnopiranosil-(1→2)-β-D-glicopiranosil)-3',4',7-trihidroxi-flavona [63]</p>	<p><i>C. clauseniana</i></p>	<p>Partes aéreas</p>	<p>DO NASCIMENTO; DE OLIVEIRA; CAMILO (2007)</p>
 <p>Genkwanina [64]</p>	<p><i>C. crocinervosa</i> <i>C. platylepis</i></p>	<p>Partes aéreas Folhas</p>	<p>ORTEGA; LOPEZ; MALDONADO (1989) DO NASCIMENTO; SILVA; DE OLIVEIRA (2002)</p>
 <p>Apigenina [65]</p>	<p><i>C. divaricata</i></p>	<p>-</p>	<p>OBER; FRONCZEK; FISCHER (1985b)</p>
 <p>Senecionil-calelepina [66]</p>	<p><i>C. hymenolepis</i></p>	<p>Partes aéreas</p>	<p>BOHLMANN et al. (1982c)</p>
 <p>Quercetina [67]</p>	<p><i>C. platylepis</i></p>	<p>Flores</p>	<p>DO NASCIMENTO; SILVA; DE OLIVEIRA (2002)</p>

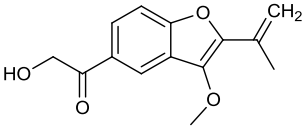
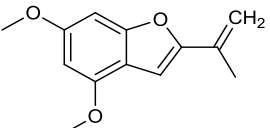
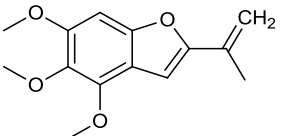
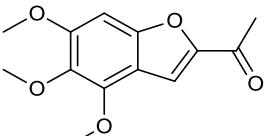
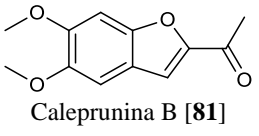
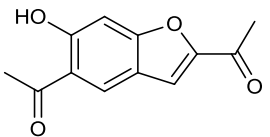
Quadro 4 (continuação) – Metabólitos secundários isolados do gênero *Calea*.

Flavonoides e outros compostos fenólicos	Espécie	Órgão vegetal	Referência
 <p>Liquiritigenina [68]</p>	<i>C. platylepis</i>	Flores	DO NASCIMENTO; SILVA; DE OLIVEIRA (2002)
 <p>Caleprunifolina [69]</p>	<i>C. prunifolia</i>	Partes aéreas	CASTRO; TAMAYO-CASTILLO; JAKUPOVIC (1989)
 <p>Ácido 3,5-di-<i>O-E</i>-cafeoilquínico [70]</p>  <p>Quercetina-3-<i>O</i>-rutinosídeo (rutina) [71]</p>	<i>C. prunifolia</i>	Folhas	PUEBLA et al. (2011)

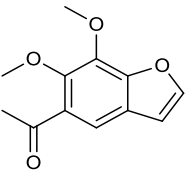
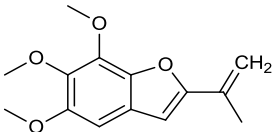
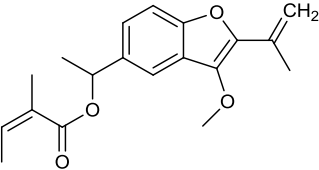
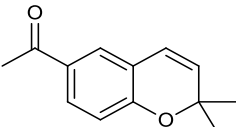
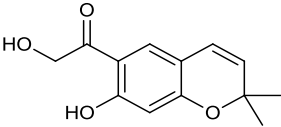
Quadro 4 (continuação) – Metabólitos secundários isolados do gênero *Calea*.

Benzofuranos	Espécie	Órgão vegetal	Referência
 <p>Calebertina [72]</p>	<p><i>C. berteriana</i> <i>C. peckii</i> <i>C. prunifolia</i></p>	<p>Partes aéreas Partes aéreas -</p>	<p>OBER; FRONCZEK; FISCHER (1985a) CASTRO; TAMAYO- CASTILLO; JAKUPOVIC (1989) OBER; FRONCZEK; FISCHER (1985a)</p>
 <p>Euparina [73]</p>	<p><i>C. harleyi</i> <i>C. platylepis</i></p>	<p>Raízes Partes aéreas</p>	<p>BOHLMANN et al. (1984) DO NASCIMENTO; SILVA; DE OLIVEIRA (2002)</p>
 <p>Caleteucrina [74]</p>  <p>9-Acetoxy-diidrocaleteucrina [75]</p>	<p><i>C.</i> <i>hymenolepis</i></p>	<p>Raízes</p>	<p>BOHLMANN et al. (1982c)</p>
 <p>9-Acetoxy-caleteucrina [76]</p>	<p><i>C.</i> <i>hymenolepis</i> <i>C. teucrifolia</i></p>	<p>Raízes Partes aéreas</p>	<p>BOHLMANN et al. (1982c) BOHLMANN et al. (1981c)</p>

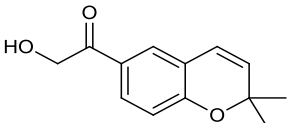
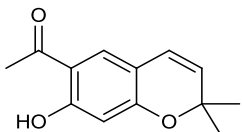
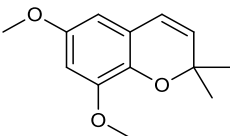
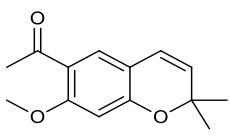
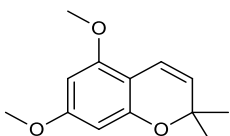
Quadro 4 (continuação) – Metabólitos secundários isolados do gênero *Calea*.

Benzofuranos	Espécie	Órgão vegetal	Referência
 <p>9-Hidroxi-caleteucrina [77]</p>	<p><i>C. hymenolepis</i> <i>C. teucrifolia</i></p>	<p>Raízes Partes aéreas</p>	<p>BOHLMANN et al. (1982c) BOHLMANN et al. (1981c)</p>
 <p>4,6-Dimetoxi-2-(1-metil-etnil)-benzofurano [78]</p>  <p>4,5,6-Dimetoxi-2-(1-metil-etnil)-benzofurano [79]</p>	<p><i>C. peckii</i> <i>C. prunifolia</i></p>	<p>Partes aéreas Partes aéreas</p>	<p>CASTRO; TAMAYO-CASTILLO; JAKUPOVIC (1989)</p>
 <p>Caleprunina A [80]</p>  <p>Caleprunina B [81]</p>	<p><i>C. peckii</i> <i>C. platylepis</i> <i>C. prunifolia</i></p>	<p>Partes aéreas Partes aéreas -</p>	<p>CASTRO; TAMAYO-CASTILLO; JAKUPOVIC (1989) DO NASCIMENTO; SILVA; DE OLIVEIRA (2002) OBER; FRONCZEK; FISCHER (1985a)</p>
 <p>Euparona [82]</p>	<p><i>C. platylepis</i></p>	<p>Partes aéreas</p>	<p>DO NASCIMENTO; SILVA; DE OLIVEIRA (2002)</p>

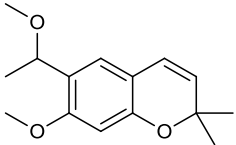
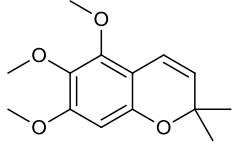
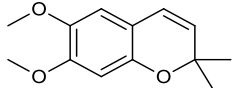
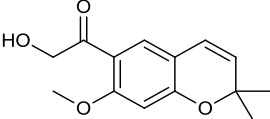
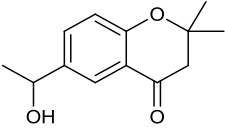
Quadro 4 (continuação) – Metabólitos secundários isolados do gênero *Calea*.

Benzofuranos	Espécie	Órgão vegetal	Referência
 <p>5-Acetil-6,7-dimetoxi-benzofurano [83]</p>  <p>5,6,7-Trimetoxi-2-(1-metiletetil)-benzofurano [84]</p>	<i>C. prunifolia</i>	Partes aéreas	CASTRO; JAKUPOVIC; BOHLMANN (1984)
 <p>8-<i>O</i>-Angeloiloxi-diidrocaleteucrina [85]</p>	<i>C. teucrifolia</i>	Partes aéreas	BOHLMANN et al. (1981c)
Cromenos (benzopiranos)	Espécie	Órgão vegetal	Referência
 <p>6-Acetil-2,2-dimetil-cromeno [86]</p>  <p>6-Hidroxi-acetil-7-hidroxi-2,2-dimetil-cromeno [87]</p>	<i>C. hispida</i>	Raízes	BOHLMANN et al. (1982f)

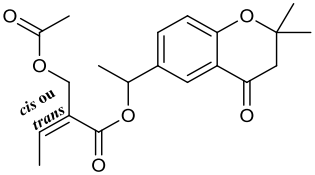
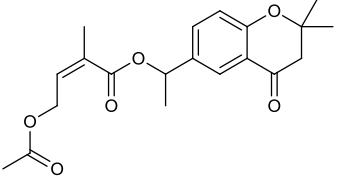
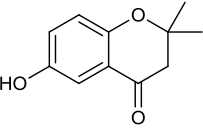
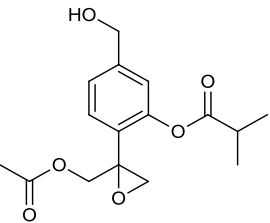
Quadro 4 (continuação) – Metabólitos secundários isolados do gênero *Calea*.

Cromenos (benzopiranos)	Espécie	Órgão vegetal	Referência
 <p>6-Hidroxi-acetil-2,2-dimetil-cromeno [88]</p>	<p><i>C. hispida</i> <i>C. peckii</i></p>	<p>Raízes Partes aéreas</p>	<p>BOHLMANN et al. (1982f) CASTRO; TAMAYO-CASTILLO; JAKUPOVIC (1989)</p>
 <p>Eupatoriocromeno [89]</p>	<p><i>C. hispida</i> <i>C. oxylepis</i> <i>C. peckii</i> <i>C. rotundifolia</i> <i>C. serrata</i></p>	<p>Raízes Raízes Partes aéreas Partes aéreas Partes aéreas</p>	<p>BOHLMANN et al. (1982f) BOHLMANN et al. (1982a) CASTRO; TAMAYO-CASTILLO; JAKUPOVIC (1989) BOHLMANN et al. (1981b) STEINBECK et al. (1997)</p>
 <p>Prunicromeno B [90]</p>	<p><i>C. jamaicensis</i> <i>C. prunifolia</i></p>	<p>- -</p>	<p>OBER; FISCHER; PARODI (1986) OBER; URBATSCH; FISCHER (1985a)</p>
 <p>Metileupatoriocromeno [91]</p>	<p><i>C. oxylepis</i> <i>C. rotundifolia</i> <i>C. teucrifolia</i></p>	<p>Raízes Partes aéreas Raízes</p>	<p>BOHLMANN et al. (1982a) BOHLMANN et al. (1981b) BOHLMANN et al. (1981c)</p>
 <p>5,7-Dimetoxi-2,2-dimetil-cromeno [92]</p>	<p><i>C. peckii</i></p>	<p>Partes aéreas</p>	<p>CASTRO; TAMAYO-CASTILLO; JAKUPOVIC (1989)</p>

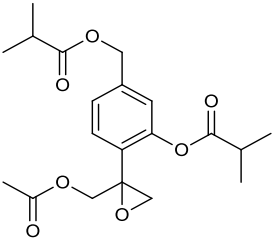
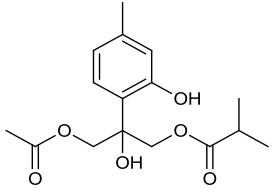
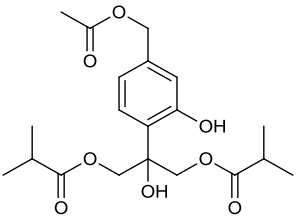
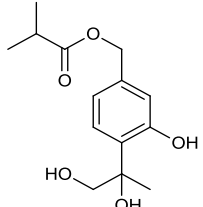
Quadro 4 (continuação) – Metabólitos secundários isolados do gênero *Calea*.

Cromenos (benzopiranos)	Espécie	Órgão vegetal	Referência
 <p>6-(1-Metoxi-etil)-7-metoxi-2,2-dimetil-cromeno [93]</p>  <p>5,6,7-Trimetoxi-2,2-dimetil-cromeno [94]</p>	<i>C. peckii</i>	Partes aéreas	CASTRO; TAMAYO-CASTILLO; JAKUPOVIC (1989)
 <p>Precoceno II [95]</p>	<i>C. peckii</i> <i>C. serrata</i>	Partes aéreas Partes aéreas	CASTRO; TAMAYO-CASTILLO; JAKUPOVIC (1989) STEINBECK et al. (1997)
 <p>6-Hidroxi-acetil-7-metoxi-dimetil-cromeno [96]</p>	<i>C. teucrifolia</i>	Raízes	BOHLMANN et al. (1981c)
Cromanonas	Espécie	Órgão vegetal	Referência
 <p>2,2-Dimetil-6-(1-hidroxi-etil)-cromanona [97]</p>	<i>C. clauseniana</i>	Partes subterrâneas	DO NASCIMENTO & DE OLIVEIRA (2014)

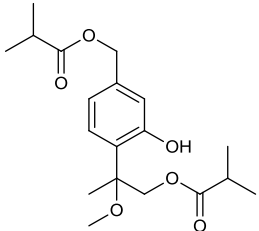
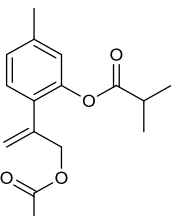
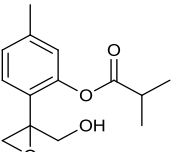
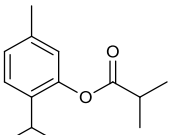
Quadro 4 (continuação) – Metabólitos secundários isolados do gênero *Calea*.

Cromanonas	Espécie	Órgão vegetal	Referência
 <p>Isômero <i>cis</i>: Acetato de uniflorol A [98] Isômero <i>trans</i>: Acetato de uniflorol B [99]</p>  <p>2,2-Dimetil-6-[1-(4-acetoxiangeloiloxi)-etil]-cromanona [100]</p>	<i>C. clauseniana</i>	Partes subterrâneas	DO NASCIMENTO & DE OLIVEIRA (2014)
 <p>2,2-Dimetil-6-hidroxi-4-cromanona [101]</p>	<i>C. cuneifolia</i>	Xilopódio	LOURENÇO; GOKITHI; CAMILO (1981)
Derivados do timol	Espécie	Órgão vegetal	Referência
 <p>3-Isobutiriloxi-7-hidroxi-8,9-epoxi-10-acetoxi-timol [102]</p>	<i>C. nelsonii</i>	Partes aéreas	MARTINEZ; SANCHEZ; JOSEPH-NATHAN (1987)

Quadro 4 (continuação) – Metabólitos secundários isolados do gênero *Calea*.

Derivados do timol	Espécie	Órgão vegetal	Referência
 <p>3,7-Diisobutiriloxi-8,9-epoxi-10-acetoxi-timol [103]</p>	<i>C. nelsonii</i>	Partes aéreas	MARTINEZ; SANCHEZ; JOSEPH-NATHAN (1987)
 <p>3,8-Diidroxi-9-acetoxi-10-isobutiriloxi-timol [104]</p>			
 <p>3,8-Diidroxi-7-Acetoxi-9,10-diisobutiriloxi-timol [105]</p>			
 <p>3,8,10-Trihidroxi-7-isobutiriloxi-timol [106]</p>			

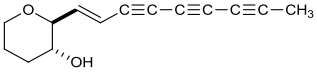
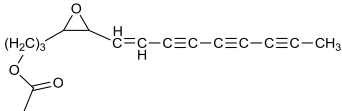
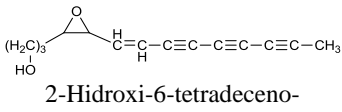
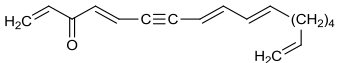
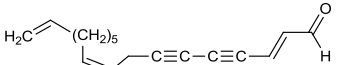
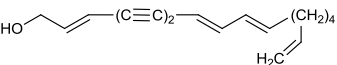
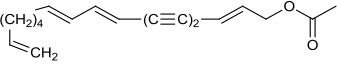
Quadro 4 (continuação) – Metabólitos secundários isolados do gênero *Calea*.

Derivados do timol	Espécie	Órgão vegetal	Referência
 <p data-bbox="176 486 501 542">3-Hidroxi-7,9-diisobutiriloxi-8-metoxi-timol [107]</p>	<p data-bbox="532 539 647 566"><i>C. nelsonii</i></p>	<p data-bbox="680 539 817 566">Partes aéreas</p>	<p data-bbox="843 494 1016 606">MALDONADO; MARQUEZ; ORTEGA (1992)</p>
 <p data-bbox="182 805 496 861">3-Isobutiriloxi-10-acetoxi-8,9-dehidrotimol [108]</p>			
 <p data-bbox="193 1045 490 1101">3-Isobutiriloxi-8,9-epoxi-10-hidroxi-timol [109]</p>	<p data-bbox="557 973 619 1000"><i>C. sp.</i></p>	<p data-bbox="711 973 778 1000">Raízes</p>	<p data-bbox="854 962 1002 1018">BOHLMANN et al. (1981c)</p>
 <p data-bbox="204 1268 476 1292">3-Isobutiriloxi-timol [110]</p>	<p data-bbox="520 1177 658 1233"><i>C. teucrifolia</i> <i>C. urticifolia</i></p>	<p data-bbox="680 1177 815 1233">Partes aéreas Raízes</p>	<p data-bbox="843 1133 1016 1276">BOHLMANN et al. (1981c) BOHLMANN & JAKUPOVIC (1979)</p>

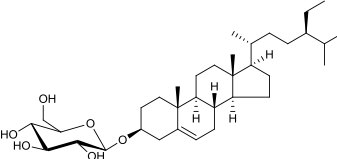
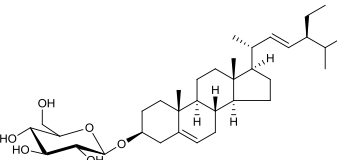
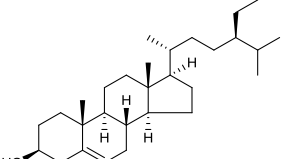
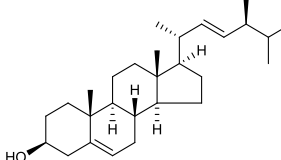
Quadro 4 (continuação) – Metabólitos secundários isolados do gênero *Calea*.

Acetilenos	Espécie	Órgão vegetal	Referência
<p>5'-Hidroxi-metil-5-(3-buteno-1-ynil)-2,2-bitiofeno [111]</p> <p>5'-Acetoxi-metil-5-(3-buteno-1-ynil)-2,2-bitiofeno [112]</p>	<p><i>C. angusta</i> <i>C. pilosa</i></p>	<p>Partes aéreas Partes aéreas</p>	<p>BOHLMANN et al. (1982d) BOHLMANN et al. (1981a)</p>
<p>$H_3C-(C\equiv C)_5-CH=CH_2$ Tridecapenta-3,5,7,9,11-in-1-eno [113]</p> <p>Diidrofalcarinol [114]</p> <p>Diidrofalcarinona [115]</p>	<p><i>C. integrifolia</i></p>	<p>Raízes</p>	<p>BOHLMANN & ZDERO (1976)</p>
<p>$H_2C=C(H)-C\equiv C-C\equiv C-C\equiv C-CH_3$ 1-Noneno-3,5,7-triino [116]</p>	<p><i>C. phyllolepis</i> <i>C. teucrifolia</i></p>	<p>- -</p>	<p>BOHLMANN; BURKHARDT; ZDERO (1973)</p>
<p>5'-Metil-5-(3-buteno-1-ynil)-2,2-bitiofeno [117]</p> <p>5'-Acetoxi-etil-5-(1-propin-1-yl)-2,2-bitiofeno [118]</p>	<p><i>C. pilosa</i></p>	<p>Partes aéreas</p>	<p>BOHLMANN et al. (1981a)</p>

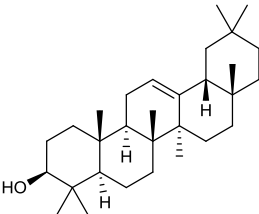
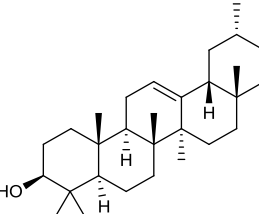
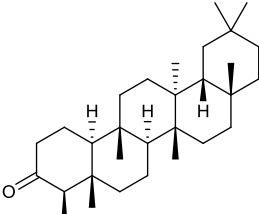
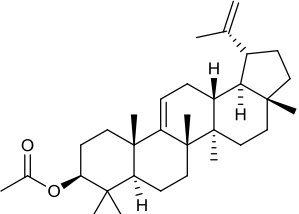
Quadro 4 (continuação) – Metabólitos secundários isolados do gênero *Calea*.

Acetilenos	Espécie	Órgão vegetal	Referência
 <p>(-)-Ictiotereol [119]</p>  <p>2-Acetoxi-6-tetradeceno-8,10,12-triin-1-ol [120]</p>  <p>2-Hidroxi-6-tetradeceno-8,10,12-triin-1-ol [121]</p>	<i>C. reticulata</i>	Partes aéreas	BOHLMANN et al. (1982b)
 <p>1,4,8,10,16-Heptadecapentaen-6-in-3-ona [122]</p>  <p>2,9,16-Heptadecatrieno-4,6-diinal [123]</p>  <p>2,8,10,16-Heptadecatetraeno-4,6-diin-1-ol [124]</p>  <p>2,8,10,16-Heptadecatetraeno-4,6-diin-1-ol de acetato [125]</p>	<i>C. scabra</i> <i>C. zacatechichi</i>	Partes aéreas Partes aéreas	BOHLMANN & ZDERO (1977)

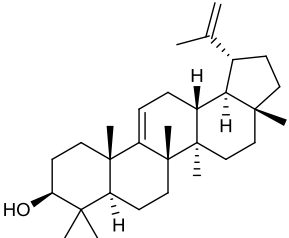
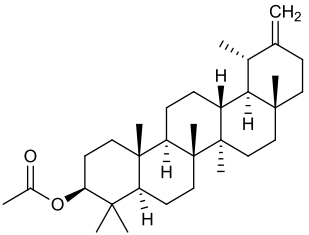
Quadro 4 (continuação) – Metabólitos secundários isolados do gênero *Calea*.

Esteroides	Espécie	Órgão vegetal	Referência
 <p>β-Sitosterol 3-β-D-glicopiranosídeo [126]</p>  <p>Estigmasterol 3-β-D-glicopiranosídeo [127]</p>	<p><i>C. parviflora</i> <i>C. platylepis</i></p>	<p>Partes aéreas Partes aéreas</p>	<p>BORGES DEL CASTILLO et al. (1986) DO NASCIMENTO; SILVA; DE OLIVEIRA (2002)</p>
 <p>β-Sitosterol [128]</p>  <p>Estigmasterol [129]</p>	<p><i>C. parviflora</i> <i>C. zacatechichi</i></p>	<p>Partes aéreas Partes aéreas</p>	<p>BORGES DEL CASTILLO et al. (1986) MARTINEZ; NAVEDA-DIAZ; JOSEPH-NATHAN (1988)</p>

Quadro 4 (continuação) – Metabólitos secundários isolados do gênero *Calea*.

Triterpenos	Espécie	Órgão vegetal	Referência
 <p>β-Amirina [130]</p>	<i>C. parviflora</i>	Partes aéreas	BORGES DEL CASTILLO et al. (1986)
 <p>α-Amirina [131]</p>			
 <p>Friedelanona [132]</p>			
 <p>Acetato de lupeol [133]</p>	<i>C. peckii</i>	Partes aéreas	CASTRO; TAMAYO-CASTILLO; JAKUPOVIC (1989)

Quadro 4 (continuação) – Metabólitos secundários isolados do gênero *Calea*.

Triterpenos	Espécie	Órgão vegetal	Referência
 <p>Lup-12-en-3-ol [134]</p>	<i>C. teucrifolia</i>	Partes aéreas	BOHLMANN et al. (1981c)
 <p>Acetato de taraxasterol [135]</p>	<i>C. zacatechichi</i>	-	QUIJANO; CALDERON; RIOS (1977)

2.5 *Calea pinnatifida* (R. BR.) LESS.

C. pinnatifida é uma erva perene, arbustiva e com ramos hexagonais (Figura 2). Essa espécie é frequentemente confundida e identificada como *C. serrata*, no entanto, *C. serrata* possui capítulos sésseis ou subsésseis, numerosos e com inflorescências em glomérulos; e *C. pinnatifida*, por sua vez, apresenta capítulos solitários, pedunculados em cimas umbeliformes e localizados nas axilas das folhas dos ramos superiores e terminais (MONDIN, 2004). De acordo com a classificação taxonômica, essa espécie pertence ao Reino – Plantae, Classe – Equisetopsida, Subclasse – Magnoliidae, Ordem – Asterales, Família – Asteraceae, Subfamília – Asteroideae, Tribo – Heliantheae, Subtribo – Melampodiinae e Gênero – *Calea* L.

Segundo Costa (2002) e Marchetti (2012), *C. pinnatifida* é conhecida popularmente como “cipó-cruz”, “aruca”, “erva-de-lagarto”, “quebra-tudo”, “picãozinho” e “olina”. As partes aéreas dessa espécie são empregadas na medicina popular como amebicida, giardicida, no tratamento de cortes e hematomas, e no combate a problemas estomacais (gastrite e má digestão) (FERREIRA et al., 1980a,b;

MALHADO FILHO, 1947; MORS; RIZZINI; PEREIRA, 2000; PRUSK & URBATSCH, 1988).

Figura 2 – *Calea pinnatifida* (R. Br.) Less.



Fonte: A autora (2013).

No que diz respeito a sua distribuição geográfica, essa espécie ocorre no Brasil, Paraguai, Uruguai e Argentina. Na flora brasileira, *C. pinnatifida* é encontrada nas regiões Sudeste, Sul e Centro-oeste, sobretudo, no Distrito Federal e nos Estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Espírito Santo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (MONDIN, 2004; MONDIN & BRINGEL, 2010).

Os dados elencados em levantamento bibliográfico permitiram observar a unanimidade em relação à escassez de informações sobre o aspecto químico e efeitos farmacológicos dessa espécie.

Kato e colaboradores (1994) realizaram a caracterização química do óleo essencial obtido das folhas de *C. pinnatifida*. A análise do óleo permitiu a identificação de doze componentes químicos, constituídos, fundamentalmente, por uma mistura de monoterpenos (α -pineno [136], β -pineno [137], sabineno [138], mirceno [139], α -felandreno [140], *p*-cimeno [142], ocimeno [143] e metil timol [144]) e sesquiterpenos (α -copaeno [141], α -cadineno [145], humuleno [146] e β -cariofileno [147]) (Figura 3).

Em estudos prévios, Ferreira e colaboradores (1980a,b) avaliaram o perfil fitoquímico dos extratos éter de petróleo e acetato de etila preparados a partir das partes aéreas de *C. pinnatifida*, identificando cinco constituintes químicos: o poliacetileno tetradeca-4*E*,6*E*,12*E*-trien-8,10-diin-1-ol [148], os ácidos anísico [149] e 4-glicosiloxi-benzoico [150], o esteroide sitosterol [128] e a lactona sesquiterpênica arucanolídeo [48]. As estruturas químicas dos

compostos isolados dos extratos éter de petróleo e acetato de etila das partes aéreas de *C. pinnatifida* são apresentadas na Figura 4.

Figura 3 – Estruturas químicas dos principais constituintes do óleo essencial de *C. pinnatifida* (R. Br.) Less.

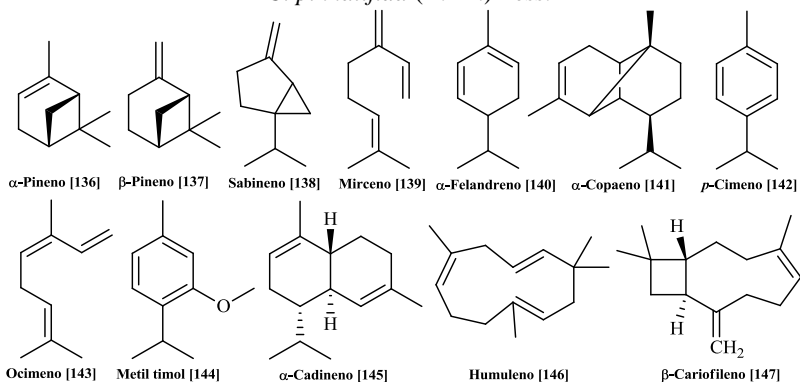
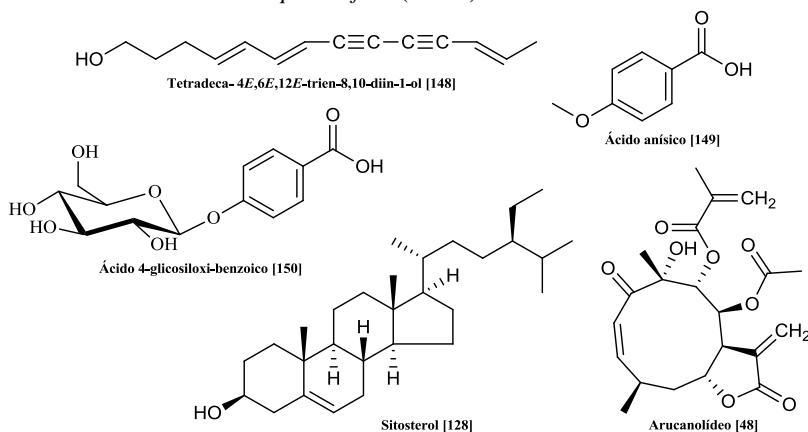


Figura 4 – Estruturas químicas dos compostos isolados das partes aéreas de *C. pinnatifida* (R. Br.) Less.



No que se refere aos estudos farmacológicos desenvolvidos com essa espécie, foram encontrados na literatura somente dois trabalhos até o momento. Em 2012, Marchetti e colaboradores avaliaram a atividade antiproliferativa dos extratos diclorometano e etanol das folhas frescas e secas de *C. pinnatifida*. Os ensaios foram realizados com nove linhagens celulares diferentes: pulmão (NCI-H460), mama (MCF-7), cólon (HT-

29), ovário com fenótipo resistente a múltiplos fármacos (NCI-ADR/RES), próstata (PC-3), melanoma (UACC-62), ovário (OVCAR-3), rim (786-O) e leucemia (K-562). O extrato diclorometano das folhas secas foi aquele que apresentou melhor perfil de citotoxicidade para as linhagens celulares empregadas, sendo posteriormente submetido a ensaios de avaliação da atividade antitumoral *in vivo*. Nos ensaios *in vivo*, foram utilizados dois modelos de câncer murino: os modelos de tumor ascítico e tumor sólido de Ehrlich. Em ambos os modelos empregados, o extrato diclorometano exibiu significativa atividade antitumoral, quer seja através do aumento na sobrevida dos animais tratados ou por meio da inibição do crescimento do tumor (MARCHETTI et al., 2012).

Tendo em vista o interessante perfil antitumoral exibido pelo extrato diclorometano de *C. pinnatifida*, Marchetti (2012) deu prosseguimento a este trabalho, objetivando identificar os possíveis princípios ativos responsáveis pela atividade antitumoral dessa espécie. Esse estudo revelou que a lactona arucanolídeo [48] é um dos principais compostos envolvidos na atividade antiproliferativa e antitumoral de *C. pinnatifida*, com destaque para sua atividade antimetastática em modelo de metástase experimental em tumor subcutâneo B16-F10 (melanoma).

2.6 *Calea uniflora* LESS.

C. uniflora Less. é uma erva perene e subarborescente, possui tricomas glandulares e tectores, xilopódio arredondado e flores amarelas (Figura 5). A mesma caracteriza-se por capítulos solitários e inflorescências longamente pedunculadas, o que a diferencia de outras espécies desse gênero (MONDIN, 2004; BUDEL et al., 2006). Segundo a classificação científica, essa espécie pertence ao Reino – Plantae, Classe – Equisetopsida, Subclasse – Magnoliidae, Ordem – Asterales, Família – Asteraceae, Subfamília – Asteroideae, Tribo – Heliantheae, Subtribo – Melampodiinae e Gênero – *Calea* L.

C. uniflora é conhecida vulgarmente pelos nomes de “erva-de-lagarto” e “arnica-da-praia” (PIO CORRÊA, 1978; ZANK, 2011). Com relação a sua distribuição, essa espécie é encontrada no Uruguai e nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, principalmente, nos Estados de São Paulo, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (FERRAZ et al., 2009).

No Estado de Santa Catarina, as partes aéreas de *C. uniflora* são empregadas na medicina popular pelas comunidades locais para o tratamento de dores e processos inflamatórios em geral, como

cicatrizante e como substituto da arnica em contusões e machucaduras internas e externas (ZANK, 2011).

Figura 5 – *Calea uniflora* Less.



Fonte: A autora (2012).

Em relação aos estudos fitoquímicos, foram realizados, até o presente momento, poucos trabalhos com essa espécie. Em 2004, Do Nascimento e De Oliveira analisaram a composição química dos extratos diclorometano e etanol das partes aéreas dessa espécie. Do extrato diclorometano foi isolado somente um composto, o ácido 2-metil-2,3-dihidroxi-butanoico-1,4-lactona [153], enquanto do extrato etanol foram isolados três compostos fenólicos heterosídeos: os flavonoides quercetina-3-*O*- β -galactopiranosídeo [151], 3',4',7-trihidroxi-flavona-7-*O*- β -glicopiranosídeo [152] e 2',4-diidroxi-3-metoxi-chalcona-4'-*O*- β -glicopiranosídeo [154]. A Figura 6 apresenta as estruturas químicas dos quatro compostos isolados das partes aéreas de *C. uniflora*.

No mesmo ano, Do Nascimento e colaboradores (2004b) descreveram a ocorrência de quatro derivados *p*-hidroxi-acetofenonas no extrato diclorometano das partes subterrâneas de *C. uniflora*: 2-senecioil-4-(metoxi-etil)-fenol [156], 2-senecioil-4-(pentadecanoiloxi-etil)-fenol [157], 2-senecioil-4-(angeloiloxi-etil)-fenol [155] e 2-senecioil-4-(hidroxi-etil)-fenol [158]. Em outro estudo, também realizado com o extrato diclorometano das partes subterrâneas dessa planta, foi reportado o isolamento e a identificação estrutural de três cromanonas: o 2,2-dimetil-6-(1-hidroxi-etil)-cromanona [97], e uma mistura do uniflorol A [159] e uniflorol B [160] (DO NASCIMENTO et al., 2007). A Figura 7 apresenta as estruturas químicas dos compostos isolados das partes subterrâneas de *C. uniflora*.

Figura 6 – Estruturas químicas dos compostos isolados das partes aéreas de *C. uniflora* Less.

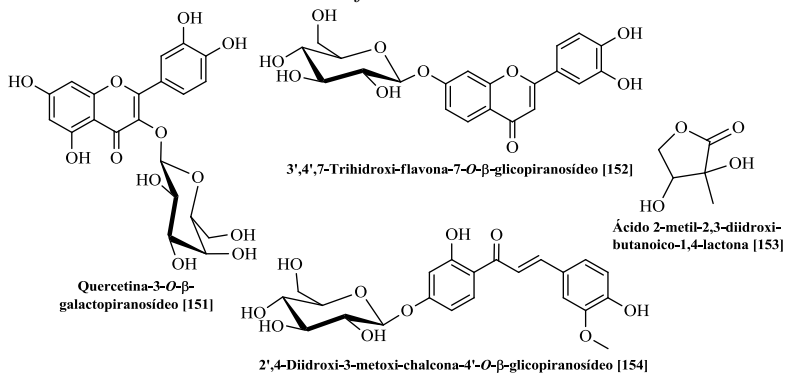
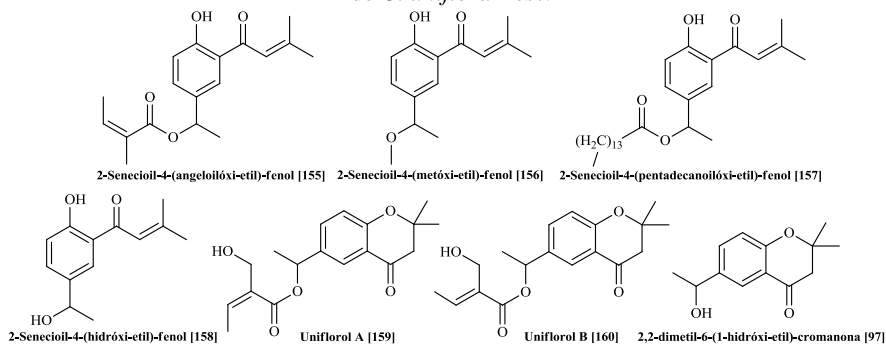


Figura 7 – Estruturas químicas dos compostos isolados das partes subterrâneas de *C. uniflora* Less.



Com relação aos efeitos farmacológicos e biológicos de *C. uniflora*, Do Nascimento, De Oliveira e Albuquerque (2002) avaliaram as propriedades tripanocida e antifúngica dos extratos diclorometano e etanol das partes aéreas e subterrâneas dessa espécie, evidenciando interessante atividade tripanocida e antifúngica para o extrato diclorometano das partes subterrâneas. Considerando o potencial farmacológico desse extrato, Do Nascimento et al. (2004b) deram continuidade a este estudo visando identificar os metabólitos secundários responsáveis por esses efeitos. Esses autores isolaram quatro compostos da classe das acetofenonas como componentes majoritários do extrato diclorometano: 2-senecioil-4-(angeloilóxi-etil)-fenol [155], 2-senecioil-4-(metóxi-etil)-fenol [156], 2-senecioil-4-

(pentadecanoiloxi-etil)-fenol [157] e 2-senecioil-4-(hidroxi-etil)-fenol [158]. Todos os compostos isolados demonstraram atividade antifúngica contra diferentes cepas de fungos dermatófitos e espécies do gênero *Candida*, sendo que essa atividade foi superior à exibida pelo extrato diclorometano. Com relação ao efeito tripanocida, somente os compostos [157] e [158] foram ativos frente às formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

No ano de 2007, Do Nascimento e colaboradores avaliaram a atividade leishmanicida de três cromanonas (97, 159 e 160) obtidas do extrato diclorometano das partes aéreas de *C. uniflora* frente à espécie *Leishmania major*. A mistura das cromanonas [159] e [160] apresentou significativo efeito leishmanicida nas doses de 100, 50 e 25 µg/mL (% inibição de crescimento = 88,9; 81,5 e 54,8%, respectivamente). A cromanona [97], no entanto, não foi bioativa em nenhuma das doses testadas.

Em outro estudo, realizado no ano de 2009, foram investigadas as atividades neurofarmacológicas (ansiedade e atividade psicomotora) e neurotoxicológicas (genotoxicidade no tecido cerebral) do extrato metanol de *C. uniflora* em ratos. De modo complementar, também foi realizada uma prospecção fitoquímica visando identificar as principais classes de metabólitos presentes nesse extrato. A análise fitoquímica preliminar indicou a presença de saponinas e flavonoides no extrato metanol; e os resultados obtidos nos ensaios farmacológicos demonstraram que a espécie em estudo não induziu deficiências psicomotoras, efeitos ansiolíticos e genotóxicos nas doses testadas; bem como não promoveu alteração da motivação e atividade locomotora dos animais avaliados (FERRAZ et al., 2009).

Em 2014, Torres avaliou a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato hidroalcoólico das flores de *C. uniflora* frente a quatro modelos animais distintos: contorções abdominais induzidas por ácido acético, teste da formalina, placa quente e edema de pata induzido por carragenina. O extrato bruto de *C. uniflora* exibiu uma interessante atividade antinociceptiva e anti-inflamatória, o que pode estar relacionado ao seu uso na medicina popular. As contorções abdominais induzidas por ácido acético foram reduzidas significativamente nas doses de 100 e 300 mg/kg quando comparado ao grupo controle. Na segunda fase da dor induzida pela formalina, este tratamento também produziu um efeito antinociceptivo e anti-inflamatório significativo. No modelo de nocicepção induzida pelo calor (placa quente), após 60 min de tratamento com a dose de 300 mg/kg, houve um aumento expressivo do tempo de reação ao estímulo nociceptivo, sugerindo uma atividade

analgésica central. Entretanto, no teste do edema de pata induzido por carragenina, o extrato bruto de *C. uniflora* não demonstrou efeito anti-inflamatório em nenhuma das doses testadas (30, 100 e 300 mg/kg). Adicionalmente, o extrato não apresentou efeito miorelaxante e não interferiu na coordenação motora dos animais submetidos ao teste do *rota-rod*, evidenciando que a ação antinociceptiva não resulta de um possível efeito depressor sobre o SNC (TORRES, 2014).

2.7 LACTONAS SESQUITERPÊNICAS (LST) E SEU POTENCIAL BIOLÓGICO

As lactonas sesquiterpênicas (LST) constituem um grande e diversificado grupo de metabólitos secundários geralmente incolores, amargos, relativamente estáveis e de caráter lipofílico. As LST apresentam 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, sendo formadas pela condensação de três unidades isoprênicas (C_5) seguida de ciclização e transformação oxidativa para produzir uma lactona *cis* ou *trans*-fundida (GHANTOUS et al., 2010; SÁNCHEZ-TORANZO et al., 2014). Em geral, o anel lactônico possui cinco membros (γ -lactona ou butirólactona) e uma ligação dupla (endo- ou exocíclica) conjugada ao grupamento carbonila, constituindo uma γ -lactona α,β -insaturada. Várias atividades biológicas das LST têm sido primariamente atribuídas à sua metade γ -lactona α,β -insaturada, pois um metileno exocíclico conjugado à carbonila ou sistemas carbonílicos α,β -insaturados adicionais são elementos estruturais chave capazes de reagir em adições do tipo Michael com nucleófilos biológicos tais como grupos sulfidrilas (grupo tiol dos resíduos de cisteína) (PADILLA-GÓNZALEZ; SANTOS; DA COSTA, 2016).

Pertencente à subfamília dos terpenoides, as LST são compostos amplamente distribuídos nas plantas superiores e, em menor quantidade, em fungos e briófitas. Já foram descritas mais de 7.000 estruturas químicas, número que justifica o amplo espectro de atividades biológicas descritas para essas substâncias (MACÍAS et al., 2006).

As LST representam uma importante classe de produtos naturais em plantas da família Asteraceae, sendo consideradas importantes marcadores quimiotaxonômicos nessa família e onde ocorre a maior abundância e variedade estrutural desses compostos (cerca de 5.000 estruturas diferentes reportadas com aproximadamente 30 subtipos de esqueletos carbocíclicos (CHATURVEDI et al., 2011; PADILLA-GÓNZALEZ; SANTOS; DA COSTA, 2016; SCOTTI et al., 2012).

Além disso, esses metabólitos também podem ser encontrados esporadicamente em outras famílias de angiospermas, tais como Apiaceae, Magnoliaceae, Lauraceae, Bombacaceae, Chloranthaceae, Rutaceae e Acanthaceae (CHATURVEDI et al., 2011; PADILLA-GÓNZALEZ; SANTOS; DA COSTA, 2016).

A respeito da localização dessa classe de micromoléculas nas plantas, as mesmas raramente estão presentes nas partes subterrâneas, sendo armazenadas, principalmente, nas partes aéreas do vegetal. Nas partes aéreas, esses compostos são produzidos e secretados, sobretudo, pelos tricomas glandulares, sejam eles localizados na superfície das folhas ou nos apêndices das anteras (GOPFERT et al., 2005; TISSIER, 2012). A localização das LST nos tricomas glandulares ocorre devido à alta toxicidade não específica de tais compostos, necessitando a compartimentalização dessas substâncias para evitar autotoxicidade. A presença de tricomas glandulares é uma característica marcante em plantas da família Asteraceae (CASTRO; LEITÃO-FILHO; MONTEIRO, 1997).

Conforme o esqueleto carbocíclico, as LST podem ser distribuídas em diferentes classes, sendo que os principais grupos descritos são: germacranolídeos, eudesmanolídeos, elemanolídeos, eremofilanolídeos, guaianolídeos, cadinanolídeos, pseudoguaianolídeos e xantolídeos (Figura 8) (SÁNCHEZ-TORANZO et al., 2014). O sufixo "olídeo" refere-se à função lactona e baseia-se no costunolídeo, um sesquiterpeno carbocíclico com 10 membros.

As LST da classe dos germacranolídeos possuem duas insaturações em seu carboesqueleto, a primeira localizada entre os carbonos C1-C10, e a segunda entre os carbonos C4-C5, sendo denominadas 1(10),4-ciclodecadieno. Dependendo da conformação apresentada por essas insaturações, é possível estabelecer quatro isômeros para a classe dos germacranolídeos: *trans, trans*; *cis, trans*; *trans, cis* e *cis, cis*. Esses isômeros são denominados de germacrolídeo, melampolídeo, heliangolídeo e *cis, cis*-germacradienolídeo, respectivamente (Figura 9).

Figura 8 – Principais classes de lactonas sesquiterpênicas.

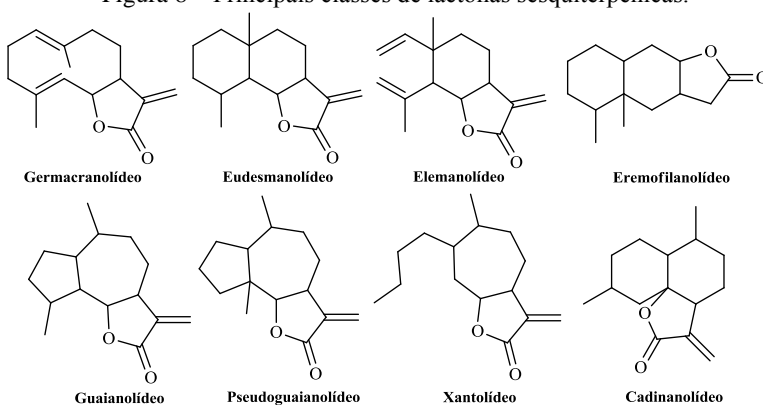
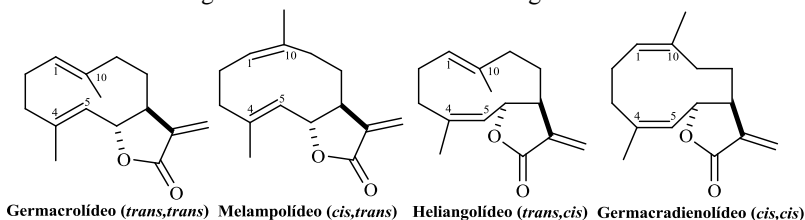


Figura 9 – Isômeros da classe dos germacranolídeos.



As LST exibem uma grande variedade de propriedades biológicas, constituindo uma classe de substâncias com potencial para uso na medicina moderna. Ghantous et al. (2010) relataram algumas LST que chegaram à fase inicial de testes clínicos (testes em seres humanos), entre elas a artemisinina (ART), a tapsigargina (TAP) e o partenolídeo (PAR). Essas LST atuam em vias de sinalização específicas, sendo seletivas contra alguns tipos de tumores e células-tronco tumorais. A TAP, por exemplo, possui ação frente a tumores sólidos avançados; enquanto a ART é ativa contra câncer de mama metastático e câncer colorretal. Atualmente, a TAP está no ensaio clínico de fase II (DOAN et al., 2015).

Entre as atividades biológicas descritas na literatura para essa classe de substâncias, podemos destacar as atividades citotóxica (KUMAR et al., 2014; MALDONADO et al., 2014a,b; PONOMARENKO, et al., 2016; RIOS et al., 2014), anti-inflamatória (BUTTIRINI et al., 2014; FÉLIX et al., 2014; FLEMMING et al., 2015; HUANG et al., 2014), antibacteriana (CIRIC et al., 2012; FORTUNA et

al, 2011; VENKATESWARA et al., 2013), antifúngica (AHMED & ABDELGALEIL, 2005; ERASTO; GRIERSON; AFOLAYAN, 2006; THEODORI et al., 2006), antiviral (LIU et al., 2010; MOHAMMED; CHRISTENSEN; COLLA, 2014; ROSSINI et al., 2012), antimalárica (GRAZIOSE et al., 2011; PAN et al., 2011; PEDERSEN et al., 2009), leishmanicida (KARIOTI et al, 2009; ODONNE et al., 2011; SOSA et al., 2016; TOLEDO et al., 2014), tripanocida (FABIAN et al., 2013; KARIOTI et al, 2009; OTOGURO et al., 2011), hipoglicemiante (HOU et al., 2003; JIA et al., 2013; SERRA-BARCELONA et al., 2014), citoprotetora gástrica (GIORDANO et al., 1992; PENISSI et al., 1998), antidepressiva (GONÇALVES et al., 2012; LIU et al., 2012; TOLARDO et al., 2010), entre outras. Além disso, as LST também possuem atividade alelopática e fitotóxica, desempenhando um papel importante na defesa das plantas contra organismos patógenos, insetos herbívoros e mamíferos (ALVARENGA et al., 2009; MACÍAS et al., 2006; SILVA et al., 2011).

2.8 COMPOSTOS FENÓLICOS (FLAVONOIDES E NÃO FLAVONOIDES) E SEU POTENCIAL BIOLÓGICO E FARMACOLÓGICO

As plantas sintetizam uma enorme variedade de metabólitos secundários, sendo o grupo dos compostos fenólicos um dos mais importantes e abundantes na natureza. Essa classe de produtos naturais constitui um importante grupo de fitoquímicos alimentares, sendo encontrada em alimentos e bebidas de origem vegetal, tais como frutas, legumes, sementes, cereais, vinho, azeite de oliva, sucos, chá e café (CHEYNIER, 2005; CHIRINOS et al., 2009; MANACH et al., 2004; MINIATI, 2007). Já foram caracterizados mais de 8.000 compostos fenólicos em plantas; compreendendo estruturas diversas que variam desde moléculas simples, com um anel aromático (C₆) ligado a um ou vários grupamentos hidroxilas, a substâncias cujas moléculas são altamente ramificadas, como os taninos (BRAVO, 1998).

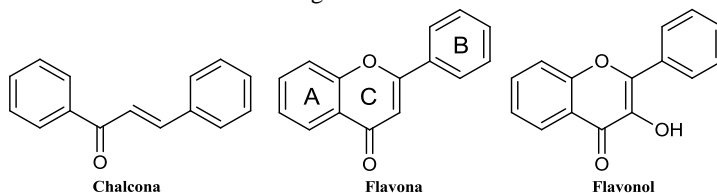
Os compostos fenólicos apresentam uma grande diversidade estrutural, podendo ser subdivididos em dois grandes grupos em função da similaridade de suas cadeias de átomos de carbono e do padrão de substituição, a saber, flavonoides e não flavonoides (MANACH et al., 2004; MICHALAK, 2006).

Os flavonoides representam a classe de compostos fenólicos mais comum e amplamente distribuída nas plantas. Mais de 5.000

flavonoides já foram descritos na natureza (COOK & SAMMAN, 1996; YAO et al., 2004). Os mesmos caracterizam-se por apresentar dois anéis benzênicos (A e B) ligados por três átomos de carbono que geralmente formam um heterociclo oxigenado (anel C), denominado núcleo flavano (Figura 10) (CORRADINI et al., 2011; MANACH et al., 2004).

Conforme o grau de oxidação e o padrão de substituição do anel heterocíclico C, os flavonoides podem ser classificados em 11 diferentes classes: flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavonóis, diidroflavonóis, isoflavonoides, flavanóis, chalconas, diidrochalconas, antocianidinas e catequinas (CORRADINI et al., 2011; HARBORNE & WILLIAMS, 2000; ROSS & KASUME, 2002). Na Figura 10 são apresentadas as estruturas básicas de algumas classes de flavonoides presentes no gênero *Calea*.

Figura 101 – Estruturas básicas de algumas classes de flavonoides encontradas no gênero *Calea*.



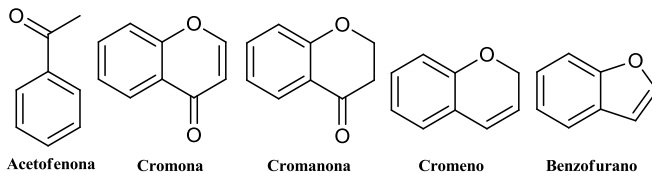
O grupo dos não flavonoides é bastante heterogêneo e, diferentemente dos flavonoides, não possui uma estrutura básica em comum. Esse grupo é composto por ácidos fenólicos (ácido benzoico, hidróxi-cinâmico e seus derivados), lignanas, cromonas, cromanonas, acetofenonas, benzofuranos, antraquinonas, cromenos, cumarinas, taninos hidrolisáveis, entre outros (CHEYNIER, 2005). Na Figura 11 são apresentadas as estruturas básicas das principais classes de não flavonoides encontradas no gênero *Calea*. Tendo em vista a abundância dos cromenos nesse gênero, essa classe química será discutida mais detalhadamente na próxima sessão.

Os compostos fenólicos são de grande interesse nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética, pois exibem um amplo espectro de propriedades farmacológicas e biológicas. Entre as atividades comprovadas cientificamente para esse grupo de metabólitos, podemos destacar a atividade antioxidante (BURCU; AYSEL; NURDAN, 2014; FAN et al., 2014; WANG et al., 2015; 2016), citotóxica (KUETE et al., 2014; MANOSROI et al., 2013; PARVEEN et al., 2014), anti-inflamatória (AZOFEIFA et al., 2013; FIGUEIREDO-RINHEL et al.,

2013; LI et al., 2014), antibacteriana (GADETSKAYA et al., 2015; GOKBULUT et al., 2013; PLYUTA et al., 2013; RASHED et al., 2014), antifúngica (GALLUCCI et al., 2014; RASHED et al., 2014; ZABKA & PAVELA, 2013), antimalárica (GADETSKAYA et al., 2015), vasodilatadora (LIU et al., 2014; PENSO et al., 2014; WANG et al., 2014), antiparasitária (OTOGURO et al., 2012; SALEM et al., 2011), tripanocida (GADETSKAYA et al., 2015) e inseticida (SINGH et al., 2014).

Além das atividades descritas anteriormente, os compostos fenólicos também possuem grande importância fisiológica e morfológica em plantas. Os mesmos contribuem para as características sensoriais e pigmentação de frutas e legumes, desempenham um papel relevante no crescimento e reprodução vegetal, fornecem proteção contra raios ultravioleta (UV), e atuam como fitoalexinas, conferindo resistência contra organismos patógenos e predadores (BRAVO, 1998; FARAH & DONANGELO, 2006).

Figura 11 – Estruturas básicas das principais classes de compostos não flavonoides encontrados em *Calea*.



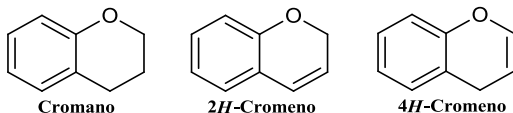
2.9 CROMENOS (BENZOPIRANOS) E ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Os cromenos constituem uma classe de produtos naturais que tem despertado grande interesse na comunidade científica devido às suas diversas propriedades biológicas. Os mesmos são compostos orgânicos policíclicos resultantes da fusão de um núcleo benzênico com um anel heterocíclico pirano. De acordo com a nomenclatura IUPAC, os cromenos são também denominados de benzopiranos (THOMAS & ZACHARIAH, 2013).

Existem alguns isômeros de benzopiranos, os quais variam conforme a orientação de fusão dos anéis em comparação com o átomo de oxigênio; resultando em três diferentes esqueletos estruturais, a saber, cromano, *2H*-cromeno e *4H*-cromeno. A classe de compostos *2H*-cromeno é a mais comum e abundante na natureza, tendo sido

reportada em diferentes espécies de vegetais, sobretudo, nas plantas da família Asteraceae (THOMAS & ZACHARIAH, 2013; VAN OTTERLO et al., 2005). Na Figura 12 são exibidos os três esqueletos estruturais possíveis para os núcleos benzopiranos.

Figura 12 – Esqueletos estruturais possíveis para os benzopiranos.



Entre as várias propriedades biológicas já descritas na literatura para os cromenos, podemos destacar as atividades anti-inflamatória (GEBHARDT et al., 2007; HEO et al., 2014; JOHNSON et al., 2010), antitumoral (ADEBAYO et al., 2011; HEO et al., 2011; PRACHYAWARAKORN; MAHIDOL; RUCHIRAWAT, 2011), analgésica (GUO et al., 2008; JOHNSON et al., 2010), antiviral (DHARMARATNE et al., 2002; IWASHIMA et al., 2005), antioxidante (JOHNSON et al., 2010; MORIMURA et al., 2009; PRACHYAWARAKORN; MAHIDOL; RUCHIRAWAT et al., 2011), antimicrobiana (QIN et al., 2011; ZAINUDDIN et al., 2010), antifúngica (PARRA; DELGADO; CUCA, 2011; QIN et al., 2011; SAGA et al., 2006), acaricida (BURKHARDT et al., 1994; RIBEIRO et al., 2011), tripanocida (BATISTA JR. et al., 2008; EROSA-REJON et al., 2010; HAREL et al., 2011) e leishmanicida (ALIZADEH et al., 2008; EROSA-REJON et al., 2010).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Investigar a composição química dos extratos etanólicos das espécies *Calea uniflora* e *C. pinnatifida*, bem como avaliar o potencial biológico dos compostos isolados.

3.2 ESPECÍFICOS

- ✓ Obter a impressão digital metabólica (*fingerprinting*) das espécies *C. uniflora* e *C. pinnatifida* por UHPLC-DAD-HRFTMS e, se possível, realizar a desreplicação das mesmas;
- ✓ Isolar e purificar os principais metabólitos secundários presentes nas espécies em estudo;
- ✓ Obter extratos direcionados para a obtenção de lactonas sesquiterpênicas (LST) e poliacetilenos;
- ✓ Determinar a estrutura química das substâncias isoladas através de técnicas espectroscópicas e espectrométricas;
- ✓ Avaliar a atividade leishmanicida e tripanocida *in vitro* dos compostos isolados de *C. uniflora* e *C. pinnatifida* frente às formas intracelulares amastigotas de *Leishmania amazonensis* e *Trypanosoma cruzi*;
- ✓ Determinar os valores de CI_{50} (concentração inibitória 50%) para os compostos mais bioativos (percentagem de inibição > 50%);
- ✓ Realizar ensaios de citotoxicidade (CC_{50}) dos compostos isolados frente às células TPH-1 não infectadas.

4 METODOLOGIA

4.1 ESPECIFICAÇÕES DOS REAGENTES E EQUIPAMENTOS

4.1.1 Equipamentos utilizados

- Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) da marca Bruker, modelos Avance 400 e/ou Ascend 600
- Espectrômetro de Massas Q Exactive Plus™ (Thermo Scientific)
- Espectrômetro de Massas Xevo G25 Qtof MS (Waters)
- Espectrofotômetro de IV da marca Shimadzu, modelo Prestige-21 FTIR-8400
- Cromatógrafo Líquido Preparativo Shimadzu modelo SCL-10ADVP
- UHPLC Accela™ (Thermo scientific, USA)
- UPLC *Acquity* (Waters)
- MPLC FMI Lab Pump, modelo QSY (Fluid Metering Inc., Syosset, NY).
- Aparelho de ponto de fusão da Microquímica, modelo MQAPF-301
- Balanças de alta precisão das marcas Katashi e Ohaus®
- Syncore da marca Büchi
- Evaporador rotativo da Büchi, modelo R-210
- Estufa a vácuo da marca Marconi
- Aparelho liofilizador da EC Apparatus, modelo Micro Modulyo
- Câmara de luz ultravioleta (UV) da marca Prodicil, modelo VA 50

4.1.2 Métodos cromatográficos, solventes e reagentes empregados

Os processos cromatográficos de adsorção [cromatografia líquida a vácuo (CLV) e cromatografia em coluna *flash* (CC)] foram realizados empregando-se como fases estacionárias sílica gel 60, com granulometria de 40-63 µm (230-400 *mesh*), da marca Vetec®; e sílica gel modificada (C18), de partículas com dimensões entre 40-63 µm, da marca Silicycle®. As colunas de vidro cilíndricas e os funis de placa sinterizada utilizados como suporte na CC e CLV, respectivamente, foram de comprimento e diâmetro variado a depender da quantidade de amostra a ser cromatografada. Para a cromatografia de adsorção em fase reversa foram empregadas colunas Lobar Lichroprep® RP18 (40-63 µm) da Merck®, e colunas de vidro Econoline® da Sorbent Technologies.

Os fracionamentos por cromatografia de permeação em gel (exclusão por tamanho molecular) foram realizados em gel de dextrana

Sephadex[®] LH-20, de procedência da GE Healthcare[®]; empregando acetona, CHCl₃, MeOH ou H₂O como fases móveis.

As cromatografias em camada delgada analítica (CCDA) foram realizadas utilizando-se cromatoplasas de gel de sílica 60 (250 µm) sobre alumínio, da marca Silicycle[®], com indicador de fluorescência em $\lambda = 254$ nm. Nas análises em fase reversa foram empregadas cromatofolhas de alumínio de sílica modificada (C18), da marca Machery-Nagel[®], também com indicador de fluorescência (UV₂₅₄).

Os eluentes empregados nos procedimentos cromatográficos foram: hexano, CH₂Cl₂, CHCl₃, AcOEt, acetona e MeOH; puros ou em misturas binárias; com gradiente crescente de polaridade. Todos os solventes orgânicos utilizados foram destilados quando necessários ou apresentavam grau de pureza P.A. (marcas Vetec[®], Dinâmica[®] ou Synth[®]). Nos procedimentos realizados em fase reversa utilizou-se ainda, como eluente, H₂O destilada.

A revelação dos compostos nas cromatoplasas analíticas foi efetuada pela exposição das placas a lâmpada ultravioleta (UV), nos comprimentos de onda curto ($\lambda = 254$ nm) e longo ($\lambda = 366$ nm); e pela nebulização com o agente cromogênico anisaldeído sulfúrico (0,5 mL de anisaldeído; 10,0 mL de ácido acético glacial; 85,0 mL de etanol; 5,0 mL de H₂SO₄ concentrado), seguido de aquecimento das placas por alguns minutos a altas temperaturas.

4.1.3 Análise instrumental

Os compostos isolados foram caracterizados por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) com o auxílio dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C, além dos mapas de correlação COSY (*Correlation Spectroscopy*), HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Correlation*) e HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*). Em alguns casos, também foram realizados espectros de RMN de ¹H NOE seletivo (*Nuclear Overhauser Effect*). Os espectros foram registrados em espectrômetro da marca Bruker, modelos Avance 400 e Ascend 600 (Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná – UFPR), operando a 400 e 600 MHz para ¹H, e 100 e 150 MHz para ¹³C, respectivamente. Os dados adquiridos (FID – *Free Induction Decay*) foram processados no programa ACD Labs (Spec Manager).

As amostras para análise foram preparadas dissolvendo-se uma pequena quantidade da mesma em solvente deuterado da marca Cambridge Isotope Laboratories (CDCl₃, acetona-*d*₆ ou MeOD-*d*₄). Os

deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm), e o tetrametilsilano (TMS) foi utilizado como padrão interno de referência ($\delta = 0$ ppm).

As multiplicidades dos sinais de RMN de ^1H foram indicadas segundo a convenção: s (simpleto), sl (simpleto largo), d (duplete), dd (duplo duplete), ddd (duplo duplo duplete), dddd (duplo duplo duplo duplete), t (tripleto), q (quadrupleto) e m (multiplete). A constante de acoplamento (J) foi expressa em Hertz (Hz) e o número de hidrogênios foi deduzido a partir da integral relativa. A identificação estrutural dos compostos foi confirmada por comparação dos seus dados espectroscópicos com dados previamente descritos na literatura.

As análises por Espectrometria de Massas de Alta Resolução (HRMS) foram registradas nos equipamentos Xevo G25 Qtof MS (Departamento de Ciências Farmacêuticas, UFSC e/ou Centro de Estudos em Biofarmácia, Departamento de Farmácia, UFPR) e Q Exactive Plus (Departamento de Ciências Farmacêuticas, USP-RP), todos com fonte de ionização por *Electrospray* (ESI) operando no modo positivo e/ou negativo de análise.

Os espectros de absorção na região do IV foram obtidos a partir de amostras dispersas em pastilhas de brometo de potássio (KBr); utilizando espectrofotômetro da Shimadzu, modelo Prestige-21 FTIR-8400 (Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Ciências Farmacêuticas, UFSC), na região de 4000 a 400 cm^{-1} .

O ponto de fusão das substâncias isoladas foi determinado em equipamento MQAPF-301 da Microquímica (Laboratório de Química Farmacêutica, Departamento de Ciências Farmacêuticas, UFSC), com temperatura variando de 0 a 350 $^{\circ}\text{C}$.

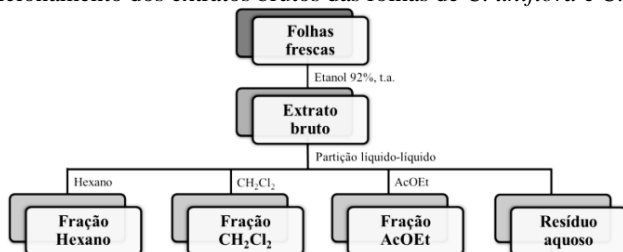
4.2 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

As folhas de *C. pinnatifida* foram coletadas na Costa da Lagoa, Florianópolis (27°56'52,40"S; 48°43'28,80"O), Santa Catarina, Brasil, nos meses de setembro de 2012 (1° material) e junho de 2013 (2° material). Já a espécie *C. uniflora* (folhas e flores) foi coletada no município de Imbituba (28°20'3,36"S; 48°67'8,21"O), Santa Catarina, Brasil, no dia 30 de outubro de 2012. A identidade botânica de ambas as espécies foi confirmada pelo Dr. John Pruski e um exemplar de cada espécie encontra-se catalogado no herbário Missouri Botanical Garden, New York, sob os números MO-2383318 (*C. pinnatifida*) e MO-2383317 (*C. uniflora*).

4.3 OBTENÇÃO E PARTICIONAMENTO DOS EXTRATOS BRUTOS

A Figura 13 ilustra os procedimentos experimentais empregados na obtenção e particionamento dos extratos brutos das folhas de *C. uniflora* e *C. pinnatifida*.

Figura 13 – Esquema dos procedimentos experimentais empregados na obtenção e particionamento dos extratos brutos das folhas de *C. uniflora* e *C. pinnatifida*.



As folhas frescas de *C. pinnatifida* (1^a coleta) (800 g) foram rasuradas com o auxílio de uma tesoura e extraídas por maceração a frio com EtOH 92%. O processo de maceração durou sete dias e foi repetido quatro vezes. O filtrado obtido em cada etapa foi reunido e o solvente foi removido em evaporador rotativo (temperatura inferior a 45 °C), originando 12,0 g de extrato bruto. Visando uma semipurificação das substâncias em grupos de coeficientes de partição semelhantes, o extrato bruto foi dissolvido em 200 mL de H₂O e submetido a uma partição líquido-líquido com solventes em ordem crescente de polaridade: hexano (4 x 150 mL), CH₂Cl₂ (4 x 100 mL) e AcOEt (4 x 100 mL), respectivamente. Após a evaporação dos solventes em rotaevaporador, obtiveram-se as frações hexano (4,5 g), diclorometano (0,5 g) e acetato de etila (1,5 g), assim como uma fração aquosa remanescente, a qual foi liofilizada fornecendo um sólido higroscópico (4,5 g).

As folhas frescas de *C. pinnatifida* (2^a coleta) (2,6 Kg) foram rasuradas e maceradas a temperatura ambiente com EtOH 92% até o esgotamento do material vegetal. Posteriormente, o extrato foi filtrado e concentrado em rotaevaporador, fornecendo um extrato bruto de cor verde escura (142,0 g). O extrato bruto foi retomado em EtOH-H₂O (30:70, v/v) e particionado com solventes de diferentes polaridades: hexano (5 x 500 mL), CH₂Cl₂ (4 x 500 mL) e AcOEt (3 x 500 mL). Após a concentração dos solventes em evaporador rotativo, obtiveram-se as frações hexano (68,5 g), diclorometano (7,4 g) e acetato de etila (5,9 g), bem como uma fração residual aquosa, a qual foi liofilizada

gerando um sólido higroscópico (52,0 g). Ainda, a fração residual aquosa foi submetida a um fracionamento em coluna de Amberlite XAD-4, empregando MeOH, resultando na fração metanol (42,5 g).

As folhas frescas de *C. uniflora* (2,3 Kg) foram rasuradas com o auxílio de uma tesoura e submetidas à extração contínua por processo de maceração com EtOH 92% por 15 dias. Após o procedimento de extração, o extrato foi filtrado e concentrado em evaporador rotativo, sob pressão reduzida, com temperatura inferior a 45 °C. O resíduo da primeira maceração foi re-extraído até a exaustão do material vegetal, resultando em um extrato bruto de coloração verde-escura (104,0 g). Posteriormente, o extrato bruto foi dissolvido em H₂O (1,2 L) e submetido a uma partição líquido-líquido com hexano (4 x 500 mL), CH₂Cl₂ (4 x 500 mL) e AcOEt (4 x 500 mL). Após a evaporação dos solventes em evaporador rotativo, obtiveram-se as frações hexano (26,8 g), diclorometano (3,2 g) e acetato de etila (6,2 g), bem como uma fração residual aquosa, a qual foi liofilizada originando um sólido higroscópico (67,8 g). Ainda, a fração residual aquosa foi submetida a um fracionamento em coluna de Amberlite XAD-4, empregando MeOH, resultando na fração metanol (47,8 g).

4.4 IMPRESSÃO DIGITAL METABÓLICA DAS ESPÉCIES *C. uniflora* E *C. pinnatifida* POR UHPLC-UV-ESI-MS E DESREPLICAÇÃO

As análises de UHPLC-UV-ESI-MS empregadas na desreplicação foram realizadas em parceria com o professor Dr. Fernando Batista da Costa da Universidade de São Paulo (USP-RP).

As análises dos extratos brutos e frações orgânicas (diclorometano, acetato de etila e metanol) de *C. uniflora* e *C. pinnatifida* foram realizadas em um UHPLC Accela™ (Thermo Fisher Scientific, USA) acoplado a um detector de UV-DAD (Thermo Fisher Scientific, PDA Detector) e a um espectrômetro de massas Q Exactive Plus™ (Thermo Fisher Scientific, USA) com ionização por *Electrospray* (ESI) e analisador do tipo Orbitrap™. Os extratos e frações foram solubilizados em EtOH 70%, na concentração de 0,5 mg/mL, e filtrados com uma membrana filtrante em Politetrafluoretileno (PTFE) com poro de 0,20 µm e diâmetro de 15 mm. Para as análises por UHPLC-UV-ESI-MS, uma alíquota de 5 µL dos extratos e frações orgânicas foi injetada via autoinjeter, e mantida à temperatura de 10 °C. A separação cromatográfica foi efetuada em uma

coluna cromatográfica de fase reversa ACE® 3 C18 (150 x 3 mm, 3 µm), protegida por uma pré-coluna equivalente. O método cromatográfico empregado foi desenvolvido pelo grupo AsterBioChem, no qual a fase móvel foi um gradiente linear de eluição utilizando como solventes H₂O com ácido fórmico (0,1%) (v/v) na bomba A, e ACN (acetonitrila) com ácido fórmico (0,1%) (v/v) na bomba B. O seguinte programa de eluição foi utilizado: 0 – 17 min, 2 - 55% de B; 17 – 20 min, 55 - 100% de B; 20 – 24 min, 100% de B; 24 – 27 min, 100 - 2% de B; 27 – 30 min, 2% de B. A vazão da fase móvel foi de 0,4 mL/min e os cromatogramas no UV foram registrados nos comprimentos de onda de 214, 254 e 325 nm.

Os espectros de massas foram adquiridos, concomitantemente, nos modos de ionização positivo e negativo, na faixa de varredura de 150 – 1.200 *m/z*. Os parâmetros de aquisição a seguir foram mantidos em todas as análises: 250 ms para o máximo tempo de injeção, intervalo entre os espectros de 1 µs, resolução de 70.000, voltagem no spray de 3,6 kV e temperatura do capilar de 300 °C.

Antes da sequência de análises foi realizada uma calibração do aparelho para cada polaridade empregando a solução Thermo Calmix (Sigma-Aldrich®). Os dados foram processados e armazenados utilizando o software Thermo™ Xcalibur™ versão 2.2 (Thermo Fisher Scientific, USA). As amostras foram analisadas em sequência iniciando pelo branco (ACN-H₂O) e, a cada dez amostras, o branco foi reinjetado. A análise dos perfis químicos foi, então, realizada por comparação dos dados de massas exatos com os bancos de dados DNP (*Dictionary of Natural Products*®) e AsterDB (*Asteraceae Data Base*), e com a literatura (SciFinder Scholar®). Adicionalmente, também foi realizado um levantamento bibliográfico e uma compilação dos dados da literatura sobre a composição química do gênero *Calea*.

4.5 FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DAS FRAÇÕES ORGÂNICAS

A Figura 14 apresenta um fluxograma resumindo os procedimentos cromatográficos realizados com a espécie *C. pinnatifida* e os respectivos compostos isolados das frações hexano, diclorometano e acetato de etila. Similarmente, a Figura 15 apresenta um fluxograma resumindo os procedimentos cromatográficos realizados com a espécie *C. uniflora* e os respectivos compostos isolados das frações diclorometano e acetato de etila.

Figura 14 – Fluxograma resumindo os procedimentos cromatográficos realizados com a espécie *C. pinnatifida* e os respectivos compostos isolados das frações hexano, diclorometano e acetato de etila.

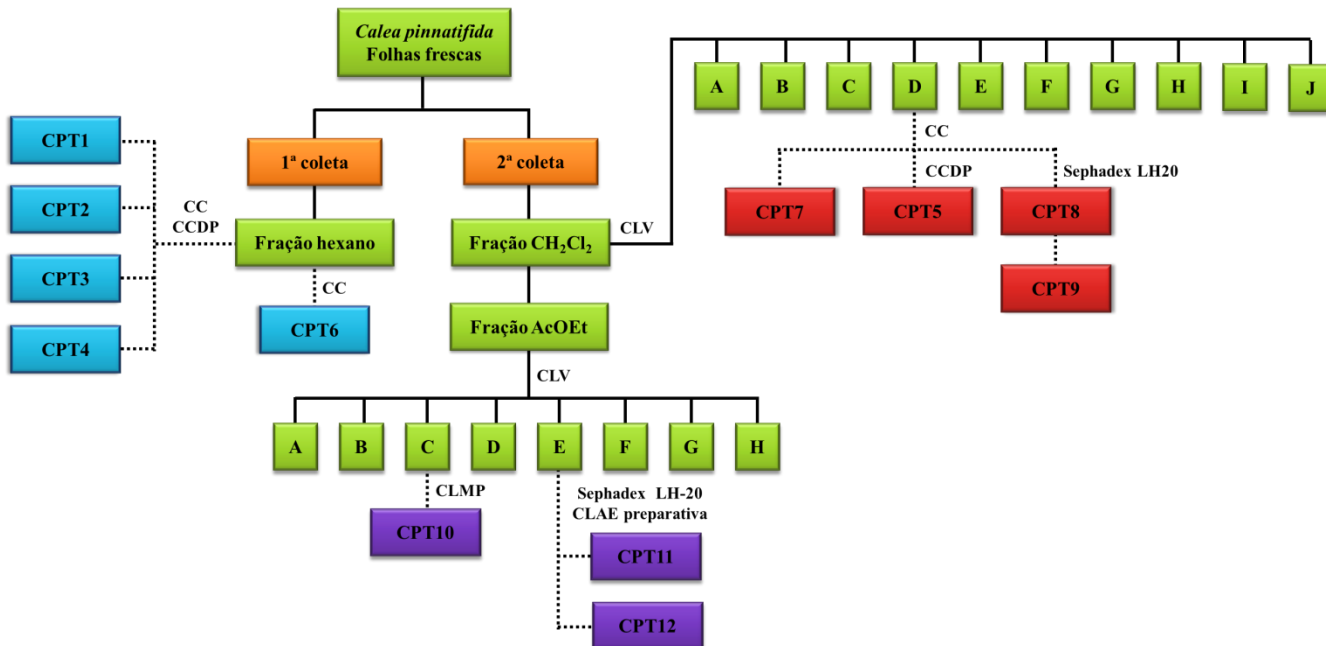
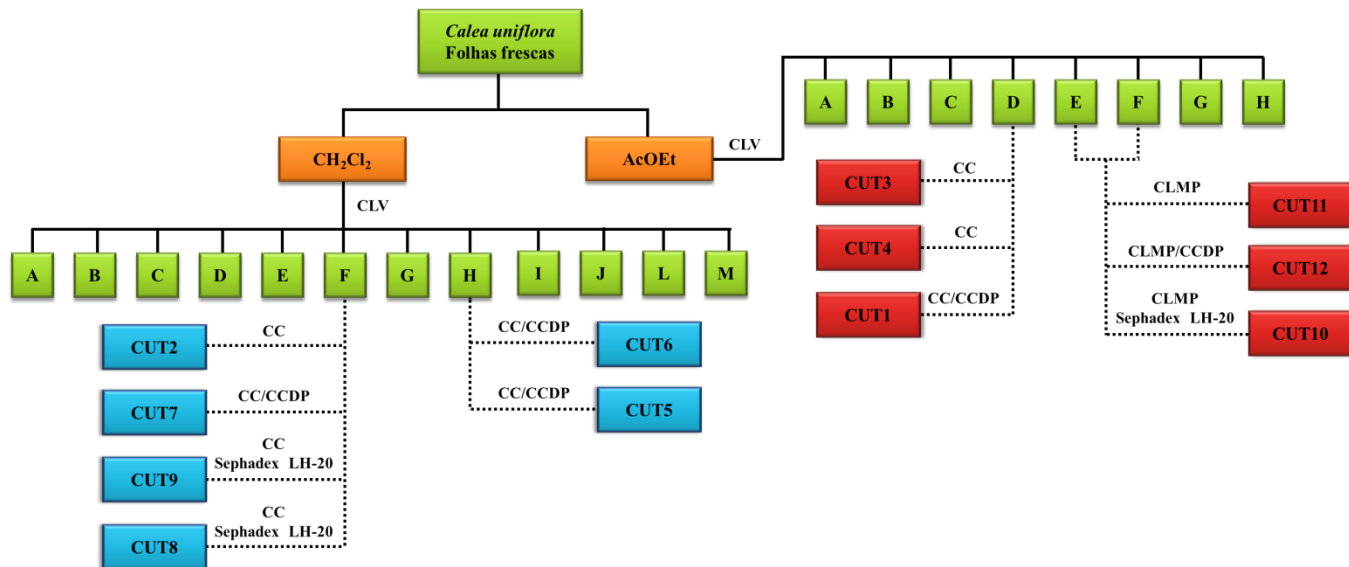


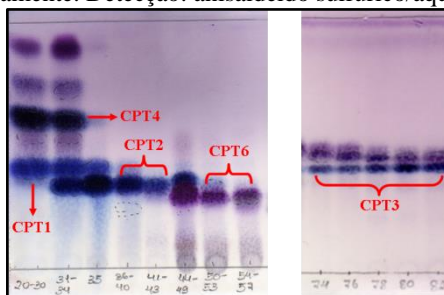
Figura 15 – Fluxograma resumindo os procedimentos cromatográficos realizados com a espécie *C. uniflora* e os respectivos compostos isolados das frações diclorometano e acetato de etila.



4.5.1 Isolamento de substâncias da fração hexano de *C. pinnatifida* (1ª coleta)

Uma alíquota da fração hexano (2,0 g) de *C. pinnatifida* foi submetida à CC, empregando sílica gel como fase estacionária e, misturas binárias de hexano e acetona (100:0, 98:2, 95:5, 90:10, 70:30, 50:50 e 0:100, respectivamente), como fase móvel. As frações obtidas foram monitoradas por CCDA e, após análise do perfil cromatográfico, as mesmas foram agrupadas conforme similaridade do fator de retenção (Rf). Este procedimento cromatográfico resultou no isolamento da substância CPT6 (5,0 mg), e na obtenção de algumas frações ricas em cromenos. Essas frações enriquecidas em cromenos foram posteriormente purificadas por CCDP (cromatografia em camada delgada preparativa) em hexano-acetona (85:15 ou 60:40, v/v), fornecendo quatro compostos codificados como: CPT1 (8,0 mg), CPT2 (18,0 mg), CPT3 (5,0 mg) e CPT4 (4,0 mg) (Figura 14). A Figura 16 apresenta a CCDA de algumas frações da CC contendo os compostos isolados descritos acima.

Figura 16 – CCDA em sílica gel de algumas frações contendo os compostos CPT1, CPT2, CPT3, CPT4 e CPT6. Fase móvel: hexano-acetona 9:1 e 8:2, respectivamente. Detecção: anisaldeído sulfúrico/aquecimento.



4.5.2 Isolamento de substâncias da fração diclorometano de *C. pinnatifida* (2ª coleta)

A fração diclorometano (7,4 g) foi submetida à técnica de CLV, empregando sílica gel de fase normal como fase estacionária e, como fase móvel, gradiente de solventes com polaridade crescente (hexano, acetona e MeOH). Esse procedimento cromatográfico forneceu dez subfrações (A, B, C, D, E, F, G, H, I e J). O sistema de eluição utilizado,

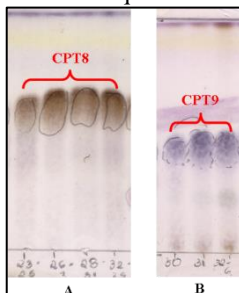
bem como o volume de solvente e a massa de cada subfração obtida estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 – Esquema de eluição utilizado no fracionamento por CLV da fração diclorometano de *C. pinnatifida*.

Fase móvel	Volume utilizado (mL)	Subfração	Massa obtida (mg)
Hexano puro	800	A	3,0
Hexano-acetona 85:15	700	B	29,0
Hexano-acetona 70:30	500	C	193,0
Hexano-acetona 55:45	500	D	1.690
Hexano-acetona 40:60	500	E	1.170
Hexano-acetona 25:75	500	F	926,0
Hexano-acetona 10:90	500	G	394,0
Acetona-MeOH 90:10	500	H	1.067
Acetona-MeOH 70:30	500	I	802,0
MeOH puro	800	J	1.150

Uma alíquota da subfração D (500 mg) foi purificada em coluna cromatográfica de sílica gel, utilizando como eluente misturas binárias de hexano- CHCl_3 , CHCl_3 -AcOEt e AcOEt-MeOH em gradiente crescente de polaridade. Foram coletadas 158 frações, as quais foram analisadas por CCDA e agrupadas em 35 frações conforme a similaridade cromatográfica. Este procedimento resultou no isolamento da substância CPT7 (7,0 mg). A fração F44-50 foi posteriormente purificada por CCDP em hexano-acetona (75:25, v/v), fornecendo um composto codificado como CPT5 (3,8 mg). Além disso, as frações F76-83 e F84-89 foram submetidas a um novo fracionamento cromatográfico em coluna, empacotadas com a fase estacionária Sephadex[®] LH-20, empregando CHCl_3 e acetona como fases móveis, respectivamente. Destes procedimentos foram obtidas 39 e 36 frações, as quais foram reunidas por similaridade em CCDA, sendo possível o isolamento de dois compostos: CPT8 (56,3 mg) e CPT9 (17,5 mg), respectivamente (Figura 14). A Figura 17 apresenta a CCDA das substâncias CPT8 (**A**) e CPT9 (**B**).

Figura 17 – CCDA em sílica gel dos compostos CPT8 (A) e CPT9 (B). Fase móvel: CHCl_3 -AcOEt 75:25 e 70:30, respectivamente. Detecção: anisaldeído sulfúrico/aquecimento.



4.5.3 Isolamento de substâncias da fração acetato de etila de *C. pinnatifida* (2ª coleta)

Uma alíquota da fração acetato de etila (4,9 g) foi submetida ao processo de fracionamento por CLV, utilizando sílica gel como fase estacionária e os solventes CH_2Cl_2 , AcOEt e MeOH (em proporções variadas) como fase móvel. Esse fracionamento cromatográfico resultou em oito subfrações (A, B, C, D, E, F, G e H). O volume de solvente empregado na CLV, o sistema de eluição e a massa de cada subfração obtida estão especificados na Tabela 3.

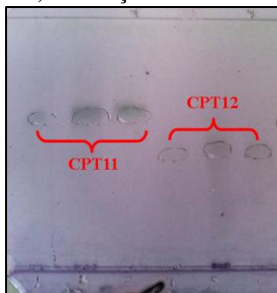
Tabela 3 – Esquema de eluição utilizado no fracionamento por CLV da fração acetato de etila de *C. pinnatifida*.

Fase móvel	Volume utilizado (mL)	Subfração	Massa obtida (mg)
CH_2Cl_2 -AcOEt 50:50	600	A	25,5
CH_2Cl_2 -AcOEt 30:70	700	B	80,0
AcOEt puro	500	C	130,5
AcOEt-MeOH 80:20	500	D	2.620
AcOEt-MeOH 60:40	500	E	1.630
AcOEt-MeOH 40:60	500	F	250,0
AcOEt-MeOH 20:80	500	G	94,0
MeOH puro	700	H	74,0

A subfração C (126,5 mg) foi submetida a um fracionamento por Cromatografia Líquida de Média Pressão (CLMP), utilizando-se uma coluna Lobar Lichroprep[®] de sílica de fase reversa (C18) como fase estacionária, e misturas de H₂O-MeOH como fase móvel. Foram obtidas 73 frações, as quais foram monitoradas por CCDA e reunidas de acordo com o perfil cromatográfico. A fração F50-53, eluída com H₂O-MeOH (60:40), forneceu 22,7 mg da substância CPT10 (Figura 14).

Uma alíquota da subfração E (1.000 mg) foi submetida à CC, utilizando-se Sephadex LH-20 como fase estacionária, e acetona-MeOH (1:1, v/v) como fase móvel. Foram obtidas 37 frações. As frações coletadas foram monitoradas por CCDA e reunidas de acordo com a similaridade cromatográfica. Uma alíquota da fração F16-19 (60 mg) foi submetida a um novo fracionamento por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em cromatógrafo Shimadzu SCL-10ADVP com injeção manual, equipado com duas bombas LC-10AD e detector UV-VIS SPD-10AV. As análises foram realizadas empregando-se uma coluna de fase reversa C18 Phenomenex Luna (250 x 10 mm, 10 µm) como fase estacionária e; uma mistura de ACN-H₂O (20:80, v/v), contendo 1% de ácido fórmico na fase aquosa, como fase móvel. Todas as análises foram realizadas em modo isocrático, com fluxo de 1,5 mL/min, detecção no UV a 325 nm e volume de injeção de 1,0 mL. Ao fim destas análises, foram obtidas duas substâncias codificadas como CPT11 (6,4 mg) e CPT12 (10,3 mg) (Figura 14). A Figura 18 apresenta a CCDA das substâncias CPT11 e CPT12.

Figura 18 – CCDA em fase reversa dos compostos CPT11 e CPT12. Fase móvel: H₂O-MeOH (60:40). Detecção: anisaldeído sulfúrico/aquecimento.



4.5.4 Isolamento de substâncias da fração diclorometano de *C. uniflora*

Uma alíquota da fração diclorometano (3,0 g) de *C. uniflora* foi submetida a um fracionamento preliminar por CLV, empregando sílica gel de fase normal como fase estacionária e hexano, CH₂Cl₂, AcOEt e MeOH, puros ou em misturas binárias, como sistema de eluição. Após a evaporação dos solventes em evaporador rotativo obtiveram-se doze subfrações (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, L e M). O volume de solvente utilizado na CLV, o sistema de eluição empregado e a massa de cada subfração obtida estão especificados na Tabela 4.

Tabela 4 – Esquema de eluição utilizado no fracionamento por CLV da fração diclorometano de *C. uniflora*.

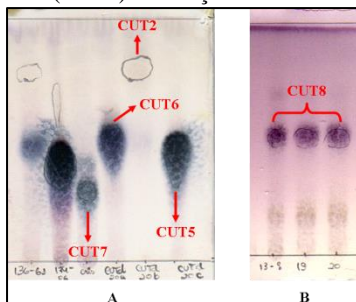
Fase móvel	Volume utilizado (mL)	Subfração	Massa obtida (mg)
Hexano-CH ₂ Cl ₂ 70:30	400	A	16,0
Hexano-CH ₂ Cl ₂ 50:50	200	B	3,0
Hexano-CH ₂ Cl ₂ 30:70	200	C	0,9
CH ₂ Cl ₂ puro	200	D	0,9
CH ₂ Cl ₂ -AcOEt 90:10	400	E	127,0
CH ₂ Cl ₂ -AcOEt 80:20	400	F	661,0
CH ₂ Cl ₂ -AcOEt 60:40	400	G	705,0
CH ₂ Cl ₂ -AcOEt 40:60	400	H	650,0
CH ₂ Cl ₂ -AcOEt 20:80	400	I	137,0
AcOEt puro	400	J	49,0
AcOEt-MeOH 70:30	400	L	344,0
AcOEt-MeOH 50:50	400	M	307,0

A subfração F (661 mg) foi submetida à CC, utilizando-se sílica gel como fase estacionária e misturas de hexano-AcOEt e AcOEt-MeOH como fases móveis. Foram coletadas 240 frações de 40 mL cada. As frações coletadas foram monitoradas por CCDA e as amostras que possuíam mesmo R_f foram reunidas. A fração F114-144, eluída com hexano-AcOEt (80:20), forneceu 76,3 mg da substância CUT2. A fração F130-139 foi submetida a um novo processo de purificação por CCDP,

eluída com CH_2Cl_2 -AcOEt (75:25, v/v), obtendo-se o composto CUT7 (2,5 mg). Além disso, as frações F69-78 e F207-213 foram purificadas em coluna de Sephadex LH-20, empregando acetona-MeOH (1:1) como sistema de eluição. Dos procedimentos de purificação por exclusão molecular em Sephadex LH-20 foram obtidas 25 e 31 frações, respectivamente. Essas frações foram agrupadas por similaridade em CCDA, sendo possível o isolamento de dois compostos: CUT9 (17,9 mg), a partir da fração F69-78, e CUT8 (5,2 mg) de F207-213 (Figura 15). A Figura 19 apresenta a CCDA de CUT2, CUT7 (A) e CUT8 (B).

A subfração H (650 mg) foi purificada em CC de sílica gel, empregando-se os seguintes solventes: CH_2Cl_2 , AcOEt e MeOH (puros ou em misturas binárias). Foram obtidas 270 frações. As frações coletadas foram monitoradas por CCDA e reunidas de acordo com a similaridade cromatográfica. Ao fim desta coluna, as frações F136-161 e F174-186 foram purificadas por CCDP, obtendo-se as substâncias CUT6 (12,2 mg) e CUT5 (77,9 mg), respectivamente (Figura 15). A Figura 19 apresenta a CCDA das substâncias CUT5 e CUT6 (A).

Figura 19 – CCDA em sílica gel de CUT2, CUT5, CUT6, CUT7 (A) e CUT8 (B). Fase móvel: CH_2Cl_2 -AcOEt (70:30). Detecção: anisaldeído sulfúrico/aquecimento.



4.5.5 Isolamento de substâncias da fração acetato de etila de *C. uniflora*

Uma alíquota da fração acetato de etila (6,0 g) foi submetida ao processo de fracionamento por CLV, utilizando sílica gel como fase estacionária e os solventes hexano, AcOEt, acetona e MeOH (em proporções variadas) como fase móvel. Esse fracionamento cromatográfico originou oito subfrações (A, B, C, D, E, F, G e H). O volume de solvente empregado na CLV, o sistema de eluição e a massa de cada subfração obtida estão especificados na Tabela 5.

Tabela 5 – Esquema de eluição utilizado no fracionamento por CLV da fração acetato de etila de *C. uniflora*.

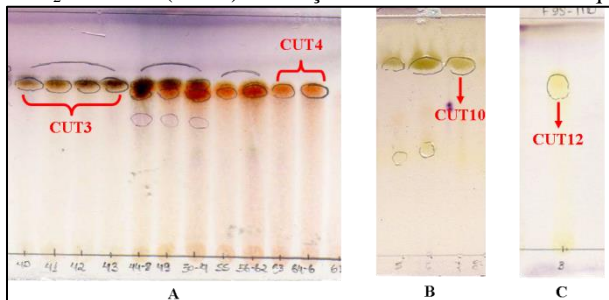
Fase móvel	Volume utilizado (mL)	Subfração	Massa obtida (mg)
Hexano-AcOEt 90:10	300	A	20,0
Hexano-AcOEt 70:30	400	B	70,0
Hexano-AcOEt 50:50	400	C	460,0
Hexano-AcOEt 30:70	400	D	2.500
Hexano-AcOEt 10:90	400	E	1.090
AcOEt-acetona 50:50	400	F	190,0
Acetona pura	400	G	874,0
Acetona-MeOH 50:50	400	H	796,0

A subfração D (2.500 mg) foi fracionada por CC em sílica gel, utilizando como eluente misturas binárias de CH_2Cl_2 -MeOH em gradiente crescente de polaridade. Foram obtidas 151 frações, as quais foram monitoradas por CCDA, e as amostras que possuíam mesmo Rf foram reunidas em 16 grupos. Este fracionamento cromatográfico resultou no isolamento dos compostos CUT3 (61,9 mg) e CUT4 (122,7 mg). Além disso, a fração F77-87 foi purificada por CCDP em CH_2Cl_2 -MeOH (85:15, v/v), fornecendo 6,0 mg do composto CUT1 (Figura 15). A Figura 20 apresenta a CCDA das substâncias CUT3 e CUT4 (A).

As subfrações E e F foram monitoradas por CCDA e reunidas por apresentarem perfil cromatográfico semelhante. As mesmas (1.280 mg) foram submetidas a um fracionamento por CLMP, utilizando-se uma coluna Lobar Lichroprep® de sílica de fase reversa (C18) como fase estacionária, e misturas de H_2O -MeOH como fase móvel. Foram obtidas 171 frações, as quais foram monitoradas por CCDA e reunidas de acordo com o perfil cromatográfico. A fração F122-134, eluída com H_2O -MeOH (70:30, v/v), forneceu 12,4 mg da substância CUT11. A fração F98-110 foi submetida a um novo processo de purificação por CCDP, eluída com CH_2Cl_2 -MeOH (70:30, v/v), obtendo-se o composto CUT12 (5,0 mg). Além disso, a fração F10-22 foi purificada em coluna de Sephadex LH-20, empregando MeOH como sistema de eluição. Foram coletadas 15 frações deste procedimento cromatográfico, as quais foram agrupadas por similaridade em CCDA, sendo possível o

isolamento da substância CUT10 (70,6 mg) (Figura 15). A Figura 20 apresenta a CCDA das substâncias CUT10 (B) e CUT12 (C).

Figura 20 – CCDA em sílica gel de CUT3 e CUT4 (A). Fase móvel: CH_2Cl_2 -MeOH (85:15). CCDA em fase reversa dos compostos CUT10 (B) e CUT12 (C). Fase móvel: H_2O -MeOH (50:50). Detecção: anisaldeído sulfúrico/aquecimento.



4.6 ENSAIOS BIOLÓGICOS *in vitro* FRENTE ÀS FORMAS AMASTIGOTAS INTRACELULARES DE *Leishmania amazonensis* e *Trypanosoma cruzi*

A avaliação da atividade antiprotozoária *in vitro* foi realizada pela Dra. Milene H. Moraes em parceria com o professor Dr. Mário Steindel (Laboratório de Protozoologia – UFSC).

A linhagem celular de leucemia monocítica aguda THP-1 (ATCC TIB202) (células coletadas no 3º ou 4º dia de crescimento) foi cultivada em placas de 96 poços em meio de cultura RPMI-1640 na ausência de vermelho de fenol (Sigma-Aldrich, CO. St. Louis, MO, EUA) e suplementada com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Life Technologies, EUA), 12,5 mM de tampão HEPES, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 2 mM de Glutamax® a temperatura de 37 °C em atmosfera de 5% de CO_2 . Posteriormente, essa cultura de células ($4,0 \times 10^4$ células/poço) foi acrescida de 100 ng/mL de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) durante 72 horas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO_2 , a fim induzir a sua diferenciação em fagócitos aderentes semelhantes a macrófagos (SCHWENDE et al., 1996).

As formas promastigotas de *L. amazonensis* MHOM/BR/77/LTB0016, expressando a enzima β -galactosidase, foram obtidas em meio Schneider (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) acrescido com 5% de SFB inativado e 2% de urina humana. As culturas

foram mantidas a 26 °C por meio de repiques semanais em garrafas de cultura celular em meio Schneider.

As formas intracelulares amastigotas a serem utilizadas no *screening* leishmanicida foram obtidas a partir do cultivo de promastigotas. Após quatro dias de cultivo; uma suspensão de promastigotas, em fase logarítmica tardia de crescimento, foi coletada por centrifugação e lavada duas vezes com PBS (Tampão Salino Fosfato, pH 7,4). A concentração de parasitas foi ajustada para $4,0 \times 10^6$ células/mL em meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 10% de soro humano AB⁺ por 1 hora a 34 °C em estufa para opsonização do parasita. Em seguida, a suspensão de promastigotas opsonizadas foi adicionada sobre as células THP-1 na proporção de parasitas/célula 10:1 e incubada durante 4 horas a 34 °C em atmosfera de 5% de CO₂. Após este período, os parasitas não internalizados nas células foram removidos por meio de uma lavagem com PBS e, as células infectadas foram incubadas por 24 horas com 180 µL de meio RPMI-1640 suplementado completo a fim de permitir a transformação das promastigotas em amastigotas intracelulares.

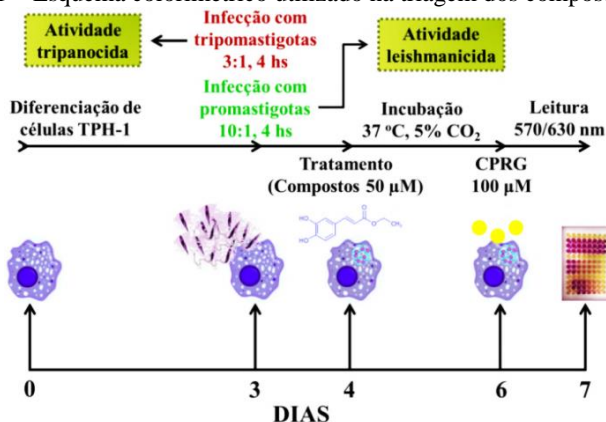
A espécie *Trypanosoma cruzi* β-galactosidase, cepa Tulahuen, foi fornecida pelo Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular, Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ, Belo Horizonte. As formas tripomastigotas, derivadas de cultura de células de fibroblastos L929 infectadas, foram utilizadas para infectar as células de macrófagos THP-1 diferenciadas ($4,0 \times 10^4$ células/poço) em microplacas de 96 poços, numa proporção de parasitas/célula 3:1; e incubadas *overnight* a 37 °C em estufa com 5% de CO₂. O meio contendo os parasitas não internalizados foi removido e substituído por 180 µL de meio de cultura fresco (BUCKNER et al., 1996).

Todos os compostos avaliados foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) e diluídos nas concentrações seriadas de 50 a 1,56 µM. Uma monocamada de células infectadas foi tratada pela adição de 20 µL de cada composto testado, seguido por incubação em estufa durante 48 horas a 34 ou 37 °C em atmosfera contendo 5% de CO₂. Após o tratamento, as células foram cuidadosamente lavadas com PBS e incubadas durante 16 horas a 37 °C com 250 µL do substrato cromogênico clorofenol vermelho-β-D-galactopiranosídeo 100 µM (CPRG) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA) e Nonidet P-40 0,1% (NP-40) (Amresco Inc., Solon, Ohio, EUA). A densidade óptica foi lida em comprimento de onda de 570/630 nm em equipamento TECAM®, modelo Infinite M200. Os ensaios biológicos foram realizados em triplicata e repetidos pelo menos duas vezes para avaliar a

reprodutibilidade dos resultados e a manutenção da atividade dos compostos em solução. A determinação da concentração que inibe em 50% o crescimento dos parasitas (CI_{50}) foi calculada a partir de curvas concentração-resposta por regressão não linear. Anfotericina B (Bristol-Myers, Squibb) e benznidazol (Sigma) foram utilizados como controle positivo nos ensaios leishmanicida e tripanocida, respectivamente; e DMSO 1% foi empregado como controle negativo.

A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio com brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT), conhecido como método colorimétrico MTT. Essa técnica consiste na incorporação do MTT por células viáveis que reduzem o composto através da ação de desidrogenases mitocondriais, formando um sal de formazana insolúvel e com coloração roxa, o qual se deposita no citoplasma. Dessa forma, a redução de MTT à formazana é diretamente proporcional ao número de células viáveis em cultura. Para realização desse ensaio de citotoxicidade, as células THP-1 ($6,0 \times 10^4$ por poço) foram semeadas em microplacas de 96 poços e diferenciadas com 100 ng/mL de PMA durante 72 horas a 37 °C em atmosfera contendo 5% de CO_2 . Em seguida, 20 μ L dos compostos testados, diluídos em meio de cultura em concentrações decrescentes de 500 a 15,6 μ M ou DMSO 1% (controle negativo), foram adicionados sobre as células e cultivados por 72 horas a 37 °C em atmosfera contendo 5% de CO_2 . A absorbância foi determinada em leitor de microplacas (TECAN) a 540 nm, e os resultados foram expressos em CC_{50} (concentração citotóxica 50%). O procedimento do ensaio colorimétrico usado na triagem dos compostos está esquematizado na Figura 21.

Figura 21 – Esquema colorimétrico utilizado na triagem dos compostos testados.



5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS E PARTICIONAMENTO LÍQUIDO-LÍQUIDO

Para a preparação dos extratos brutos de ambas as espécies *C. uniflora* e *C. pinnatifida* empregou-se EtOH 92% como líquido extrator devido à sua baixa toxicidade, baixo risco ambiental e elevada polaridade, o que o torna capaz de extrair uma grande variedade de metabólitos secundários. Os valores dos rendimentos provenientes dos extratos das folhas de *C. uniflora* e *C. pinnatifida* estão apresentados na Tabela 6. De modo geral, os extratos brutos das duas espécies apresentaram bons rendimentos de massa bruta, haja vista que o material vegetal empregado no processo extrativo foi fresco e, por conseguinte, apresentava elevados teores de água.

Tabela 6 – Rendimentos das extrações das folhas de *C. uniflora* e *C. pinnatifida*.

Extratos	Material vegetal fresco	Massa bruta(g)	Rendimento%
<i>C. uniflora</i>	2.300	104,0	4,52
<i>C. pinnatifida</i> (1ª coleta)	800	12,0	1,5
<i>C. pinnatifida</i> (2ª coleta)	2.600	142,0	5,45

O particionamento com solventes de polaridades distintas (hexano, CH₂Cl₂ e AcOEt) possibilitou o fracionamento do extrato bruto em grupos de constituintes químicos com coeficientes de partição semelhantes. Hexano é considerado um solvente de baixa polaridade, extraindo compostos químicos mais apolares (graxas, óleos voláteis, esteroides, triterpenos). Enquanto isso, CH₂Cl₂ e AcOEt são solventes de polaridade intermediária, sendo capazes de solubilizar metabólitos secundários mais polares (lactonas sesquiterpências, alcaloides, derivados fenólicos em sua formas agliconas). Desta forma, foi possível realizar uma semipurificação das substâncias presentes no extrato bruto.

5.2 IMPRESSÃO DIGITAL METABÓLICA DOS EXTRATOS E FRAÇÕES ORGÂNICAS DAS ESPÉCIES *C. uniflora* E *C. pinnatifida* E DESREPLICAÇÃO

Impressão digital química ou *fingerprinting* metabólico é a análise de um conjunto de amostras de maneira simples e rápida visando à obtenção do perfil metabólico característico de um organismo sob determinadas condições. As análises de *fingerprinting* não têm por finalidade identificar cada metabólito detectado, mas sim comparar e classificar perfis ou modelos metabólicos que podem variar em resposta a perturbações genéticas ou ambientais, podendo ainda identificar substâncias discriminantes ou biomarcadores (DETTMER; ARONOV; HAMMOCK, 2007; KRASTANOV, 2010; VILLAS-BÔAS & GOMBERT, 2007). Por sua vez, a técnica de desreplcação (do inglês, *dereplication*) refere-se à rápida identificação de metabólitos secundários conhecidos em uma espécie em estudo, sendo uma ferramenta bastante útil na detecção de novos compostos bioativos na presença de substâncias ativas conhecidas. No entanto, essa não é uma tarefa fácil, haja vista que os metabólitos secundários ocorrem numa vasta gama de concentrações nos produtos naturais, juntamente com enormes variações na sua composição e propriedades físicas e químicas. Dessa forma, são necessários métodos analíticos confiáveis, robustos e seletivos para identificar esses metabólitos em amostras complexas (ABDELMOHSEN et al., 2014; YULIANA et al., 2011).

As impressões digitais dos extratos e frações orgânicas foram obtidas por UHPLC-UV(DAD)-MS. Os cromatogramas dos diferentes extratos e frações foram acessados e, em cada tempo de retenção (t_R), o espectro no UV foi analisado para identificar a classe química das substâncias presentes. Além disso, o espectro de massas também foi empregado para obter a massa monoisotópica dos íons pico base bem como os fragmentos originados nos modos de ionização positivo e negativo. Dessa forma, mediante comparação dos dados de t_R , curvas de absorção no UV e espectro de massas com os bancos de dados AsterDB e DNP e/ou dados da literatura sobre a composição química do gênero *Calea*, foi possível sugerir algumas substâncias presentes nos extratos das duas espécies em estudo.

A análise dos perfis químicos de *C. uniflora* e *C. pinnatifida* demonstrou a presença de LST, flavonoides, derivados do ácido hidroxicinâmico, entre outros compostos fenólicos. Os flavonoides apresentam intensa absorção no UV, exibindo duas bandas de absorção características: banda II (anel A) com máximo de absorção entre 240-

295 nm e banda I (anel B) com máximo de absorção entre 300-550 nm, com variações que dependem da classe do flavonoide e da presença de grupos substituintes (auxócromos) (ANDERSEN & MARKHAM, 2006; GOBBO-NETO & LOPES, 2008; ROBARDS & ANTOLOVICH, 1997). Por sua vez, os derivados do ácido hidroxí-cinâmico, componentes majoritários nos extratos e frações orgânicas, apresentam caracteristicamente duas bandas de absorção máxima no UV: uma em torno de 300 nm e outra em torno de 320 nm (CLIFFORD et al., 2003; GOBBO-NETO & LOPES, 2008). As LST, detectadas em quantidades menores do que o esperado nas amostras, absorvem em torno de 220 nm quando apresentam duplas ligações conjugadas heteroanulares ou duplas exocíclicas conjugadas à carbonila como grupos cromóforos (SCHMIDT, 1999; MERFORT, 2002; SILVERSTEIN; BASSLER; MORRIL, 1979). É importante salientar que anéis γ -lactônicos α,β -insaturados com ligação dupla exocíclica conjugada à carbonila são bastante comuns no gênero *Calea*. Além disso, tendo em vista que algumas LST não possuem cromóforos relevantes, alguns compostos dessa classe química podem não ter sido detectados nas análises por UHPLC-UV-DAD. As Figuras 22 e 23 apresentam os cromatogramas com os perfis químicos obtidos por UHPLC-UV-DAD das espécies *C. pinnatifida* e *C. uniflora*, respectivamente.

A desrepliação do extrato bruto de *C. pinnatifida* possibilitou a identificação de nove substâncias por comparação com os bancos de dados AsterDB e DNP. Essa espécie apresentou em sua composição química basicamente derivados fenólicos (derivados do ácido hidroxí-cinâmico, flavonoides e cromenos). Além disso, alguns dos compostos identificados tiveram a confirmação das suas estruturas químicas pela coinjeção de substâncias puras e análise dos seus padrões de fragmentação MS/MS obtidos no mesmo equipamento. A Figura 24 apresenta os cromatogramas de íons totais (TIC) do extrato bruto da espécie *C. pinnatifida* obtidos nos modos negativo e positivo, respectivamente.

Figura 22 – Cromatogramas ($\lambda = 214, 254$ e 325 nm) do extrato bruto e frações orgânicas (diclorometano, acetato e metanol), respectivamente, de *C. pinnatifida* obtidos por UHPLC-UV-DAD (Fase móvel: H_2O -ACN, com gradiente de eluição; coluna ACE C18, 150×3 mm, $3 \mu m$; vazão da fase móvel $0,4$ mL/min). RT: 0,00 - 30,00

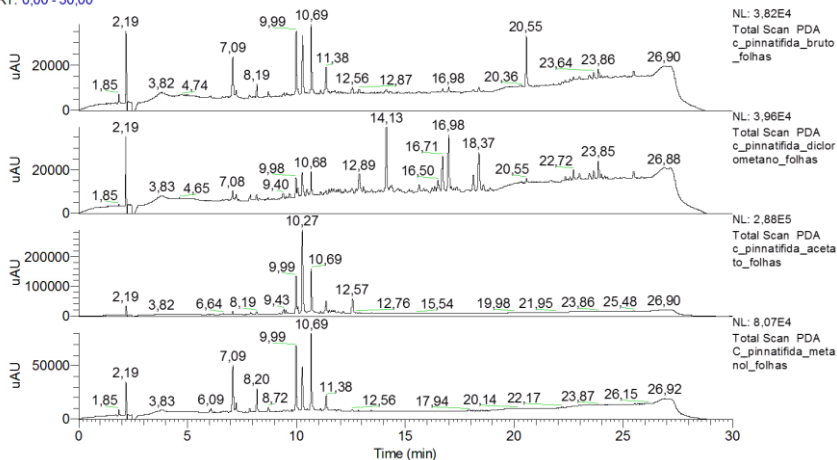


Figura 23 – Cromatogramas ($\lambda = 214, 254$ e 325 nm) do extrato bruto e frações orgânicas (diclorometano, acetato e metanol), respectivamente, de *C. uniflora* obtidos por UHPLC-UV-DAD (Fase móvel: H_2O -ACN, com gradiente de eluição; coluna ACE C18, 150×3 mm, $3 \mu m$; vazão da fase móvel $0,4$ mL/min). RT: 0,00 - 30,00

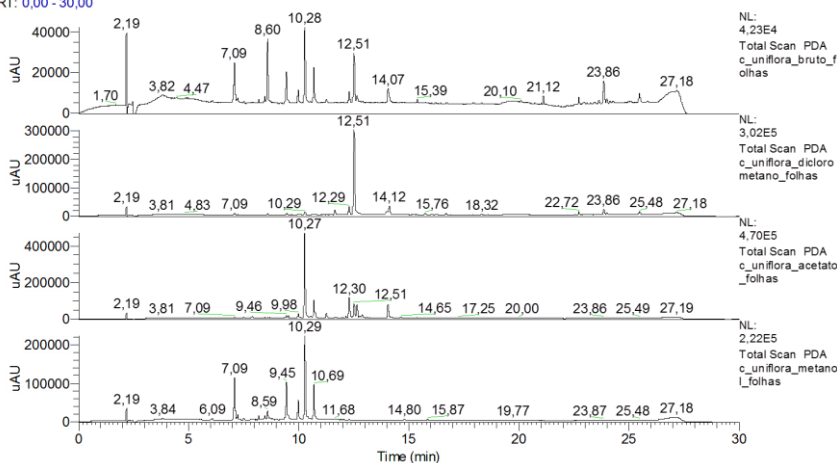
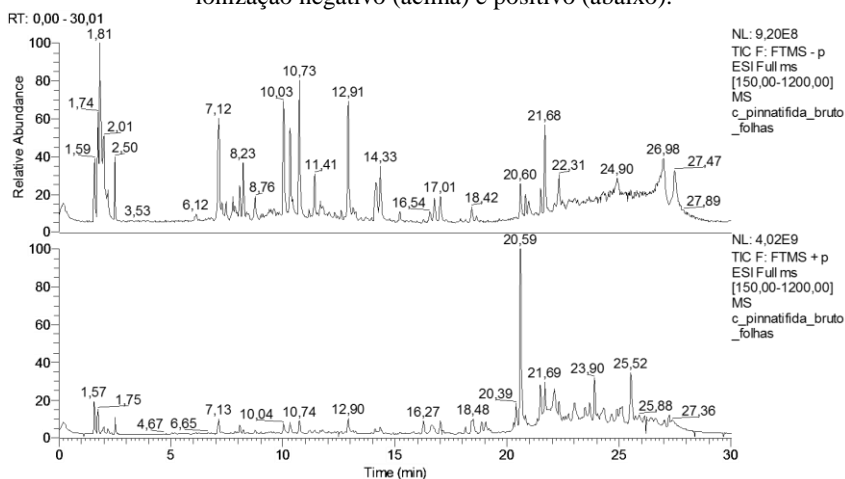


Figura 24 – Cromatogramas de íons totais (TIC) do extrato bruto de *C. pinnatifida* obtidos a partir das análises por UHPLC-DAD-MS nos modos de ionização negativo (acima) e positivo (abaixo).



Os derivados do ácido hidroxi-cinâmico foram identificados por meio dos espectros no UV e pelos espectros de massas (íons pico base e fragmentos característicos). Para tal, foi empregado o esquema hierárquico para identificação de ácidos clorogênicos desenvolvido por Clifford e colaboradores (2003, 2005, 2006, 2007). A tabela 7 contém a identificação de alguns constituintes do extrato bruto de *C. pinnatifida* com correspondentes tempos de retenção, dados de espectrometria de massas e no UV obtidos por UHPLC-DAD-MS.

O pico cromatográfico com t_R de 7,12 min é sugestivo do ácido 3-*O*-cafeoilquínico (3-ACQ), conhecido como ácido clorogênico. Este pico apresentou o íon pico base de m/z 355 $[M+H]^+$ no modo positivo e m/z 353 $[M-H]^-$ no modo negativo. Além disso, o 3-ACQ apresentou o íon fragmento de m/z 191 $[(M-H) - CAF]^-$ referente à perda de uma unidade cafeoila (CAF) no modo de ionização negativo (CLIFFORD et al., 2003; CLIFFORD; KNIGHT; KUHNERT, 2005; JANDA et al., 2009). Para melhor diferenciação dos outros isômeros cafeoilquínicos (4-ACQ e 5-ACQ), os dados obtidos (t_R , espectro de massas e fragmentação) também foram comparados com os reportados por Faleiro (2014), no qual foi realizada a desreplicação de extratos de *Aldama* La Llave empregando o mesmo método utilizado nesse trabalho.

O pico cromatográfico com t_R de 7,94 min corresponde ao ácido cafeico (ACAF), apresentando o íon pico base de m/z 163 $[(M+H) - H_2O]^+$ no modo positivo, formado a partir da desidratação do ácido cafeico; e o pico íon base de m/z 179 $[M-H]^-$ no modo de ionização negativo (WANG et al., 2012).

O pico cromatográfico com t_R de 8,76 min foi identificado como o ácido 3-*O*-feruloilquínico (3-AFQ), apresentando o íon pico base de m/z 369 $[M+H]^+$ no modo de ionização positivo e o íon de m/z 367 $[M-H]^-$ no modo negativo, baseado na descrição de Clifford et al. (2003) e comparação com dados de Faleiro (2014).

O pico cromatográfico com t_R de 9,46 min é sugestivo da quercetina 3-*O*- β -D-glicopiranosídeo (isoquercitrina, ISOQ), apresentando o íon pico base de m/z 465 $[M+H]^+$ no modo positivo e o íon de m/z 463 $[M-H]^-$ no modo negativo. Além disso, a isoquercitrina apresentou o íon fragmento de m/z 301 $[(M-H) - \text{Glicose}]^-$ correspondente à perda da molécula glicose no modo negativo (BRITO et al., 2014; LAMBERT et al., 2015). Ainda, o padrão dessa substância foi injetado para comparação dos espectros no UV e de massas.

Os picos com t_R de 10,03; 10,31 e 10,73 min correspondem aos ácidos dicafeoilquínicos (diACQ), sendo identificados como 3,4-diACQ, 3,5-diACQ e 4,5-diACQ, respectivamente. No modo de ionização positivo, esses compostos apresentaram os íons de m/z 517 $[M+H]^+$ e m/z 499 $[(M+H) - H_2O]^+$, sendo o segundo originado a partir da perda de uma molécula de água do ácido diACQ. Enquanto isso, no modo de ionização negativo foi observado o íon de m/z 515 $[M-H]^-$ como íon pico base. A identificação inequívoca desses três isômeros foi realizada pela ordem de eluição e seus padrões de fragmentação (CLIFFORD et al. 2003; CLIFFORD; KNIGHT; KUHNERT, 2005; JAISWAL et al., 2014).

O pico cromatográfico com t_R de 14,15 min é sugestivo do cafeato de etila (CAFET). Este pico apresentou o íon pico base de m/z 209 $[M+H]^+$ no modo de ionização positivo e o íon de m/z 207 $[M-H]^-$ no modo de ionização negativo. Além disso, o cafeato de etila apresentou o íon fragmento de m/z 179 $[(M-H) - C_2H_5]^-$ correspondente à perda do grupamento etila no modo de ionização negativo (LAMBERT et al., 2015). Ainda, um padrão do cafeato de etila foi injetado separadamente para confirmação da estrutura química.

O pico cromatográfico com t_R de 20,59 min foi identificado como o cromo metileupatoriocromo (MEUP), apresentando o íon pico base de m/z 233 $[M+H]^+$ no modo de ionização positivo.

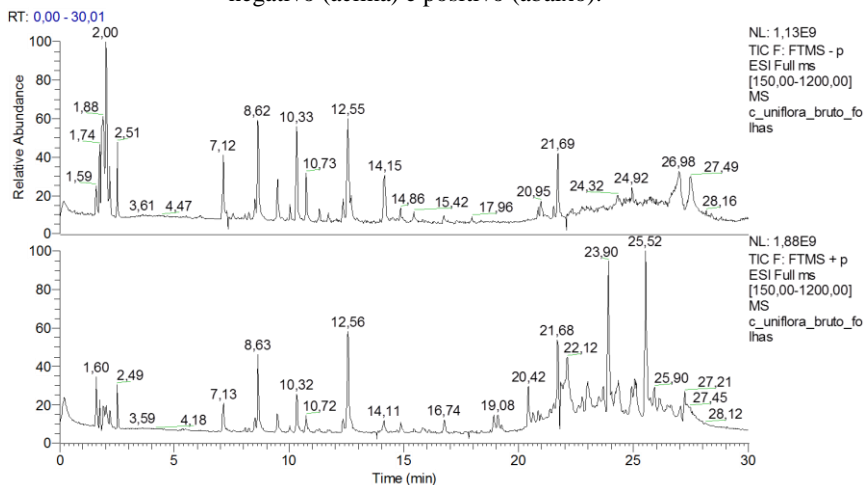
Tabela 7 – Constituintes químicos identificados no extrato bruto de *C. pinnatifida* com correspondentes tempos de retenção (t_R), dados de espectrometria de massas e no UV obtidos a partir das análises por UHPLC-DAD-MS.

t_R (min)	Substâncias sugeridas	Íons observados (m/z) nos cromatogramas TIC (UHPLC-MS) no modo positivo	Íons observados (m/z) nos cromatogramas TIC (UHPLC-MS) no modo negativo	UV _{máx} (nm)
7,12	3-ACQ	[M+H] ⁺ 355,1016 pb (erro: 3,6 ppm); [(M+H) – AQ] ⁺ 163	[M-H] ⁻ 353,0876 pb (erro: 0,8 ppm); [(M-H) – CAF] ⁻ 191	299, 326
7,94	ACAF	[(M+H) – H ₂ O] ⁺ 163,0389 pb (erro: 3,7 ppm)	[M-H] ⁻ 179,0339 pb (erro: 2,8 ppm)	296, 324
8,76	3-AFQ	[M+H] ⁺ 369,1176 pb (erro: 2,7 ppm); [(M+H) – AQ] ⁺ 177	[M-H] ⁻ 367,1028 pb (erro: 0,3 ppm)	298, 328
9,46	ISOQ	[M+H] ⁺ 465,1021 pb (erro: 2,6 ppm); [(M+H) – Glc] ⁺ 303	[M-H] ⁻ 463,0877 pb (erro: 0 ppm); [(M-H) – Glc] ⁻ 301	255, 354
10,03	3,4-diACQ	[M+H] ⁺ 517,1332 pb (erro: 2,7 ppm); [(M+H) – H ₂ O] ⁺ 499	[M-H] ⁻ 515,1184 pb (erro: 1,2 ppm); [(M-H) – AQ] ⁻ 353	297, 325
10,31	3,5-diACQ	[M+H] ⁺ 517,1331 pb (erro: 2,9 ppm); [(M+H) – H ₂ O] ⁺ 499	[M-H] ⁻ 515,1182 pb (erro: 1,6 ppm); [(M-H) – AQ] ⁻ 353	300, 327
10,73	4,5-diACQ	[M+H] ⁺ 517,1330 pb (erro: 3,0 ppm); [(M+H) – H ₂ O] ⁺ 499	[M-H] ⁻ 515,1187 pb (erro: 0,6 ppm); [(M-H) – AQ] ⁻ 353	297, 327
14,15	CAFET	[M+H] ⁺ 209,0805 pb (erro: 4,3 ppm)	[M-H] ⁻ 207,0654 pb (erro: 1,4 ppm) [(M-H) – C ₂ H ₅] ⁻ 179	300, 325
20,59	MEUP	[M+H] ⁺ 233,1169 pb (erro: 3,9 ppm)	-	283, 329

pb: pico base; ACQ: ácido cafeoilquínico; CFQ: ácido feruloilquínico; AQ: ácido quínico; Glc: glicose; CAF: cafeoila; ACAF: ácido cafeico; ISOQ: isoquercitrina; CAFET: cafeato de etila; MEUP: metileupatoriocromeno. Desreplicação considerando valores de erro < 5 ppm.

A desreplicação do extrato bruto da espécie *C. uniflora* permitiu a identificação preliminar de oito substâncias. De maneira semelhante à espécie *C. pinnatifida*, *C. uniflora* revelou-se composta basicamente por compostos fenólicos, derivados do ácido hidroxí-cinâmico e flavonoides. Os picos cromatográficos com tempo de retenção (t_R) 7,12; 7,94; 9,46; 10,03; 10,31; 10,73 e 14,15 min foram desreplicados anteriormente e correspondem as substâncias 3-ACQ, ACAF, ISOQ, 3,4-diACQ, 3,5-diACQ, 4,5-diACQ e CAFET, respectivamente. Além dessas substâncias, o pico cromatográfico com t_R de 12,56 min foi identificado como a cromona noreugenina (NOR). Este pico apresentou o íon pico base de m/z 193 $[M+H]^+$ no modo positivo e m/z 191 $[M-H]^-$ no modo negativo. O espectro no UV desse composto apresentou dois máximos de absorção, um em 248 nm e outro em 293 nm. É importante salientar que o grupo cromona (C_6-C_3) é o centro cromofórico da maioria dos compostos flavonoídicos ($C_6-C_3-C_6$), fato que justifica essas duas bandas de absorção no UV típicas de flavonoides (FREDERICE et al., 2009). Ainda, um padrão da NOR foi injetado separadamente para confirmação da estrutura química. A Figura 25 apresenta os cromatogramas de íons totais (TIC) do extrato bruto de *C. uniflora* obtidos nos modos de ionização negativo e positivo, respectivamente.

Figura 25 – Cromatogramas de íons totais (TIC) do extrato bruto de *C. uniflora* obtidos a partir das análises por UHPLC-DAD-MS nos modos de ionização negativo (acima) e positivo (abaixo).



5.3 IDENTIFICAÇÃO E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

O estudo químico das folhas de *C. uniflora* e *C. pinnatifida*, utilizando métodos convencionais de cromatografia em gel de sílica e cromatografia líquida de alta eficiência, culminou no isolamento e caracterização estrutural de 23 metabólitos secundários provenientes de diferentes classes químicas: cromenos, flavonoides nas formas agliconas e glicosiladas, lactonas sesquiterpênicas, aldeídos fenólicos, cromonas, diterpenos e derivados do ácido hidroxi-cinâmico (ácidos clorogênicos). Dos 23 metabólitos isolados, 10 foram oriundos da espécie *C. pinnatifida*, 11 da espécie *C. uniflora* e dois foram isolados de ambas as espécies. Também é importante ressaltar que todos os compostos isolados estão sendo descritos pela primeira vez para as espécies em estudo e a maioria para o gênero *Calea*.

A caracterização estrutural das substâncias isoladas foi realizada através da interpretação de seus dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C , incluindo experimentos bidimensionais como COSY, HSQC e HMBC, além de espectrometria de massas. A confirmação final de suas estruturas foi realizada por comparação com dados de RMN e dados físicos (p.f.) disponíveis na literatura. Entre os compostos isolados destacam-se as lactonas sesquiterpênicas, as quais são encontradas como componentes majoritários e característicos do gênero *Calea*.

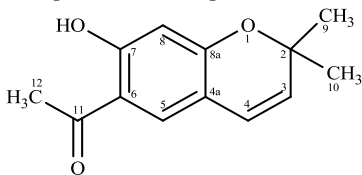
A seguir será discutida a elucidação estrutural de cada uma das substâncias obtidas. Para melhor compreensão, a caracterização dos compostos foi realizada de acordo com a espécie da qual foram isolados.

5.3.1 Investigação fitoquímica da espécie *C. pinnatifida*

5.3.1.1 Substância CPT1 (eupatoriocromeno)

O composto CPT1 (8,0 mg) (Figura 26) foi obtido da fração hexano (1ª coleta) como cristais amarelos em forma de agulhas, com ponto de fusão (p.f.) na faixa de 78-80 °C. Na análise por CCDA, esse composto apresentou-se como uma mancha com fator de retenção (Rf) 0,47 no sistema de eluição hexano:acetona (90:10, v/v). Além disso, essa substância apresentou extinção de fluorescência sob luz UV em $\lambda = 254$ nm e, fluorescência no comprimento de onda $\lambda = 366$ nm. Após revelação com solução de anisaldeído sulfúrico, esse composto desenvolveu coloração azul-marinho.

Figura 26 – Estrutura química do composto CPT1 (eupatoriocromeno).



O espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Figura 27) do composto CPT1 revelou a presença de dois simpletos largos ressonando em δ_{H} 7,31 (1H; sl; H-5) e δ_{H} 6,33 (1H; sl; H-8), indicando a presença de um anel benzeno 1,2,4,5-tetrassubstituído. Também foram observados dois dupletos de um sistema de spin AM em δ_{H} 6,28 (1H; d; $J=9,9$ Hz; H-4) e δ_{H} 5,58 (1H; d; $J=9,9$ Hz; H-3), típicos de hidrogênios olefínicos com configuração *cis*, sugerindo a ocorrência de um cromeno (benzopirano). Esta classe de metabólitos secundários foi confirmada pela presença de um simpleto intenso em δ_{H} 1,44 (6H; s; H-9 e H-10), integrando para seis hidrogênios, atribuído às duas metilas geminais localizadas no carbono C-2 do anel pirano. Um simpleto adicional em δ_{H} 2,54 (3H; s; H-12) foi sugestivo de hidrogênios de grupo metila alfa a um grupo carbonila.

Todas as atribuições dos valores de ^{13}C foram feitas com base nos experimentos de correlação heteronuclear HSQC (Figura 28) e HMBC (Figura 29). Os mapas de correlação HSQC e HMBC demonstraram a presença de 13 sinais, incluindo uma carbonila de cetona (δ_{C} 202,3), dois carbonos sp^2 aromáticos (δ_{C} 104,5 e 128,5), dois carbonos aromáticos quaternários (δ_{C} 113,8 e 113,5), dois carbonos aromáticos quaternários oxigenados (δ_{C} 160,4 e 165,2), dois carbonos olefínicos (δ_{C} 121,0 e 128,9), um carbono quaternário sp^3 oxigenado (δ_{C} 77,9) e três grupamentos metila (δ_{C} 26,1; 28,6 e 28,6).

As correlações $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ a longa distância observadas no mapa de correlação HMBC permitiram estabelecer a conectividade entre os átomos na molécula. O hidrogênio olefínico que ressona em δ_{H} 6,28 (H-4) mostrou correlação com os carbonos em δ_{C} 77,9 (C-2), 128,5 (C-5) e 160,4 (C-8a). Além disso, o hidrogênio aromático em δ_{H} 7,31 (H-5) apresentou correlação com os carbonos em δ_{C} 121,0 (C-4), 165,2 (C-7), 160,4 (C-8a) e 202,3 (C-11); e os hidrogênios metílicos em δ_{H} 1,44 (H-9 e H-10) mostraram correlação com os carbonos em δ_{C} 77,9 (C-2), 128,9 (C-3) e 28,1 (C-10). A Figura 30 apresenta algumas correlações HMBC do composto CPT1.

Os dados descritos acima são consistentes com um esqueleto 2,2-dimetil-2*H*-cromeno. Considerando-se os dados publicados na literatura (GÓMEZ-HURTADO et al., 2012; HAREL et al., 2011) e a análise dos dados espectrais de RMN 1D e 2D, o composto CPT1 (C₁₃H₁₄O₃) foi identificado como sendo o eupatoriocromeno (6-acetil-7-hidroxi-2,2-dimetil-cromeno). Vale salientar que após a caracterização desse composto por RMN, o mesmo sofreu uma nova purificação, obtendo-se 100% de pureza por CLUE-DAD (Cromatografia Líquida de Ultraeficiência acoplada a Detector de Arranjo de Diodos). A Tabela 8 apresenta uma comparação dos dados de RMN de ¹H e ¹³C do eupatoriocromeno com os dados reportados por Gómez-Hurtado e colaboradores (2012).

Figura 27 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) do composto CPT1 (eupatoriocromeno).

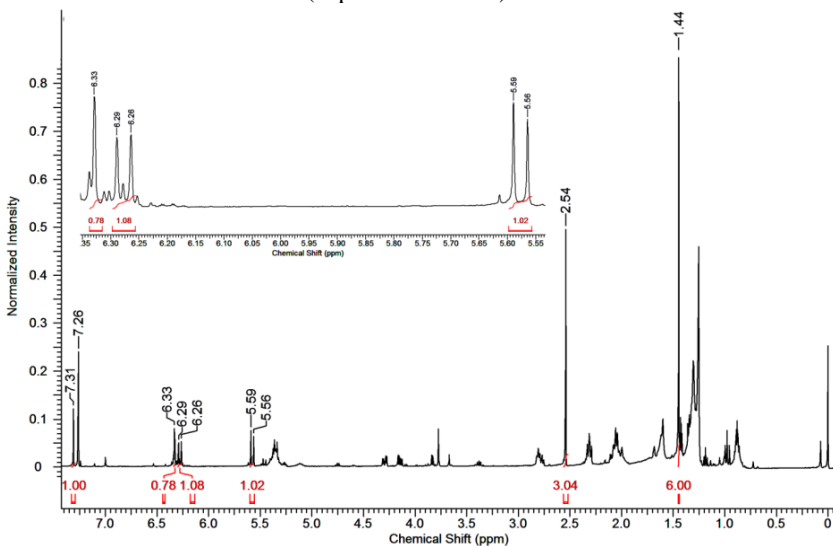


Figura 28 – Mapa de correlação HSQC (400 MHz, CDCl₃) do composto CPT1 (eupatoriocromeno).

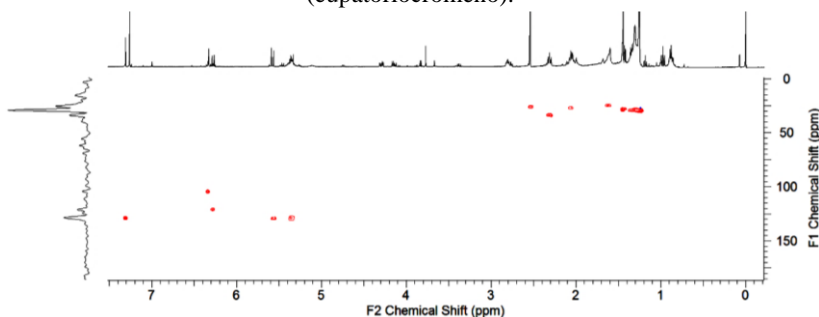


Figura 29 – Mapa de correlação HMBC (400 MHz, CDCl₃) do composto CPT1 (eupatoriocromeno).

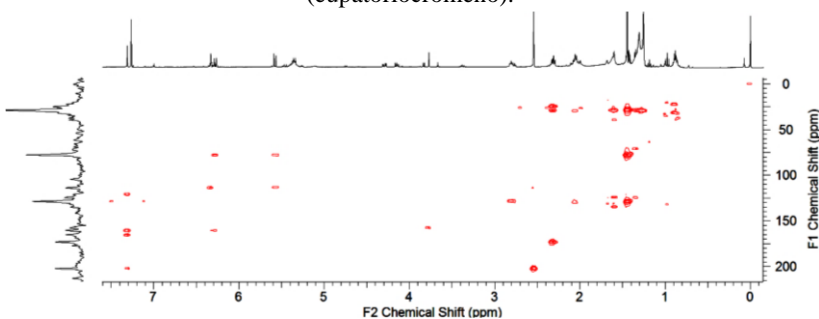


Figura 30 – Representação de algumas correlações HMBC do composto CPT1 (eupatoriocromeno).

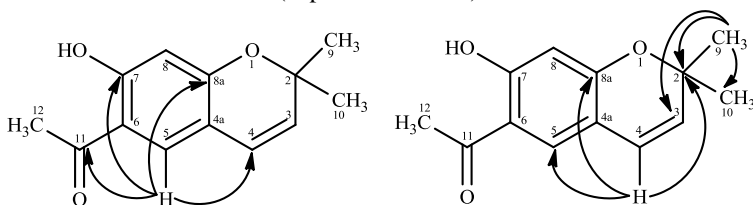


Tabela 8 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (400 e 100 MHz, CDCl_3) do eupatoriocromeno em comparação com dados da literatura.

Posição	δ_{H} (mult., J Hz) 400 MHz	δ_{C} 100 MHz	HMBC	GÓMEZ-HURTADO et al. (2012), CDCl_3	
				δ_{H} (mult., J Hz)	δ_{C}
				500 MHz	125 MHz
2	-	77,9	-	-	77,9
3	5,58 (d; 9,9)	128,9	2/4a	5,57 (d; 9,96)	128,8
4	6,28 (d; 9,9)	121,0	2/5/8a	6,26 (d; 9,96)	120,9
4a	-	113,5	-	-	113,5
5	7,31 (sl)	128,5	4/7/8a/11	7,29 (s)	128,5
6	-	113,8	-	-	113,9
7	-	165,2	-	-	165,0
8	6,33 (sl)	104,5	4a/6/7/8a	6,31 (s)	104,4
8a	-	160,4	-	-	160,4
9	1,44 (s)	28,6	2/3/10	1,43 (s)	28,5
10	1,44 (s)	28,6	2/3/9	1,43 (s)	28,5
11	-	202,3	-	-	202,3
12	2,54 (s)	26,1	6/11	2,52 (s)	26,2

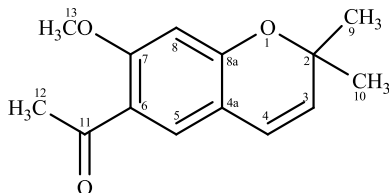
O eupatoriocromeno é um cromeno bastante comum no gênero *Calea*, tendo sido previamente reportado nas espécies *Calea serrata* (STEINBECK et al., 1997), *C. hispida* (BOHLMANN et al., 1982f), *C. oxylepis* (BOHLMANN et al., 1982a), *C. rotundifolia* (BOHLMANN et al., 1981b) e *C. peckii* (CASTRO et al., 1989). Além disso, esse composto também foi isolado de espécies de outros gêneros e famílias, tais como *Ageratina arsenei* (Asteraceae) (GÓMEZ-HURTADO et al., 2012), *A. riparia* (BANERJEE et al., 1985), *Piper aduncum* (Piperaceae) (MOREIRA; GUIMARÃES; KAPLAN, 1998), *Eupatorium riparium* (Asteraceae) (BANDARA et al., 1992) e *Tithonia diversifolia* (Asteraceae) (ZHAI et al., 2010). Com relação ao seu potencial biológico, foi avaliada a atividade desse composto frente a parasitas do gênero *Trypanosoma* (HAREL et al., 2013) e larvas dos insetos *Culex pipiens* e *Oncopeltus fasciatus* (KLOCKE et al., 1985).

5.3.1.2 Substância CPT2 (metileupatoriocromeno)

O composto CPT2 (18,0 mg) (Figura 31) foi isolado da fração hexano (1ª coleta) como um óleo amarelo. Na análise por CCDA, essa

substância apresentou-se como uma mancha com valor de $R_f = 0,40$ no sistema de solvente hexano:acetona (90:10, v/v), com extinção de fluorescência sob luz UV no comprimento de onda $\lambda = 254$ nm. Após revelação com o reagente anisaldeído sulfúrico, esse composto desenvolveu coloração azul-marinho.

Figura 31 – Estrutura química do composto CPT2 (metileupatoriocromeno).



O espectro de RMN 1D das substâncias CPT1 e CPT2 apresentaram o mesmo padrão de sinais, sugerindo que este composto também trata-se de um cromeno. O espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Figura 32) desse composto mostrou sinais típicos de hidrogênios de sistema aromático, apresentando um simpleto em δ_{H} 7,54 (1H; s; H-5) e outro em δ_{H} 6,38 (1H; s; H-8). Também foi notada a presença dois dupletos em δ_{H} 6,30 (1H; d; $J=9,8$ Hz; H-4) e δ_{H} 5,53 (1H; d; $J=9,8$ Hz; H-3), com constante de acoplamento da ordem de 9,8 Hz, característica de hidrogênios olefínicos com isomeria geométrica *cis*. A presença de um simpleto intenso integrando para seis hidrogênios em δ_{H} 1,44 (6H; s; H-9 e H-10) é referente às duas metilas geminais ligadas ao anel pirano. Um simpleto adicional em δ_{H} 2,56 (3H; s; H-12) é sugestivo de hidrogênios metílicos próximos a carbonila. A principal diferença observada entre os compostos CPT1 e CPT2 foi o aparecimento de um sinal, integrando para três hidrogênios, em δ_{H} 3,88 (3H; s; H-13), compatível com a presença de um grupamento metoxila no composto CPT2.

O espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) (Figura 33) do composto CPT2 apresentou 14 sinais característicos de um esqueleto cromênico: δ_{C} 77,7 (C-2), 128,4 (C-3), 121,4 (C-4), 114,0 (C-4a), 129,1 (C-5), 120,8 (C-6), 161,2 (C-7), 99,7 (C-8), 158,5 (C-8a), 28,4 (C-9), 28,4 (C-10), 197,6 (C-11), 31,9 (C-12) e 55,6 (C-13). As atribuições dos valores de ^{13}C também foram realizadas com auxílio dos experimentos de correlação heteronuclear HSQC (Figura 34) e HMBC (Figura 35).

A partir das correlações espectroscópicas ^1H - ^{13}C a longa distância observadas no mapa de correlação HMBC foi possível estabelecer a

conectividade entre os átomos na molécula. O hidrogênio olefínico H-4 (δ_H 6,30) mostrou correlação com os carbonos C-2 (δ_C 77,7), C-4a (δ_C 114,0), C-5 (δ_C 129,1) e C-8a (δ_C 158,5). O mapa de correlação HMBC também revelou correlação entre o sinal do hidrogênio aromático em δ_H 6,38 (H-8) e os carbonos em δ_C 114,0 (C-4a), 120,8 (C-6), 161,2 (C-7) e 158,5 (C-8a); os hidrogênios metílicos em δ_H 1,44 (H-10) mostraram correlação com os carbonos em δ_C 77,7 (C-2), 128,4 (C-3) e 28,4 (C-9); e, por sua vez, os hidrogênios da metoxila em δ_H 3,88 (H-13) apresentaram correlação com o carbono aromático oxigenado em δ_C 161,2 (C-7). Na Figura 36 são apresentadas algumas correlações HMBC do composto CPT2.

A combinação de todos os dados espectroscópicos apresentados acima e a comparação com dados disponíveis na literatura (HAREL et al., 2011; ZHAI et al., 2010) permitiram a identificação do composto CPT2 ($C_{14}H_{16}O_3$) como sendo o metileupatoriocromeno (6-acetil-7-metoxi-2,2-dimetil-cromeno). Na Tabela 9 são apresentados os dados de RMN de 1H e ^{13}C do metileupatoriocromeno, bem como as correlações 1H - ^{13}C a longa distância observadas no mapa de correlação HMBC e a comparação com os dados descritos por Harel e colaboradores (2011).

O composto metileupatoriocromeno foi isolado anteriormente de plantas de diferentes gêneros da família Asteraceae, entre elas podemos destacar as espécies *Calea oxylepis* (BOHLMANN et al., 1982a), *C. teucrifolia* (BOHLMANN et al., 1981c), *C. rotundifolia* (BOHLMANN et al., 1981b), *C. morii* (BOHLMANN et al., 1981a), *Tithonia diversifolia* (ZHAI et al., 2010), *Ageratina pichinchensis* var. *bustamenta* (AGUILAR-GUADARRAMA et al., 2009), *Flourensia riparia* (URIBURU et al., 2004) e *Encelia farinosa* (KUNZE; MUELLER; PROKSCH, 1995). Além disso, também foram investigadas algumas atividades biológicas para esse composto, a exemplo das atividades antiprotozoária (HAREL et al., 2013), antifúngica (SATO et al., 1996), inseticida (SRIVASTAVA & PROKSCH, 1993), larvicida (KLOCKE et al., 1985) e fototóxica (PROKSCH et al., 1983).

Figura 32 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto CPT2 (metileupatoriocromeno).

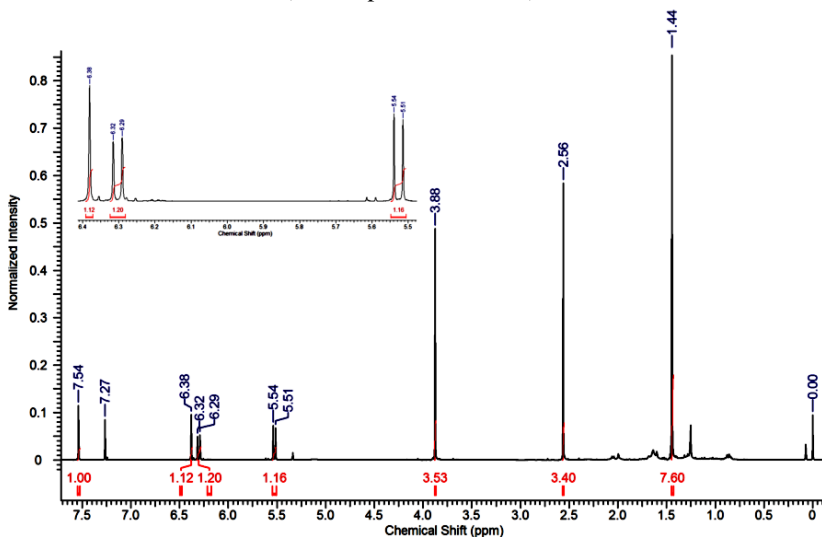


Figura 33 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto CPT2 (metileupatoriocromeno).

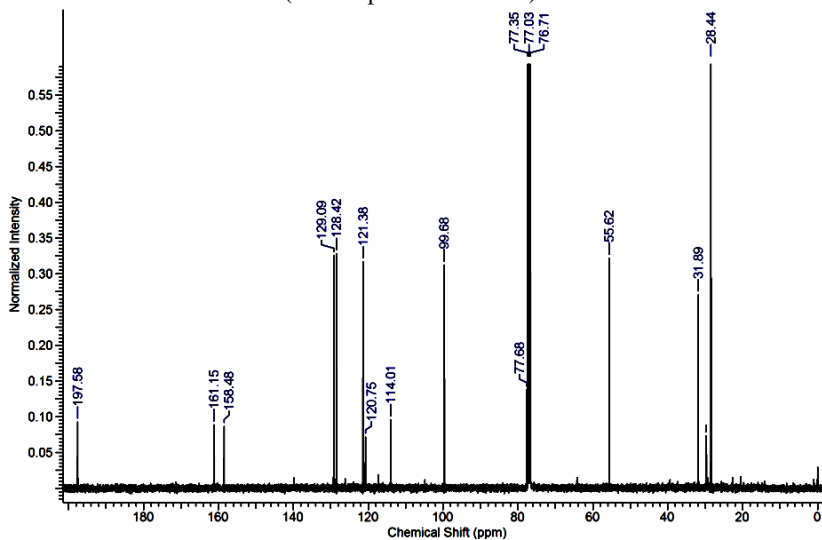


Figura 34 – Mapa de correlação HSQC (400 MHz, CDCl_3) do composto CPT2 (metileupatoriocromeno).

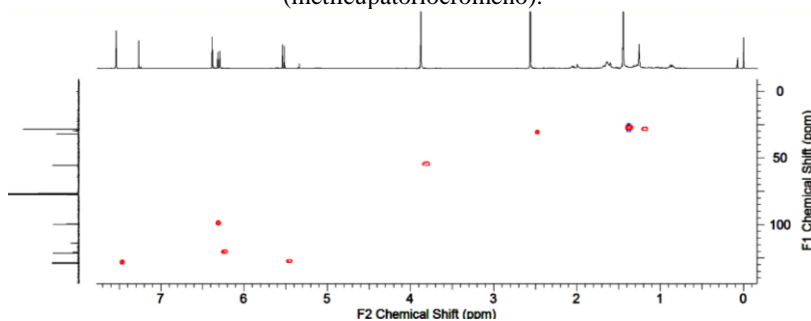


Figura 35 – Mapa de correlação HMBC (400 MHz, CDCl_3) do composto CPT2 (metileupatoriocromeno).

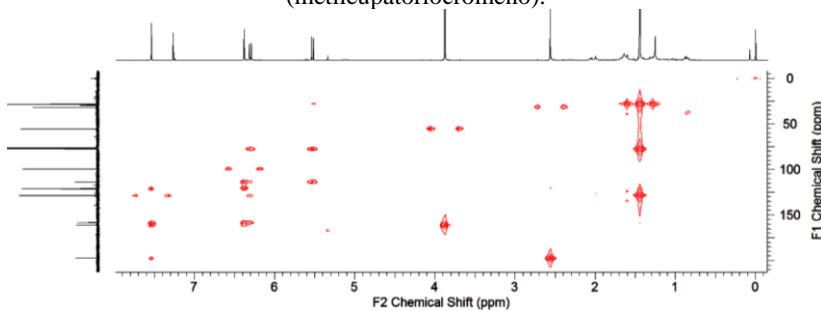


Figura 36 – Representação de algumas correlações HMBC do composto CPT2 (metileupatoriocromeno).

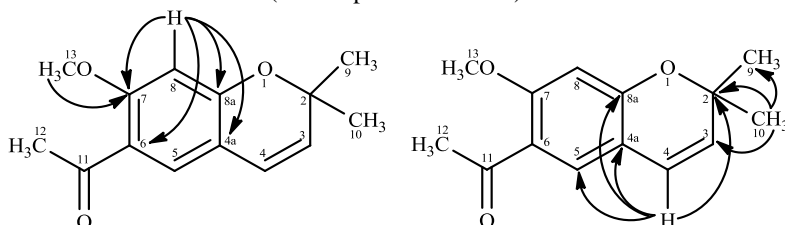


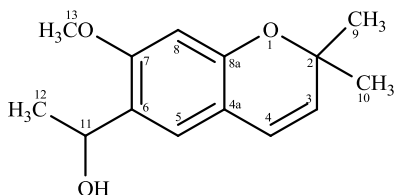
Tabela 9 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (400 e 100 MHz, CDCl_3) do cromeno metileupatoriocromeno em comparação com dados da literatura.

Posição	δ_{H} (mult., J Hz) 400 MHz	δ_{C} 100 MHz	HMBC	HAREL et al. (2011), CDCl_3	
				δ_{H} (mult., J Hz) 400 MHz	δ_{C} 100 MHz
2	-	77,7	-	-	77,8
3	5,53 (d; 9,8)	128,4	2/4a/9/10	5,51 (d; 9,8)	128,6
4	6,30 (d; 9,8)	121,4	2/4a/5/8a	6,29 (d; 9,8)	121,5
4a	-	114,0	-	-	114,2
5	7,54 (s)	129,1	4/7/8/8a/11	7,52 (s)	129,3
6	-	120,8	-	-	120,8
7	-	161,2	-	-	161,3
8	6,38 (s)	99,7	4a/6/7/8a	6,37 (s)	99,8
8a	-	158,5	-	-	158,7
9	1,44 (s)	28,4	2/3/10	1,43 (s)	28,6
10	1,44 (s)	28,4	2/3/9	1,43 (s)	28,6
11	-	197,6	-	-	197,8
12	2,56 (s)	31,9	6/11	2,55 (s)	32,1
13	3,88 (s)	55,6	7	3,86 (s)	55,8

5.3.1.3 Substância CPT3 (encecalinol)

O composto CPT3 (5,0 mg) (Figura 37) foi obtido da fração hexano (1ª coleta) como uma goma esverdeada. Na análise por CCDA, esse composto apresentou-se como uma mancha com $R_f = 0,38$ no sistema de eluição hexano:acetona (80:20, v/v). Além disso, essa substância apresentou extinção de fluorescência sob luz UV em $\lambda = 254$ nm e, quando revelado com o reativo anisaldeído sulfúrico, adquiriu coloração azul-marinho.

Figura 37 – Estrutura química do composto CPT3 (encecalinol).



Os espectros de RMN 1D e 2D da substância CPT3 apresentaram sinais semelhantes aos dos cromenos eupatoriocromeno (CPT1) e metileupatoriocromeno (CPT2), sugerindo que este composto também pertence a esta classe química. O espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Figura 38) do composto CPT4 revelou a presença de um duplete em δ_{H} 6,94 (1H; d; $J=0,3$ Hz; H-5) e um simpleto em δ_{H} 6,37 (1H; s; H-8), indicativo da presença de um anel aromático 1,2,4,5-tetrassubstituído. Também foi observado um duplo duplete em δ_{H} 6,27 (1H; dd; $J=9,7; 0,3$ Hz; H-4) e um duplete em δ_{H} 5,47 (1H; d; $J=9,7$ Hz; H-3). A presença de um simpleto intenso, integrando para seis hidrogênios em δ_{H} 1,42 (6H; s; H-9 e H-10), é atribuída às duas metilas geminais localizadas no carbono C-2 do anel pirano. Um sinal adicional em δ_{H} 3,82 (3H; s; H-13) na forma de um simpleto, com integração para 3H, é sugestivo de hidrogênios ligados a carbono sp^3 oxigenado, o qual foi atribuído a uma metoxila. A principal diferença observada entre os compostos CPT2 e CPT3 foi referente à multiplicidade e aos valores de deslocamento químico dos hidrogênios H-11 e H-12. No composto CPT4, os hidrogênios H-12 aparecem no espectro como um duplete ressonando em δ_{H} 1,48 (3H; d; $J=6,5$ Hz; H-12), enquanto o hidrogênio H-11 revelou-se como um quadruplete ressonando em δ_{H} 5,02 (1H; q; $J=6,5$ Hz; H-11), típico de hidrogênio carbinólico.

Todas as atribuições dos valores de ^{13}C foram realizadas com o auxílio dos experimentos de correlação heteronuclear HSQC (Figura 39) e HMBC (Figura 40). Os mapas de correlação HSQC e HMBC evidenciaram a presença de 14 átomos de carbono, incluindo dois carbonos sp^2 aromáticos (δ_{C} 99,9 e 123,9), dois carbonos aromáticos quaternários (δ_{C} 113,7 e 125,6), dois carbonos aromáticos quaternários oxigenados (δ_{C} 153,2 e 157,5), dois carbonos olefínicos (δ_{C} 121,9 e 127,9), um carbono quaternário sp^3 oxigenado (δ_{C} 76,5), dois carbonos sp^3 oxigenados (δ_{C} 55,6 e 65,8) e três grupamentos metila (δ_{C} 22,9; 28,2 e 28,2).

As correlações ^1H - ^{13}C a longa distância visualizadas no mapa de correlação HMBC permitiram estabelecer a conectividade entre os átomos na molécula. O hidrogênio olefínico que ressona em δ_{H} 6,27 (H-4) mostrou correlação com os carbonos em δ_{C} 76,5 (C-2), 123,9 (C-5) e 153,2 (C-8a). Além disso, o hidrogênio aromático em δ_{H} 6,37 (H-8) apresentou correlação com os carbonos em δ_{C} 113,7 (C-4a), 125,6 (C-6), 157,5 (C-7) e 153,2 (C-8a) e os hidrogênios metílicos em δ_{H} 1,48 (H-12) mostraram correlação com os carbonos em δ_{C} 125,6 (C-6) e 65,8 (C-11). Na Figura 41 são apresentadas algumas correlações HMBC do composto CPT4.

Os dados descritos acima reforçam a hipótese da substância CPT3 tratar-se de um cromeno. Considerando-se os dados publicados na literatura (FANG; YU; MABRY, 1988; HAREL et al., 2011) e a análise dos dados espectroscópicos de RMN 1D e 2D, o composto CPT3 ($C_{14}H_{18}O_3$) foi elucidado como sendo o cromeno enecalinalol [6-(1-hidroxi-etil)-7-metoxi-2,2-dimetil-cromeno]. É importante ressaltar que após a identificação desse composto por RMN 1D e 2D, o mesmo sofreu uma nova purificação, obtendo-se cerca de 70% de pureza por CLUEDAD. Na Tabela 10 é realizada uma comparação dos dados de RMN de 1H e ^{13}C do enecalinalol com os dados descritos por Harel e colaboradores (2011).

O cromeno enecalinalol foi isolado previamente de plantas de diferentes gêneros, entre elas podemos destacar as espécies *Calea morii* (BOHLMANN et al., 1981a), *Ageratina glechonophylla* (GONZALEZ et al., 1989), *Ageratum conyzoides* L. (GONZALEZ et al., 1991) e *Baccharis glutinosa* (DOMINGUEZ; EL DAHMI; ROMBOLD, 1986). De maneira adicional, também foram investigadas algumas propriedades biológicas para esse composto, a exemplo das atividades antiprotozoária (HAREL et al., 2013), antifúngica (AGUILAR-GUADARRAMA et al., 2009), antimicrobiana (RIOS; AGUILAR-GUADARRAMA; NAVARRO, 2004) e larvicida (KLOCKE et al., 1985).

Figura 38 – Espectro de RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$) do composto CPT3 (encecalinalol).

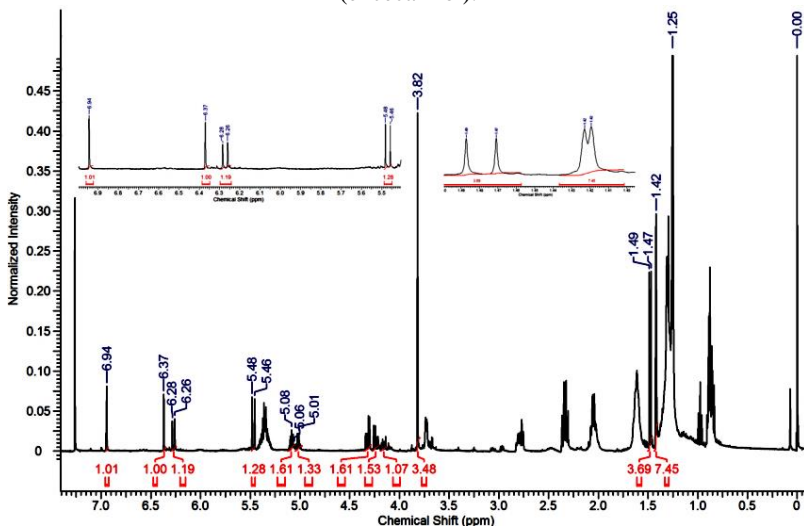


Figura 39 – Mapa de correlação HSQC (400 MHz, CDCl_3) do composto CPT3 (encecalinol).

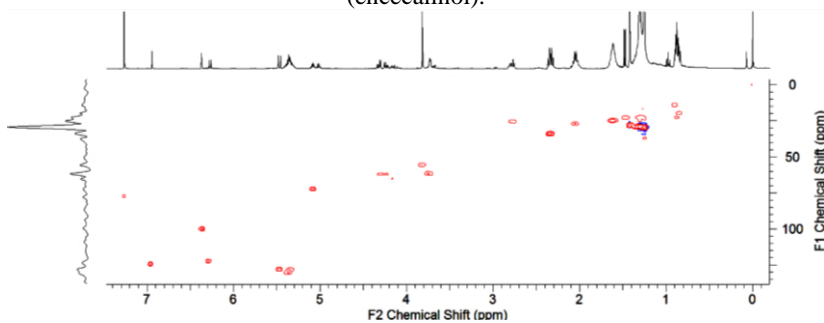


Figura 40 – Mapa de correlação HMBC (400 MHz, CDCl_3) do composto CPT3 (encecalinol).

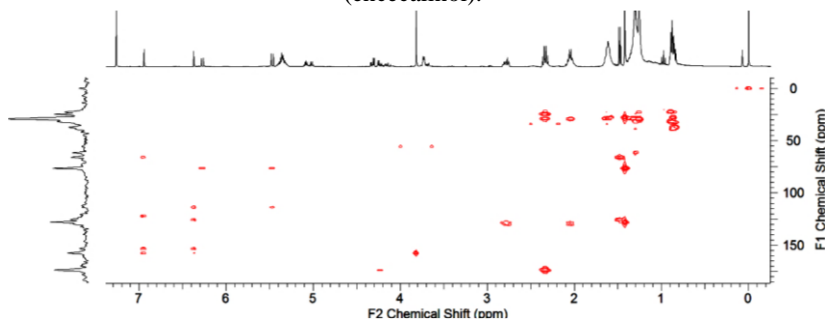


Figura 41 – Representação de algumas correlações HMBC do composto CPT3 (encecalinol).

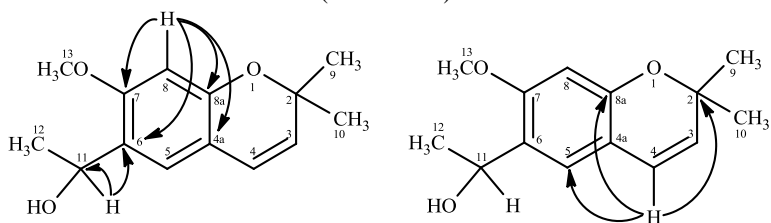


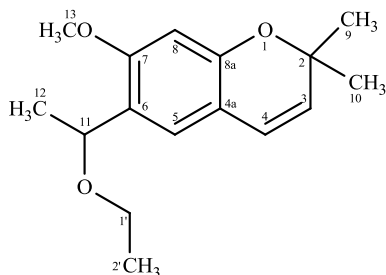
Tabela 10 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (400 e 100 MHz, CDCl_3) do cromeno enecalol em comparação com dados da literatura.

Posição	δ_{H} (mult., J Hz) 400 MHz	δ_{C} 100 MHz	HMBC	HAREL et al. (2011), CDCl_3	
				δ_{H} (mult., J Hz) 400 MHz	δ_{C} 100 MHz
2	-	76,5	-	-	76,1
3	5,47 (d; 9,7)	127,9	2/4a	5,46 (d; 9,8)	121,7
4	6,27 (dd; 9,7; 0,3)	121,9	2/5/8a	6,27 (d; 9,8)	123,6
4a	-	113,7	-	-	113,6
5	6,94 (d; 0,3)	123,9	4/7/8a/11	6,94 (s)	127,4
6	-	125,6	-	-	125,8
7	-	157,5	-	-	157,0
8	6,37 (s)	99,9	4a/6/7/8a	6,37 (s)	99,4
8a	-	153,2	-	-	153,0
9	1,42 (s)	28,2	2/3/10	1,41 (s)	27,8
10	1,42 (s)	28,2	2/3/9	1,42 (s)	27,8
11	5,02 (q; 6,5)	65,8	12	5,01 (q; 6,5)	65,2
12	1,48 (d; 6,5)	22,9	6/11	1,47 (d; 6,5)	22,8
13	3,82 (s)	55,6	7	3,81 (s)	55,1

5.3.1.4 Substância CPT4 (etil enecalol)

O composto CPT4 (4,0 mg) (Figura 42) foi isolado da fração hexano (1ª coleta) como um óleo verde amarelado. Na análise por CCDA, essa substância apresentou-se como uma mancha com valor de $R_f = 0,67$ no sistema de solvente hexano:acetona (90:10, v/v), com extinção de fluorescência sob luz UV no comprimento de onda $\lambda = 254$ nm. Após revelação com o agente cromogênico anisaldeído sulfúrico, essa substância desenvolveu coloração azul-marinho.

Figura 42 – Estrutura química do composto CPT4 (etil enecalol).



O espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) (Figura 43) do composto CPT4 mostrou uma estreita semelhança com o espectro de RMN de ^1H de CPT3, sugerindo que aquele composto também pertence à classe dos cromenos. Foram identificados no espectro dois simpletos, um em δ_{H} 7,00 (1H; s; H-5) e outro em δ_{H} 6,34 (1H; s; H-8), que podem ser atribuídos a hidrogênios aromáticos pertencentes a um sistema de spin AM. Também foi notada a presença de dois dupletos referentes a hidrogênios olefínicos em δ_{H} 6,29 (1H; d; $J=9,7$ Hz; H-4) e δ_{H} 5,45 (1H; d; $J=9,7$ Hz; H-3). A presença de um simpleto integrando para seis hidrogênios em δ_{H} 1,43 (6H; s; H-9 e H-10) é referente às duas metilas geminais ligadas ao anel pirano; e um sinal em δ_{H} 3,77 (3H; s; H-13) na forma de um simpleto, com integração para 3H, corrobora a presença de uma metoxila. Adicionalmente, também foi observado no espectro um duplete em δ_{H} 1,35 (3H; d; $J=6,4$ Hz; H-12) acoplando com um quadruplete ressonando em δ_{H} 4,74 (1H; q; $J=6,4$ Hz; H-11). A comparação entre os espectros de CPT3 e CPT4 evidenciou a presença de três sinais que não haviam sido visualizados em CPT3. O espectro do composto CPT4 apresentou ainda dois duplos quadrupletos em δ_{H} 3,39 (1H; dq; $J=9,4$; 7,0 Hz; H-1'a) e δ_{H} 3,37 (1H; dq; $J=9,4$; 7,0 Hz; H-1'b), característicos de hidrogênios diastereotópicos de metileno e um duplo duplete em δ_{H} 1,18 (3H; dd; $J=7,0$; 7,0 Hz; H-2'). Esse conjunto de sinais corrobora a presença de um grupamento etoxila.

Todas as atribuições dos valores de ^{13}C foram realizadas com o auxílio dos experimentos de correlação heteronuclear HSQC (Figura 44) e HMBC (Figura 45). Os mapas de correlação HSQC e HMBC evidenciaram a presença de 16 sinais, incluindo dois carbonos sp^2 aromáticos (δ_{C} 99,3 e 123,9), dois carbonos aromáticos quaternários (δ_{C} 113,9 e 124,6), dois carbonos aromáticos quaternários oxigenados (δ_{C} 152,8 e 157,6), dois carbonos olefínicos (δ_{C} 122,2 e 127,5), um carbono quaternário sp^3 oxigenado (δ_{C} 76,3), três carbonos sp^3 oxigenados (δ_{C} 55,5; 63,8 e 70,9) e quatro metilas (δ_{C} 15,5; 22,8; 28,2 e 28,2).

As correlações ^1H - ^{13}C a longa distância observadas no mapa de correlação HMBC permitiram estabelecer a conectividade entre os átomos na molécula. O hidrogênio olefínico H-4 (δ_{H} 6,29) mostrou correlação com os carbonos C-2 (δ_{C} 76,3), C-4a (δ_{C} 113,9), C-5 (δ_{C} 123,9) e C-8a (δ_{C} 152,8). Além disso, os hidrogênios diastereotópicos H-1'a e H-1'b (δ_{H} 3,39; 3,37) apresentaram correlação com os carbonos C-11 (δ_{C} 70,9) e C-2' (δ_{C} 15,5); e os hidrogênios metílicos H-12 (δ_{H} 1,35) mostraram correlação com os carbonos C-6 (δ_{C} 124,6) e C-11 (δ_{C} 70,9). Na Figura 46 são mostradas algumas correlações HMBC do composto CPT4.

A combinação de todos os dados espectroscópicos apresentados acima e a comparação com dados disponíveis na literatura (STEELINK & MARSHALL, 1979) permitiram constatar que o composto CPT4 ($C_{16}H_{22}O_3$) trata-se do cromeno etil enecalol [6-(1-etoxi-etil)-7-metoxi-2,2-dimetil-cromeno]. Na Tabela 11 estão sumarizados os dados de RMN de 1H e ^{13}C do etil enecalol, bem como as correlações 1H - ^{13}C a longa distância observadas no mapa de correlação HMBC e a comparação com os dados descritos por Steelink e Marshall (1979).

O cromeno etil enecalol foi descrito anteriormente como um artefato da espécie *Encelia farinosa* Gray produzido durante o processo de extração empregando EtOH como líquido extrator (STEELINK & MARSHALL, 1979). Em geral, os derivados etoxilados são pouco comuns do ponto de vista biogênético; entretanto, esse composto também foi isolado do extrato *n*-hexano de *Ageratum conyzoides*, e em nenhum procedimento cromatográfico de isolamento e purificação foi empregado EtOH (FANG; YU; MABRY, 1988). No intuito de averiguar se esse composto é ou não um artefato oriundo do processo extrativo com EtOH, foi realizada uma extração com MeOH empregando uma pequena parte do material vegetal e, em seguida, o extrato bruto foi submetido ao mesmo procedimento de particionamento. Após análise por CCDA, o etil enecalol não foi identificado, concluindo-se que, provavelmente, o mesmo tratava-se de um artefato. Não há registros na literatura de estudos biológicos desenvolvidos com esse cromeno.

Figura 43 – Espectro de RMN de 1H (600 MHz, $CDCl_3$) de CPT4 (etil enecalol).

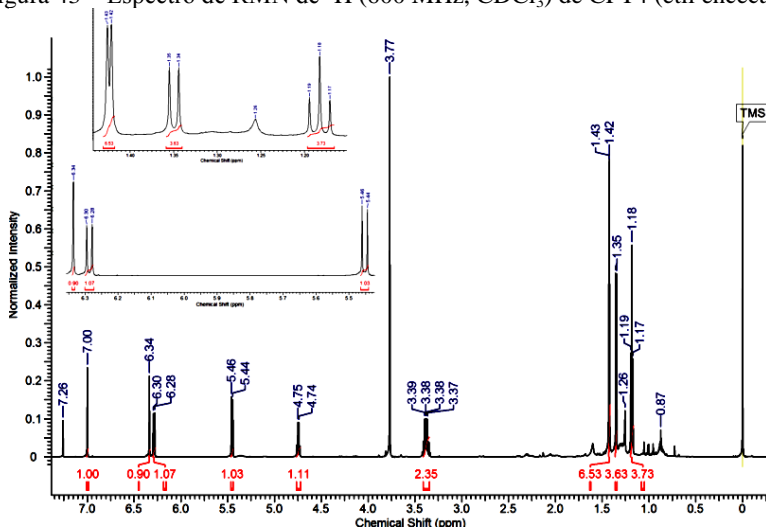


Figura 44 – Mapa de correlação HSQC (600 MHz, CDCl_3) do composto CPT4 (etil enecalol).

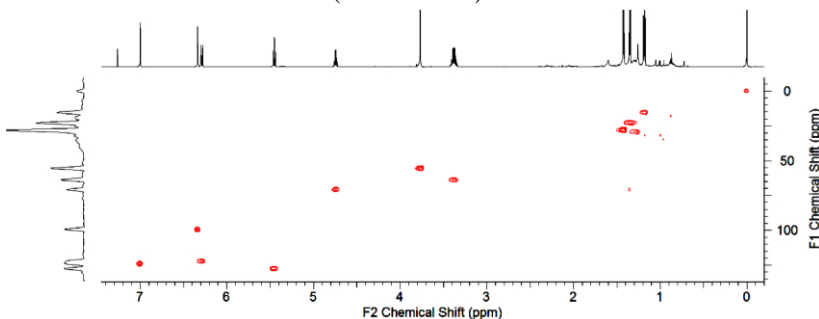


Figura 45 – Mapa de correlação HMBC (600 MHz, CDCl_3) do composto CPT4 (etil enecalol).

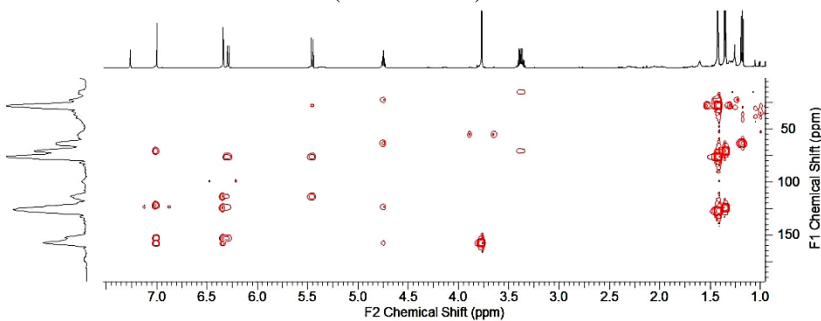


Figura 46 – Representação de algumas correlações HMBC do composto CPT4 (etil enecalol).

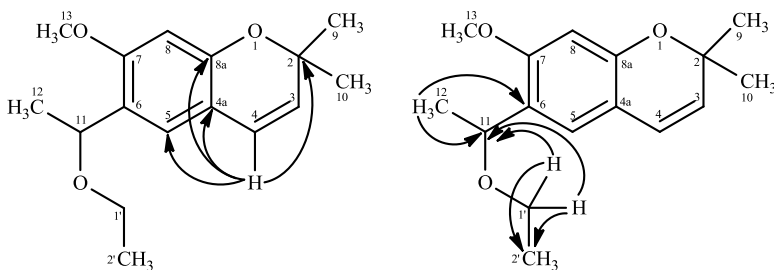


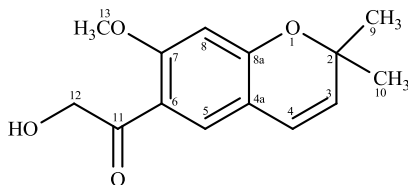
Tabela 11 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (600 e 150 MHz, CDCl_3) do cromeno etil enecalol em comparação com dados da literatura.

Posição	δ_{H} (mult., J Hz) 400 MHz	δ_{C} 100 MHz	HMBC	STEELINK & MARSHALL (1979), CCl_4
				δ_{H} (mult., J Hz) 100 MHz
2	-	76,3	-	-
3	5,45 (d; 9,7)	127,5	2/4a/9/10	5,33 (d; 10,0)
4	6,29 (d; 9,7)	122,2	2/4a/5/8a	6,24 (d; 10,0)
4a	-	113,9	-	-
5	7,00 (s)	123,9	4/7/8/8a/11	7,00 (s)
6	-	124,6	-	-
7	-	157,6	-	-
8	6,34 (s)	99,3	4a/6/7/8a/11	6,28 (s)
8a	-	152,8	-	-
9	1,43 (s)	28,2	2/3/10	1,33 (s)
10	1,43 (s)	28,2	2/3/9	1,33 (s)
11	4,74 (q; 6,4)	70,9	5/7/12/1'	4,72 (q; 7,0)
12	1,35 (d; 6,4)	22,8	6/11	1,26 (d; 7,0)
13	3,77 (s)	55,5	7	3,63 (s)
1'a	3,39 (dq; 9,4; 7,0)	63,8	11/2'	3,31 (q; 6,0)
1'b	3,37 (dq; 9,4; 7,0)	63,8	11/2'	
2	1,18 (dd; 7,0; 7,0)	15,5	1'	1,10 (d; 6,0)

5.3.1.5 Substância CPT5 (12-hidroxi-enecalina)

O composto CPT5 (3,8 mg) (Figura 47) foi isolado da fração diclorometano (2ª coleta) como um óleo de cor amarela. Na análise por CCDA, esse composto apresentou-se como uma mancha com $R_f = 0,43$ no sistema de eluição hexano:acetona (75:25, v/v). Além disso, essa substância apresentou extinção de fluorescência sob luz UV em $\lambda = 254$ nm e fluorescência no comprimento de onda $\lambda = 366$ nm. Após revelação com solução de anisaldeído sulfúrico, esse composto desenvolveu coloração azul-marinho.

Figura 47 – Estrutura química do composto CPT5 (12-hidroxi-encecalina).



O espectro de RMN 1D das substâncias CPT2 e CPT5 apresentaram o mesmo padrão de sinais, sugerindo que este composto também trata-se de um cromeno. O espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) (Figura 48) do composto CPT5 mostrou sinais típicos de hidrogênios de sistema aromático, apresentando um simpleto em δ_{H} 7,76 (1H; s; H-5) e outro em δ_{H} 6,38 (1H; s; H-8). Também foi notada a presença dois dupletos em δ_{H} 6,33 (1H; d; $J=9,9$ Hz; H-4) e δ_{H} 5,56 (1H; d; $J=9,9$ Hz; H-3), com constante de acoplamento da ordem de 9,9 Hz, característica de hidrogênios olefínicos com isomeria geométrica *cis*. A presença de um simpleto intenso integrando para seis hidrogênios em δ_{H} 1,46 (6H; s; H-9 e H-10) é referente às duas metilas geminais ligadas ao anel pirano. Um simpleto adicional em δ_{H} 3,89 (3H; s; H-13), integrando para três hidrogênios, é compatível com a presença de um grupamento metoxila. A principal diferença observada entre os compostos CPT2 e CPT5 foi referente à multiplicidade e aos valores de deslocamento químico dos hidrogênios H-12. No composto CPT5, os hidrogênios H-12 aparecem no espectro como um duplete ressonando em δ_{H} 4,68 (2H; d; $J=4,6$ Hz; H-12), típico de hidrogênio carbinólico. Além disso, no espectro de CPT5 foi observada a presença de um tripleto adicional em δ_{H} 3,84 (1H; t; $J=4,6$ Hz), integrando para um hidrogênio, atribuído a um grupamento hidroxila (OH). A constante de acoplamento de 4,6 Hz é referente ao acoplamento da hidroxila com os hidrogênios do metileno (H-12).

Todas as atribuições dos valores de ^{13}C foram realizadas com o auxílio dos experimentos de correlação heteronuclear HSQC (Figura 49) e HMBC (Figura 50). Os mapas de correlação HSQC e HMBC evidenciaram a presença de 14 átomos de carbono, incluindo dois carbonos sp^2 aromáticos (δ_{C} 99,6 e 129,2), dois carbonos aromáticos quaternários (δ_{C} 114,6 e 115,5), dois carbonos aromáticos quaternários oxigenados (δ_{C} 159,8 e 162,4), dois carbonos olefínicos (δ_{C} 121,2 e 128,9), um carbono quaternário sp^3 oxigenado (δ_{C} 78,2), dois carbonos sp^3 oxigenados (δ_{C} 55,7 e 69,6), uma carbonila de cetona (197,2) e dois grupamentos metila (δ_{C} 28,6 e 28,6).

A partir das correlações espectroscópicas ^1H - ^{13}C a longa distância observadas no mapa de correlação HMBC foi possível estabelecer a conectividade entre os átomos na molécula. O hidrogênio olefínico H-4 (δ_{H} 6,33) mostrou correlação com os carbonos C-2 (δ_{C} 78,2), C-5 (δ_{C} 129,2) e C-8a (δ_{C} 159,8). O mapa de correlação HMBC também revelou correlação entre o sinal do hidrogênio aromático em δ_{H} 6,38 (H-8) e os carbonos em δ_{C} 115,5 (C-6), 162,4 (C-7) e 159,8 (C-8a); enquanto os hidrogênios metílicos em δ_{H} 1,46 (H-10) mostraram correlação com os carbonos em δ_{C} 78,2 (C-2), 128,9 (C-3) e 28,6 (C-9) e os hidrogênios da metoxila em δ_{H} 3,89 (H-13) apresentaram correlação com o carbono aromático oxigenado em δ_{C} 162,4 (C-7). Além disso, o hidrogênio da hidroxila mostrou correlação com os carbonos C-11 (δ_{C} 197,2) e C-12 (δ_{C} 69,6). Na Figura 51 são apresentadas algumas correlações HMBC do composto CPT5.

A combinação de todos os dados espectroscópicos apresentados acima e a comparação com dados disponíveis na literatura (BOHLMANN & JAKUPOVIC, 1978) permitiram a identificação do composto CPT5 ($\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{O}_4$) como sendo o cromeno 12-hidroxi-encecalina, também conhecido como 7-(*O*)-metil-desacetil-ripariocromeno B. Na Tabela 12 são apresentados os dados de RMN de ^1H e ^{13}C da 12-hidroxi-encecalina, bem como as correlações ^1H - ^{13}C a longa distância observadas no mapa de correlação HMBC e a comparação com os dados descritos por Bohlmann e Jakupovic (1978).

Figura 48 – Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) de CPT5 (12-hidroxi-encecalina).

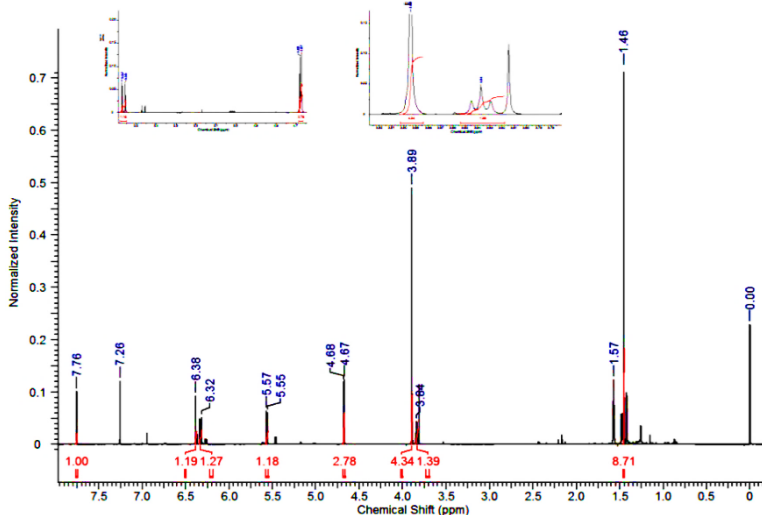


Figura 49 – Mapa de correlação HSQC (600 MHz, CDCl_3) do composto CPT5 (12-hidroxi-encecalina).

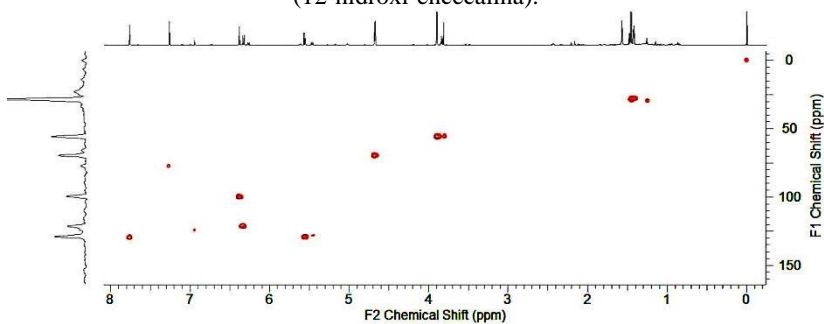


Figura 50 – Mapa de correlação HMBC (600 MHz, CDCl_3) do composto CPT5 (12-hidroxi-encecalina).

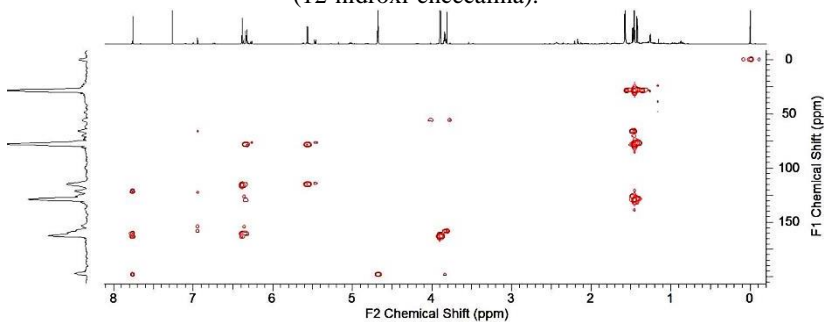


Figura 51 – Representação de algumas correlações HMBC do composto CPT5 (12-hidroxi-encecalina).

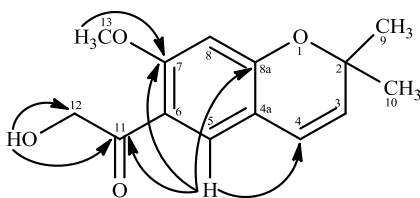


Tabela 12 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (600 e 150 MHz, CDCl_3) do cromeno 12-hidroxi-enecalina em comparação com dados da literatura.

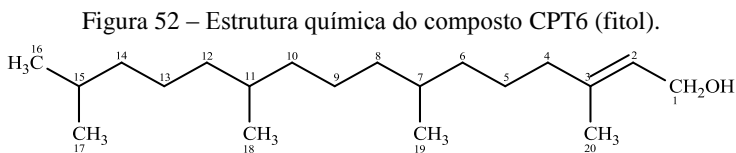
Posição	δ_{H} (mult., J Hz) 600 MHz	δ_{C} 150 MHz	HMBC	BOHLMANN & JAKUPOVIC (1978), CDCl_3
				δ_{H} (mult., J Hz) 270 MHz
2	-	78,2	-	-
3	5,56 (d; 9,9)	128,9	2/4a/9/10	5,51 (d; 9,5)
4	6,33 (d; 9,9)	121,2	2/5/8a	6,30 (d; 9,5)
4a	-	114,6	-	-
5	7,76 (s)	129,2	4/7/8a/11	7,73 (s)
6	-	115,5	-	-
7	-	162,4	-	-
8	6,38 (s)	99,6	6/7/8a/11	6,35 (s)
8a	-	159,8	-	-
9	1,46 (s)	28,6	2/3/10	1,44 (s)
10	1,46 (s)	28,6	2/3/9	1,44 (s)
11	-	197,2	-	-
12	4,68 (d; 4,6)	69,6	11	4,64 (d; 4,0)
13	3,89 (s)	55,7	7	3,86 (s)
OH	3,84 (t; 4,6)	-	11/12	-

O composto 12-hidroxi-enecalina foi isolado anteriormente das espécies *Helichrysum cymosum* (L.) D. Don (JAKUPOVIC et al., 1989), *Brasilia sickii* (BOHLMANN et al., 1983), *Lagascea rigida* (BOHLMANN & JAKUPOVIC, 1978), *Calea teucrifolia* (BOHLMANN et al., 1981c) e *Arnica lesingii* (MERFORT; PABREITER; WILLUHN, 1992). No entanto, até o presente momento não há relatos na literatura de estudos biológicos desenvolvidos com esse cromeno.

5.3.1.6 Substância CPT6 (fitol)

O composto CPT6 (5,0 mg) (Figura 52) foi isolado da fração hexano (1ª coleta) como um óleo amarelo. Na análise por CCDA, esse composto mostrou-se como uma mancha com $R_f = 0,51$ no sistema de eluição hexano:acetona (80:20, v/v). Além disso, essa substância não apresentou fluorescência em $\lambda = 366$ nm, bem como não extinguiu a

fluorescência em $\lambda = 254$ nm. Após revelação com o reativo anisaldeído sulfúrico, esse composto adquiriu cor roxa.



O espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Figura 53) da substância CPT6 revelou a presença de um triplo quadrupletto em δ_{H} 5,41 (1H; tq; $J=7,0$; 1,2 Hz; H-2), característico de hidrogênio olefínico. A constante de acoplamento da ordem de 7,0 Hz sugere um acoplamento vicinal ($^3J_{\text{HH}}$), enquanto a constante de acoplamento de 1,2 Hz é indicativa de acoplamento alílico ($^4J_{\text{HH}}$). Também foi observado no espectro um dupletto em δ_{H} 4,15 (2H; d; $J=7,0$ Hz; H-1), integrando para dois hidrogênios, típico de hidrogênios oximetilênicos; e dois multipletos na região entre δ_{H} 1,35-1,26 e δ_{H} 1,15-1,10; característico de grupos CH_2 de cadeia carbônica alifática. Na região mais protegida do espectro foram observados três sinais, o primeiro em δ_{H} 0,87 (6H; d; $J=6,3$ Hz; H-16 e H-17), o segundo em δ_{H} 0,85 (3H; d; $J=6,3$ Hz; H-18) e o terceiro em δ_{H} 0,84 (3H; d; $J=6,6$ Hz; H-19), integrando para 3H cada, característicos de hidrogênios metílicos. O espectro de hidrogênio também revelou um sinal de metila mais desprotegido que os anteriores, com deslocamento químico em δ_{H} 1,67 (3H; d; $J=1,2$ Hz; H-20), sugerindo a presença de um grupamento metila ligado a um carbono olefínico. A constante de acoplamento de 1,2 Hz é sugestiva de acoplamento alílico ($^4J_{\text{HH}}$). Este conjunto de dados espectrais sugere a ocorrência de um diterpeno. Com o intuito de confirmar a atribuição do hidrogênio H-2, foi realizada a simulação da multiplicidade e dos valores das constantes de acoplamento com o auxílio do programa FOMSC3 (CONSTANTINO et al., 2006). Para tal, foram utilizados os valores de deslocamento químico e de J (Hz) obtidos no espectro experimental (Figura 54).

Todas as atribuições dos valores de ^{13}C foram realizadas com o auxílio dos experimentos de correlação heteronuclear HSQC (Figura 55) e HMBC (Figura 56). Os mapas de correlação HSQC e HMBC evidenciaram a presença de 20 átomos de carbono, incluindo um carbono sp^2 olefínico (δ_{C} 123,2), um carbono olefínico quaternário (δ_{C} 140,3), um carbono sp^3 oxigenado (δ_{C} 59,5), nove metilenos (δ_{C} 24,4;

24,7; 25,2; 36,4; 37,4; 37,6; 38,3; 39,3 e 39,9), três metinos (δ_C 28,0; 32,6 e 32,8) e cinco grupos metila (δ_C 16,2; 19,8; 19,8; 22,7 e 22,7).

As correlações a mais de uma ligação entre hidrogênio e carbono ($^2J_{HC}$, $^3J_{HC}$ e $^4J_{HC}$) observadas no mapa de correlação HMBC permitiram estabelecer a conectividade dos fragmentos identificados. O hidrogênio olefínico H-2 (δ_H 5,41) mostrou correlação com os carbonos C-1 (δ_C 59,5), C-4 (δ_C 39,9) e C-20 (δ_C 16,2). Adicionalmente, os hidrogênios oximetilênicos em δ_H 4,15 (H-1) apresentaram correlação com os carbonos C-2 (δ_C 123,2), C-3 (δ_C 140,3) e C-4 (δ_C 39,9); e os hidrogênios metílicos H-16 (δ_H 0,87) mostraram correlação com os carbonos C-14 (δ_C 39,3), C-15 (δ_C 28,0) e C-17 (δ_C 22,7). Na Figura 57 são apresentadas algumas correlações HMBC do composto CPT6.

Todas as informações espectrais anteriormente descritas corroboram a presença de um esqueleto diterpênico. Considerando-se os dados descritos na literatura (MELOS et al., 2007; MIRANDA et al., 2012; RAGASA; JAVIER; TAN, 2003) e a análise dos dados espectroscópicos de RMN uni- e bidimensionais, o composto CPT6 ($C_{20}H_{40}O$) foi identificado como sendo o fitol (3,7,11,15-tetrametilhexadec-2-en-*trans*-1-ol). Na Tabela 13 é apresentada uma comparação dos dados de RMN de 1H e ^{13}C do fitol com os dados reportados por Ragasa, Javier e Tan (2003); bem como são enumerados os acoplamentos a longa distância J_{HC} identificados no mapa de correlação HMBC.

O fitol é um diterpeno pertencente ao grupo dos álcoois acíclicos insaturados de cadeia longa ($C_{20}H_{40}O$) e ramificada. O mesmo é parte integrante da família das clorofilas, conferindo a essas substâncias uma propriedade hidrofóbica. O fitol é encontrado majoritariamente na clorofila *a*, bem como em menor proporção nas clorofilas *b*, *c* e *d*. Outras possíveis fontes desse diterpeno incluem óleos vegetais, carnes, produtos lácteos derivados de ruminantes, fosfolipídios bacterianos e vitamina K (MCGINTY; LETIZIA; API, 2010; RONTANI & VOLKMAN, 2003).

Alguns trabalhos publicados na literatura têm evidenciado o potencial biológico desse álcool acíclico insaturado. Já foram descritas para o fitol atividades antimicobactéria (SAIKIA et al.; 2010), antinociceptiva (LEITE, 2010), anti-inflamatória (SANTOS et al., 2013; SILVA et al., 2013), antioxidante (SANTOS et al., 2013), antiparasitária (MORAES et al., 2014) e ansiolítica (COSTA et al., 2014). Além disso, esse diterpeno é rotineiramente empregado na indústria como componente de xampus, sabonetes, cosméticos, detergentes, entre outros; e seus derivados são capazes de induzir resposta imunológica em

humanos, possibilitando sua utilização como adjuvante em vacinas (AACHOUI et al., 2011).

Figura 53 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto CPT6 (fitol).

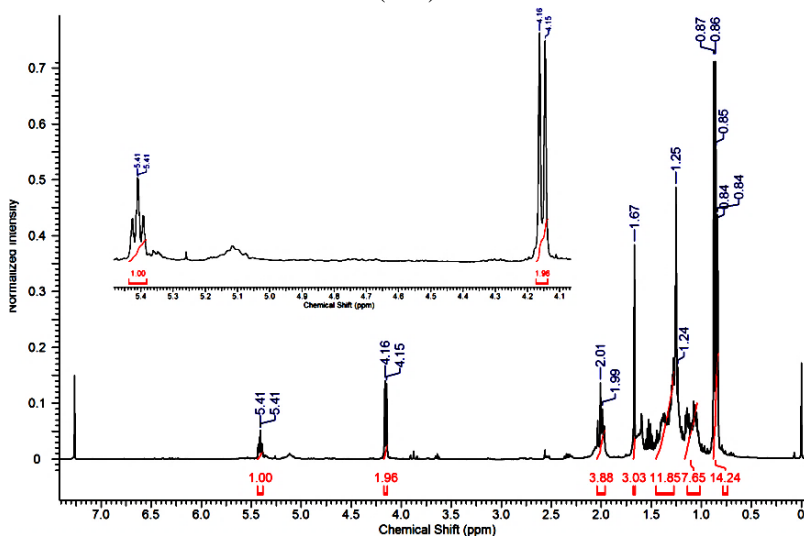


Figura 54 – Comparação do sinal de RMN de H-2 (esquerda – espectro experimental; direita – simulador FOMSC3).

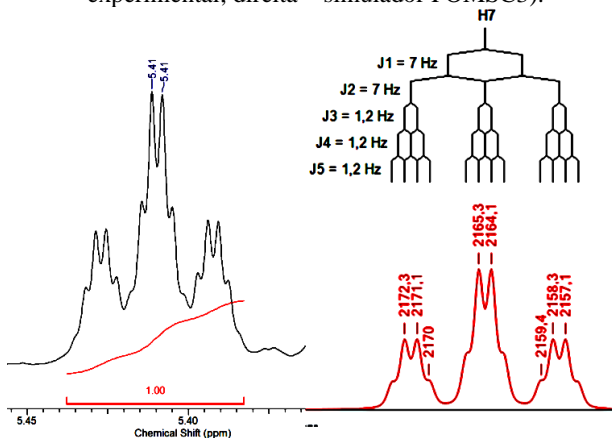


Figura 55 – Mapa de correlação HSQC (400 MHz, CDCl_3) do composto CPT6 (fitol).

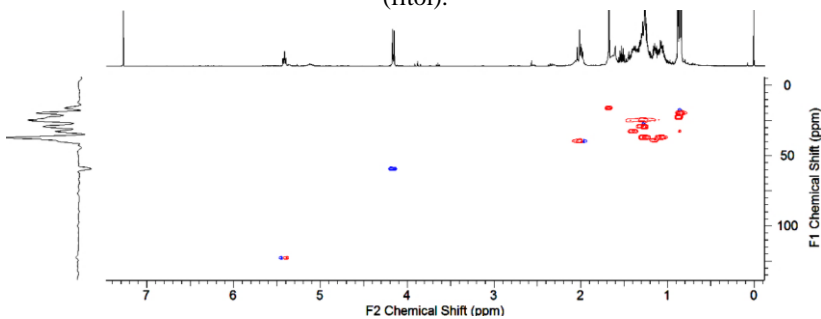


Figura 56 – Mapa de correlação HMBC (400 MHz, CDCl_3) do composto CPT6 (fitol).

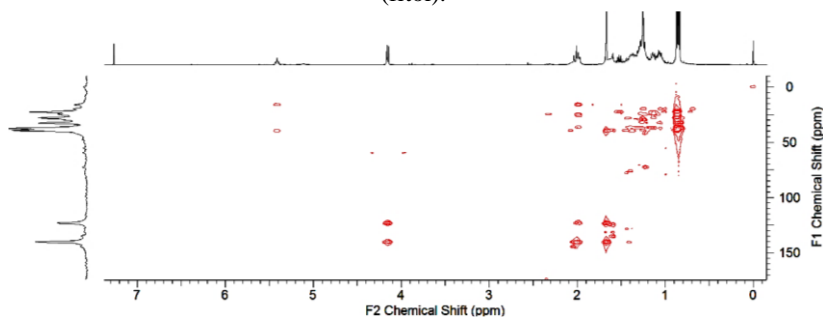


Figura 57 – Representação de algumas correlações HMBC do composto CPT6 (fitol).

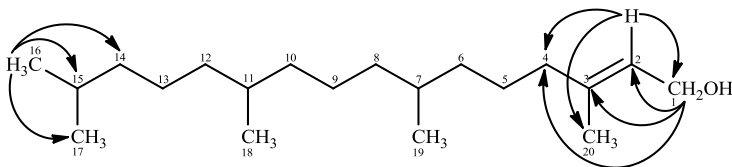


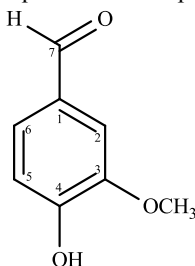
Tabela 13 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (400 e 100 MHz, CDCl_3) do diterpeno fitol em comparação com dados da literatura. NO = sinal não observado.

Posição	δ_{H} (mult., J Hz) 400 MHz	δ_{C} 100 MHz	HMBC	RAGASA; JAVIER; TAN (2003), CDCl_3	
				δ_{H} (mult., J Hz)	δ_{C}
				400 MHz	100 MHz
1	4,15 (d; 7,0)	59,5	2/3/4	4,15 (d; 6,7)	59,4
2	5,41 (tq; 7,0; 1,2)	123,2	1/4/20	5,41 (t; 6,7)	123,1
3	-	140,3	-	-	140,3
4	2,04-2,00 (m)	39,9	2/3/5/20	NO	39,9
5	1,35-1,26 (m)	25,2	-	NO	25,1
6	1,15-1,10 (m)	36,4	-	NO	36,6
7	1,35-1,26 (m)	32,6	-	NO	32,7
8	1,15-1,10 (m)	37,6	-	NO	37,4
9	1,35-1,26 (m)	24,4	-	NO	24,4
10	1,15-1,10 (m)	37,4	-	NO	37,4
11	1,35-1,26 (m)	32,8	-	NO	32,8
12	1,15-1,10 (m)	38,3	-	NO	37,3
13	1,35-1,26 (m)	24,7	-	NO	24,8
14	1,15-1,10 (m)	39,3	-	NO	39,4
15	1,35-1,26 (m)	28,0	-	NO	28,1
16	0,87 (d; 6,3)	22,7	14/15/17	0,87 (d; 6,7)	22,7
17	0,87 (d; 6,3)	22,7	14/15/16	0,87 (d; 6,7)	22,6
16	0,85 (d; 6,3)	19,8	7/8/12	0,86 (d; 2,0)	19,7
19	0,84 (d; 6,6)	19,8	7/8	0,85 (d; 3,2)	19,7
20	1,67 (d; 1,2)	16,2	2/3/4	NO	16,2

5.3.1.7 Substância CPT7 (vanilina)

O composto CPT7 (7,0 mg) (Figura 58) foi isolado da fração diclorometano (2ª coleta) como um sólido cristalino, com p.f. entre 81,8-82,0 °C. Na análise por CCDA, essa substância apresentou-se como uma mancha com valor de $R_f = 0,58$ no sistema de solvente $\text{CHCl}_3:\text{AcOEt}$ (90:10, v/v), com extinção de fluorescência sob luz UV no comprimento de onda $\lambda = 254$ nm. Após revelação com o reagente químico anisaldeído sulfúrico, essa substância desenvolveu coloração amarelo-clara.

Figura 58 – Estrutura química do composto CPT7 (vanilina).



O espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) (Figura 59) do composto CPT7 revelou a presença de dois dupletos ressonando em δ_{H} 7,425 (1H; d; $J=1,8$ Hz; H-2) e δ_{H} 7,04 (1H; d; $J=8,4$ Hz; H-5), e um duplo duplete em δ_{H} 7,424 (1H; dd; $J=8,4$; 1,8 Hz; H-6), sugerindo a presença de um anel aromático 1,3,4-trissubstituído. Também foi observado um simpleto em δ_{H} 9,83 (1H; s; H-7), típico de hidrogênio aldeídico, indicando a ocorrência de um aldeído fenólico. Um sinal adicional em δ_{H} 3,97 (3H; s; OCH_3), na forma de um simpleto com integração para 3H, é sugestivo de hidrogênios ligados a carbono sp^3 oxigenado, o qual foi atribuído a um grupo metoxila.

Todas as atribuições dos valores de ^{13}C foram realizadas com o auxílio dos mapas de correlação heteronuclear HSQC (Figura 60) e HMBC (Figura 61). Os mapas de correlação HSQC e HMBC evidenciaram a presença de oito átomos de carbono, incluindo uma carbonila de aldeído (δ_{C} 190,8), três carbonos sp^2 aromáticos (δ_{C} 108,9; 114,4 e 127,4), um carbono aromático quaternário (δ_{C} 129,9), dois carbonos aromáticos quaternários oxigenados (δ_{C} 147,1 e 151,6) e um carbono quaternário sp^3 oxigenado (δ_{C} 56,2).

As correlações ^1H - ^{13}C a longa distância visualizadas no mapa de correlação HMBC permitiram estabelecer a conectividade entre os átomos na molécula. O hidrogênio aldeídico que ressona em δ_{H} 9,83 (H-7) mostrou correlação com os carbonos em δ_{C} 108,9 (C-2), 127,4 (C-6), 129,9 (C-1) e 147,1 (C-3). Além disso, a hidroxila fenólica em δ_{H} 6,16 apresentou correlação com os carbonos em δ_{C} 114,4 (C-5), 147,1 (C-3) e 151,6 (C-4); e os hidrogênios da metoxila em δ_{H} 3,97 (OCH_3) mostraram correlação com o carbono em δ_{C} 147,1 (C-3). Na Figura 62 são apresentadas algumas correlações HMBC do composto CPT7.

A análise conjunta dos dados espectroscópicos de RMN 1D e 2D apresentados acima e a comparação com dados publicados na literatura (FRANÇA et al., 2005) permitiram constatar que o composto CPT7

($C_8H_8O_3$) trata-se da vanilina (4-hidroxi-3-metoxi-benzaldeído). Na Tabela 14 há uma comparação dos dados de RMN de 1H e ^{13}C da vanilina com os dados descritos por França e colaboradores (2005).

A vanilina constitui um dos principais componentes da baunilha, sendo um dos aromatizantes mais apreciados e empregados mundialmente. Esse composto pode ser obtido de diferentes plantas do gênero *Vanilla*, particularmente, da espécie *V. planifolia*, conhecida popularmente como “baunilha”. As principais aplicações da vanilina ocorrem nas indústrias de produtos alimentares, em bolos, doces, sorvetes, chocolates e bebidas; e também como aromatizantes de tabacos, perfumes e medicamentos (DAUGSCH & PASTORE, 2005; SUN et al., 2001).

Alguns trabalhos publicados na literatura têm demonstrado o potencial biológico da vanilina. Já foram descritas para esse composto atividades antimutagênica (SHAUGHNESSY; SETZER; DEMARINI, 2001), antioxidante (LIBARDI, 2010), conservante (CERRUTTI & ALZAMORA, 1996; RUPASINGHE et al., 2006) e antimicrobiana (CERRUTTI; ALZAMORA; VIDALES, 1997, RUPASINGHE et al., 2006). Além disso, Haridas Nidhina, Poulouse e Gopalakrishnapillai (2011) reportaram a capacidade da vanilina de induzir a diferenciação de adipócitos em células murinas (3T3-L1) e estes, por sua vez, exibiram alta sensibilidade à insulina, a qual foi evidenciada por um aumento significativo na absorção de glicose.

Figura 59 – Espectro de RMN de 1H (600 MHz, $CDCl_3$) do composto CPT7 (vanilina).

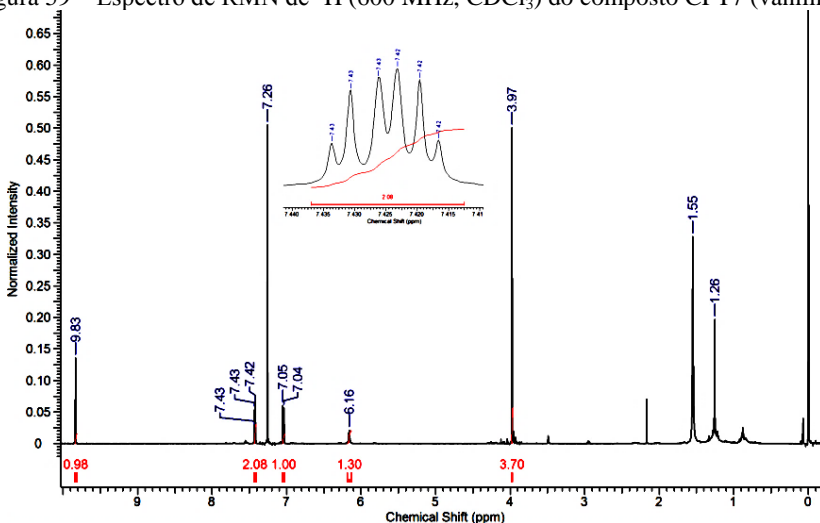


Figura 60 – Mapa de correlação HSQC (600 MHz, CDCl₃) do composto CPT7 (vanilina).

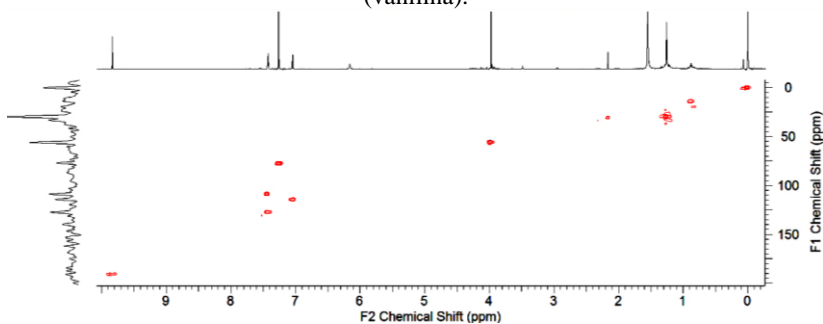


Figura 61 – Mapa de correlação HMBC (600 MHz, CDCl₃) do composto CPT7 (vanilina).

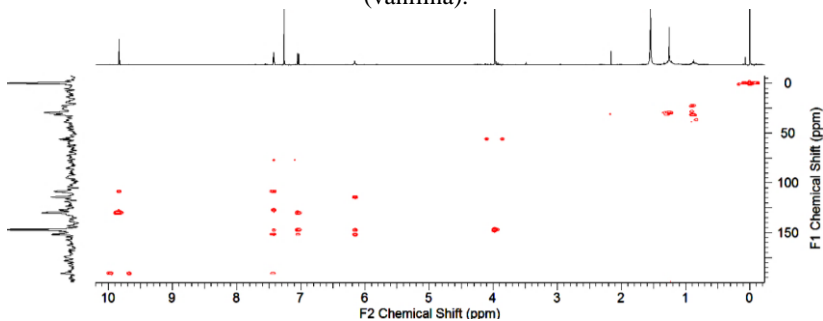


Figura 62 – Representação de algumas correlações HMBC do composto CPT7 (vanilina).

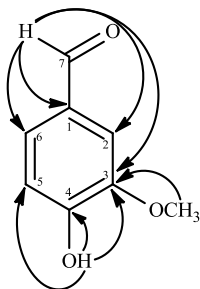


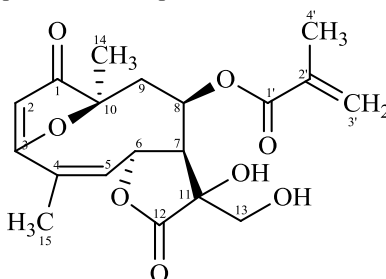
Tabela 14 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (600 e 150 MHz, CDCl_3) do aldeído fenólico vanilina em comparação com dados da literatura. NO = sinal não observado.

Posição	δ_{H} (mult., J Hz) 600 MHz	δ_{C} 150 MHz	HMBC	FRANÇA et al. (2005), CDCl_3	
				δ_{H} (mult., J Hz) 200 MHz	δ_{C} 50 MHz
1	-	129,9	-	-	129,9
2	7,425 (d; 1,8)	108,9	4/6/7	7,38 (d; 1,6)	108,7
3	-	147,1	-	-	147,1
4	-	151,6	-	-	151,7
5	7,04 (d; 8,4)	114,4	1/3/4	7,00 (d; 8,4)	114,4
6	7,424 (dd; 8,4; 1,8)	127,4	2/3/4/7	7,39 (d; 8,4; 1,6)	127,5
7	9,83 (s)	190,8	1/2/3/6	9,81 (s)	190,9
OH	6,16 (sl)	-	3/4/5	NO	-
OCH_3	3,97 (s)	56,2	3	3,96 (s)	56,1

5.3.1.8 Substância CPT8 (11,13-diidroxi-calaxina)

O composto CPT8 (56,3 mg) (Figura 63) foi obtido da fração diclorometano (2ª coleta) na forma de um sólido amorfo de cor esbranquiçada, com p.f. na faixa de 144,5-146,0 °C. Na análise por CCDA, esse composto apresentou-se como uma mancha com $R_f = 0,52$ no sistema de eluição $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{AcOEt}$ (75:25, v/v). Além disso, essa substância apresentou extinção de fluorescência sob luz UV em $\lambda = 254$ nm e, após revelação com solução de anisaldeído sulfúrico, desenvolveu coloração marrom.

Figura 63 – Estrutura química do composto CPT8 (11,13-diidroxi-calaxina).



O espectro de IV (KBr) (Figura 64) do composto CPT8 mostrou absorções em 1768 cm^{-1} (γ -lactona), 1712 e 1589 cm^{-1} (furanona), sugerindo a presença de um furanoheliangolídeo (SAKAMOTO et al., 2003; SANTOS et al., 2004). Além disso, a banda localizada em 1166 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento C–O de grupo álcool e/ou éter, e a banda em 1589 cm^{-1} foi correspondente ao estiramento olefínico (–C=C–).

O espectro de massas de alta resolução (HRMS) (Figura 65) da substância CPT8, obtido com fonte de ionização por *Electrospray* no modo negativo [ESI(-)-MS], registrou um pico do íon molecular de m/z 377,1234 [M–H]⁻ (calculado m/z 377,1236). Essa massa é coerente com a fórmula molecular $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{O}_8$, e indica um índice de deficiência de hidrogênios (IDH) igual a nove para esse composto. A Figura 66 apresenta o perfil de fragmentação do composto CPT8 por ESI(-)-HRMS, e a Figura 67 esquematiza uma proposta de fragmentação para esse composto.

O espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 600 MHz) (Figura 68) da substância CPT8 apresentou sinais característicos de lactona sesquiterpênica do gênero *Calea*. A ausência do par de dupletos referente ao metileno exocíclico e a presença de um par de dupletos em δ_{H} 4,22 (1H; d; $J=12,7$ Hz; H-13a) e δ_{H} 3,89 (1H; d; $J=12,7$ Hz; H-13b) fornece evidências da saturação entre C-11 e C-13, e sugere a presença hidrogênios oximetilênicos diastereotópicos. Um simpleto em δ_{H} 5,59 (1H; s; H-2) em adição a um duplo quadrupletos em δ_{H} 6,02 (1H; dq; $J=3,6$; 1,8 Hz; H-5) sugere a presença de um furanoheliangolídeo (BOLHMANN et al., 1982c). Também foi possível visualizar no espectro dois sinais característicos de hidrogênios oximetínicos em δ_{H} 5,09 (1H; ddd; $J=4,4$; 2,9; 2,2 Hz; H-8) e δ_{H} 5,17 (1H; ddq; $J=4,2$; 3,6; 1,8 Hz; H-6), e um sinal típico de hidrogênio metínico em δ_{H} 3,40 (1H; dd; $J=4,2$; 2,2 Hz; H-7). O pequeno valor da constante de acoplamento observado entre os hidrogênios H-6 e H-7 ($J_{6,7}=4,2$ Hz) corrobora a presença de um heliangolídeo 12,6 α -*trans* lactonizado com uma dupla ligação 4,5-*cis*. Dois sinais com deslocamento químico em δ_{H} 2,54 (1H; dd; $J=15,2$; 4,4 Hz; H-9a) e δ_{H} 2,34 (1H; dd, $J=15,2$; 2,9 Hz; H-9b) foram atribuídos a hidrogênios diastereotópicos de grupo metileno. Também foi possível visualizar no espectro um duplo dupletos em δ_{H} 2,08 (3H; dd; $J=1,8$; 1,8 Hz; H-15) e um simpleto em δ_{H} 1,47 (3H; s; H-14), integrando para 3H cada, correspondentes a dois grupamentos metilas. Um simpleto largo em δ_{H} 3,26 (1H; sl; OH) foi referente a um grupo hidroxila. Por fim, a cadeia lateral éster apresentou três sinais com deslocamento químico em δ_{H} 6,05 (1H; dq; $J=2,0$; 1,0 Hz; H-3'a); δ_{H}

5,65 (1H; dq, $J=2,0; 1,5$ Hz; H-3'b) e δ_{H} 1,86 (3H; dd, $J=1,5; 1,0$; H-4'), indicando a presença de um grupamento metacrilato (MeCr). Na Figura 69 consta o mapa de correlação homonuclear COSY (J_{HH}), confirmando os acoplamentos visualizados no espectro de RMN de ^1H . Entre os acoplamentos observados nesse mapa de correlação, podemos destacar o acoplamento do hidrogênio em δ_{H} 3,40 (H-7) com os hidrogênios em δ_{H} 5,17 (H-6) e δ_{H} 5,09 (H-8); e do hidrogênio olefínico em δ_{H} 6,05 (H-3'a) com os hidrogênios em δ_{H} 5,65 (H-3'b) e δ_{H} 1,86 (H-4').

A configuração relativa dos carbonos quirais foi deduzida através dos valores das constantes de acoplamento, as quais foram correlacionadas com o ângulo diedro obtido por meio de estereomodelos e aplicação da curva de Karplus. O fato da dupla ligação existente entre os carbonos C-4 e C-5 apresentar orientação *cis*, aliado à constante de acoplamento da ordem de 4,2 Hz observada entre os hidrogênios H-6 e H-7, sugere que estes hidrogênios apresentam orientações diferentes. Assumindo que o hidrogênio H-7 possui orientação α , como ocorre na grande maioria das lactonas sesquiterpênicas de angiospermas (FISHER, 1990; IBRAHIM et al., 2013; SHI et al. 2015), pode-se sugerir uma orientação β para o hidrogênio H-6. Similarmente, a pequena constante de acoplamento exibida entre os hidrogênios H-7 e H-8 ($J_{7,8}=2,2$ Hz) indica uma orientação β para a cadeia lateral éster e α para o hidrogênio H-8. O sinal correspondente ao hidrogênio H-7 possui um valor de deslocamento químico inusualmente baixo (δ_{H} 3,40), sugerindo que este hidrogênio está próximo ao oxigênio do anel furano. Esta proximidade requer uma orientação α para os hidrogênios H-14 do grupo metil, assim como ocorre em todos os furanoheliangolídeos de estereoquímica conhecida (DE VIVAR et al., 1976; OBER; URBATSCH; FISCHER, 1986; PASSREITER; STÖBER; ORTEGA, 2000; SAKAMOTO et al., 2003; TRIANA, 1984).

Todas as atribuições dos valores de ^{13}C foram realizadas com o auxílio dos experimentos de correlação heteronuclear HSQC (Figura 70) e HMBC (Figura 71). Os mapas de correlação HSQC e HMBC evidenciaram a presença de 19 átomos de carbono, incluindo uma carbonila de lactona (δ_{C} 173,4), uma carbonila de cetona α,β -insaturada (δ_{C} 205,4), uma carbonila de éster α,β -insaturada (δ_{C} 166,7), três carbonos sp^2 olefínicos (δ_{C} 103,7; 128,1 e 132,9), dois carbonos olefínicos quaternários (δ_{C} 130,9 e 134,9), um carbono olefínico quaternário oxigenado (δ_{C} 185,2), três sp^3 carbonos oxigenados (δ_{C} 45,5; 68,4 e 75,9), dois carbonos quaternários sp^3 oxigenados (δ_{C} 78,1 e 88,4), um metileno (δ_{C} 43,4), um metino (δ_{C} 54,9) e três grupos metila (δ_{C} 18,1; 19,8 e 22,1).

As correlações a mais de uma ligação entre hidrogênio e carbono ($^2J_{\text{HC}}$, $^3J_{\text{HC}}$ e $^4J_{\text{HC}}$) visualizadas no mapa de correlação HMBC permitiram estabelecer a conectividade entre os fragmentos na molécula. A posição da cadeia lateral éster na molécula foi confirmada pela correlação do hidrogênio oximetínico H-8 (δ_{H} 5,09) com a carbonila de éster em δ_{C} 166,7 (C-1'). Além disso, o hidrogênio olefínico H-2 (δ_{H} 5,59) mostrou correlação com os carbonos C-1 (δ_{C} 205,4), C-3 (δ_{C} 185,2), C-4 (δ_{C} 130,9) e C-10 (δ_{C} 88,4); e o sinal atribuído ao grupo OH (δ_{H} 3,26) apresentou correlação com os carbonos C-7 (δ_{C} 54,9), C-11 (δ_{C} 78,1) e C-12 (δ_{C} 173,4). Na Figura 72 são apresentadas algumas correlações HMBC do composto CPT8.

A análise dos dados espectrais de IV, HRMS e RMN 1D e 2D permitiram caracterizar o composto CPT8 ($\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_8$) como sendo a lactona 11,13-diidroxi-calaxina (11,13-diidro-11,13-diidroxi-atrípliciólídeo-8 β -metacrilato). Até o momento não há registro na literatura do isolamento ou identificação estrutural dessa substância, sugerindo tratar-se de uma lactona inédita na literatura. No entanto, da espécie *C. pilosa* foi previamente isolado um composto com estrutura química semelhante, denominada 11,13-epóxi-calaxina (BOLHMANN et al., 1981a). A principal diferença entre a 11,13-epóxi-calaxina e a 11,13-diidroxi-calaxina é a substituição do grupamento epoxi por um diol. Na Tabela 15 é realizada uma descrição detalhada dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C do composto CPT8, bem como são apresentadas as correlações observadas nos mapas de correlação COSY e HMBC.

Figura 64 – Espectro de IV do composto CPT8 (11,13-diidroxi-calaxina).

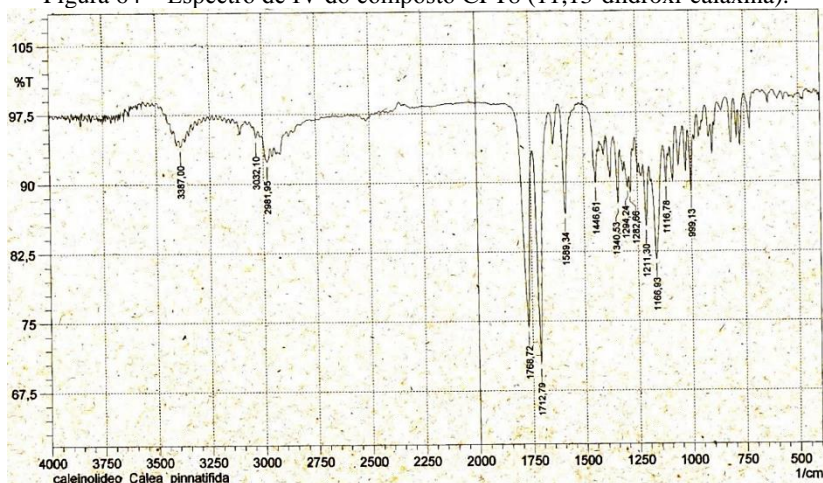


Figura 65 – Espectro de massas de alta resolução (modo varredura) do composto CPT8 (11,13-diidroxi-calaxina) obtido por ESI(-)-HRMS.

T: FTMS - p ESI Full ms [150,00-1200,00]

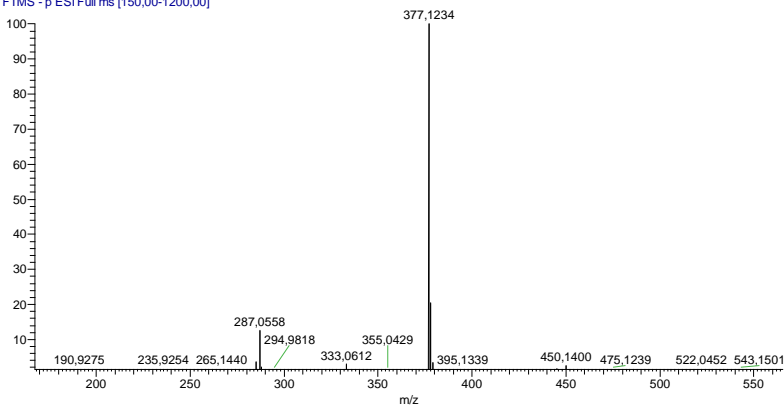


Figura 66 – Perfil de fragmentação do composto CPT8 (11,13-diidroxi-calaxina) por ESI(-)-MS².

F: FTMS - p ESI Full ms2 1000,00@hcd35,00 [150,00-1200,00]

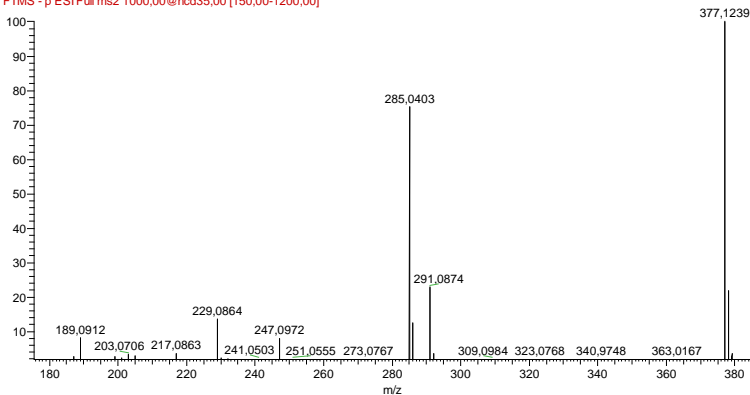


Figura 67 – Proposta de fragmentação do composto CPT8 (11,13-diidroxi-calaxina) [ESI(-)-HRMS].

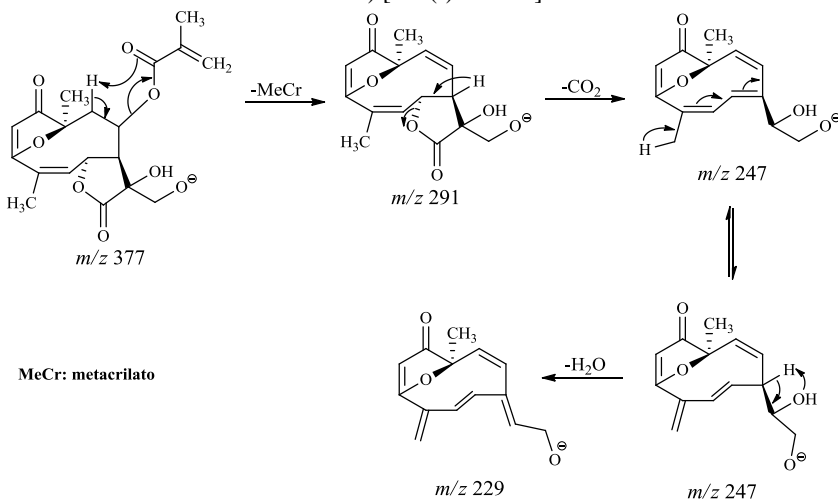


Figura 68 – Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) do composto CPT8 (11,13-diidroxi-calaxina).

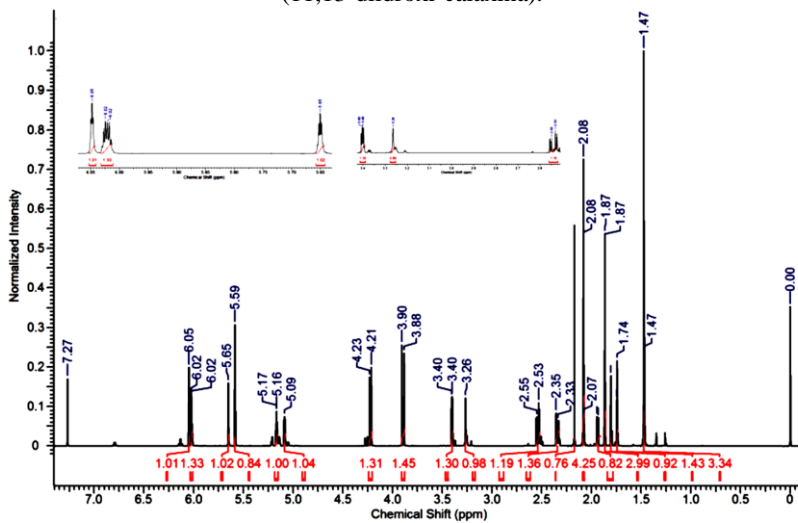


Figura 69 – Mapa de correlação COSY (600 MHz, CDCl_3) do composto CPT8 (11,13-diidroxi-calaxina).

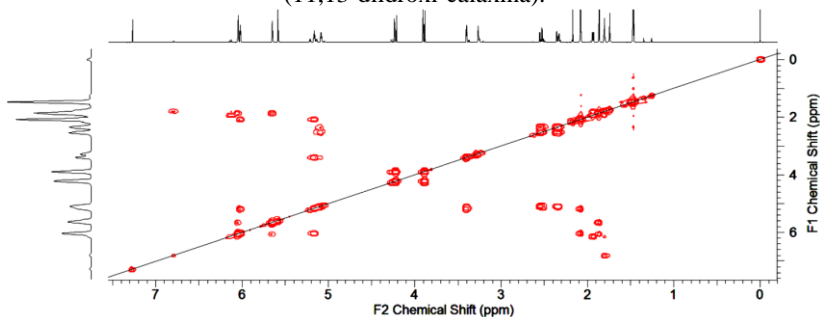


Figura 70 – Mapa de correlação HSQC (600 MHz, CDCl_3) do composto CPT8 (11,13-diidroxi-calaxina).

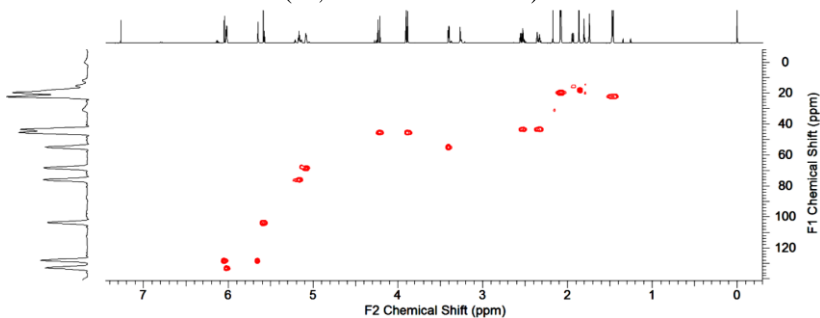


Figura 71 – Mapa de correlação HMBC (600 MHz, CDCl_3) do composto CPT8 (11,13-diidroxi-calaxina).

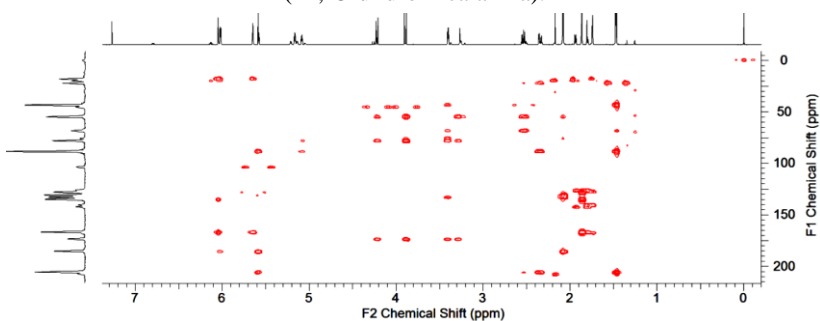


Figura 72 – Representação de algumas correlações HMBC do composto CPT8 (11,13-diidroxi-calaxina).

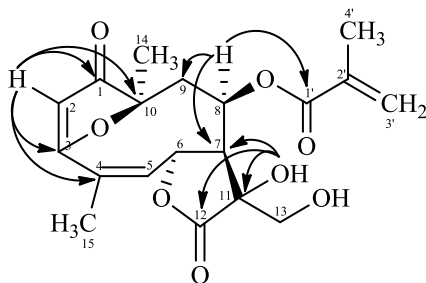


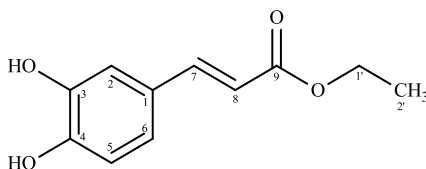
Tabela 15 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (600 e 150 MHz, CDCl_3) do composto CPT8 (11,13-diidroxi-calaxina).

Posição	δ_{H} (mult., J Hz)	^1H - ^1H COSY	δ_{C} (HSQC)	HMBC
1	-	-	205,4	-
2	5,59 (sl)	-	103,7	1/3/4/10
3	-	-	185,2	-
4	-	-	130,9	-
5	6,02 (dq; 3,6; 1,8)	6/15	132,9	3/7
6	5,17 (ddq; 4,2; 3,6; 1,8)	5/7/15	75,9	4/5/7/8/12
7	3,40 (dd; 4,2; 2,2)	6/8	54,9	5/6/8/9/11/12
8	5,09 (ddd; 4,4; 2,9; 2,2)	7/9a/9b	68,4	6/7/9/10/11/11'
9a	2,54 (dd; 15,2; 4,4)	8/9b	43,4	1/7/8/10/14
9b	2,34 (dd; 15,2; 2,9)	8/9a	43,4	1/7/10/14
10	-	-	88,4	-
11	-	-	78,1	-
12	-	-	173,4	-
13a	4,22 (d; 12,7)	13b	45,5	7/8/11/12
13b	3,89 (d; 12,7)	13a	45,5	7/11/12
14	1,47 (s)	-	22,2	1/8/9/10
15	2,08 (dd; 1,8; 1,8)	5/6	19,8	3/4/5/7
1'	-	-	166,7	-
2'	-	-	134,9	-
3'a	6,05 (dq; 2,0; 1,0)	3'b/4'	128,1	1'/2'/4'
3'b	5,65 (dq; 2,0; 1,5)	3'a/4'	128,1	1'/2'/4'
4'	1,86 (dd; 1,5; 1,0)	3'a/3'b	18,1	1'/2'/3'
OH	3,26 (sl)	-	-	7/11/12

5.3.1.9 Substância CPT9 (cafeato de etila)

O composto CPT9 (17,5 mg) (Figura 73) foi obtido da fração diclorometano (2ª coleta) como cristais esbranquiçados em forma de agulhas, com p.f. na faixa de 149,2-150,2 °C. Na análise por CCDA, esse composto apresentou-se como uma mancha com $R_f = 0,44$ no sistema de eluição $\text{CHCl}_3:\text{AcOEt}$ (70:30, v/v); com extinção de fluorescência sob luz UV no comprimento de onda $\lambda = 254$ nm, e fluorescência em $\lambda = 366$ nm. Após revelação com anisaldeído sulfúrico, esse composto desenvolveu coloração marrom-acinzentada.

Figura 73 – Estrutura química do composto CPT9 (cafeato de etila).



O espectro de RMN de ^1H (600 MHz, acetona- d_6) (Figura 74) do composto CPT9 revelou a presença de dois dupletos ressonando em δ_{H} 7,16 (1H; d; $J=2,2$ Hz; H-2) e δ_{H} 6,87 (1H; d; $J=8,2$ Hz; H-5), e um duplo duplo duplete em δ_{H} 7,04 (1H; ddd; $J=8,2; 2,2; 0,4$ Hz; H-6), indicando a presença de um anel aromático 1,2,4-trissubstituído. Também foi observado um duplete em δ_{H} 6,27 (1H; d; $J=15,9$ Hz; H-8) e um duplo duplete em δ_{H} 7,53 (1H; dd; $J=15,9; 0,4$ Hz; H-7), típico de hidrogênios olefínicos com configuração *trans*, sugerindo a ocorrência de um derivado de ácido cinâmico. O espectro exibiu ainda um quadruplete em δ_{H} 4,18 (2H; q; $J=7,1$ Hz; H-1'), característico de hidrogênios oximetilênicos; e um triplete em δ_{H} 1,27 (3H; t; $J=7,1$ Hz; H-2'), coerente com a presença de um grupo etoxi.

Todas as atribuições dos valores de ^{13}C foram realizadas com o auxílio dos experimentos de correlação heteronuclear HSQC (Figura 75) e HMBC (Figura 76). Os mapas de correlação HSQC e HMBC evidenciaram a presença de 11 átomos de carbono, incluindo uma carbonila de éster (δ_{C} 167,5), três carbonos sp^2 aromáticos (δ_{C} 115,1; 116,5 e 122,4), um carbono aromático quaternário (δ_{C} 127,6), dois carbonos aromáticos quaternários oxigenados (δ_{C} 146,2 e 148,9), dois carbonos sp^2 olefínicos (δ_{C} 115,9 e 145,5), um carbono sp^3 oxigenado (δ_{C} 60,5) e um grupo metila (δ_{C} 14,8).

As correlações a mais de uma ligação entre hidrogênio e carbono ($^2J_{\text{HC}}$ e $^3J_{\text{HC}}$) observadas no mapa de correlação HMBC permitiram

estabelecer a conectividade dos fragmentos identificados. O hidrogênio aromático H-5 (δ_H 6,87) mostrou correlação com os carbonos C-1 (δ_C 127,6) e C-3 (δ_C 146,2); o hidrogênio olefínico em δ_H 7,53 (H-7) apresentou correlação com os carbonos C-2 (δ_C 115,1), C-6 (δ_C 122,4) e C-9 (δ_C 167,5); e os hidrogênios metílicos H-2' (δ_H 1,27) mostraram correlação com o carbono C-1' (δ_C 60,5). Na Figura 77 são apresentadas algumas correlações HMBC do composto CPT9.

A análise conjunta dos dados espectrais anteriormente descritos corrobora a presença de um derivado do ácido hidroxi-cinâmico, o qual é caracterizado estruturalmente por um esqueleto carbônico C₆-C₃. Considerando-se os dados descritos na literatura (LAN et al., 2012; XIANG et al., 2011) e a análise dos dados espectrais de RMN uni e bidimensionais, o composto CPT9 (C₁₁H₁₂O₄) foi identificado como sendo o cafeato de etila. Tendo em vista que a formação de derivados etoxilados é pouco comum do ponto de vista biogenético, o cafeato de etila é, provavelmente, um artefato do ácido cafeico formado durante o processo de extração com EtOH. Na Tabela 16 é realizada uma comparação dos dados de RMN 1D e 2D do cafeato de etila com os dados descritos por Xiang et al. (2011); bem como são sumarizados os acoplamentos a longa distância J_{HC} identificados no mapa de correlação HMBC.

O cafeato de etila foi isolado anteriormente de plantas de diferentes famílias, tais como *Ilex latifolia* Thunb. (Aquifoliaceae) (HU; HE; JIANG, 2014), *Cirsium japonicum* var. *australe* (Asteraceae) (LAI et al., 2014), *Artemisia capillaris* (Asteraceae) (ZHAO et al., 2014), *Mikania micrantha* (Asteraceae) (XU et al., 2013), *Lactuca tuberosa* (Asteraceae) (STOJAKOWSKA et al., 2013), *Hedyosmum brasiliense* (Chloranthaceae) (AMOAHA et al., 2013), *Ziziphora clinopodioides* (Lamiaceae) (FURUKAWA et al., 2012), *Euphorbia tangutica* (Euphorbiaceae) (ZHANG et al., 2012), *Vernonia scorpioides* (Asteraceae) (KREUGER et al., 2012), entre outras. Além disso, também foram relatadas várias propriedades biológicas para esse composto, tais como atividade hipoglicemiante (LAI et al., 2014), alelopática (XU et al., 2013), anti-inflamatória (CHIANG et al., 2005), antioxidante (SILVA et al., 2000), antifibrótica (BOSELLI et al., 2009), antitumoral (LEE et al., 2014), antifúngica (TANG et al., 2014), entre outras.

Figura 74 – Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, acetona- d_6) do composto CPT9 (cafeato de etila).

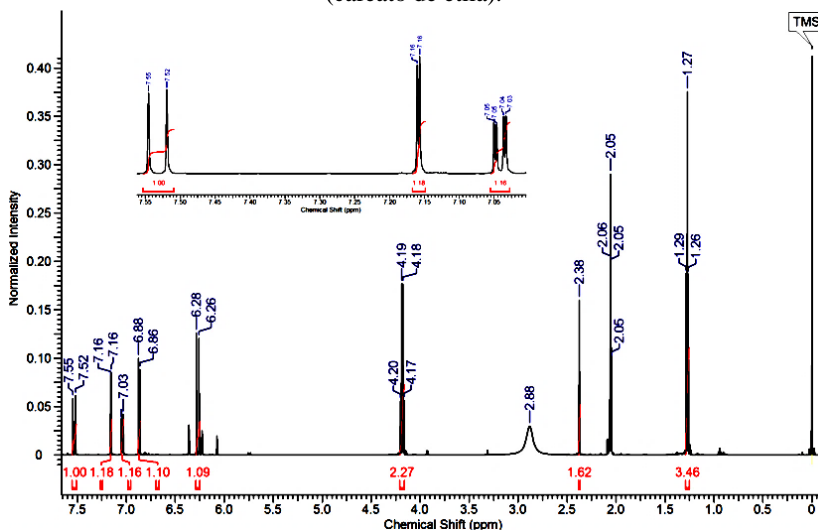


Figura 75 – Mapa de correlação HSQC (600 MHz, acetona- d_6) do composto CPT9 (cafeato de etila).

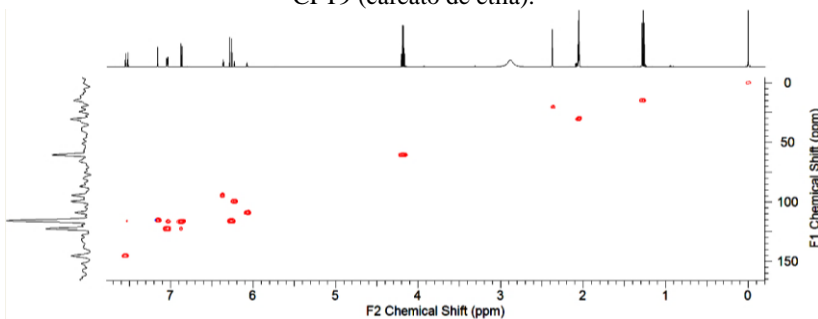


Figura 76 – Mapa de correlação HMBC (600 MHz, acetona- d_6) do composto CPT9 (cafeato de etila).

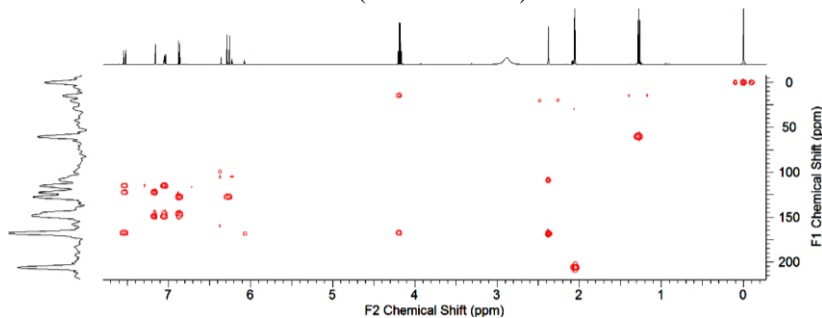


Figura 77 – Representação de algumas correlações HMBC do composto CPT9 (cafeato de etila).

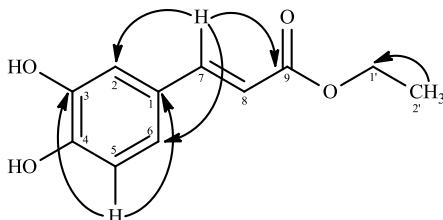


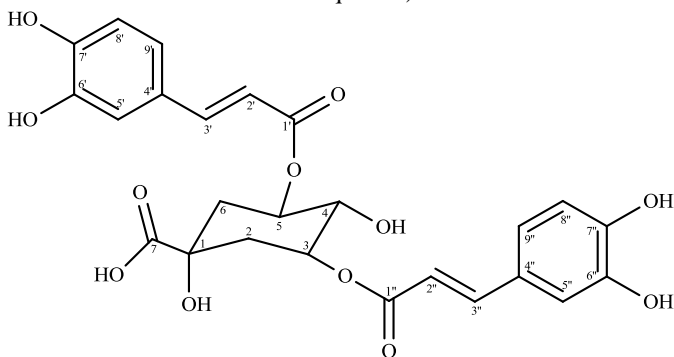
Tabela 16 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (600 e 150 MHz, acetona- d_6) do cafeato de etila em comparação com dados da literatura.

Posição	δ_{H} (mult., J Hz) 600 MHz	δ_{C} 150 MHz	HMBC	XIANG et al. (2011), DMSO- d_6	
				δ_{H} (mult., J Hz) 600 MHz	δ_{C} 150 MHz
				1	-
2	7,16 (d; 2,2)	115,1	4/6	7,18 (d; 1,5)	115,2
3	-	146,2	-	-	145,5
4	-	148,9	-	-	148,7
5	6,87 (d; 8,2)	116,5	1/3	6,88 (d; 8,4)	116,3
6	7,04 (ddd; 8,2; 2,2; 0,4)	122,4	2/4	7,05 (dd; 8,4;1,5)	122,4
7	7,53 (dd; 15,9; 0,4)	145,5	2/6/9	7,55 (d; 15,6)	146,2
8	6,27 (d; 15,9)	115,9	1/9	6,29 (d; 15,6)	115,6
9	-	167,5	-	-	167,4
1'	4,18 (q; 7,1)	60,5	9/2'	4,18 (q; 7,2)	60,5
2'	1,27 (d; 7,1)	14,8	1'	1,28 (d; 7,2)	14,6

5.3.1.10 Substância CPT10 (ácido 3,5-di-*O-E*-cafeoilquínico)

O composto CPT10 (22,7 mg) (Figura 78) foi obtido da fração acetato de etila (2ª coleta) como um sólido amarelo-esverdeado, com p.f. na faixa de 163-164,5 °C. Na análise por CCDA em fase reversa (C18), esse composto apresentou-se como uma mancha com $R_f = 0,76$ no sistema de eluição $H_2O:MeOH$ (50:50, v/v); com extinção de fluorescência sob luz UV no comprimento de onda $\lambda = 254$ nm, e fluorescência em $\lambda = 366$ nm. Após revelação com solução de anisaldeído sulfúrico, esse composto desenvolveu coloração marrom-esverdeada.

Figura 78 – Estrutura química do composto CPT10 (ácido 3,5-di-*O-E*-cafeoilquínico).



O espectro de RMN de 1H (600 MHz, $MeOD-d_4$) (Figura 79) do composto CPT10 apresentou quatro dupletos em δ_H 6,27 (1H; d; $J=15,9$ Hz; H-2'), δ_H 6,36 (1H; d; $J=15,9$ Hz; H-2''), δ_H 7,58 (1H; d; $J=15,9$ Hz; H-3') e δ_H 7,62 (1H; d; $J=15,9$ Hz; H-3''), típicos de hidrogênios olefínicos com configuração *trans* ($J=15,9$ Hz). Também foram observados três sinais em δ_H 6,78 (2H; d; $J=8,2$ Hz; H-8' e H-8''), δ_H 6,97 (2H; dd; $J=8,2$; 2,0 Hz; H-9' e H-9'') e δ_H 7,06 (2H; d; $J=2,0$ Hz; H-5' e H-5''), integrando para dois hidrogênios cada, o que sugere dois sistemas de acoplamento AMX (presença de dois anéis aromáticos 1,3,4-trissubstituídos). Esse conjunto de sinais permitiu sugerir a presença de duas unidades cafeóilas (CAF). Além disso, também foram diagnosticados sinais compatíveis com uma molécula de ácido quínico (AQ). Foram observados no espectro três sinais típicos de hidrogênios oximetínicos em δ_H 3,96 (1H; dd; $J=7,8$; 3,3 Hz; H-4), δ_H 5,41 (1H; dm; $J=7,8$ Hz; H-3) e δ_H 5,43 (1H; ddd; $J=6,5$; 3,3; 3,2 Hz; H-5); e um

conjunto de sinais característicos de hidrogênios metilênicos na região compreendida entre $\delta_{\text{H}} 2,32$ e $2,16$ (H-2 e H-6).

Todas as atribuições dos valores de ^{13}C foram realizadas com o auxílio dos experimentos de correlação heteronuclear HSQC (Figura 80) e HMBC (Figura 81). Os mapas de correlação HSQC e HMBC evidenciaram a presença de 25 átomos de carbonos, incluindo duas carbonilas de éster α,β -insaturadas ($\delta_{\text{C}} 168,5$ e $168,9$), uma carbonila de ácido carboxílico ($\delta_{\text{C}} 177,9$), seis carbonos sp^2 aromáticos ($\delta_{\text{C}} 115,3$; $115,3$; $116,6$; $116,6$; $123,0$ e $123,0$), dois carbonos aromáticos quaternários ($\delta_{\text{C}} 127,9$ e $127,9$), quatro carbonos aromáticos quaternários oxigenados ($\delta_{\text{C}} 146,9$; $146,9$; $149,8$ e $149,8$), quatro carbonos sp^2 olefínicos ($\delta_{\text{C}} 115,3$; $115,8$; $147,2$ e $147,2$), três carbonos oxigenados sp^3 ($\delta_{\text{C}} 71,2$; $72,1$ e $72,1$), um carbono oxigenado sp^3 quaternário ($\delta_{\text{C}} 75,3$) e dois metilenos ($\delta_{\text{C}} 36,5$ e $38,2$).

A posição dos grupos cafeoílas (axial ou equatorial) na molécula foi estabelecida com base nos valores de deslocamentos químicos e das constantes de acoplamento dos hidrogênios H-3, H-4 e H-5. O valor de J de H-4 com H-3 indicou um acoplamento axial-axial ($J = 7,8$ Hz), enquanto o acoplamento de H-4 com H-5 sugeriu uma relação axial-equatorial ($J = 3,3$ Hz); corroborando a hipótese de uma orientação 3-equatorial 5-axial para as unidades cafeoílas e equatorial para a hidroxila da posição C-4. Adicionalmente, a ligação dos grupos cafeoílas a molécula de ácido quínico foi estabelecida pelas correlações observadas no mapa de correlação HMBC entre o hidrogênio H-5 ($\delta_{\text{H}} 5,43$) e o carbono C-1' ($\delta_{\text{C}} 168,9$), e entre o hidrogênio H-3 ($\delta_{\text{H}} 5,41$) e o carbono C-1'' ($\delta_{\text{C}} 168,5$). Na Figura 82 são apresentadas algumas correlações HMBC do composto CPT10.

Todas as informações espectrais anteriormente descritas ratificam a presença de um derivado de ácido quínico esterificado com duas unidades cafeoílas. A interpretação dos dados espectroscópicos de RMN (1D e 2D) de CPT10 e a comparação com dados disponíveis na literatura (AN et al., 2008; KODOMA et al., 1998; PUEBLA et al., 2011) conduziu à estrutura do ácido 3,5-di-*O-E*-cafeoil-quínico ($\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{O}_{12}$). Na Tabela 17 é realizada uma comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C desse derivado de ácido clorogênico com os dados reportados por Kodoma e colaboradores (1998); bem como são enumerados todos os acoplamentos a longa distância J_{HC} identificados no mapa de correlação HMBC.

O ácido 3,5-di-*O-E*-cafeoilquínico foi previamente isolado de várias espécies de plantas, tais como *Calea prunifolia* (PUEBLA et al., 2011), *Ligularia thomsonii* (HUSSAIN et al., 2014), *Suaeda glauca*

(AN et al., 2008), *Bistorta manshuriensis* (CHANG et al., 2009), *Solidago virga-aurea* var. *gigantea* (SANG; SANG; KONG, 2004), *Centella asiatica* (SATAKE et al., 2007), *Calendula officinalis* L. (OLENNIKOV & KASHCHENKO, 2014), *Pluchea indica* (L.) Less. (ARSININGTYAS et al., 2014), entre outras. Na literatura são relatadas para o ácido 3,5-di-*O-E*-cafeoilquínico diversas atividades biológicas, tais como vasodilatadora (PUEBLA et al., 2011), hepatoprotetora (AN et al., 2008), antitrombótica (SATAKE et al., 2007), hipoglicemiante (OLENNIKOV & KASHCHENKO, 2014), antioxidante (HUSSAIN et al., 2014), antihistamínica (WANG et al., 2006a), anticolinesterásica (CONFORTI et al., 2010), antinociceptiva (SANTOS et al., 2005) e antimicrobiana (ZHU; ZHANG; LO, 2004).

Figura 79 – Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, MeOD- d_4) do composto CPT10 (ácido 3,5-di-*O-E*-cafeoilquínico)

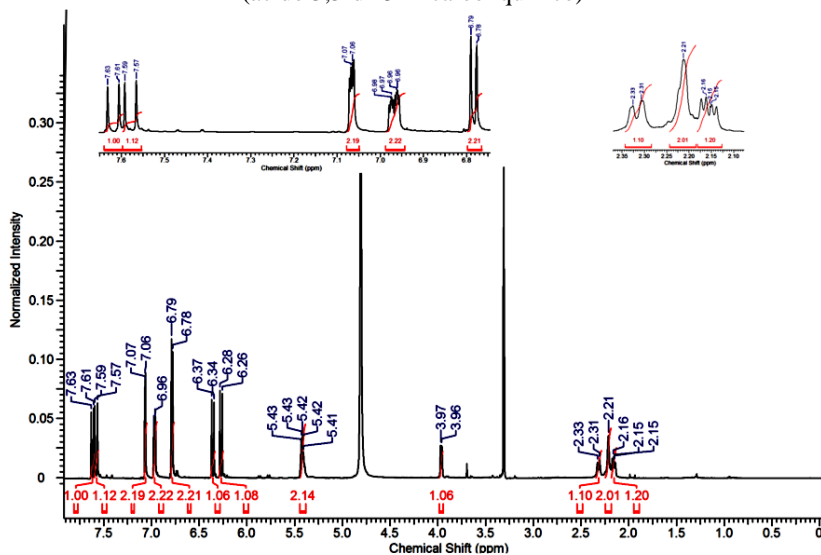


Figura 80 – Mapa de correlação HSQC (600 MHz, MeOD- d_4) do composto CPT10 (ácido 3,5-di-*O-E*-cafeoilquínico).

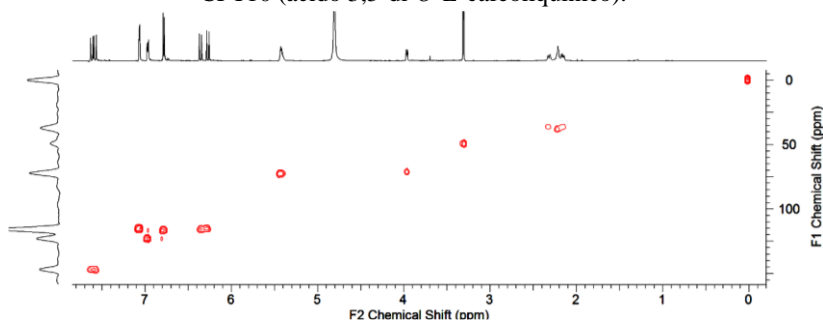


Figura 81 – Mapa de correlação HMBC (600 MHz, MeOD- d_4) do composto CPT10 (ácido 3,5-di-*O-E*-cafeoilquínico).

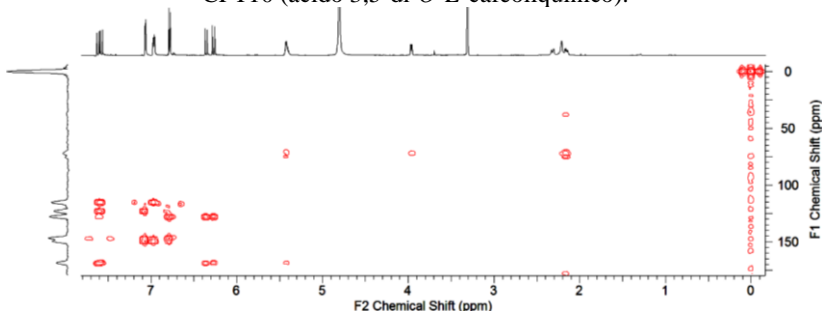


Figura 82 – Representação de algumas correlações HMBC do composto CPT10 (ácido 3,5-di-*O-E*-cafeoilquínico).

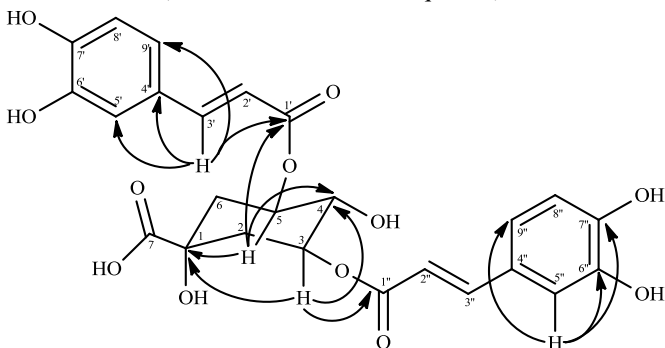


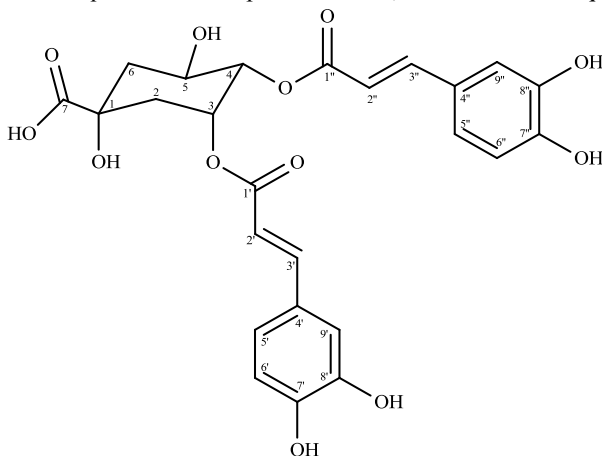
Tabela 17 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (MeOD- d_4) do ácido 3,5-di-*O-E*-cafeoilquínico em comparação com dados da literatura.

Posição	δ_{H} (mult., J Hz) 600 MHz	δ_{C} 150 MHz	HMBC	KODOMA et al. (1998), acetona- d_6	
				δ_{H} (mult., J Hz)	δ_{C}
				270 MHz	100 MHz
1	-	75,3	-	-	74,8
2a	2,21 (m)	38,2	3/7	2,20 (m)	38,1
2b	2,21 (m)	38,2	3/7	2,20 (m)	38,1
3	5,41 (dm; 7,8)	72,1	1/4/1''	5,40 (m)	72,1
4	3,96 (dd; 7,8; 3,3)	71,2	3/5	3,99 (m)	70,6
5	5,43 (ddd; 6,5; 3,3; 3,2)	72,1	1/4/1'	5,40 (m)	72,4
6a	2,32 (dd; 14,2; 3,2)	36,5	-	2,20 (m)	36,3
6b	2,16 (dd; 14,2; 6,5)	36,5	1/2/5/7	2,20 (m)	36,3
7	-	177,9	-	-	176,3
1'	-	168,5	-	-	167,2
2'	6,27 (d; 15,9)	115,3	1'/4'	6,29 (d; 15,9)	116,8
3'	7,58 (d; 15,9)	147,2	1'/4'/5'/9'	7,60 (d; 15,9)	146,1
4'	-	127,9	-	-	128,1
5'	7,06 (d; 2,0)	115,3	6'/7'/9'	7,11 (d; 1,9)	115,6
6'	-	146,9	-	-	146,8
7'	-	149,8	-	-	149,2
8'	6,78 (d; 8,2)	116,6	4'/6'	6,81 (d; 7,8)	116,1
9'	6,97 (dd; 8,2; 2,0)	123,0	5'/6'/7'	6,97 (dd; 7,8; 1,9)	122,9
1''	-	168,9	-	-	167,5
2''	6,36 (d; 15,9)	115,8	1''/4''	6,30 (d; 15,9)	116,8
3''	7,62 (d; 15,9)	147,2	1''/4''/5''/9''	7,61 (d; 15,9)	146,4
4''	-	127,9	-	-	128,2
5''	7,06 (d; 2,0)	115,3	6''/7''/9''	7,11 (d; 1,9)	115,7
6''	-	146,9	-	-	146,8
7''	-	149,8	-	-	149,3
8''	6,78 (d; 8,2)	116,6	4''/6''	6,83 (d; 7,8)	116,7
9''	6,97 (dd; 8,2; 2,0)	123,0	5''/6''/7''	7,00 (dd; 7,8; 1,9)	123,1

5.3.1.11 Substâncias CPT11 e CPT12 (ácidos 3,4-di-*O-E*-cafeoilquínico e 4,5-di-*O-E*-cafeoilquínico, respectivamente)

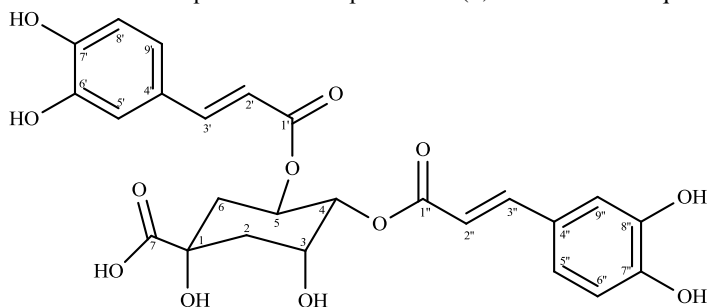
O composto CPT11 (6,4 mg) (Figura 83) foi obtido da fração acetato de etila (2ª coleta) como uma goma de coloração marrom-esverdeada. Na análise por CCDA em fase reversa (C18), essa substância apresentou-se como uma mancha com $R_f = 0,75$ no sistema de eluição $H_2O:MeOH$ (40:60, v/v). Além disso, esse composto apresentou extinção de fluorescência sob luz UV em $\lambda = 254$ nm e fluorescência no comprimento de onda $\lambda = 366$ nm. Após revelação com solução de anisaldeído sulfúrico, esse composto desenvolveu coloração marrom-acinzentada.

Figura 83 – Estrutura química do composto CPT11 (3,4-di-*O-E*-cafeoilquínico).



A substância CPT12 (10,3 mg) (Figura 84), também oriunda da fração acetato de etila (2ª coleta), foi obtida como uma goma marrom. Na análise por CCDA em fase reversa (C18), esse composto apresentou-se como uma mancha com $R_f = 0,63$ no sistema de eluição $H_2O:MeOH$ (40:60, v/v); com extinção de fluorescência sob luz UV no comprimento de onda $\lambda = 254$ nm e fluorescência em $\lambda = 366$ nm. Após revelação com o agente cromogênico anisaldeído sulfúrico, esse composto adquiriu coloração marrom-acinzentada.

Figura 84 – Estrutura química do composto C12 (4,5-di-*O-E*-cafeoilquínico).

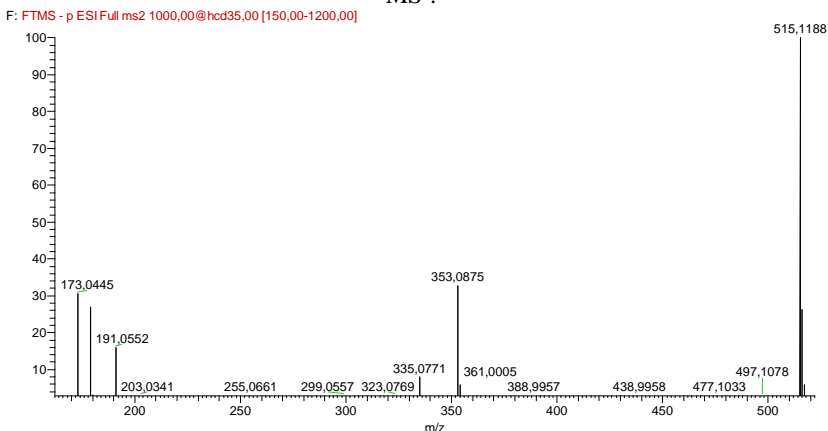


Os espectros de massas de alta resolução (modo varredura) dos compostos CPT11 e CPT12, registrados no modo de ionização negativo [ESI(-)-HRMS], apresentaram um pico do íon molecular de m/z 515,1184 $[M-H]^-$ e m/z 515,1187 $[M-H]^-$, respectivamente, compatíveis com a presença de derivados dicafeoilquínicos (duas unidades cafeóilas e uma molécula de ácido quínico). A presença dos íons fragmentos de m/z 353 (ácido clorogênico) e m/z 191 (ácido quínico) dão suporte a esta proposta de estrutura. Na natureza existem seis isômeros posicionais com essa estrutura básica (1,3-diACQ; 1,4-diACQ; 1,5-di-ACQ; 3,4-diACQ; 3,5-diACQ e 4,5-di-ACQ), no entanto, após análise de todos os dados de massas, foi possível restringir esse número a três possibilidades: 3,4-diACQ; 3,5-diACQ e 4,5-di-ACQ. Segundo Clifford e colaboradores, é possível realizar a identificação inequívoca desses três isômeros baseado em seus padrões de fragmentação (CLIFFORD et al. 2003, 2007; CLIFFORD; KNIGHT; KUHNERT, 2005; CLIFFORD; ZHENG; KUHNERT, 2006).

Os isômeros 3,5-diACQ e 4,5-diACQ exibem padrões de fragmentação similares, diferindo na abundância relativa de cada íon fragmento obtido a partir do íon molecular (CLIFFORD et al., 2003). O isômero 3,4-diACQ, por sua vez, apresenta íons fragmentos únicos, sendo por isso facilmente distinguido dos outros dois (CLIFFORD et al., 2003; CLIFFORD; KNIGHT; KUHNERT, 2005; DE MARIA & MOREIRA, 2004). A diferença entre esses três derivados do ácido clorogênico foi possível por meio da análise dos espectros de íons produto (MS^2) oriundos da fragmentação do íon de m/z 515, onde os fragmentos de m/z 173 e m/z 335 foram observados exclusivamente no espectro de massas do isômero 3,4-diACQ (Figura 85). O íon fragmento de m/z 335 $[(M-H) - CAF - H_2O]^-$ é referente à perda de uma unidade cafeoíla (CAF) e de uma molécula de H_2O , enquanto o íon fragmento de

m/z 173 $[(M-H) - (2CAF) - H_2O]^-$ é atribuído à perda de duas unidades CAF e uma molécula de H_2O (DE MARIA & MOREIRA, 2004). Baseado no padrão de fragmentação descrito anteriormente, o composto CPT11 foi caracterizado como sendo o ácido 3,4-di-*O-E*-cafeoilquínico.

Figura 85 – Perfil de fragmentação do isômero 3,4-diACQ obtido por ESI(-)-MS².



A confirmação da estrutura do composto C12, de modo a distinguir entre os isômeros 3,5-diACQ e 4,5-diACQ, foi realizada por meio da análise da abundância relativa de cada íon fragmento obtido a partir do íon de m/z 515. A presença do pico íon base de m/z 179 e a existência do fragmento minoritário de m/z 191 (Figura 86) sugere que o composto C12 trata-se do isômero 4,5-diACQ. Caso se tratasse do isômero 3,5-diACQ estes fragmentos apareciam com abundância relativa trocada, sendo majoritário o íon fragmento de m/z 191 e minoritário o íon fragmento de m/z 179 (CLIFFORD et al., 2003; CLIFFORD; KNIGHT; KUHNERT, 2005; DE MARIA & MOREIRA, 2004). Esta diferença pode ser explicada porque a remoção de uma unidade CAF ocorre mais facilmente caso esta se encontre nas posições C-3 ou C-5, enquanto em C-4 essa perda é mais difícil de ocorrer. Um argumento plausível para a estabilidade do grupo CAF na posição C-4 fundamenta-se na acidez dos grupos COOH e OH. Além disso, a participação 1,2 acil é outra justificativa pertinente. A participação 1,2 acil facilita a perda de 5-OH (em 3,4-diACQ) ou de 5-CAF (em 4,5-diACQ), conferindo maior estabilidade à unidade cafeoila em C-4 quando comparado com as posições C-3 e C-5 alternativas (CLIFFORD

et al., 2003). Na Tabela 18 são mostrados os principais fragmentos obtidos pela análise dos espectros de massas [ESI(-)-MS²] dos isômeros 3,4-diACQ; 3,5-diACQ (dados descritos na seção 5.3.1.10) e 4,5-diACQ. Ainda, na Figura 87 está esquematizada uma proposta de fragmentação para o composto 3,4-diACQ (CPT11).

Figura 86 – Perfil de fragmentação do isômero 4,5-diACQ obtido por ESI(-)-MS².

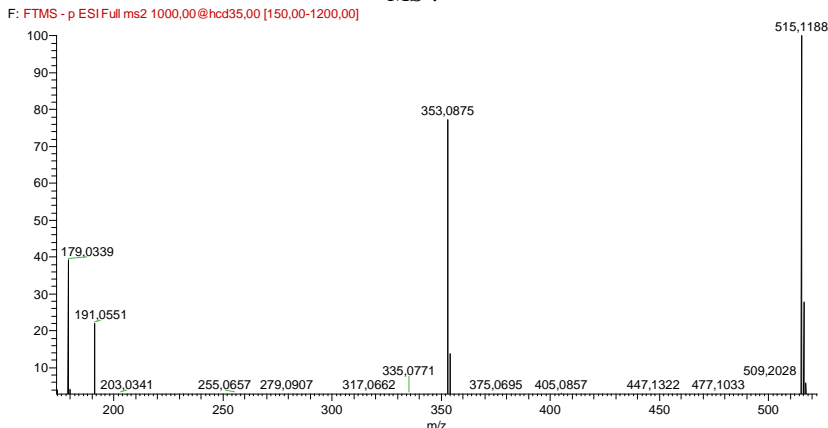
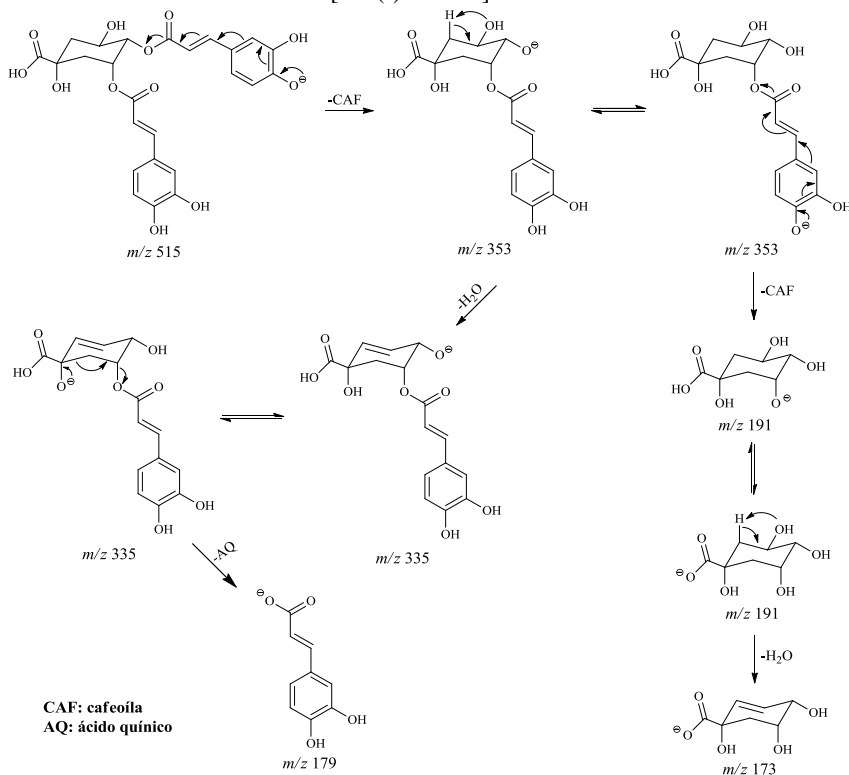


Tabela 18 – Fragmentos obtidos por ESI(-)-MS² para os isômeros 3,4-diACQ; 3,5-diACQ e 4,5-diACQ.

Isômeros	MS ¹ Íon molecular	MS ²	
		Íon pico base	Íons fragmentos secundários
3,4-diACQ	515	353	173 pb, 179, 191, 335
3,5-diACQ	515	353	179, 191 pb
4,5-diACQ	515	353	179 pb, 191

pb: pico base

Figura 87 – Proposta de fragmentação do ácido 3,4-di-*O*-*E*-cafeoilquínico [ESI(-)-HRMS].

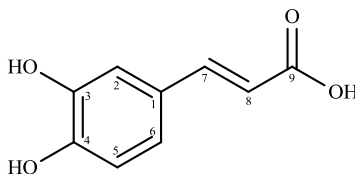


5.3.2 Investigação fitoquímica da espécie *C. uniflora*

5.3.2.1 Substância CUT1 (ácido cafeico)

O composto CUT1 (6,0 mg) (Figura 88) foi obtido da fração acetato de etila como um sólido amarelado, com p.f. na faixa de 224-227 °C. Na análise por CCDA, esse composto apresentou-se como uma mancha com $R_f = 0,40$ no sistema de eluição $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (85:15, v/v), com extinção de fluorescência sob luz UV no comprimento de onda $\lambda = 254$ nm, e fluorescência em $\lambda = 366$ nm. Após revelação com solução de anisaldeído sulfúrico, esse composto desenvolveu cor marrom.

Figura 88 – Estrutura química do composto CUT1 (ácido cafeico).



Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C da substância CUT1 apresentaram uma estreita similaridade com os espectros de RMN de CPT9, sugerindo que o composto CUT1 também se trata de um derivado de ácido cinâmico. O espectro de RMN de ^1H (600 MHz, MeOD- d_4) (Figura 89) de CUT1 apresentou dois dupletos ressonando em δ_{H} 7,01 (1H; d; $J=1,9$ Hz; H-2) e δ_{H} 6,75 (1H; d; $J=8,0$ Hz; H-5), e um duplo duplete em δ_{H} 6,88 (1H; dd; $J=8,0$; 1,9 Hz; H-6), sugerindo a presença de um anel benzênico 1,2,4-trissubstituído. Também foi observada a presença de dois dupletos em δ_{H} 7,38 (1H; d; $J=15,9$; H-7) e δ_{H} 6,26 (1H; d; $J=15,9$ Hz; H-8), típicos de sistema *trans*-alceno de derivados aromáticos $\text{C}_6\text{-C}_3$.

As atribuições dos valores de ^{13}C foram realizadas com o auxílio dos mapas de correlação heteronuclear HSQC (Figura 90) e HMBC (Figura 91). Os mapas de correlação HSQC e HMBC evidenciaram a presença de nove átomos de carbono, incluindo uma carbonila de ácido carboxílico (δ_{C} 173,8), três carbonos sp^2 aromáticos (δ_{C} 114,8; 116,3 e 121,4), um carbono aromático quaternário (δ_{C} 128,5), dois carbonos aromáticos quaternários oxigenados (δ_{C} 146,6 e 148,5) e dois carbonos sp^2 olefínicos (δ_{C} 120,2 e 143,3).

As correlações a mais de uma ligação entre hidrogênio e carbono ($^2J_{\text{HC}}$, $^3J_{\text{HC}}$ e $^4J_{\text{HC}}$) visualizadas no mapa de correlação HMBC permitiram estabelecer a conectividade entre os átomos na molécula. O hidrogênio aromático H-6 (δ_{H} 6,88) mostrou correlação com os carbonos C-2 (δ_{C} 114,8), C-4 (δ_{C} 148,5) e C-7 (δ_{C} 143,3); e o hidrogênio olefínico em δ_{H} 6,26 (H-8) apresentou correlação com os carbonos C-1 (δ_{C} 128,5) e C-9 (δ_{C} 173,8). Na Figura 92 são apresentadas algumas correlações HMBC do composto CUT1.

A análise dos dados espectroscópicos de RMN 1D e 2D apresentados acima e a comparação com dados publicados na literatura (BHATT, 2011) permitiram a identificação do composto CUT1 ($\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$) como sendo o ácido cafeico. Na Tabela 19 é realizada uma comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C do ácido cafeico com os dados descritos por Bhatt (2011). É importante salientar que alguns

valores deslocamentos químicos de ^{13}C descritos por Bhatt (2011) apresentam variações de deslocamento químico quando comparados aos valores obtidos para a substância CUT1.

O ácido cafeico foi previamente isolado de várias espécies de plantas, tais como *Abutilon theophrasti* (MAMADALIEVA et al., 2014), *Chenopodium quinoa* Willd. (TANG et al., 2015), *Perilla frutescens* var. *arguta* (ZHOU et al., 2014b), *Kitaibelia vitifolia* (KURCUBIC et al., 2013), *Achillea fragrantissima* (HAMMAD et al., 2014), *Sphallerocarpus gracilis* (GAO et al., 2014), *Artemisia absinthium* L. (LEE et al., 2013b), *Polygonum multiflorum* Thunb. (THIRUVENGADAM et al., 2014), *Lycopersicon esculentum* Mill. (MLADENOVIC et al., 2014), entre outras. Vários trabalhos publicados na literatura têm evidenciado o potencial biológico desse ácido hidroxicinâmico. Já foram relatadas para o ácido cafeico atividade quimiopreventiva (YANG et al., 2014), antioxidante (NADANASABAPATHI; RUFIA; MANJU, 2013), anti-inflamatória (YANG et al., 2013a), antinociceptiva (GAMARO et al., 2011), antidiabética (CHAO et al., 2010), antiangiogênica (KIM et al., 2009) e antiherpética (IKEDA et al., 2011).

Figura 89 – Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, $\text{MeOD-}d_4$) do composto CUT1 (ácido cafeico).

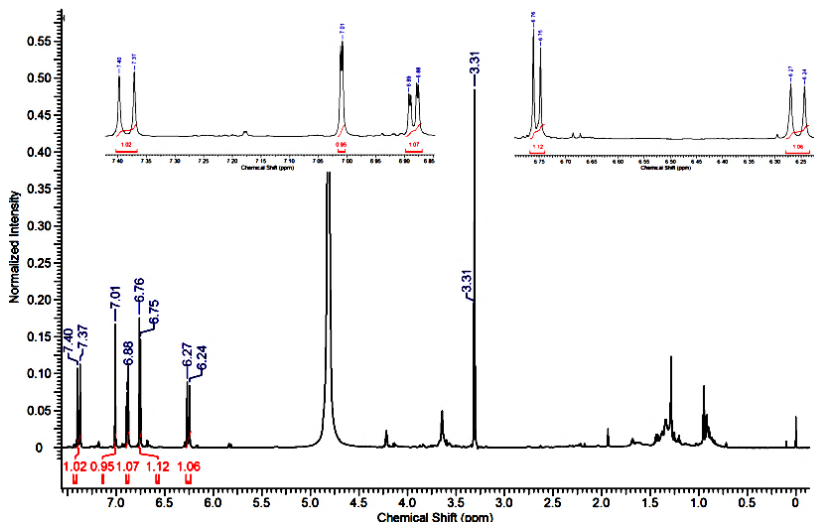


Figura 90 – Mapa de correlação HSQC (600 MHz, MeOD- d_4) do composto CUT1 (ácido cafeico).

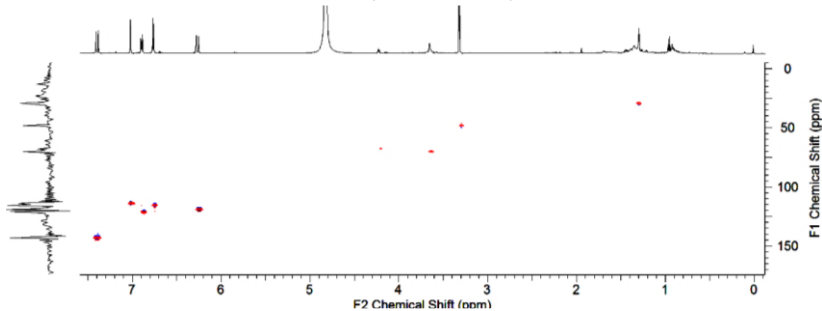


Figura 91 – Mapa de correlação HMBC (600 MHz, MeOD- d_4) do composto CUT1 (ácido cafeico).

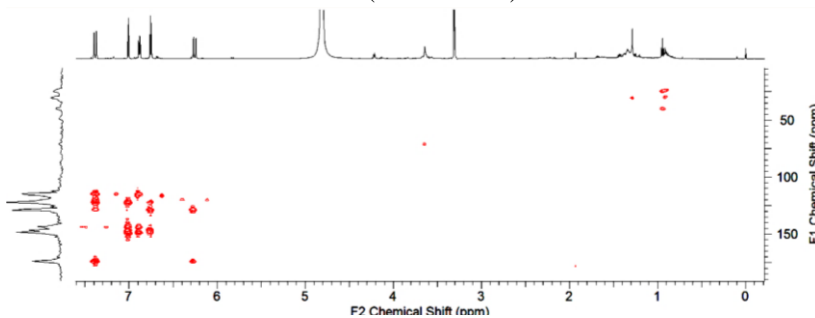


Figura 92 – Representação de algumas correlações HMBC do composto CUT1 (ácido cafeico).

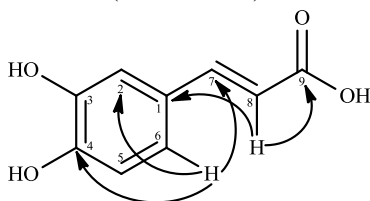


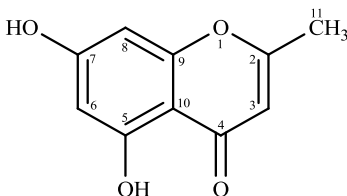
Tabela 19 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (600 e 100 MHz, MeOD- d_4) do ácido cafeico em comparação com dados da literatura.

Posição	δ_{H} (mult., J Hz) 600 MHz	δ_{C} 150 MHz	HMBC	BHATT (2011), D ₂ O	
				δ_{H} (mult., J Hz)	δ_{C}
				300 MHz	75 MHz
1	-	128,5	-	-	125,4
2	7,01 (d; 1,9)	114,8	3/4/6/7	7,10 (s)	114,8
3	-	146,6	-	-	145,2
4	-	148,5	-	-	148,3
5	6,75 (d; 8,2)	116,3	1/3/4/6	6,80 (d; 8,0)	115,8
6	6,88 (dd; 8,2; 1,9)	121,4	2/4/7	7,02 (d; 8,0)	121,4
7	7,38 (d; 15,9)	143,3	1/2/6/8/9	7,51 (d; 15,0)	141,4
8	6,26 (d; 15,9)	120,2	1/9	6,35 (d; 15,0)	127,5
9	-	173,8	-	-	174,7

5.3.2.2 Substância CUT2 (noreugenina)

O composto CUT2 (76,3 mg) (Figura 93) foi obtido da fração diclorometano na forma de cristais amarelos, com p.f. na faixa de 254,8-257,0 °C. Na análise por CCDA, esse composto apresentou-se como uma mancha com R_f = 0,52 no sistema de eluição CH₂Cl₂:AcOEt (75:25, v/v). Além disso, essa substância apresentou extinção de fluorescência sob luz UV em $\lambda = 254$ nm e, após revelação com solução de anisaldeído sulfúrico, adquiriu coloração amarelo-clara.

Figura 93 – Estrutura química do composto CUT2 (noreugenina).



O espectro de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) (Figura 94) do composto CUT2 apresentou sinais em região mais desprotegida, indicando tratar-se de uma substância aromática. Foi possível visualizar no espectro dois dupletos ressonando em δ_{H} 6,36 (1H; d; $J=2,0$ Hz; H-8) e δ_{H} 6,23 (1H; d; $J=2,0$ Hz; H-6), sugerindo a presença de um anel

benzeno 1,2,3,5-tetrassubstituído. A constante de acoplamento da ordem de 2,0 Hz é típica de padrão de substituição *meta*. A presença de um simpleto largo em δ_{H} 12,89 (1H; sl; OH) é referente a uma hidroxila quelatogênica localizada no carbono C-5 (DA SILVA, 2009). De modo suplementar, foi observado no espectro um sinal em δ_{H} 6,07 (1H; sl; H-3), característico de hidrogênio olefínico; e um simpleto largo em δ_{H} 2,37 (3H; s; H-11), atribuído a um grupo metila, o qual está mais desblindado, provavelmente, devido à proximidade a uma dupla ligação.

Todas as atribuições dos valores de ^{13}C foram realizadas com o auxílio dos experimentos de correlação heteronuclear HSQC (Figura 95) e HMBC (Figura 96). Os mapas de correlação HSQC e HMBC evidenciaram a presença de 10 átomos de carbonos, incluindo uma carbonila de cetona α,β -insaturada (δ_{C} 182,9), dois carbonos aromáticos sp^2 (δ_{C} 94,5 e 99,5), um carbono aromático quaternário (δ_{C} 104,9), três carbonos aromáticos quaternários oxigenados (δ_{C} 159,3; 164,1 e 164,8), um carbono sp^2 olefínico (δ_{C} 108,9), um carbono olefínico quaternário oxigenado (δ_{C} 168,3) e um grupamento metil (δ_{C} 20,3).

As correlações ^1H - ^{13}C a longa distância visualizadas no mapa de correlação HMBC permitiram estabelecer a conectividade entre os átomos na molécula. A hidroxila fenólica quelada por ligação hidrogênio-carbonila que ressona em δ_{H} 12,89 (OH) mostrou correlação com os carbonos C-5 (164,1), C-6 (99,5) e C-10 (104,9); e o hidrogênio olefínico em δ_{H} 6,07 (H-3) apresentou correlação com os carbonos em δ_{C} 20,3 (C-11), 104,9 (C-10), 168,3 (C-2) e 182,9 (C-4). Na Figura 97 são apresentadas a algumas correlações HMBC do composto CUT2.

Os dados espectroscópicos descritos acima permitiram propor um esqueleto básico de cromona. As informações obtidas através da análise dos espectros de RMN 1D e 2D aliadas à comparação com valores da literatura (ALI et al., 1990; HUANG et al., 2010; KANG; LI; HAO, 2003) permitiram caracterizar a substância CUT2 ($\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_4$) como sendo a cromona noreugenina (5,7-diidroxí-2-metil-cromona). Na Tabela 20 é realizada uma comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C da noreugenina com os dados reportados por Ali e colaboradores (1990).

A noreugenina é uma cromona encontrada em várias espécies vegetais, sendo descrita para as espécies *Mallotus apelta* (LU et al., 2014), *Hymenocallis littoralis* Salisb. (ANH; DUONG; HOANG, 2014), *Ammi visnaga* (SELLAMI et al., 2013), *Melaleuca cajuputi* Powell (RATTANABURI et al., 2014), *Pisonia aculeata* (WU et al., 2011b), *Knoxia corymbosa* (WANG et al., 2006b) e *Polygonum multiflorum* (RAO et al., 2009). Entre os efeitos biológicos e farmacológicos citados

na literatura para esse composto, podemos destacar a atividade antirrugosa (CAROLA et al., 2010) e antiviral (HU et al., 1994).

Figura 94 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do composto CUT2 (noreugenina).

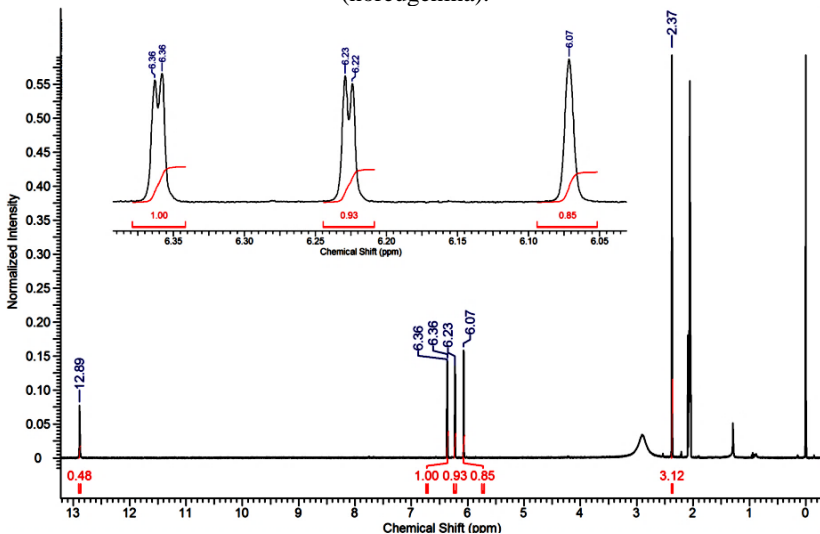


Figura 95 – Mapa de correlação HSQC (400 MHz, acetona- d_6) do composto CUT2 (noreugenina).

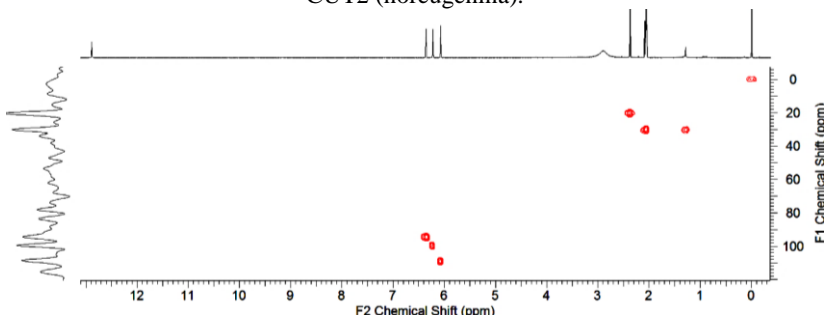


Figura 96 – Mapa de correlação HMBC (400 MHz, acetona- d_6) do composto CUT2 (noreugenina).

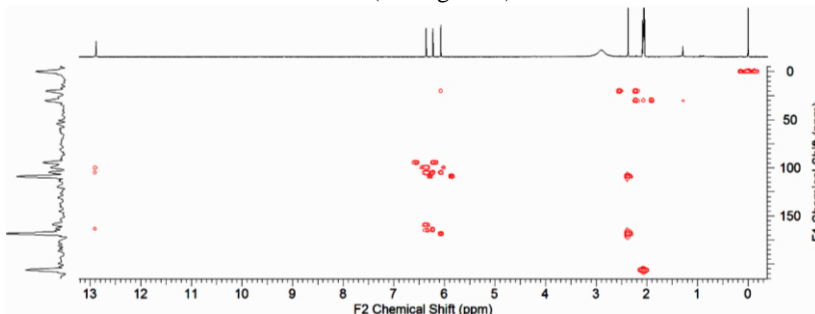


Figura 97 – Representação de algumas correlações HMBC do composto CUT2 (noreugenina).

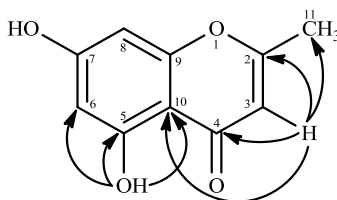


Tabela 20 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (400 e 100 MHz, acetona- d_6) da cromona noreugenina em comparação com dados da literatura.

Posição	δ_{H} (mult., J Hz) 400 MHz	δ_{C} 100 MHz	HMBC	ALI et al. (1990), DMSO- d_6	
				δ_{H} (mult., J Hz)	δ_{C}
				400 MHz	100 MHz
2	-	168,3	-	-	168,7
3	6,07 (sl)	108,9	2/4/10/11	6,13 (s)	108,8
4	-	182,9	-	-	182,6
5	-	164,1	-	-	164,9
6	6,23 (d; 2,0)	99,5	5/8/10	6,18 (d; 1,9)	99,6
7	-	164,8	-	-	168,4
8	6,36 (d; 2,0)	94,5	4/6/7/9/10	6,30 (d; 1,9)	94,6
9	-	159,3	-	-	162,4
10	-	104,9	-	-	104,3
11	2,37 (sl)	20,3	2/3	2,34 (sl)	20,7
OH	12,89 (sl)	-	5/6/10	12,83 (sl)	-

5.3.2.3 Amostra CUT3 (mistura de buteína e orobol)

A amostra CUT3 (61,9 mg) foi obtida da fração acetato de etila como um sólido amarelo. Na análise por CCDA, a mesma apresentou-se como uma mancha com valor de $R_f = 0,69$ no sistema de solvente $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (85:15, v/v), com extinção de fluorescência sob luz UV no comprimento de onda $\lambda = 254$ nm. Após revelação com o reagente químico anisaldeído sulfúrico, essa amostra desenvolveu cor laranja. A análise dos dados espectroscópicos de RMN 1D e 2D sugeriram que CUT3 trata-se, na realidade, de uma mistura de duas substâncias na proporção 1:1 (CUT3-1: Figura 98; CUT3-2: Figura 99). Adicionalmente, as informações obtidas por meio dos experimentos de correlação heteronuclear (HSQC e HMBC) permitiram estabelecer a atribuição inequívoca dos deslocamentos químicos de todos os átomos de hidrogênio e carbono dos dois compostos presentes nessa mistura.

Figura 98 – Estrutura química do composto CUT3-1 (buteína).

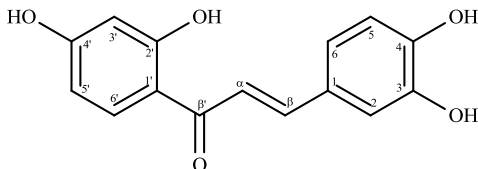
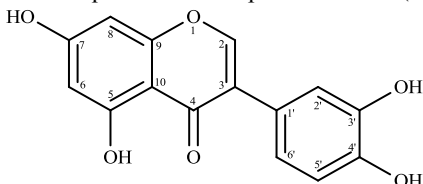


Figura 99 – Estrutura química do composto CUT3-2 (orobol).



O espectro de RMN ^1H (400 MHz, $\text{MeOD}-d_4$) (Figura 100) da amostra CUT3 apresentou sinais em região mais desprotegida, sugerindo que essa mistura é constituída por duas substâncias aromáticas. Além disso, a análise dos dados espectrais permitiu definir para a primeira substância (CUT3-1) um esqueleto de chalcona, enquanto para a segunda (CUT3-2) foi atribuído um esqueleto de isoflavona, ambos com núcleo fundamental $\text{C}_6\text{-C}_3\text{-C}_6$. O espectro de CUT3-1 apresentou um duplete em δ_{H} 7,54 (1H; d; $J=15,3$ Hz; H- α) e um duplo duplete em δ_{H} 7,72 (1H; dd; $J=15,3$; 0,5 Hz; H- β), típico de sistema *trans*-alceno de derivados aromáticos $\text{C}_6\text{-C}_3\text{-C}_6$ (HALBWIRTH,

2010). Além disso, também foram visualizados seis sinais de hidrogênios aromáticos referentes a dois anéis fenila em δ_{H} 7,94 (1H; d; $J=8,9$ Hz; H-6'), δ_{H} 6,42 (1H; dd; $J=8,9; 2,5$ Hz; H-5'), δ_{H} 6,29 (1H; d; $J=2,5$ Hz; H-3'), δ_{H} 7,11 (1H; ddd; $J=8,2; 2,3; 0,5$ Hz; H-6), δ_{H} 6,82 (1H; dd; $J=8,2; 0,4$ Hz; H-5) e δ_{H} 7,18 (1H; dd; $J=2,3; 0,4$ Hz; H-2). O composto CUT3-2 foi caracterizado pela presença de um simpleto em δ_{H} 8,03 (1H; s; H-2), típico de hidrogênio H-2 de isoflavonas. De maneira adicional, no espectro também foram observados cinco sinais na região de hidrogênios aromáticos: δ_{H} 7,02 (1H; dd; $J=1,9; 0,5$ Hz; H-2'), δ_{H} 6,85 (1H; dd; $J=8,9; 1,9$ Hz; H-6'), δ_{H} 6,82 (1H; dd; $J=8,9; 0,5$ Hz; H-5'), δ_{H} 6,34 (1H; d; $J=2,1$ Hz; H-8) e δ_{H} 6,22 (1H; dd; $J=2,1$ Hz; H-6). A Figura 101 apresenta uma expansão do espectro de RMN de ^1H da amostra CUT3 na região entre 7,62-6,18 ppm.

Todas as atribuições dos valores de ^{13}C foram realizadas com o auxílio dos experimentos de correlação HSQC (Figura 102) e HMBC (Figura 102). Os mapas de correlação HSQC e HMBC evidenciaram a presença de 15 átomos de carbonos para o composto CUT3-1 (δ_{C} 193,6; 167,5; 166,3; 150,1; 147,2; 146,1; 133,4; 128,4; 123,6; 118,5; 116,6; 115,9; 114,9; 109,2 e 103,9) e 15 átomos de carbonos para o composto CUT3-2 (δ_{C} 182,4; 165,9; 164,0; 159,8; 155,0; 147,2; 146,8; 124,9; 123,7; 121,8; 117,5; 116,6; 106,4; 100,2 e 94,8), reforçando a hipótese de esqueletos carbônicos com núcleo fundamental C₆-C₃-C₆.

As correlações a mais de uma ligação entre hidrogênio e carbono ($^2J_{\text{HC}}$, $^3J_{\text{HC}}$ e $^4J_{\text{HC}}$) visualizadas no mapa de correlação HMBC permitiram estabelecer a conectividade entre os fragmentos nas duas substâncias. Para o composto CUT3-1, o hidrogênio olefínico H- β (δ_{H} 7,72) mostrou correlação com os carbonos C- α (δ_{C} 118,5), C- β' (δ_{C} 193,6), C-1 (δ_{C} 128,4), C-2 (δ_{C} 115,9) e C-6 (δ_{C} 123,6); e o hidrogênio aromático em δ_{H} 6,29 (H-5') apresentou correlação com os carbonos C-1' (δ_{C} 114,9), C-3' (δ_{C} 109,2) e C-6' (δ_{C} 167,5). Para o composto CUT3-2, o hidrogênio olefínico H-2 (δ_{H} 8,03) mostrou correlação com os carbonos C-1' (δ_{C} 124,9), C-4 (δ_{C} 182,4) e C-9 (δ_{C} 159,8); e o hidrogênio aromático em δ_{H} 6,22 (H-6) apresentou correlação com os carbonos C-5 (δ_{C} 164,0), C-7 (δ_{C} 165,9), C-8 (δ_{C} 94,8) e C-10 (δ_{C} 106,4). Nas Figuras 103 e 104 são representadas algumas correlações HMBC dos compostos CUT3-1 e CUT3-2, respectivamente.

A análise dos dados espectroscópicos de RMN 1D e 2D apresentados acima e a comparação com dados publicados na literatura (CHEN et al., 2008; ZHENG; LIANG; HU, 2006) permitiram a identificação do composto CUT3-1 (C₁₅H₁₂O₅) como sendo a chalcona buteína, e do composto CUT3-2 (C₁₅H₁₀O₆) como sendo a isoflavona

orobol (isoluteolina). Nas Tabelas 21 e 22 é realizada uma comparação dos dados de RMN da buteína e da isoluteolina, respectivamente, com dados da literatura.

Figura 100 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{MeOD-}d_4$) da amostra CUT3 (buteína e orobol).

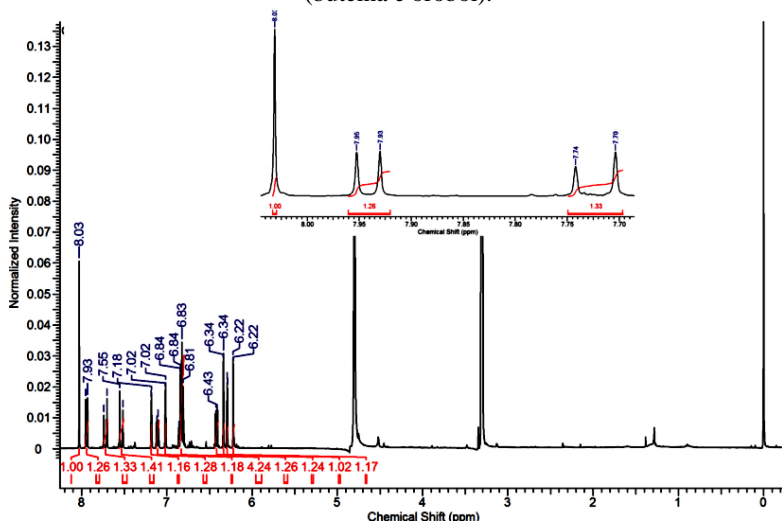


Figura 101 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{MeOD-}d_4$) na região de 7,62-6,18 ppm.

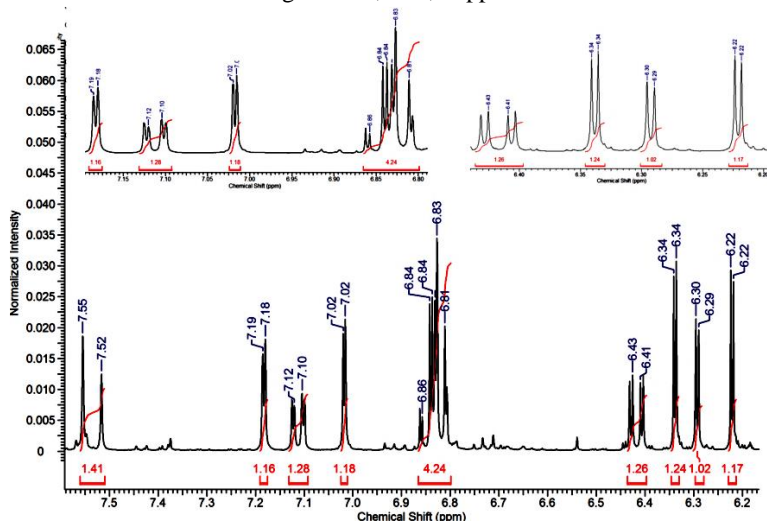


Figura 102 – Mapa de correlação HSQC (400 MHz, MeOD- d_4) da amostra CUT3 (buteína e orobol).

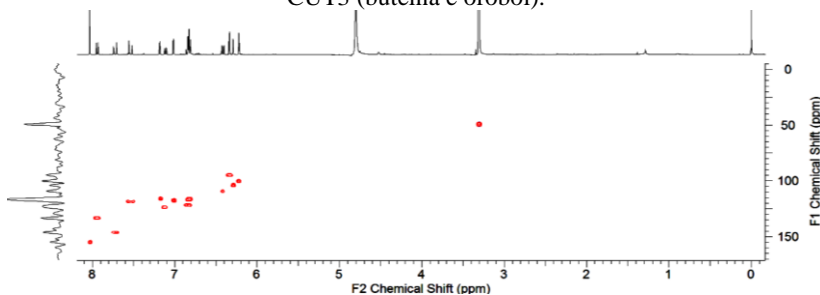


Figura 103 – Mapa de correlação HMBC (400 MHz, MeOD- d_4) da amostra CUT3 (buteína e orobol).

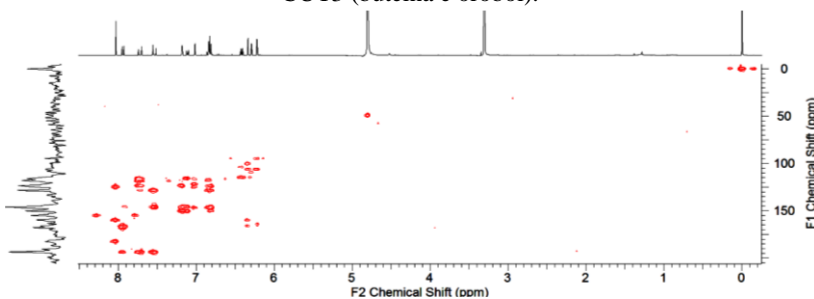


Figura 104 – Representação de algumas correlações HMBC do composto CUT3-1 (buteína).

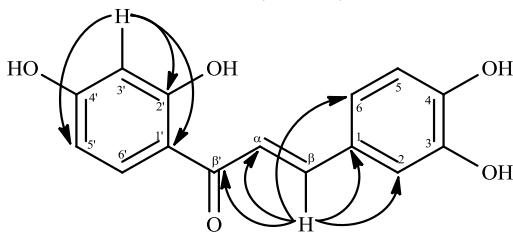


Figura 105 – Representação de algumas correlações HMBC do composto CUT3-2 (orobol).

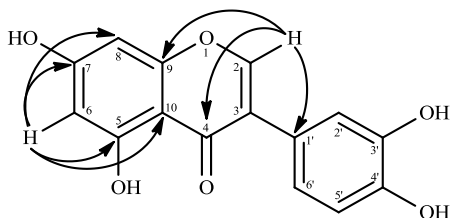


Tabela 21 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (400 e 100 MHz, $\text{MeOD-}d_4$) da chalcona buteína em comparação com dados da literatura.

Posição	δ_{H} (mult., J Hz) 400 MHz	δ_{C} 100 MHz	HMBC	CHEN et al. (2008), acetona- d_6	
				δ_{H} (mult., J Hz) 500 MHz	δ_{C} 125 MHz
				1	-
2	7,18 (dd; 2,3; 0,4)	115,9	$\beta/3/4/6$	7,34 (d; 2,0)	115,9
3	-	147,2	-	-	146,3
4	-	150,1	-	-	149,2
5	6,82 (dd; 8,2; 0,4)	116,6	1/4/6	6,89 (d; 8,5)	116,4
6	7,11 (ddd; 8,2; 2,3; 0,5)	123,6	$\beta/2/4/5$	7,21 (dd; 8,5; 2,0)	123,4
1'	-	114,9	-	-	114,5
2'	-	167,5	-	-	167,0
3'	6,29 (d; 2,5)	103,9	1'/2'/5'	6,35 (d; 2,0)	103,7
4'	-	166,3	-	-	166,5
5'	6,42 (dd; 8,9; 2,5)	109,2	1'/3'	6,46 (dd; 8,5; 2,0)	108,6
6'	7,94 (d; 8,9)	133,4	$\beta'/2'/4'$	8,10 (d; 9,0)	133,2
α	7,54 (d; 15,3)	118,5	$\beta/\beta'/1$	7,68 (d; 15,5)	118,3
β	7,72 (dd; 15,3; 0,5)	146,1	$\alpha/\beta'/1/2/6$	7,75 (d; 15,5)	145,5
β'	-	193,6	-	-	192,7

Tabela 22 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (400 e 100 MHz, MeOD- d_4) da isoflavona orobol (isoluteolina) em comparação com dados da literatura.

Posição	δ_{H} (mult., J Hz) 400 MHz	δ_{C} 100 MHz	HMBC	ZHENG; LIANG; HU (2006), acetona- d_6	
				δ_{H} (mult., J Hz)	δ_{C}
				300 MHz	75 MHz
2	8,03 (s)	155,0	1'4/9	8,11 (s)	154,3
3	-	123,7	-	-	123,4
4	-	182,4	-	-	181,5
5	-	164,0	-	-	163,4
6	6,22 (d; 2,1)	100,2	5/7/8/10	6,26 (d; 1,8)	99,7
7	-	165,9	-	-	165,2
8	6,34 (d; 2,1)	94,8	6/7/9/10	6,38 (d; 1,8)	94,5
9	-	159,8	-	-	159,0
10	-	106,4	-	-	105,7
1'	-	124,9	-	-	124,1
2'	7,02 (dd; 1,9; 0,5)	117,5	1'5'/6'	7,10 (d; 1,5)	117,0
3'	-	147,2	-	-	145,6
4'	-	146,8	-	-	146,4
5'	6,82 (dd; 8,9; 0,5)	116,6	2'/3'	6,86 (d; 8,4)	115,9
6'	6,85 (dd; 8,9; 1,9)	121,8	3/2'/4'	6,90 (dd; 8,4; 1,5)	121,4

A buteína foi previamente isolada de espécies vegetais de diferentes gêneros (CAVALCANTE et al., 2012; CHEN et al., 2008; HASHIDA et al., 2014; PARK et al., 2014; SERGENT et al., 2014; ZHAO et al., 2013). Além disso, vários trabalhos publicados na literatura têm demonstrado o seu potencial biológico. Já foram relatadas para essa chalcona atividade antiadipogênica (SONG et al., 2013), anticoagulante (LIAO; LUO; KONG, 2013), antifibrótica (SZUSTER-CIESIELSKA et al., 2014), antitumoral (CHO; WOO; KO, 2014; JANG et al., 2012; RAJENDRAN et al., 2011) e antioxidante (FARHOOSH, 2005).

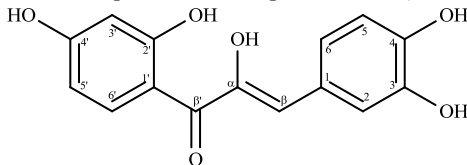
No tocante ao orobol, o mesmo já foi isolado de diferentes espécies, tais como *Eclipta prostrata* (TEWTRAKUL et al., 2011), *Thermopsis dolichocarpa*, *Vexibia alopecuroides* (SYROV et al., 2001), *Cudrania tricuspidata* (Carr.) Bur. (ZHENG; LIANG; HU, 2006), *Dalbergia odorifera* (LEE et al., 2013a), *Litsea guatemalensis* Mez. (SIMÃO DA SILVA et al., 2012), entre outras. Com relação aos estudos

biológicos realizados com essa isoflavona, são descritas atividades anti-inflamatória (SIMÃO DA SILVA et al., 2012; TEWTRAKUL et al., 2011), antioxidante (RUEFER & KULLING, 2006), hepatoprotetora (SYROV et al., 2001), hipolipidêmica (KHUSHBAKTOVA; SYROV; BATIROV, 1991) e antitumoral (YAMASHITA; KAWADA; NAKANO, 1990).

5.3.2.4 Substância CUT4 (α -hidroxi-buteína)

O composto CUT4 (122,7 mg) (Figura 106) foi obtido da fração acetato de etila na forma de um sólido laranja, com p.f. na faixa de 177,1-178,3 °C. Na análise por CCDA, esse composto apresentou-se como uma mancha com $R_f = 0,65$ no sistema de eluição $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (85:15, v/v). Além disso, essa substância apresentou extinção de fluorescência sob luz UV em $\lambda = 254$ nm e, após revelação com solução de anisaldeído sulfúrico, intensificou a coloração laranja.

Figura 106 – Estrutura química do composto CUT4 (α -hidroxi-buteína).



O espectro de RMN de ^1H (600 MHz, $\text{MeOD}-d_4$) (Figura 107) do composto CUT4 apresentou um conjunto de sinais entre δ_{H} 7,61 e 6,699; compatíveis com a presença de três hidrogênios aromáticos de um sistema de acoplamento ABX para o anel B: δ_{H} 7,61 (1H; d; $J=8,4$ Hz; H-6'), δ_{H} 6,72 (1H; d; $J=2,0$ Hz; H-3') e δ_{H} 6,699 (1H; dd; $J=8,4$; 2,0 Hz; H-5'). Observaram-se também no espectro um par de dupletos ressonando em δ_{H} 7,52 (1H; d; $J=2,0$ Hz; H-2) e δ_{H} 6,84 (1H; d; $J=8,3$ Hz; H-5), e um duplo duplete em δ_{H} 7,24 (1H; d; $J=8,3$; 2,0 Hz; H-6), sugerindo a presença de um anel benzênico do tipo 1,2,4-trissubstituído. Adicionalmente, um simpleto típico de hidrogênio olefínico em δ_{H} 6,696 (1H; s) foi atribuído ao hidrogênio β à carbonila. Esses dados espectroscópicos sugerem fortemente a presença de uma estrutura básica do tipo $\text{C}_6\text{-C}_3\text{-C}_6$, a qual é consistente com um esqueleto de α -hidroxi-chalconas. Além disso, a geometria molecular da olefina dessa chalcona foi determinada com configuração molecular *trans* com base em estudos anteriores (FERREIRA; VAN DER MERWE; ROUX, 1974; MALAN

& ROUX, 1974; METUNO et al., 2008; VAN DER MERWE et al., 1972).

Todas as atribuições dos valores de ^{13}C foram realizadas com o auxílio do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 108) e dos experimentos de correlação heteronuclear HSQC (Figura 109) e HMBC (Figura 110). O espectro de RMN de ^{13}C e os mapas de correlação HSQC e HMBC evidenciaram a presença de 15 átomos de carbonos, incluindo uma carbonila de cetona α,β -insaturada (δ_{C} 184,6), seis carbonos sp^2 aromáticos (δ_{C} 99,4; 114,0; 116,7; 118,7; 126,5 e 126,9), dois carbonos aromáticos quaternários (δ_{C} 115,0 e 125,4), quatro carbonos aromáticos quaternários oxigenados (δ_{C} 146,8; 149,5; 168,5 e 169,7), um carbono sp^2 olefínico (δ_{C} 114,7) e um carbono olefínico quaternário oxigenado (δ_{C} 147,7).

A partir das correlações espectroscópicas ^1H - ^{13}C a longa distância observadas no mapa de correlação HMBC foi possível estabelecer a conectividade entre os átomos na molécula. A atribuição do hidrogênio H- β foi confirmada por suas correlações com os carbonos C-2 (δ_{C} 118,7); C-6 (δ_{C} 126,5); C- α (δ_{C} 147,7) e C- β' (δ_{C} 184,6). A ressonância de RMN de ^{13}C em δ_{C} 147,7 foi atribuída ao carbono C- α . Além disso, o hidrogênio aromático H-5 (δ_{H} 6,84) mostrou correlação com os carbonos C-1 (δ_{C} 125,4), C-3 (δ_{C} 146,8) e C-4 (δ_{C} 149,5); e o hidrogênio em δ_{H} 6,699 (H-5') apresentou correlação com os carbonos aromáticos em δ_{C} 115,9 (C-1') e δ_{C} 99,4 (C-3'). Na Figura 111 são apresentadas algumas correlações HMBC do composto CUT4.

A combinação de todos os dados espectroscópicos apresentados acima e a comparação com dados disponíveis na literatura (METUNO et al., 2008) permitiram a identificação do composto CUT4 ($\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_6$) como sendo a chalcona α -hidroxi-buteína (2',4',3,4- α -pentahidroxi-chalcona). Na Tabela 22 estão sumarizados os dados de RMN de ^1H e ^{13}C da α -hidroxi-buteína, bem como as correlações ^1H - ^{13}C a longa distância observadas no mapa de correlação HMBC e a comparação com os dados descritos por Metuno e colaboradores (2008). No entanto, é importante salientar que alguns dos sinais descritos por esses autores apresentam valores de deslocamento químico de ^1H e ^{13}C trocados.

A ocorrência natural de α -hidroxi-chalconas é extremamente rara na natureza, sendo descritos até agora somente alguns exemplos (FERREIRA; VAN DER MERWE; ROUX, 1974; MALAN & ROUX, 1974; METUNO et al., 2008). A α -hidroxi-buteína foi descrita anteriormente em apenas quatro espécies vegetais: *Peltogyne pubescens*, *P. venosa* (MALAN & ROUX, 1974), *Trachylobium verrucosum* (FERREIRA; VAN DER MERWE; ROUX, 1974) e *Treculia acuminata*

(METUNO et al., 2008). Não há relatos na literatura a respeito do potencial biológico desse composto.

Figura 107 – Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, MeOD- d_4) do composto CUT4 (α -hidroxi-buteína).

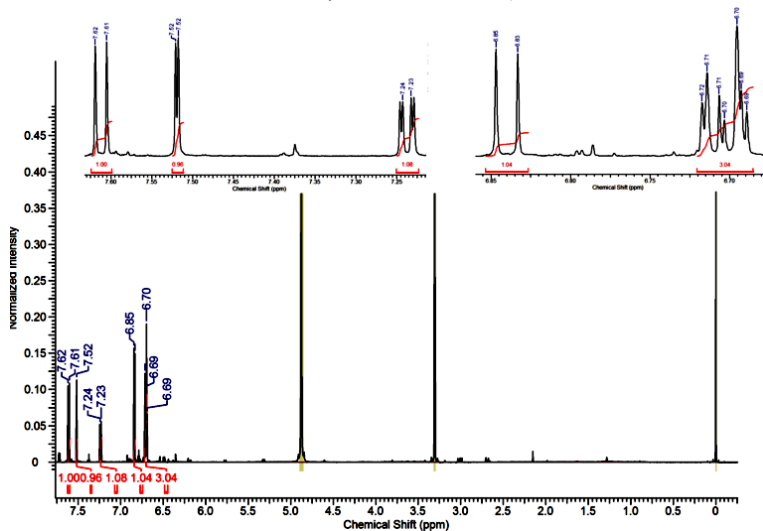


Figura 108 – Espectro de RMN de ^{13}C (600 MHz, MeOD- d_4) do composto CUT4 (α -hidroxi-buteína).

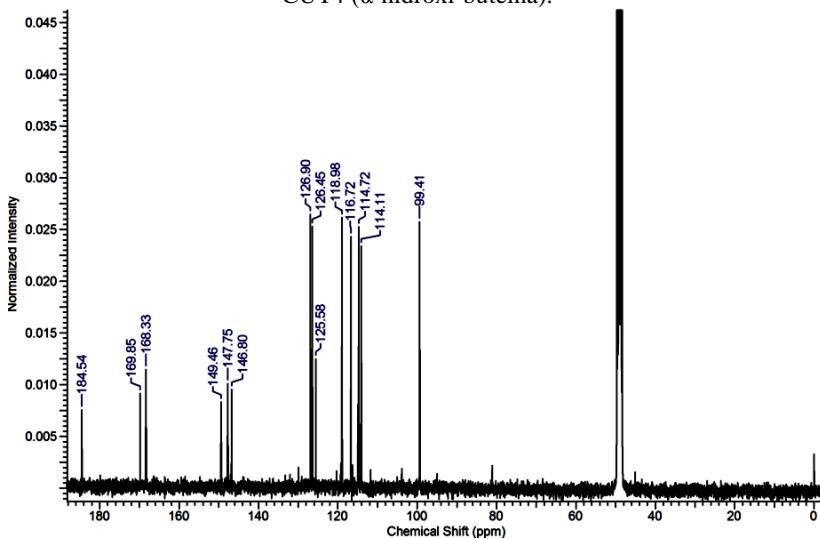


Figura 109 – Mapa de correlação HSQC (600 MHz, MeOD- d_4) do composto CUT4 (α -hidroxi-buteína).

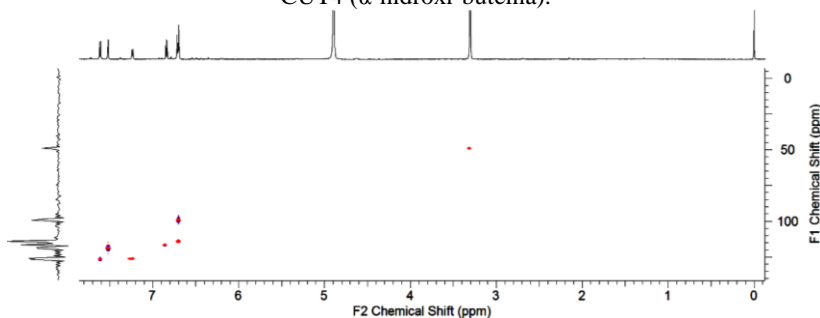


Figura 110 – Mapa de correlação HMBC (600 MHz, MeOD- d_4) do composto CUT4 (α -hidroxi-buteína).

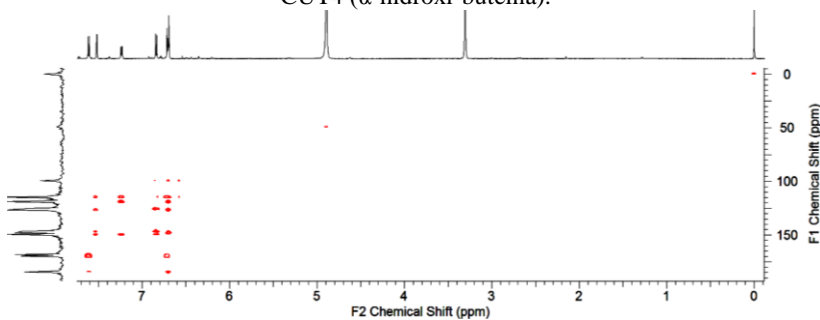


Figura 111 – Representação de algumas correlações HMBC do composto CUT4 (α -hidroxi-buteína).

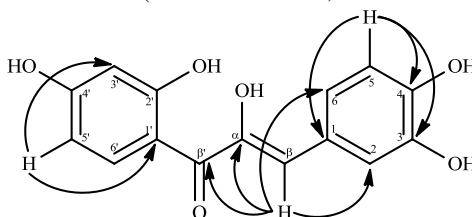


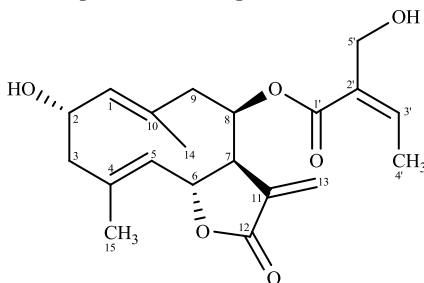
Tabela 23 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (600 e 150 MHz, $\text{MeOD-}d_4$) da chalcona α -hidroxi-buteína em comparação com dados da literatura.

Posição	δ_{H} (mult., J Hz) 600 MHz	δ_{C} 150 MHz	HMBC	METUNO et al. (2008), CDCl_3	
				δ_{H} (mult., J Hz)	δ_{C}
				600 MHz	150 MHz
1	-	125,4	-	-	113,8
2	7,52 (d; 2,0)	118,7	$\beta/3/4/6$	7,53 (d; 1,9)	117,9
3	-	146,8	-	-	145,7
4	-	149,5	-	-	148,4
5	6,84 (d; 8,3)	116,7	1/3/4	6,85 (d; 8,2)	115,7
6	7,24 (dd; 8,3; 2,0)	126,5	$\beta/2/4/5$	7,26 (dd; 8,2; 1,9)	125,4
1'	-	115,0	-	-	124,5
2'	-	169,7	-	-	168,8
3'	6,72 (d; 2,0)	99,4	1'/2'/4'/5'	6,69 (d; 1,9)	113,6
4'	-	168,5	-	-	167,4
5'	6,699 (dd; 8,4; 2,0)	114,0	1'/3'	6,70 (dd; 8,3; 1,9)	113,1
6'	7,61 (d; 8,4)	126,9	$\beta'/2'/4'$	7,60 (d; 8,3)	125,8
α	-	147,7	-	-	146,7
β	6,696 (s)	114,7	$\alpha/\beta'/2/6$	6,71 (s)	98,4
β'	-	184,6	-	-	183,4

5.3.2.5 Substância CUT5 (desacetileupaserrina)

O composto CUT5 (77,9 mg) (Figura 112) foi obtido da fração diclorometano na forma de um sólido cristalino com cor branca, com p.f. na faixa de 163,5-165,0 °C. Na análise por CCDA, esse composto apresentou-se como uma mancha com $R_f = 0,45$ no sistema de solvente $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{AcOEt}$ (40:60, v/v). Além disso, essa substância apresentou extinção de fluorescência sob luz UV em $\lambda = 254$ nm e, após revelação com o agente cromogênico anisaldeído sulfúrico, desenvolveu cor azul-marinho.

Figura 112 – Estrutura química do composto CUT5 (desacetileupaserrina).



O espectro de massas de alta resolução (Figura 113) do composto CUT5, obtido com fonte de ionização por *Electrospray* no modo positivo [ESI(+)-MS], registrou um íon de m/z 385,1645, referente ao aduto de sódio $[M+Na]^+$ (calculado m/z 385,1627). Essa massa é compatível com a fórmula molecular $C_{20}H_{26}NaO_6$, e indica um índice de deficiência de hidrogênios (IDH) igual a oito para esse composto.

O espectro de RMN de 1H (600 MHz, acetona- d_6) (Figura 114) da substância CUT5 apresentou dois dupletos em δ_H 6,15 (1H; d; $J=3,6$ Hz; H-13a) e δ_H 5,63 (1H; d; $J=3,2$ Hz; H-13b), característicos de hidrogênios olefínicos de grupamento exometileno, acoplando com um hidrogênio ressonando em δ_H 3,24 (1H; dddd; $J=8,5; 3,6; 3,2; 1,0$ Hz; H-7), dando evidências da presença de uma lactona sesquiterpênica α,β -insaturada. Também foi possível visualizar dois sinais característicos de hidrogênios olefínicos em δ_H 5,10 (1H; m; H-5) e δ_H 5,09 (1H; m; H-1); e três sinais típicos de hidrogênios oximetínicos em δ_H 5,89 (1H; ddd; $J=5,2; 2,1; 1,0$ Hz; H-8), δ_H 5,20 (1H; ddd; $J=10,0; 8,5; 0,3$ Hz; H-6) e δ_H 4,73 (1H; ddd; $J=9,7; 9,7; 5,8$ Hz; H-2). Um conjunto de sinais com deslocamento químico em δ_H 2,80 (1H; dd; $J=14,3; 5,3$ Hz; H-9a), δ_H 2,66 (1H; dd, $J=10,9; 5,8$ Hz; H-3a), δ_H 2,49 (1H; dd, $J=14,3; 2,1$ Hz; H-9b) e δ_H 2,07 (1H; m; H-3b) foi atribuído a hidrogênios diastereotópicos de grupo metileno. As constantes de acoplamento da ordem de 14,3 e 10,9 Hz são típicas de acoplamento geminal ($^2J_{HH}$) hidrogênio-hidrogênio. Também foi possível visualizar no espectro um duplo duplete em δ_H 1,80 (3H; dd; $J=1,5; 0,3$ Hz; H-15) e um duplete em δ_H 1,57 (3H; d; $J=1,0$ Hz; H-14), integrando para 3H cada, correspondentes a dois grupamentos metil olefínicos. As constantes de acoplamento da ordem de 1,5 e 1,0 Hz são sugestivas de acoplamento alílico ($^4J_{HH}$). Por fim, a cadeia lateral éster apresentou quatro sinais com deslocamento químico em δ_H 6,37 (1H; qdd; $J=7,2; 1,5; 1,5$ Hz; H-3'), δ_H 4,27 (1H; ddd; $J=13,4; 1,5; 1,5$ Hz; H-5'a), δ_H 4,17 (1H; ddd;

$J=13,4; 1,5; 1,5$ Hz; H-5'a) e $\delta_{\text{H}} 1,99$ (3H; ddd; $J=7,2; 1,5; 1,5$ Hz; H-4'), indicando a presença de um grupamento acetoxi-sarraceniólxi. A Figura 115 apresenta uma expansão do espectro de RMN de ^1H do composto CUT5 na região entre 5,63-1,57 ppm. Com o intuito de confirmar a atribuição do hidrogênio H-7, foi realizada a simulação da multiplicidade e dos valores das constantes de acoplamento com o auxílio do programa FOMSC3 (CONSTANTINO et al., 2006). Para tal, foram utilizados os valores de deslocamento químico e de J (Hz) obtidos no espectro experimental (Figura 116). Na Figura 117 é apresentado o mapa de correlação COSY (J_{HH}), confirmando os acoplamentos observados no espectro de RMN de ^1H . Entre os acoplamentos observados nesse mapa de correlação, podemos destacar o acoplamento do hidrogênio em $\delta_{\text{H}} 3,24$ (H-7) com os hidrogênios em $\delta_{\text{H}} 6,15$ (H-13a), $\delta_{\text{H}} 5,63$ (H-13b) e $\delta_{\text{H}} 5,20$ (H-6); e do hidrogênio em $\delta_{\text{H}} 4,73$ (H-2) com os hidrogênios em $\delta_{\text{H}} 5,09$ (H-1), $\delta_{\text{H}} 2,66$ (H-3a) e $\delta_{\text{H}} 2,07$ (H-3b).

A configuração relativa dos carbonos quirais foi deduzida através do valor das constantes de acoplamento, as quais foram correlacionadas com o ângulo diedro obtido por meio de estereomodelos e aplicação da curva de Karplus; e também foram utilizados experimentos de NOE. As grandes constantes de acoplamentos observadas entre os hidrogênios H-5 e H-6 ($J_{5,6} = 10,0$ Hz) e entre H-6 e H-7 ($J_{6,7} = 8,5$ Hz) sugerem um arranjo antiperiplanar de H-5, H-6 e H-7. Assumindo que o hidrogênio H-7 possui orientação α , como ocorre na grande maioria das lactonas sesquiterpênicas de angiospermas (FISHER, 1990; IBRAHIM et al., 2013; SHI et al. 2015), pode-se propor uma orientação β para o hidrogênio H-6. Além disso, a irradiação seletiva do sinal de H-7 ($\delta_{\text{H}} 3,24$), por meio do experimento de NOE (Figura 118), não causou alteração no sinal de H-6 ($\delta_{\text{H}} 5,20$), corroborando a configuração sugerida anteriormente. Similarmente, a pequena constante de acoplamento exibida entre os hidrogênios H-7 e H-8 ($J_{7,8} = 1,0$ Hz) indica uma orientação β para a cadeia lateral éster e α para o hidrogênio H-8. Essa informação foi confirmada pelo experimento de NOE, uma vez que a irradiação seletiva do sinal de H-8 ($\delta_{\text{H}} 5,89$) (Figura 119) causou alteração no sinal de H-7 ($\delta_{\text{H}} 3,24$) (H-7 e H-8 possuem a mesma configuração relativa). Para o grupo hidroxila localizado no carbono C-2 foi atribuída uma orientação α com base nos valores das constantes de acoplamento observados entre o hidrogênio H-2 e os hidrogênios H-3a ($J_{2,3a} = 5,8$ Hz) e H-3b ($J_{2,3b} = 9,7$ Hz).

Todas as atribuições dos valores de ^{13}C foram realizadas com o auxílio dos experimentos de correlação heteronuclear HSQC (Figura 120) e HMBC (Figura 121). Os mapas de correlação HSQC e HMBC

evidenciaram a presença de 20 átomos de carbono, incluindo uma carbonila de lactona (δ_C 169,7), uma carbonila de éster (δ_C 166,2), quatro carbonos sp^2 olefínicos (δ_C 120,4; 130,2; 135,9 e 138,9), quatro carbonos olefínicos quaternários (δ_C 133,5; 134,3; 138,9 e 143,2), quatro carbonos sp^3 oxigenados (δ_C 63,6; 69,3; 72,6 e 76,3), dois metilenos (δ_C 44,5 e 49,8), um metino (δ_C 53,5) e três metilas (δ_C 15,6; 18,7 e 20,1).

As correlações a mais de uma ligação entre hidrogênio e carbono ($^2J_{HC}$, $^3J_{HC}$ e $^4J_{HC}$) visualizadas no mapa de correlação HMBC permitiram estabelecer a conectividade entre os fragmentos na molécula. A posição da cadeia lateral éster na molécula foi confirmada pela correlação do hidrogênio oximetínico H-8 (δ_H 5,89) com a carbonila de éster em δ_H 166,2 (C-1'). Além disso, o hidrogênio olefínico H-3' (δ_H 6,37) mostrou correlação com os carbonos C-1' (δ_C 166,2), C-4' (δ_C 15,6) e C-5' (δ_C 63,6); e o hidrogênio H-2 (δ_H 4,73) apresentou correlação com os carbonos C-3 (δ_C 49,8) e C-10 (δ_C 134,3). A Figura 122 apresenta algumas correlações HMBC do composto CUT5.

O assinalamento de todos os sinais de RMN de 1H e ^{13}C confirmou a presença de uma lactona sesquiterpênica com esqueleto germacranolídeo 12,6 α -*trans* lactonizado apresentando um grupamento acetoxi-sarracenióxi no carbono C-8 e um grupo hidroxila no carbono C-2. A análise dos dados espectroscópicos de HRMS, RMN 1D e 2D e a comparação com dados descritos na literatura (HERZ & DE GROOTE, 1977; HERZ; KUMAR; BLOUNT, 1980; KUPCHAN et al., 1973) permitiram caracterizar o composto CUT5 (C₂₀H₂₆O₆) como sendo a lactona desacetileupaserrina. Na Tabela 24 é realizada uma comparação dos dados de RMN de 1H e ^{13}C da desacetileupaserrina com os dados descritos por Herz e De Groote (1977); e Herz, Kumar e Blount (1980).

Figura 113 – Espectro de massas de alta resolução do composto CUT5 (desacetileupaserrina) obtido por ESI(+)-HRMS.

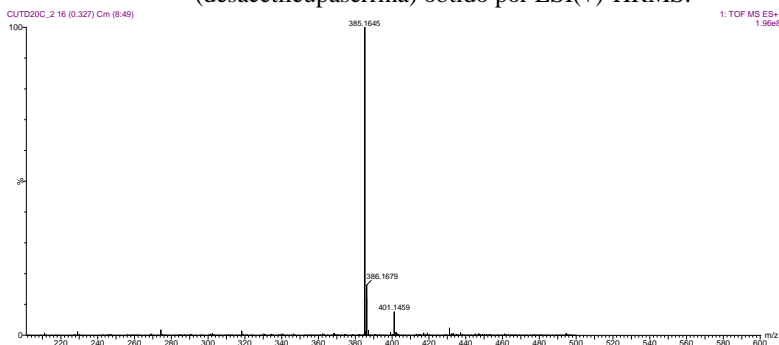


Figura 114 – Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, acetona- d_6) do composto CUT5 (desacetileupaserrina).

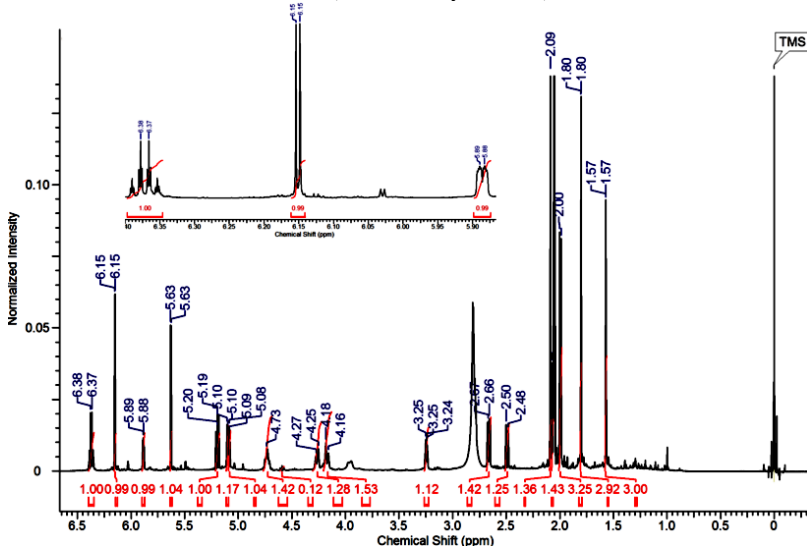


Figura 115 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (600 MHz, acetona- d_6) do composto CUT5 na região de 5,63-1,57 ppm.

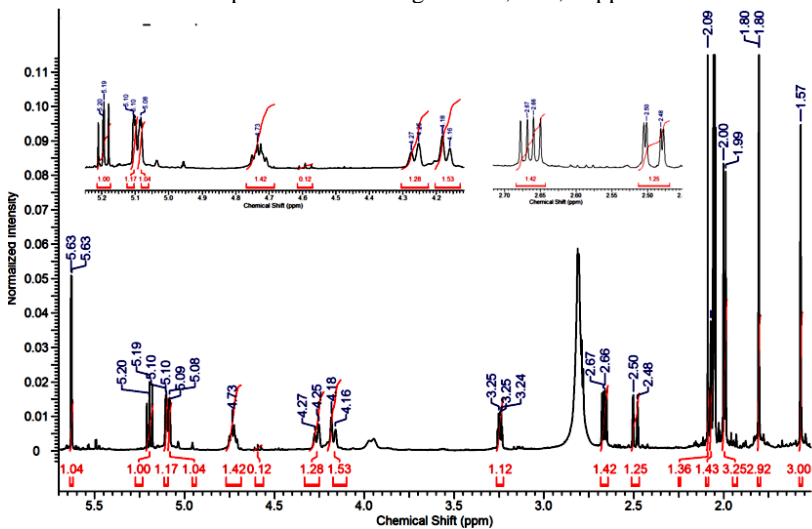


Figura 116 – Comparação do sinal de RMN de ^1H de H-7 do composto CUT5 (esquerda – espectro experimental; direita – simulador FOMSC3).

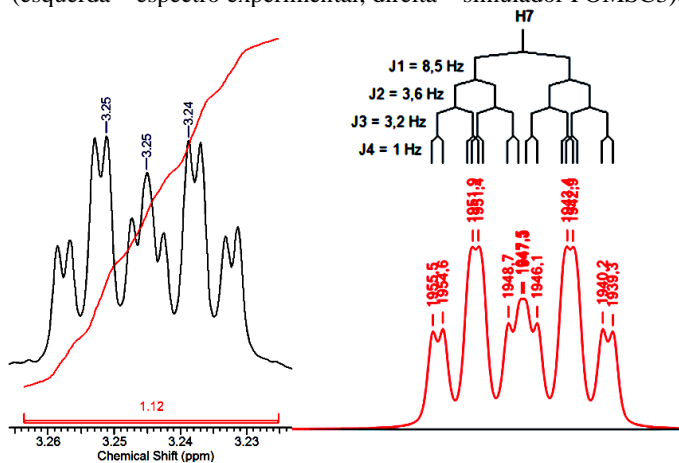


Figura 117 – Mapa de correlação COSY (600 MHz, acetona- d_6) do composto CUT5 (desacetileupaserrina).

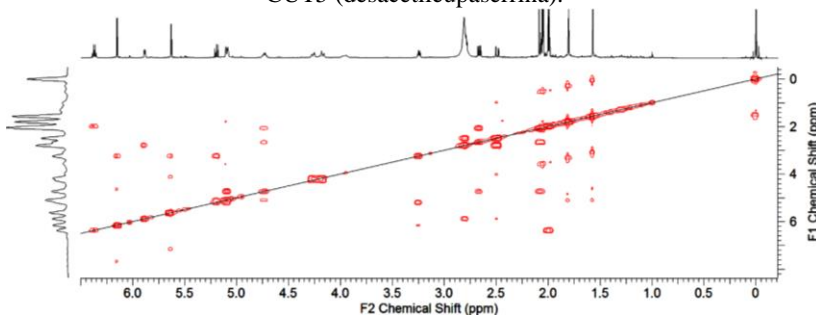


Figura 118 – Espectro de NOE (600 MHz, acetona- d_6) do composto CUT5 (desacetileupaserrina) irradiado em 3,24 ppm.

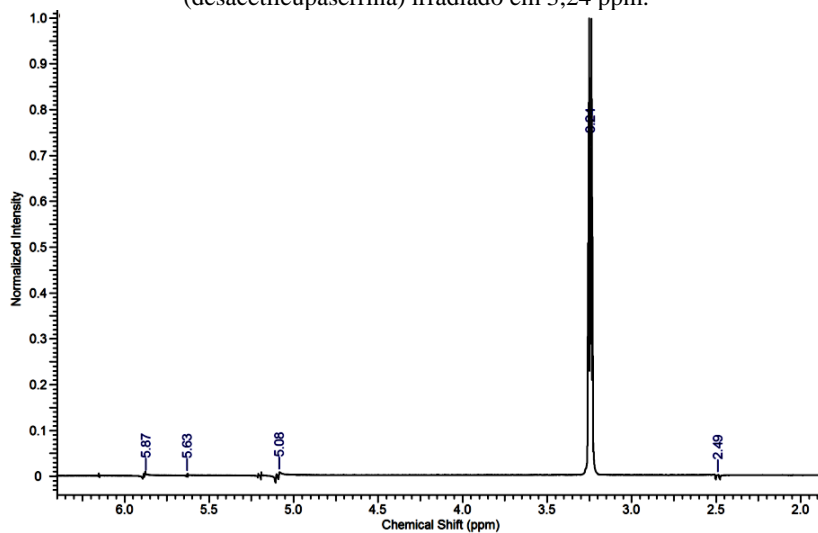


Figura 119 – Espectro de NOE (600 MHz, acetona- d_6) do composto CUT5 (desacetileupaserrina) irradiado em 5,89 ppm.

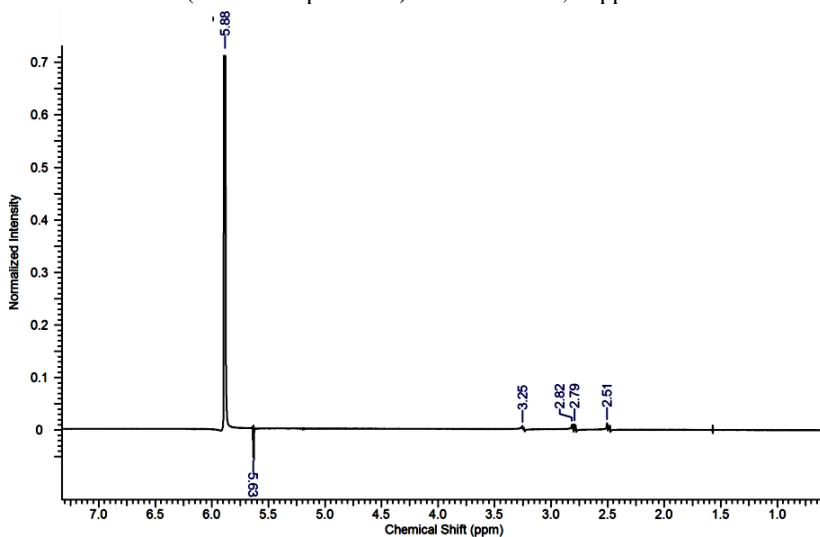


Figura 120 – Mapa de correlação HSQC (600 MHz, acetona- d_6) do composto CUT5 (desacetileupaserrina).

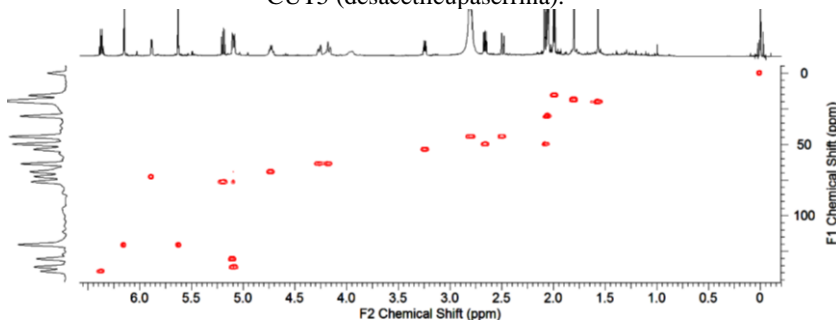


Figura 121 – Mapa de correlação HMBC (600 MHz, acetona- d_6) do composto CUT5 (desacetileupaserrina).

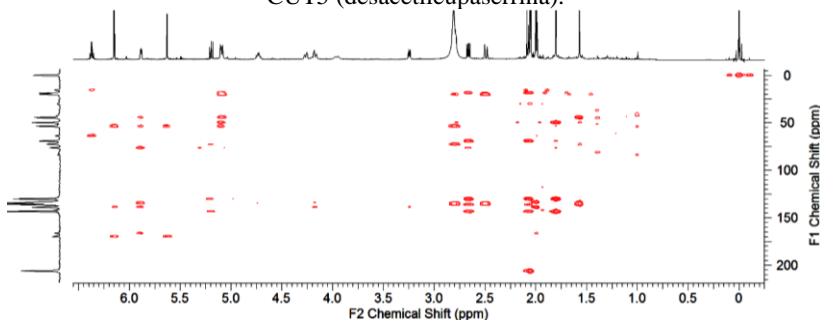


Figura 122 – Representação de algumas correlações HMBC do composto CUT5 (desacetileupaserrina).

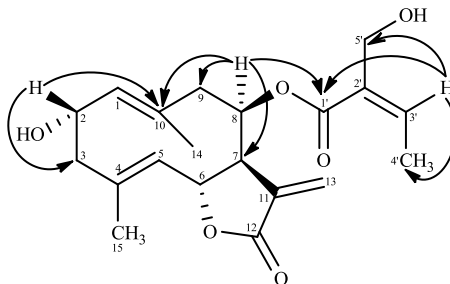


Tabela 24 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (600 e 150 MHz, acetona- d_6) da lactona desacetileupaserrina em comparação com dados da literatura.

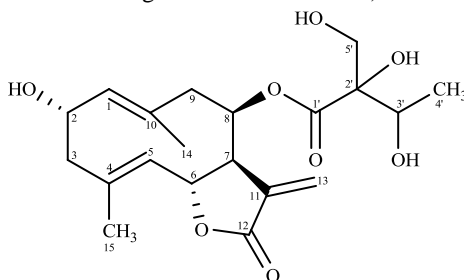
Posição	δ_{H} (mult., J Hz) 600 MHz	δ_{C} 150 MHz	HMBC	HERZ & DE GROOTE (1977), CDCl_3	HERZ; KUMAR; BLOUNT (1980), CDCl_3
				δ_{H} (mult., J Hz) 300 MHz	δ_{C} 67,09 MHz
1	5,09 (m)	135,9	9/14	5,00 (m)	134,1
2	4,73 (ddd; 9,7; 9,7; 5,8)	69,3	3/10	4,74 (dt; 9,5; 5,5)	69,1
3a	2,66 (dd; 10,9; 5,8)	49,8	1/2/4/5/15	2,72 (dd; 9,5; 5,5)	48,8
3b	2,07 (m)	49,8	1/2/4/5/15	2,10 (t; 9,5)	48,8
4	-	143,2	-	-	143,1
5	5,10 (m)	130,2	3/7/15	5,00 (m)	129,2
6	5,20 (ddd; 10,0; 8,5; 0,3)	76,3	4/5/7/8	5,13 (dd; 10,0; 7,0)	76,0
7	3,24 (dddd; 8,5; 3,6; 3,2; 1,0)	53,5	5/6/11/13	2,94 (dddd; 7,0; 4,0; 3,5; 3,0)	53,0
8	5,89 (ddd; 5,2; 2,1; 1,0)	72,6	6/7/9/10/ 11/1'	5,85 (ddd; 6,0; 4,0; 2,0)	71,7
9a	2,80 (dd; 14,3; 5,3)	44,5	1/7/8/10/14	2,86 (dd; 15,6; 6,0)	44,0
9b	2,49 (dd; 14,3; 2,1)	44,5	1/10	2,36 (dd; 15,0; 2,0)	44,0
10	-	134,3	-	-	134,8
11	-	138,9	-	-	136,5
12	-	169,7	-	-	169,8
13a	6,15 (d; 3,6)	120,4	7/11/12	6,33 (d; 3,5)	121,5
13b	5,63 (d; 3,2)	120,4	7/11/12	5,61 (d; 3,0)	121,5
14	1,57 (d; 1,0)	20,1	1/9/10	1,77 (s)	19,9
15	1,80 (dd; 1,0; 0,3)	18,7	2/3/4/5/6	1,53 (s)	18,8
1'	-	166,2	-	-	165,9
2'	-	133,5	-	-	131,5
3'	6,37 (qdd; 7,2; 1,5; 1,5)	138,9	1'/4'/5'	6,40 (d; 7,5)	140,8
4'	1,99 (ddd; 7,2; 1,5; 1,5)	15,6	2'/3'	2,01 (d; 7,5)	15,9
5'a	4,27 (ddd; 13,4; 1,5; 1,5)	63,6	2'/3'	4,21 (q; 7,0)	64,0
5'b	4,17 (ddd; 13,4; 1,5; 1,5)	63,6	1'/2'/3'	4,21 (q; 7,0)	64,0

A desacetileupaserrina foi isolada anteriormente de diferentes espécies dos gêneros *Eupatorium* e *Helianthus*, tais como *E. chinense* (ITOH et al., 2009), *E. fortunei* Turcz (HARUNA; SAKAKIBARA; ITO, 1986), *E. semiserratatum* (KUPCHAN et al., 1973), *E. mikanioides* (HERZ; KUMAR; BLOUNT, 1980), *H. mollis* (DANIEWSKI et al., 1993), *H. pumilus* (HERZ & DE GROOTE, 1977), *H. gracilentus* (MELEK et al., 1984) e *H. maximiliani* (STEWART; GERSHENZON; MABRY, 1984). Com relação aos estudos biológicos realizados com essa lactona, são descritas atividades antialérgica (ITOH et al., 2009), fagorrepelente (DANIEWSKI et al., 1993) e antitumoral (KUPCHAN et al., 1973; KUPCHAN; ASHMORE; SNEDEN, 1978).

5.3.2.6 Substância CUT6 (2 α -hidroxi-8 β -2',3',5'-trihidroxi-angeloiloxi-costunolídeo)

O composto CUT6 (12,2 mg) (Figura 123) foi obtido da fração diclorometano na forma de um óleo de coloração alaranjada. Na análise por CCDA, esse composto apresentou-se como uma mancha com R_f = 0,50 no sistema de eluição CH₂Cl₂:AcOEt (40:60, v/v). Além disso, essa substância apresentou extinção de fluorescência sob luz UV em comprimento de onda $\lambda = 254$ nm e, após revelação com o agente cromogênico anisaldeído sulfúrico, adquiriu coloração azul-marinho.

Figura 123 – Estrutura química do composto CUT6 (2 α -hidroxi-8 β -2',3',5'-trihidroxi-angeloiloxi-costunolídeo).



Os espectros de RMN de ¹H das substâncias CUT5 e CUT6 apresentaram o mesmo padrão de sinais, sugerindo que este composto também se trata de uma lactona sesquiterpênica do tipo germacranolídeo. O espectro de RMN de ¹H (600 MHz, acetona-*d*₆) (Figura 124) da substância CUT6 apresentou dois dupletos em δ_{H} 6,18

(1H; d; $J=3,6$ Hz; H-13a) e δ_{H} 5,70 (1H; d; $J=3,2$ Hz; H-13b), sugestivos de grupamento metileno olefínico exocíclico, acoplado com um hidrogênio ressonando em δ_{H} 3,29 (1H; dddd; $J=8,4; 3,6; 3,2; 1,0$ Hz; H-7), sugerindo a presença de um anel γ -lactônico α,β -insaturado. Também foi possível visualizar dois sinais característicos de hidrogênios olefínicos em δ_{H} 5,11 (1H; dd; $J=9,7; 1,2$ Hz; H-1) e δ_{H} 5,05 (1H; dd; $J=9,9; 1,5$ Hz; H-5); e três sinais típicos de hidrogênios oximetínicos em δ_{H} 6,01 (1H; ddd; $J=4,2; 2,8; 1,0$ Hz; H-8), δ_{H} 5,26 (1H; dd; $J=9,9; 8,4$ Hz; H-6) e δ_{H} 4,75 (1H; ddd; $J=9,7; 9,7; 5,7$ Hz; H-2). Um conjunto de sinais com deslocamento químico em δ_{H} 2,72 (1H; dd; $J=14,4; 4,2$ Hz; H-9a), δ_{H} 2,66 (1H; dd; $J=10,9; 5,7$ Hz; H-3a), δ_{H} 2,57 (1H; dd; $J=14,4; 2,8$ Hz; H-9b) e δ_{H} 2,07 (1H; m; H-3b) foi atribuído a hidrogênios diastereotópicos de grupo metileno. As constantes de acoplamento da ordem de 14,4 e 10,9 Hz são sugestivas de acoplamento geminal ($^2J_{\text{HH}}$) hidrogênio-hidrogênio. Também foi possível visualizar no espectro dois dupletos em δ_{H} 1,80 (3H; d; $J=1,5$ Hz; H-15) e δ_{H} 1,61 (3H; d; $J=1,2$ Hz; H-14), integrando para 3H cada, correspondentes a dois grupamentos metila ligados a carbonos olefínicos. As constantes de acoplamento da ordem de 1,5 e 1,2 Hz são sugestivas de acoplamento alílico ($^4J_{\text{HH}}$). A principal diferença observada entre os compostos CUT5 e CUT6 ocorreu na cadeia lateral éster. No composto CUT6 houve a substituição da dupla ligação C-C, localizada nos carbonos C-2' e C-3', por dois grupamentos OH. Assim, a cadeia lateral éster do composto CUT6 apresentou quatro sinais com deslocamento químico em δ_{H} 4,51 (1H; q; $J=6,6$ Hz; H-3'), δ_{H} 4,35 (1H; d; $J=11,2$ Hz; H-5'a), δ_{H} 4,20 (1H; d; $J=11,2$ Hz; H-5'a) e δ_{H} 1,50 (3H; d; $J=6,6$ Hz; H-4').

Todas as atribuições dos valores de ^{13}C foram realizadas com o auxílio dos experimentos de correlação heteronuclear HSQC (Figura 125) e HMBC (Figura 126). Os mapas de correlação HSQC e HMBC evidenciaram a presença de 20 átomos de carbono, incluindo uma carbonila de lactona (δ_{C} 169,7), uma carbonila de éster (δ_{C} 170,6), três carbonos sp^2 olefínicos (δ_{C} 121,7; 130,8 e 135,8), três carbonos olefínicos quaternários (δ_{C} 134,5; 137,6 e 143,0), cinco carbonos sp^3 oxigenados (δ_{C} 59,8; 67,3; 69,5; 75,6 e 75,7), um carbono sp^3 oxigenado quaternário (δ_{C} 80,2), dois metilenos (δ_{C} 45,1 e 49,8), um metino (δ_{C} 53,1) e três grupos metila (δ_{C} 19,0; 19,4 e 20,3).

As correlações a mais de uma ligação entre hidrogênio e carbono visualizadas no mapa de correlação HMBC permitiram estabelecer a conectividade entre os fragmentos na molécula. A posição da cadeia lateral éster na molécula foi confirmada pela correlação do hidrogênio oximetínico H-8 (δ_{H} 6,01) com a carbonila de éster em δ_{H} 170,6 (C-1').

Além disso, o hidrogênio oximetínico H-6 (δ_H 5,26) mostrou correlação com os carbonos C-4 (δ_C 143,0), C-7 (δ_C 53,1) e C-8 (δ_C 75,6); os hidrogênios metil olefínicos H-15 (δ_H 1,80) apresentaram correlação com os carbonos C-2 (δ_C 69,5) e C-3 (δ_C 49,8); e os hidrogênios metílicos H-4' (δ_H 1,50) mostraram correlação com os carbonos C-2' (δ_C 80,2) e C-3' (δ_C 59,8). Na Figura 127 são apresentadas algumas correlações HMBC ($^2J_{HC}$, $^3J_{HC}$ e $^4J_{HC}$) do composto CUT6.

A análise dos dados espectrais de RMN e a comparação com dados descritos na literatura (PEARCE; GERSHENZON; MABRY, 1986) permitiram caracterizar o composto CUT6 ($C_{20}H_{28}O_8$) como sendo a lactona 2 α -hidroxi-8 β -2',3',5'-trihidroxi-angeloiloxi-costunolídeo. Na Tabela 25 são apresentados os dados de RMN 1D e 2D da substância 2 α -hidroxi-8 β -2',3',5'-trihidroxi-angeloiloxi-costunolídeo, bem como é realizada uma comparação com os dados descritos por Pearce, Gershenzon e Mabry (1986). É importante salientar que alguns valores de deslocamentos químicos descritos por esses autores apresentam variações de deslocamento químico quando comparados aos valores obtidos para a substância CUT6. Ainda, esse composto foi previamente isolado das espécies *Eupatorium mikanioides* (KERZ; KUMAR; BLOUNT; 1980) e *Helianthus resinosus* (PEARCE; GERSHENZON; MABRY, 1986), e não há relatos na literatura acerca do seu potencial biológico.

Figura 124 – Espectro de RMN de 1H (600 MHz, acetona- d_6) do composto CUT6 (2 α -hidroxi-8 β -2',3',5'-trihidroxi-angeloiloxi-costunolídeo).

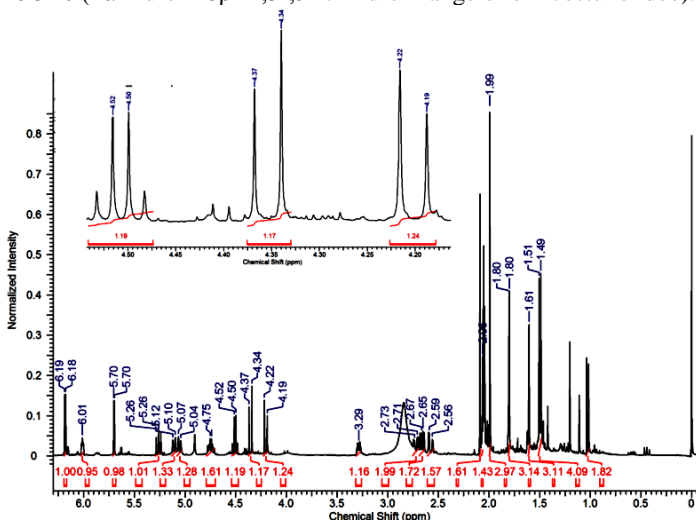


Figura 125 – Mapa de correlação HSQC (600 MHz, acetona- d_6) do composto CUT6 (2α -hidroxi- 8β - $2',3',5'$ -trihidroxi-angeloiloxi-costunolídeo).

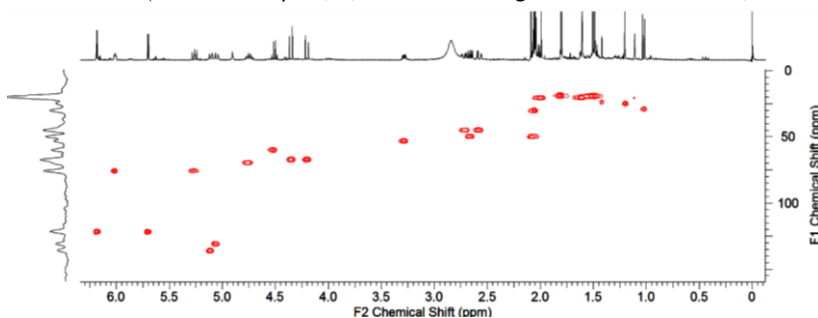


Figura 126 – Mapa de correlação HMBC (600 MHz, acetona- d_6) do composto CUT6 (2α -hidroxi- 8β - $2',3',5'$ -trihidroxi-angeloiloxi-costunolídeo).

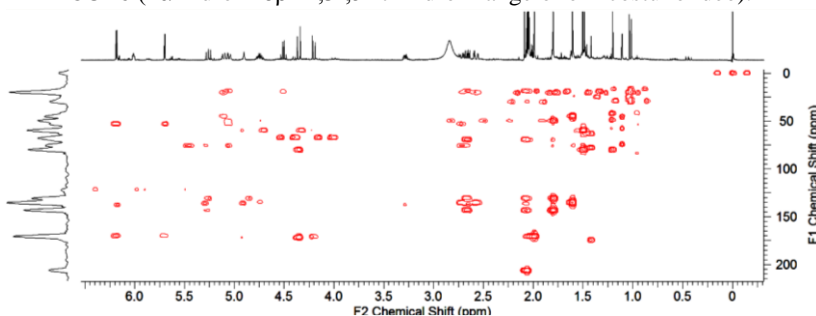


Figura 127 – Representação de algumas correlações HMBC do composto CUT6 (2α -hidroxi- 8β - $2',3',5'$ -trihidroxi-angeloiloxi-costunolídeo).

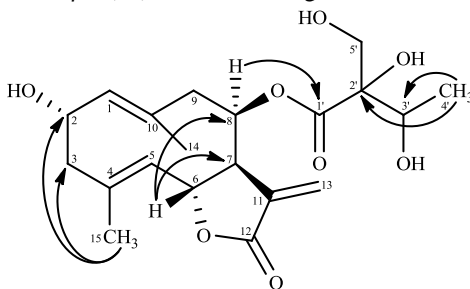


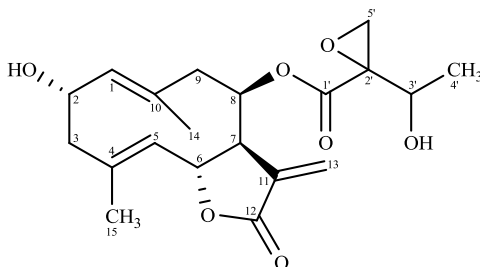
Tabela 25 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (600 e 150 MHz, acetona- d_6) da lactona 2 α -hidroxi-8 β -2',3',5'-trihidroxi-angeloiloxi-costunolídeo em comparação com dados da literatura.

Posição	δ_{H} (mult., J Hz) 600 MHz	δ_{C} 150 MHz	HMBC	PEARCE; GERSHENZON; MABRY (1986), DMSO- d_6	
				δ_{H} (mult., J Hz) 200 MHz	δ_{C} 22,6 MHz
1	5,11 (dd; 9,7; 1,2)	135,8	9/14	4,97 (dd; 10,0; 1,5)	134,5
2	4,75 (ddd; 9,7; 9,7; 5,7)	69,5	3/10	4,58 (ddd; 10,0; 10,0; 6,0)	67,9
3a	2,66 (dd; 10,9; 5,7)	49,8	1/2/4/5/15	2,50 (dd; 10,5; 6,0)	48,7
3b	2,07 (m)	49,8	1/4/5/15	1,93 (dd; 10,5; 10,0)	48,7
4	-	143,0	-	-	141,7
5	5,05 (dd; 9,9; 1,5)	130,8	3/6/7/15	4,97 (dd; 10,0; 1,5)	129,4
6	5,26 (dd; 9,9; 8,4)	75,7	4/5/7/8	5,24 (dd; 10,0; 8,5)	75,2
7	3,29 (dddd; 8,4; 3,6; 3,2; 1,0)	53,1	11/13	3,18 (dddd; 8,5; 3,5; 3,2; 1,5)	51,9
8	6,01 (ddd; 4,2; 2,8; 1,0)	75,6	6/10/1'	5,78 (ddd; 5,5; 2,5; 1,5)	72,3
9a	2,72 (dd; 14,4; 4,2)	45,1	1/8/14	2,52 (dd; 14,8; 5,5)	43,9
9b	2,57 (14,4; 2,8)	45,1	-	2,38 (14,0; 2,5)	43,9
10	-	134,5	-	-	133,3
11	-	137,6	-	-	136,7
12	-	169,7	-	-	169,4
13a	6,18 (d; 3,6)	121,7	7/11/12	6,07 (d; 3,5)	121,2
13b	5,70 (d; 3,2)	121,7	7/11/12	5,64 (d; 3,2)	121,2
14	1,61 (d; 1,2)	20,3	9	1,55 (d; 1,4)	19,6
15	1,80 (d; 1,5)	19,0	2/3	1,72 (d; 1,5)	18,3
1'	-	170,6	-	-	172,9
2'	-	80,2	-	-	81,8
3'	4,51 (q; 6,6)	59,8	4'/5'	3,67 (q; 6,5)	68,6
4'	1,50 (d; 6,6)	19,4	2'/3'	0,94 (d; 6,5)	17,7
5'a	4,35 (d; 11,2)	67,3	1'/2'/3'	3,40 (s)	64,7
5'b	4,20 (d; 11,2)	67,3	1'/3'	3,40 (s)	64,7

5.3.2.7 Substância CUT7 (2 α -hidroxi-8 β -3'-hidroxi-2',5'-epoxi-angeloiloxi-costunolídeo)

O composto CUT7 (2,5 mg) (Figura 128) foi obtido da fração diclorometano na forma de um sólido esbranquiçado, com p.f. na faixa de 190,5-193,0 °C. Na análise por CCDA, esse composto apresentou-se como uma mancha com $R_f = 0,29$ no sistema de eluição $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{AcOEt}$ (40:60, v/v). Além disso, essa substância apresentou extinção de fluorescência sob luz UV em $\lambda = 254$ nm e, após revelação com o reagente químico anisaldeído sulfúrico, desenvolveu coloração azul marinho.

Figura 128 – Estrutura química do composto CUT7 (2 α -hidroxi-8 β -3'-hidroxi-2',5'-epoxi-angeloiloxi-costunolídeo).



O espectro de massas de alta resolução do composto CUT7, obtido com fonte de ionização por *Electrospray* no modo positivo [ESI(+)-MS] (Figura 129), registrou um íon de m/z 401,1582, referente ao aduto de sódio $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calculado 401,1571). Essa massa é coerente com a fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{NaO}_7$, e sugere um índice de deficiência de hidrogênios igual a oito para esse composto.

Os espectros de RMN das substâncias CUT6 e CUT7 apresentaram o mesmo padrão de sinais, sugerindo que este composto também se trata de um germacranolídeo. O espectro de RMN de ^1H (600 MHz, acetona- d_6) (Figura 130) do composto CUT7 apresentou dois dupletos em δ_{H} 6,15 (1H; d; $J=3,6$ Hz; H-13a) e δ_{H} 5,66 (1H; d; $J=3,2$ Hz; H-13b), característicos de hidrogênios olefínicos de grupamento exometileno, acoplando com um hidrogênio ressonando em δ_{H} 3,24 (1H; dddd; $J=8,5; 3,6; 3,2; 1,0$ Hz; H-7), dando evidências da presença de uma lactona sesquiterpênica α,β -insaturada. Também foi possível visualizar dois sinais característicos de hidrogênios olefínicos em δ_{H} 5,09 (1H; dd; $J=9,6; 1,0$ Hz; H-1) e δ_{H} 5,05 (1H; dd; $J=9,9; 1,4$ Hz; H-5); e três sinais sugestivos de hidrogênios oximetínicos em δ_{H} 5,96 (1H;

ddd; $J=4,2; 2,6; 1,0$ Hz; H-8), δ_{H} 5,23 (1H; dd; $J=9,9; 8,5$ Hz; H-6) e δ_{H} 4,75 (1H; m; H-2). Um conjunto de sinais com deslocamento químico em δ_{H} 2,74 (1H; dd; $J=14,3; 4,2$ Hz; H-9a), δ_{H} 2,66 (1H; dd; $J=10,9; 5,8$ Hz; H-3a), δ_{H} 2,53 (1H; dd; $J=14,3; 2,6$ Hz; H-9b) e δ_{H} 2,07 (1H; m; H-3b) foi atribuído a hidrogênios diastereotópicos de grupo metileno. As constantes de acoplamento da ordem de 14,3 e 10,9 Hz são típicas de acoplamento geminal hidrogênio-hidrogênio ($^2J_{\text{HH}}$). Também foi possível visualizar no espectro dois dupletos em δ_{H} 1,82 (3H; d; $J=1,4$ Hz; H-15) e δ_{H} 1,67 (3H; d; $J=1,0$ Hz; H-14), integrando para 3H cada, correspondentes a dois grupamentos metil olefínicos. As constantes de acoplamento da ordem de 1,4 e 1,0 Hz são sugestivas de acoplamento alílico ($^4J_{\text{HH}}$). A principal diferença observada entre os compostos CUT6 e CUT7 ocorreu na cadeia lateral éster. O composto CUT6 apresentou dois grupamentos OH na cadeia lateral, um localizado no carbono C-2', e outro no carbono C-5'. Enquanto isso, no composto CUT7 esses dois grupamentos OH foram substituídos por um grupo epóxido, o qual foi confirmado pela presença de dois dupletos mais protegidos em δ_{H} 3,83 (1H; d; $J=11,0$ Hz; H-5'a) e δ_{H} 3,67 (1H; d; $J=11,0$ Hz; H-5'b). A Figura 131 apresenta uma expansão do espectro de RMN de ^1H do composto CUT7 na região entre 5,25-3,23 ppm.

Todas as atribuições dos valores de ^{13}C foram realizadas com o auxílio dos experimentos de correlação heteronuclear HSQC (Figura 132) e HMBC (Figura 133). Os mapas de correlação HSQC e HMBC evidenciaram a presença de 20 átomos de carbono, incluindo uma carbonila de lactona (δ_{C} 169,7), uma carbonila de éster (δ_{C} 172,8), três carbonos sp^2 olefínicos (δ_{C} 121,6; 130,8 e 135,8), três carbonos olefínicos quaternários (δ_{C} 134,1; 137,8 e 143,0), cinco carbonos sp^3 oxigenados (δ_{C} 60,1; 66,2; 69,6; 75,3 e 75,8), um carbono sp^3 oxigenado quaternário (δ_{C} 82,4), dois metilenos (δ_{C} 45,2 e 49,8), um metino (δ_{C} 53,4) e três grupos metila (δ_{C} 19,2; 19,6 e 20,1).

As ligações a mais de uma ligação entre hidrogênio e carbono ($^2J_{\text{HC}}$, $^3J_{\text{HC}}$ e $^4J_{\text{HC}}$) visualizadas no mapa de correlação HMBC permitiram estabelecer a conectividade entre os fragmentos na molécula. A posição da cadeia lateral éster foi confirmada pela correlação do hidrogênio oximetínico H-8 (δ_{H} 5,96) com a carbonila de éster em δ_{H} 172,8 (C-1'). Além disso, o hidrogênio metilênico H-3b (δ_{H} 2,06) mostrou correlação com os carbonos C-2 (δ_{C} 69,6), C-4 (δ_{C} 143,0) e C-5 (δ_{C} 130,8) e C-15 (δ_{C} 19,2); e o hidrogênio oximetínico H-5'b (δ_{H} 3,67) apresentou correlação com os carbonos C-1' (δ_{C} 172,8) e C-2' (δ_{C} 82,4). Na Figura 134 são apresentadas algumas correlações HMBC do composto CUT7.

A análise dos dados espectroscópicos de HRMS, RMN 1D e 2D, e a comparação com dados descritos na literatura (PEARCE; GERSHENZON; MABRY, 1986) permitiram caracterizar o composto CUT7 ($C_{20}H_{26}O_6$) como sendo a lactona 2α -hidroxi- 8β - $3'$ -hidroxi- $2',5'$ -epoxi-angeloiloxi-costunolídeo. Na Tabela 26 são apresentados os dados de RMN de 1H e ^{13}C da substância 2α -hidroxi- 8β - $3'$ -hidroxi- $2',5'$ -epoxi-angeloiloxi-costunolídeo, bem como é realizada uma comparação com os dados reportados por Pearce, Gershenzon e Mabry (1986). É importante salientar que alguns valores de deslocamentos químicos descritos por esses autores apresentam variações de deslocamento químico quando comparados aos valores obtidos para a substância CUT7. Até o presente momento esse composto foi isolado somente da espécie *Helianthus resinosus* (PEARCE; GERSHENZON; MABRY, 1986) e não existem relatos na literatura a respeito do seu potencial farmacológico.

Figura 129 – Espectro de massas de alta resolução do composto CUT7 (2α -hidroxi- 8β - $3'$ -hidroxi- $2',5'$ -epoxi-angeloiloxi-costunolídeo) obtido por [ESI(+)-HRMS].

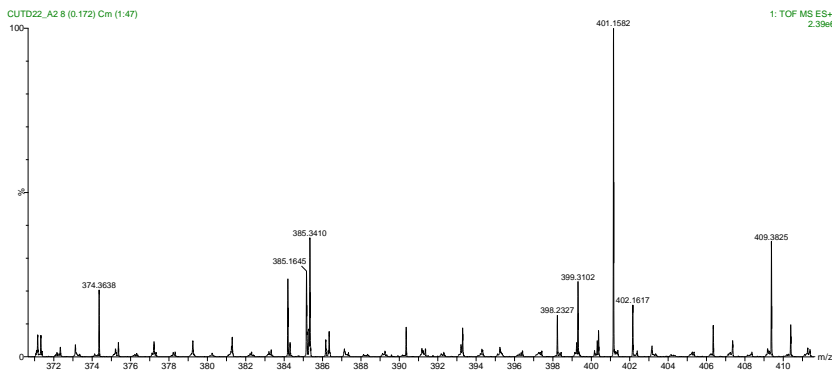


Figura 130 – Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, acetona- d_6) do composto CUT7 (2 α -hidroxi-8 β -3'-hidroxi-2',5'-epoxi-angeloiloxi-costunolídeo).

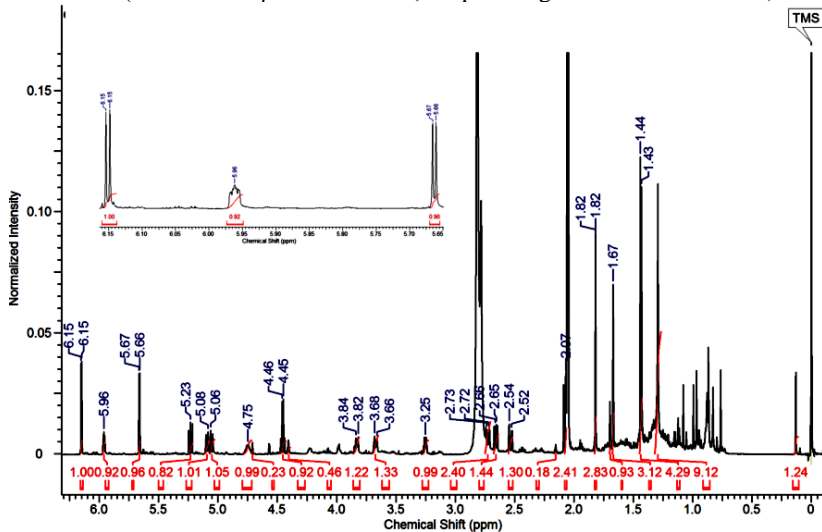


Figura 131 – Expansão do espectro de RMN de ^1H do composto CUT7 (600 MHz, acetona- d_6) na região de 5,25-3,23 ppm.

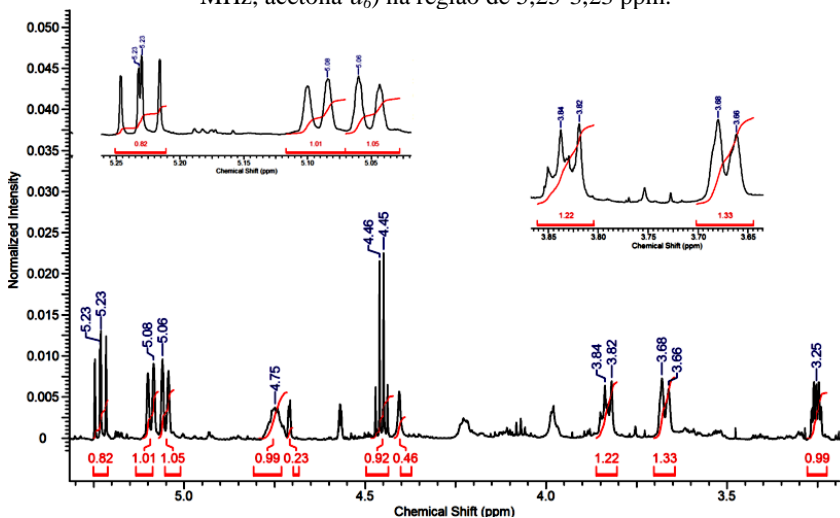


Figura 132 – Mapa de correlação HSQC (600 MHz, acetona- d_6) do composto CUT7 (2 α -hidroxi-8 β -3'-hidroxi-2',5'-epoxi-angeloiloxi-costunolídeo).

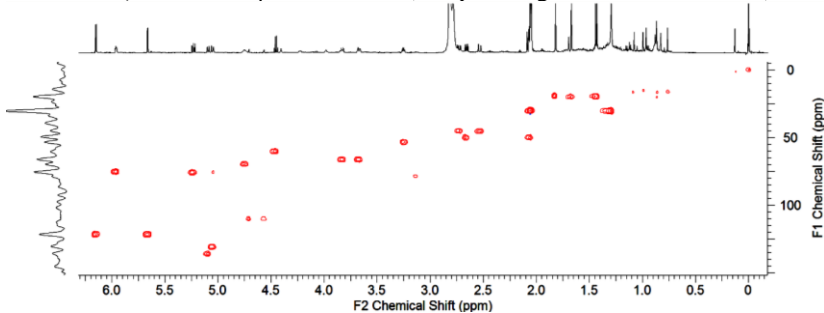


Figura 133 – Mapa de correlação HMBC (600 MHz, acetona- d_6) do composto CUT7 (2 α -hidroxi-8 β -3'-hidroxi-2',5'-epoxi-angeloiloxi-costunolídeo).

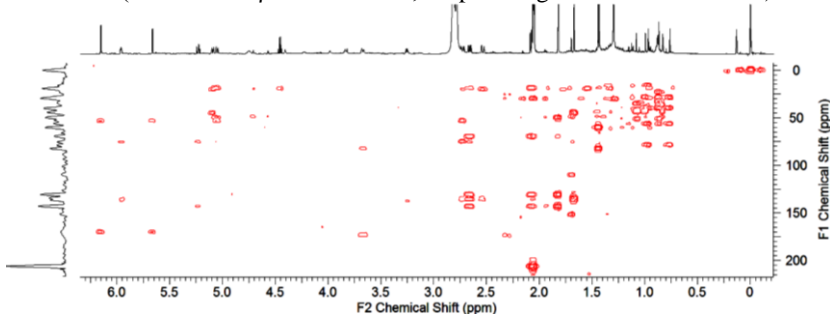


Figura 134 – Representação de algumas correlações HMBC do composto CUT7 (2 α -hidroxi-8 β -3'-hidroxi-2',5'-epoxi-angeloiloxi-costunolídeo).

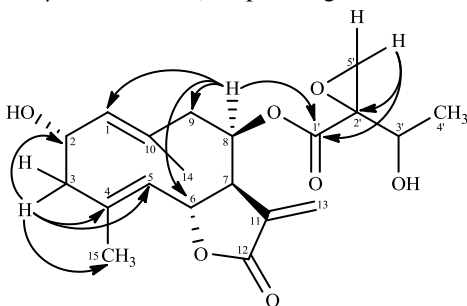


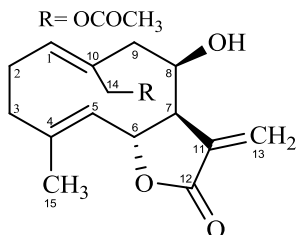
Tabela 26 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (600 e 150 MHz, acetona- d_6) da lactona 2 α -hidroxi-8 β -3'-hidroxi-2',5'-epoxi-angeloiloxi-costunolídeo em comparação com dados da literatura.

Posição	δ_{H} (mult., J Hz) 600 MHz	δ_{C} 150 MHz	HMBC	PEARCE; GERSHENZON; MABRY (1986), DMSO- d_6	
				δ_{H} (mult., J Hz) 200 MHz	δ_{C} 22,6 MHz
1	5,09 (dd; 9,6; 1,0)	135,8	9/14	4,96 (dd; 10,0; 1,5)	134,5
2	4,75 (m)	69,6	-	4,56 (ddd; 10,0; 10,0; 6,0)	68,1
3a	2,66 (dd; 10,9; 5,8)	49,8	1/2/4/5/15	2,50 (dd; 10,5; 6,0)	48,8
3b	2,06 (m)	49,8	2/4/5/15	1,93 (dd; 10,5; 10,0)	48,8
4	-	143,0	-	-	142,3
5	5,05 (dd; 9,9; 1,4)	130,8	3/7/15	4,96 (dd; 10,0; 1,5)	129,4
6	5,23 (dd; 9,9; 8,5)	75,8	4/8	5,21 (dd; 10,0; 8,5)	75,1
7	3,24 (dddd; 8,5; 3,6; 3,2; 1,0)	53,4	11	3,23 (dddd; 8,5; 3,5; 3,2; 1,5)	51,7
8	5,96 (ddd; 4,2; 2,6; 1,0)	75,3	1/6/9/1'	5,77 (ddd; 5,5; 2,5; 1,5)	73,3
9a	2,74 (dd; 14,3; 4,2)	45,2	7/8/10/14	2,52 (dd; 14,0; 5,5)	43,7
9b	2,53 (14,3; 2,6)	45,2	1/14	2,42 (14,0; 2,5)	43,7
10	-	134,1	-	-	133,5
11	-	137,8	-	-	136,5
12	-	169,7	-	-	169,4
13a	6,15 (d; 3,6)	121,6	7/12	6,08 (d; 3,5)	121,4
13b	5,66 (d; 3,2)	121,6	7/12	5,64 (d; 3,2)	121,4
14	1,67 (d; 1,0)	20,1	9/10	1,52 (d; 1,5)	19,5
15	1,82 (d; 1,4)	19,2	2/3/4/5	1,74 (d; 1,5)	18,6
1'	-	172,8	-	-	171,5
2'	-	82,4	-	-	81,3
3'	4,45 (q; 6,7)	60,1	4'	4,40 (q; 6,5)	59,6
4'	1,44 (d; 6,7)	19,6	2'/3'	1,36 (d; 6,5)	19,0
5'a	3,83 (d; 11,0)	66,2	2'	3,56 (d; 11,0)	65,3
5'b	3,67 (d; 11,0)	66,2	1'/2'	3,45 (d; 11,0)	65,3

5.3.2.8 Substância CUT8 (ovatifolina)

O composto CUT8 (5,2 mg) (Figura 135) foi obtido da fração diclorometano na forma de uma goma de coloração esverdeada. Na análise por CCDA, esse composto apresentou-se como uma mancha com $R_f = 0,51$ no sistema de solvente $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{AcOEt}$ (70:30, v/v). Além disso, essa substância apresentou extinção de fluorescência sob luz UV em comprimento de onda $\lambda = 254$ nm e, após revelação com o reagente anisaldeído sulfúrico, adquiriu cor roxa.

Figura 135 – Estrutura química do composto CUT8 (ovatifolina).



O espectro de massas de alta resolução do composto CUT8, adquirido com fonte de ionização por *Electrospray* no modo positivo [ESI(+)-MS] (Figura 136), exibiu um íon de m/z 329,1352, referente ao aduto de sódio $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calculado 329,1365). Essa massa é consistente com a fórmula molecular $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{NaO}_5$, e indica com um índice de insaturação igual a sete para esse composto.

Os espectros de RMN das substâncias CUT5, CUT6, CUT7 e CUT8 apresentaram o mesmo padrão de sinais, sugerindo que este composto também se trata de uma lactona sesquiterpênica do tipo germacranolídeo. O espectro de RMN de ^1H (600 MHz, acetona- d_6) (Figura 137) da substância CUT8 apresentou dois dupletos em δ_{H} 6,17 (1H; d; $J=3,6$ Hz; H-13a) e δ_{H} 5,64 (1H; d; $J=3,2$ Hz; H-13b), típicos de grupamento metileno olefínico exocíclico, acoplando com um hidrogênio ressonando em δ_{H} 2,94 (1H; dddd; $J=8,3; 3,6; 3,2; 0,9$ Hz; H-7), sugerindo a presença de um anel γ -lactônico α,β -insaturado. Também foi possível visualizar dois sinais característicos de hidrogênios olefínicos em δ_{H} 5,19 (1H; ddd; $J=12,4; 4,4; 0,5$ Hz; H-1) e δ_{H} 4,97 (1H; dd; $J=10,1; 1,4$ Hz; H-5); e dois sinais típicos de hidrogênios oximetínicos em δ_{H} 5,21 (1H; ddd; $J=10,1; 8,3; 0,3$ Hz; H-6) e δ_{H} 4,68 (1H; m; H-8). Um conjunto de sinais com deslocamento químico em δ_{H} 2,99 (1H; dd; $J=14,0; 5,5$ Hz; H-9a), δ_{H} 2,53 (1H; dddd; $J=12,8; 12,4;$

11,8; 5,4 Hz; H-2a), δ_{H} 2,35 (1H; ddd; $J=11,4; 5,4; 1,7$ Hz; H-3a), δ_{H} 2,23 (2H; m; H-2b e H-9b) e δ_{H} 2,17 (1H; ddd; $J=11,8; 11,4; 5,8$ Hz; H-3b) foi atribuído a hidrogênios diastereotópicos de grupo metileno. As constantes de acoplamento da ordem de 14,0; 12,8 e 11,4 Hz são sugestivas de acoplamento geminal entre hidrogênios metilênicos diastereotópicos. Também foi possível visualizar no espectro um duplo duplete em δ_{H} 1,66 (3H; dd; $J=1,4; 0,3$ Hz; H-15) e um simpleto em δ_{H} 1,97 (3H; s; H-2'), integrando para 3H cada, correspondentes a dois grupamentos metila. As principais diferenças observadas entre os compostos CUT5, CUT6, CUT7 e CUT8 foram à ausência do grupamento hidroxila e da cadeia lateral éster, localizados nos carbonos C-2 e C-8, respectivamente. Além disso, o composto CUT8 apresentou um grupamento acetoxi adicional no carbono C-14. A Figura 138 apresenta uma expansão do espectro de RMN de ^1H do composto CUT8 na região entre 4,98-1,66 ppm. Na Figura 139 consta o mapa de correlação homonuclear COSY (J_{HH}), confirmando os acoplamentos observados no espectro de RMN de ^1H . Entre os acoplamentos observados nesse mapa de correlação, podemos destacar o acoplamento do hidrogênio em δ_{H} 2,94 (H-7) com os hidrogênios em δ_{H} 6,17 (H-13a), δ_{H} 5,64 (H-13b) e δ_{H} 5,21 (H-6); e do hidrogênio em δ_{H} 5,19 (H-1) com os hidrogênios em δ_{H} 4,67 (H-14a), δ_{H} 2,53 (H-2a) e δ_{H} 2,23 (H-2b).

Todas as atribuições dos valores de ^{13}C foram realizadas com o auxílio dos experimentos de correlação heteronuclear HSQC (Figura 140) e HMBC (Figura 141). Os mapas de correlação HSQC e HMBC evidenciaram a presença de 17 átomos de carbono, incluindo uma carbonila de lactona (δ_{C} 170,3), uma carbonila de éster (δ_{C} 170,8), três carbonos sp^2 olefínicos (δ_{C} 119,7; 129,1 e 135,5), três carbonos olefínicos quaternários (δ_{C} 135,7; 140,5 e 141,9), três carbonos sp^3 oxigenados (δ_{C} 63,6; 72,1 e 75,4), três metilenos (δ_{C} 26,4; 39,5 e 43,5), um metino (δ_{C} 54,3) e dois grupamentos metila (δ_{C} 16,8 e 20,9).

As correlações a mais de uma ligação entre hidrogênio e carbono ($^2J_{\text{HC}}$, $^3J_{\text{HC}}$ e $^4J_{\text{HC}}$) visualizadas no mapa de correlação HMBC permitiram estabelecer a conectividade entre os fragmentos na molécula. A posição do grupamento acetoxi na molécula foi confirmada pela correlação do hidrogênio carbinólico H-14a (δ_{H} 4,71) com a carbonila de éster em δ_{H} 170,8 (C-1'). Além disso, o hidrogênio olefínico H-13a (δ_{H} 6,17) mostrou correlação com os carbonos C-7 (δ_{C} 54,3), C-11 (δ_{C} 140,5) e C-12 (δ_{C} 170,3); e os hidrogênio metílicos H-15 (δ_{H} 1,66) apresentaram correlação com os carbonos C-3 (δ_{C} 39,5), C-4 (δ_{C} 141,9) e C-5 (δ_{C} 129,1). Na Figura 142 são apresentadas algumas correlações HMBC do composto CUT8.

A análise dos dados espectroscópicos de HRMS, RMN 1D e 2D, e a comparação com dados descritos na literatura (CESPEDES et al., 2001; GNECCO et al., 1973; HOENEISEN; SICVA; BOHLMANN, 1980) permitiram caracterizar o composto CUT8 ($C_{17}H_{22}O_5$) como sendo a lactona sesquiterpênica ovatifolina. Na Tabela 27 são apresentados os dados de RMN da ovatifolina, bem como as correlações 1H - ^{13}C a longa distância observadas no mapa de correlação HMBC e a comparação com os dados descritos por Cespedes et al. (2001).

A ovatifolina foi previamente isolada de diferentes espécies de plantas, tais como *Aristolelia chilensis* (CESPEDES et al., 2010), *Inula salsoloides* (JESKE; HUNECK; JAKUPOVIC, 1996), *Greenmaniella resinosa* (ZDERO; BOLHMANN; SCOTT, 1987), *Eupatorium fortunei* Turcz (HARUNA; SAKAKIBARA; ITO, 1986), *Inula germanica* (BOHLMANN; BARUAH; JAKUPOVIC, 1985), *Blainvillea acmella* (SINGH et al., 1985), *Podanthus mitiqui* (HOENEISEN; SICVA; BOHLMANN, 1980) e *P. ovatifolius* (GNECCO et al., 1973). Alguns trabalhos publicados na literatura têm evidenciado o potencial biológico dessa lactona sesquiterpênica. Já foi reportada para a ovatifolina atividade citotóxica (HOENEISEN; SICVA; BOHLMANN, 1980), anti-inflamatória (CESPEDES et al., 2000; 2010), alelopática e antioxidante (CESPEDES et al., 2001).

Figura 136 – Espectro de massas de alta resolução do composto CUT8 (ovatifolina) obtido por [ESI(+)-HRMS].

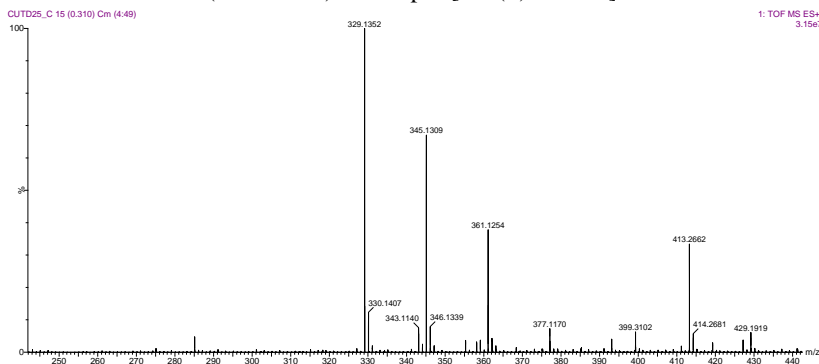


Figura 137 – Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, acetona- d_6) do composto CUT8 (ovatifolina).

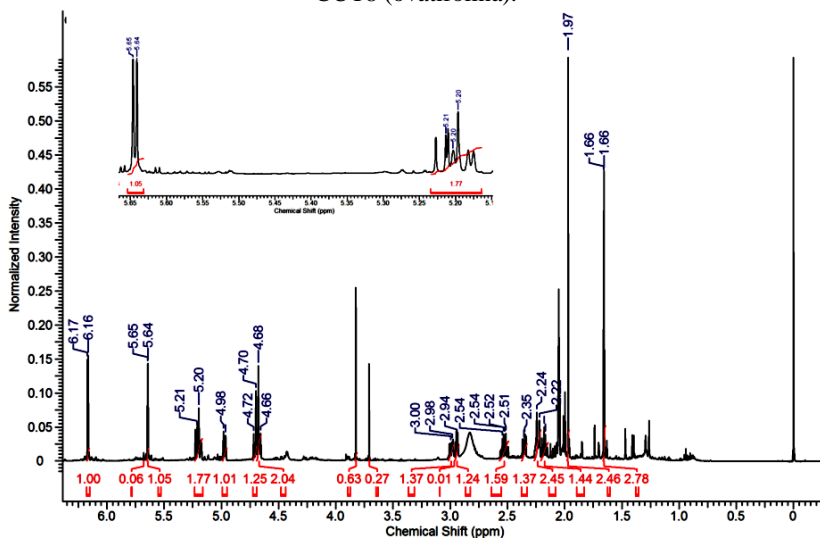


Figura 138 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (600 MHz, acetona- d_6) na região de 4,98-1,66 ppm.

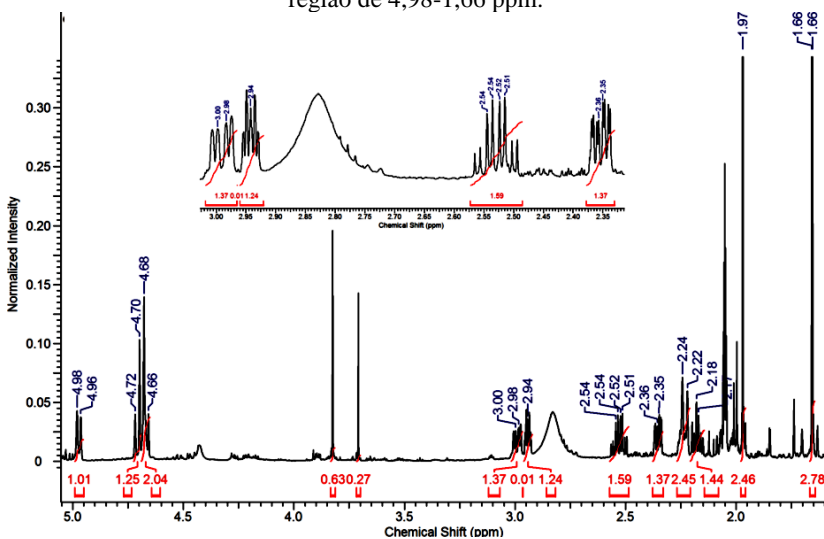


Figura 139 – Mapa de correlação COSY (600 MHz, acetona- d_6) do composto CUT8 (ovatifolina).

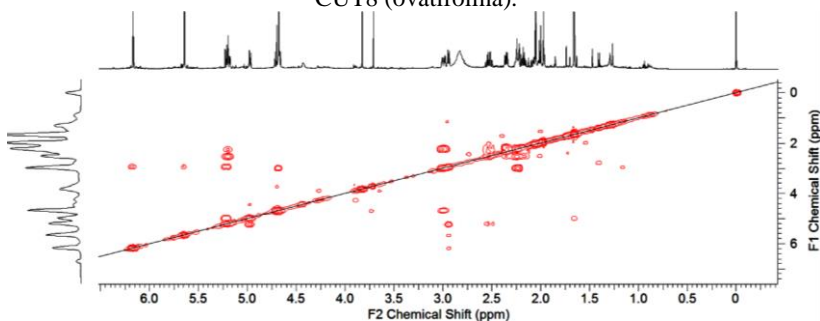


Figura 140 – Mapa de correlação HSQC (600 MHz, acetona- d_6) do composto CUT8 (ovatifolina).

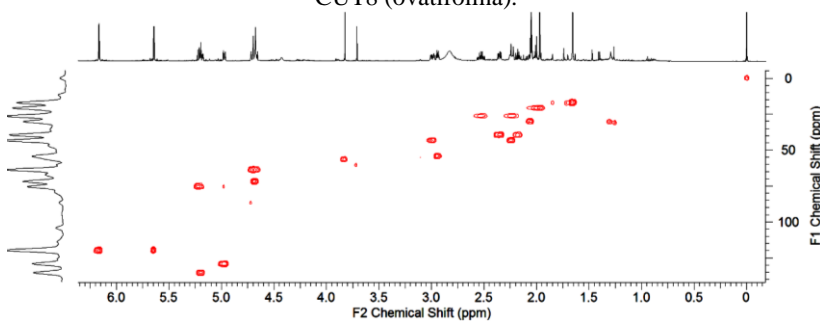


Figura 141 – Mapa de correlação HMBC (600 MHz, acetona- d_6) do composto CUT8 (ovatifolina).

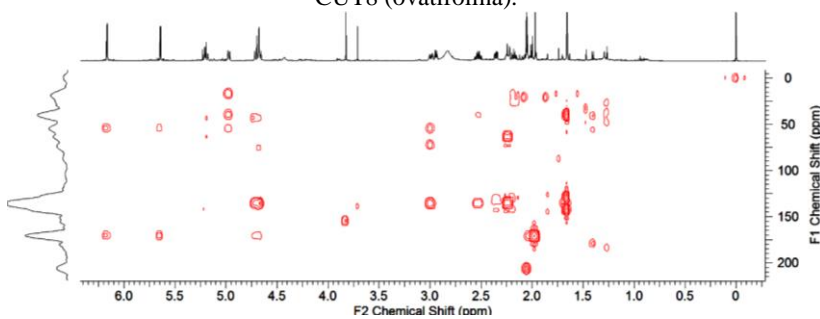
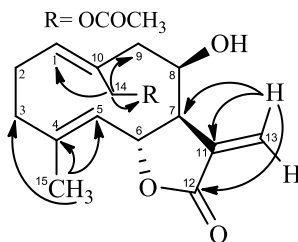


Figura 142 – Representação de algumas correlações HMBC de CUT8 (ovatifolina).

Tabela 27 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (600 e 150 MHz, acetona- d_6) da lactona ovatifolina em comparação com dados da literatura.

Posição	δ_{H} (mult., J Hz) 600 MHz	δ_{C} 150 MHz	HMBC	CESPEDES et al.
				(2001), CDCl_3 δ_{H} (mult., J Hz) 300 MHz
1	5,19 (ddd; 12,4; 4,4; 0,5)	135,5	9/14	5,12 (dd)
2a	2,53 (dddd; 12,8; 12,4; 11,8; 5,4)	26,4	1/3	2,32-2,25 (m)
2b	2,23 (m)	26,4	1/10/14	2,32-2,25 (m)
3a	2,35 (ddd; 11,4; 5,4; 1,7)	39,5	1/2/4/5/15	2,32-2,25 (m)
3b	2,17 (ddd; 11,8; 11,4; 5,8)	39,5	2/4/5/15	2,32-2,25 (m)
4	-	141,9	-	-
5	4,97 (dd; 10,1; 1,4)	129,1	3/7/15	4,87 (d)
6	5,21 (ddd; 10,1; 8,3; 0,3)	75,4	4/7/8	5,23 (dd)
7	2,94 (dddd; 8,3; 3,6; 3,2; 0,9)	54,3	-	2,76 (ddd)
8	4,68 (m)	72,1	6/7	4,69 (d)
9a	2,99 (dd; 14,0; 5,5)	43,5	7/8/10	2,96 (dd)
9b	2,23 (m)	43,5	1/8/14	2,18 (d)
10	-	135,7	-	-
11	-	140,5	-	-
12	-	170,3	-	-
13a	6,17 (d; 3,6)	119,7	7/11/12	6,35 (d)
13b	5,64 (d, 3,2)	119,7	7/12	5,59 (d)
14a	4,71 (d; 11,8)	63,6	1/9/1'	4,81 (d)
14b	4,67 (dd; 11,8; 0,5)	63,6	1/9/1'	4,57 (d)
15	1,66 (dd; 1,4; 0,3)	16,8	3/4/5	1,64 (s)
1'	-	170,8	-	-
2'	1,97 (s)	20,9	1'	2,07 (s)

5.3.2.9 Substância CUT9 (cafeato de etila)

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C da substância CUT9 apresentaram o mesmo perfil de sinais daqueles observados para CPT9, permitindo concluir que o composto CUT9 também se trata do cafeato de etila (dados espectroscópicos na seção 5.3.1.9).

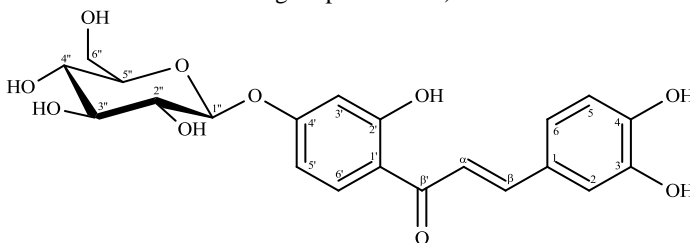
5.3.2.10 Substância CUT10 (ácido 3,5-di-*O-E*-cafeoilquínico)

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C da substância CUT10 apresentaram o mesmo perfil de sinais daqueles observados para CPT10, permitindo constatar que o composto CUT10 também se trata do ácido 3,5-di-*O-E*-cafeoilquínico (dados espectroscópicos na seção 5.3.1.10).

5.3.2.11 Substância CUT11 (buteína-4'-*O*- β -glicopiranosídeo)

O composto CUT11 (12,4 mg) (Figura 143) foi isolado da fração acetato de etila como um sólido laranja, com p.f. na faixa de 193,5-195,5 °C. Na análise por CCDA em fase reversa (C18), essa substância apresentou-se como uma mancha com valor de $R_f = 0,55$ no sistema de solvente $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ (40:60, v/v), com extinção de fluorescência sob luz UV no comprimento de onda $\lambda = 254$ nm. Após revelação com o reagente químico anisaldeído sulfúrico, essa substância intensificou a coloração laranja.

Figura 143 – Estrutura química do composto CUT11 (buteína-4'-*O*- β -glicopiranosídeo).



O espectro de RMN de ^1H (600 MHz, $\text{MeOD}-d_4$) (Figura 144) do composto CUT11 foi consistente com a presença de uma aglicona e uma molécula de açúcar. Os sinais de ressonância observados no espectro de RMN de ^1H para a aglicona foram típicos de hidrogênios olefinicos α,β -

insaturados, com deslocamento químico em δ_{H} 7,46 (1H; d; $J=15,3$ Hz; H- α) e δ_{H} 7,66 (1H; d; $J=15,3$ Hz; H- β). Também foi observada a presença de seis hidrogênios aromáticos com padrão de acoplamento característico de anel 1,2,4-trissubstituído, sugerindo a presença de dois anéis benzênicos (A e B): δ_{H} 7,93 (1H; d; $J=9,0$ Hz; H-6'), δ_{H} 7,10 (1H; d; $J=2,1$ Hz; H-2), δ_{H} 7,03 (1H; dd; $J=8,1$; 2,1 Hz; H-6), δ_{H} 6,73 (1H; d; $J=8,1$ Hz; H-5), δ_{H} 6,59 (1H; dd; $J=9,0$; 2,5 Hz; H-5'') e δ_{H} 6,52 (1H; d; $J=2,5$ Hz; H-3'). A geometria da dupla ligação olefínica foi determinada como *trans* devido à magnitude da constante de acoplamento ($J=15,3$ Hz) entre os hidrogênios H- α e H- β . Os dados descritos acima sugerem fortemente a presença de um núcleo fundamental 1,3-diaril-propano (C₆-C₃-C₆), o qual é consistente com um esqueleto de chalcona devido à presença da ligação olefínica. O sinal de ressonância referente em δ_{H} 4,94 (1H; d; $J=7,4$ Hz; H-1'') foi atribuído ao hidrogênio anomérico. O valor típico da constante de acoplamento do hidrogênio anomérico ($J=7,4$ Hz) e a sua multiplicidade duplete sugerem a presença de uma unidade β -D-glicose (ROSLUND et al., 2008). Adicionalmente, o valor de deslocamento químico do carbono anomérico (δ_{C} 101,4) indica que a ligação da molécula de glicose a aglicona ocorreu através de uma ligação *O*-glicosídica. Outros valores de ressonância que confirmam a presença da unidade glicose são: δ_{H} 3,81 (1H; dd; $J=12,1$; 2,3 Hz; H-6''a), δ_{H} 3,62 (1H; dd; $J=12,1$; 5,5 Hz; 6''b), δ_{H} 3,39 (2H; m; H-3'' e H-4''), δ_{H} 3,39 (1H; dm; $J=7,4$ Hz; H-2'') e 3,32 (1H; ddd; $J=9,2$; 5;5; 2,3 Hz; H-5'').

Todas as atribuições dos valores de ^{13}C foram realizadas com o auxílio dos experimentos de correlação heteronuclear HSQC (Figura 145) e HMBC (Figura 146). Os mapas de correlação HSQC e HMBC evidenciaram a presença de 21 átomos de carbonos: δ_{C} 194,3; 167,1; 165,4; 150,5; 147,0; 147,0; 132,9; 128,5; 124,1; 118,5; 116,9; 116,7; 116,1; 109,5; 105,3; 101,4; 78,4; 78,4; 74,9; 71,4 e 62,5; isto reforça a hipótese do esqueleto carbônico com núcleo fundamental C₆-C₃-C₆ ligado a uma porção açúcar.

As correlações a mais de uma ligação entre hidrogênio e carbono ($^2J_{\text{HC}}$, $^3J_{\text{HC}}$ e $^4J_{\text{HC}}$) visualizadas no mapa de correlação HMBC permitiram estabelecer a conectividade entre os fragmentos na molécula. A ligação da unidade glicopiranosila à aglicona foi confirmada pela correlação do hidrogênio anomérico H-1'' (δ_{H} 4,94) com o carbono C-4' (δ_{C} 165,4) do anel aromático A. Além disso, o hidrogênio olefínico H- β (δ_{H} 7,66) mostrou correlação com os carbonos C- α (δ_{C} 118,5), C- β' (δ_{C} 194,3), C-1 (δ_{C} 128,5), C-2 (δ_{C} 116,1) e C-6 (δ_{C} 124,1). Na Figura 147 são apresentadas algumas correlações HMBC do composto CUT11.

Os dados espectroscópicos descritos acima permitiram propor um esqueleto básico de chalcona *O*-heterosídica. As informações obtidas através da análise dos espectros de RMN 1D e 2D, aliadas à comparação com valores da literatura (ZHU et al., 2009), permitiram caracterizar a substância CUT11 (C₂₁H₂₂O₁₀) como sendo a buteína-4'-*O*-β-glicopiranosídeo (coreopsina). Na Tabela 28 é realizada uma comparação dos dados de RMN de ¹H e ¹³C da coreopsina com os dados reportados por Zhu et al. (2009). No entanto, é importante salientar que alguns dos sinais descritos por esses autores apresentam atribuições de deslocamento químico e multiplicidade questionáveis. Por exemplo, esses autores sugerem que os hidrogênios olefínicos H-α e H-β são química- e magneticamente equivalentes, atribuindo uma multiplicidade simples (s) para ambos.

Figura 144 – Espectro de RMN de ¹H (600 MHz, MeOD-*d*₄) do composto CUT11 (buteína-4'-*O*-β-glicopiranosídeo).

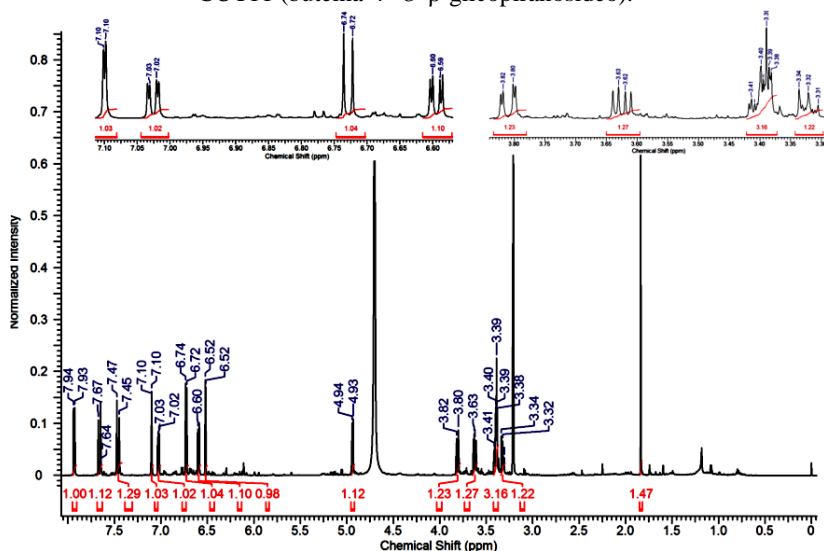


Figura 145 – Mapa de correlação HSQC (600 MHz, MeOD- d_4) do composto CUT11 (buteína-4'- O - β -glicopiranosídeo).

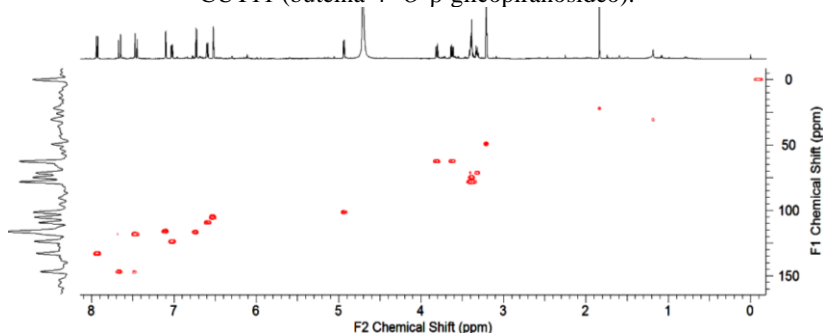


Figura 146 – Mapa de correlação HMBC (600 MHz, MeOD- d_4) do composto CUT11 (buteína-4'- O - β -glicopiranosídeo).

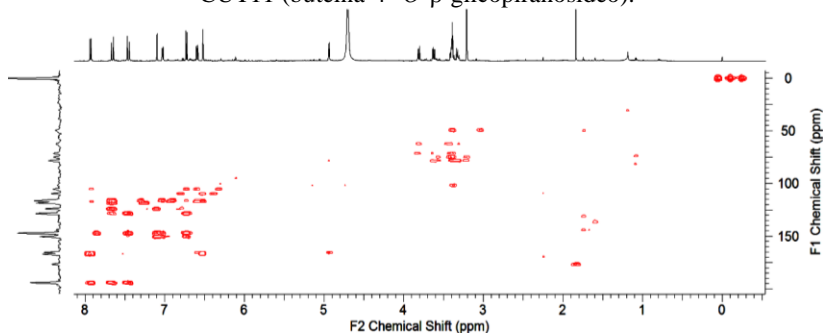


Figura 147 – Representação de algumas correlações HMBC do composto CUT11 (buteína-4'- O - β -glicopiranosídeo).

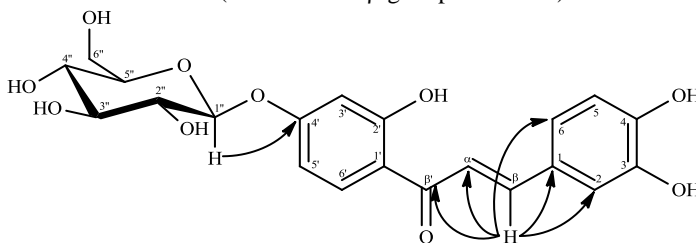


Tabela 28 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (600 e 150 MHz, $\text{MeOD}-d_4$) da chalcona buteína-4'-*O*- β -glicopiranosídeo em comparação com dados da literatura.

Posição	δ_{H} (mult., J Hz) 600 MHz	δ_{C} 150 MHz	HMBC	ZHU et al. (2009), $\text{DMSO}-d_6$	
				δ_{H} (mult., J Hz)	δ_{C}
				600 MHz	150 MHz
1	-	128,5		-	126,4
2	7,10 (d; 2,1)	116,1	$\beta/4/6$	7,28 (d; 1,8)	116,0
3	-	147,0	-	-	145,7
4	-	150,5	-	-	149,1
5	6,73 (d; 8,1)	116,7	1/2/3/4	6,82 (d; 8,4)	115,9
6	7,03 (dd; 8,1; 2,1)	124,1	$\beta/2/3$	7,22 (dd; 8,4; 1,8)	123,0
1'	-	116,9	-	-	115,1
2'	-	167,1	-	-	164,8
3'	6,52 (d; 2,5)	105,3	1'/2'/4'/5'	6,57 (d; 1,8)	103,7
4'	-	165,4	-	-	163,6
5'	6,59 (dd; 9,0; 2,5)	109,5	1'/3'/4'	6,63 (dd; 8,0; 1,8)	108,5
6'	7,93 (d; 9,0)	132,9	$\beta/1'/2'/3'/4'$	8,22 (d; 8,0)	132,7
α	7,46 (d; 15,3)	118,5	$\beta/\beta'/1$	7,69 (s)	117,6
β	7,66 (d; 15,3)	147,0	$\alpha/\beta'/1/2/6$	7,69 (s)	145,7
β'	-	194,3	-	-	192,2
1''	4,94 (d; 7,4)	101,4	3''/4'	5,02 (d; 7,2)	99,8
2''	3,39 (dm; 7,4)	74,9	3''/4''	3,25 (dd; 7,8; 7,2)	73,2
3''	3,39 (m)	78,4	2''/5''	3,42 (d; 7,8)	77,3
4''	3,39 (m)	78,4	3''/5''	3,16 (m)	69,7
5''	3,32 (ddd; 9,2; 5,6; 2,3)	71,4	3''/4''/6''	3,30 (m)	76,4
6''a	3,81 (dd; 12,1; 2,3)	62,5	5''	3,69 (d; 10,8)	60,7
6''b	3,62 (dd; 12,1; 5,6)	62,5	4''/5''	3,45 (dd; 12,0; 6,0)	60,7

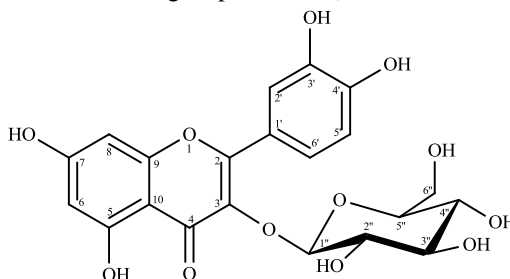
A buteína-4'-*O*- β -glicopiranosídeo foi identificada anteriormente em plantas de diferentes gêneros, entre elas podemos destacar as espécies *Bidens ceruna* L. (ZHU et al., 2009), *B. parviflora* (WANG et al., 2007), *Sophora alopecuroides* L. (YANG et al., 2013b), *Butea monosperma* (Lam.) Taub. (AHMED et al., 2011), *Wedelia prostrata* (FARAG et al., 1997), *Coreopsis tinctoria* (DIAS et al., 2010), entre outras. Suplementarmente, também foram relatadas algumas propriedades biológicas para esse composto, tais como atividade antioxidante (AHMED et al., 2011; ZHU et al., 2009), antialérgica

(WANG et al., 2007) e inibitória para a neuraminidase do vírus influenza A (AHMED et al., 2011).

5.3.2.12 Substância CUT12 (quercetina-3-*O*- β -glicopiranosídeo)

O composto CUT12 (5,0 mg) (Figura 148) foi obtido da fração acetato de etila como um sólido alaranjado, com p.f. na faixa de 216-218 °C. Na análise por CCDA em fase reversa (C18), esse composto apresentou-se como uma mancha com $R_f = 0,40$ no sistema de eluição $H_2O:MeOH$ (50:50, v/v); com extinção de fluorescência sob luz UV no comprimento de onda $\lambda = 254$ nm, e fluorescência em $\lambda = 366$ nm. Após revelação com o agente cromogênico anisaldeído sulfúrico, esse composto desenvolveu coloração amarelo-alaranjada.

Figura 148 – Estrutura química do composto CUT12 (quercetina-3-*O*- β -glicopiranosídeo).



O espectro de RMN de 1H (600 MHz, $MeOD-d_4$) (Figura 149) do composto CUT12 foi compatível com a presença de uma aglicona e uma unidade de açúcar. Os sinais de ressonância observados no espectro de RMN de 1H para a aglicona foram típicos de um esqueleto de flavonol: dois dupletos em δ_H 7,61 (1H; d; $J=2,2$ Hz; H-2') e δ_H 6,76 (1H; d; $J=8,5$ Hz; H-5') e um duplo duplete em δ_H 7,48 (1H; dd; $J=8,5; 2,2$ Hz; H-6'), sugerindo a presença de grupos *orto*-dioxigenados no anel B do núcleo flavonoídico (VOGT & TAYLOR, 1995). Também foi visualizado no espectro um par de dupletos em δ_H 6,19 (1H; d; $J=2,1$ Hz; H-8) e δ_H 6,03 (1H; d; $J=2,1$ Hz; H-6), característicos de hidrogênios aromáticos com padrão de acoplamento do tipo *meta*. O sinal de ressonância referente à unidade de açúcar em δ_H 5,04 (1H; d; $J=7,8$ Hz; H-1'') foi atribuído ao hidrogênio anomérico. O valor típico da constante de acoplamento do hidrogênio anomérico ($J=7,8$ Hz) e a

sua multiplicidade duplete corroboram a presença de uma unidade β -D-glicose (ROSLUND et al., 2008). Ainda, o valor de deslocamento químico do carbono anomérico (δ_C 104,9) sugere que a ligação da molécula de glicose à aglicona ocorreu através de uma ligação *O*-glicosídica. Outras ressonâncias que confirmam a presença da glicose são: δ_H 3,60 (1H; dd; $J=11,9$; 2,5 Hz; H-6''a), δ_H 3,48 (1H; dd; $J=11,9$; 5,3 Hz; 6''b), δ_H 3,38 (1H; dd; $J=9,1$; 7,8 Hz; H-2''), δ_H 3,32 (1H; dd; $J=9,1$; 8,9 Hz; H-3''), δ_H 3,25 (1H; dd; $J=9,6$; 8,9 Hz; H-2'') e 3,11 (1H; ddd; $J=9,6$; 5,3; 2,5 Hz; H-5'').

Os experimentos de correlação heteronuclear HSQC (Figura 150) e HMBC (Figura 151) possibilitaram a atribuição dos deslocamentos químicos de todos os carbonos da molécula. Os mapas de correlação HSQC e HMBC evidenciaram a presença de 15 sinais referentes aos átomos de carbonos da aglicona e seis sinais referentes à glicose: δ_C 170,9; 163,0; 159,1; 159,1; 158,9; 150,4; 146,3; 135,9; 123,4; 123,3; 117,6; 116,1; 104,9; 104,9; 101,5; 95,9; 78,5; 78,5; 75,8; 71,3 e 62,6; reforçando a hipótese do esqueleto carbônico C₆-C₃-C₆ ligado a uma porção heterosídica.

As correlações a mais de uma ligação entre hidrogênio e carbono ($^2J_{HC}$, $^3J_{HC}$ e $^4J_{HC}$) observadas no mapa de correlação HMBC possibilitaram estabelecer a conectividade entre os fragmentos na molécula. A ligação da unidade glicopiranosila à aglicona foi ratificada pela correlação do hidrogênio anomérico H-1'' (δ_H 5,04) com o carbono C-3' (δ_C 135,9) do anel heterocíclico C. Além disso, o hidrogênio aromático H-8 (δ_H 6,19) mostrou correlação com os carbonos C-4 (δ_C 170,9), C-6 (δ_C 101,5), C-7 (δ_C 159,1) e C-10 (δ_C 104,9); e o hidrogênio H-2' apresentou correlação com os carbonos C-2 (δ_C 158,9), C-1' (δ_C 123,4), C-3' (δ_C 146,3) e C-4' (δ_C 150,4). Na Figura 152 são apresentadas algumas correlações HMBC do composto CUT12.

A combinação de todos os dados espectroscópicos apresentados acima e a comparação com dados disponíveis na literatura (DUDEK-MAKUCH & MATLAWSKA, 2011; GUVENALP; DEMIREZER, 2005) permitiram identificar o composto CUT12 (C₂₁H₂₀O₁₂) como sendo o flavonol glicosilado quercetina-3-*O*- β -glicopiranosídeo (isoquercitrina). Na Tabela 29 são apresentados os dados de RMN de 1H e ^{13}C da quercetina-3-*O*- β -glicopiranosídeo, bem como as correlações 1H - ^{13}C a longa distância observadas no mapa de correlação HMBC e a comparação com os dados descritos por Guvenalp e Demirezer (2005). É importante salientar que alguns valores de deslocamentos químicos descritos por esses autores apresentam variações de deslocamento

químico quando comparados aos valores obtidos para a substância CUT12.

A quercetina-3-*O*- β -glicopiranosídeo foi isolada anteriormente de diferentes fontes vegetais, entre elas podemos destacar as espécies *Monochaetum multiflorum* (ISAZA; ITO; YOSHIDA, 2001), *Tropaeolum majus* L. (GASPAROTTO JÚNIOR et al., 2011), *Aesculus hippocastanum* (DUDEK-MAKUCH & MATLAWSKA, 2011), *Asperula arvensis* L. (GUVENALP & DEMIREZER, 2005), *Argemone platyceras* (FERNANDEZ et al., 2005), *Parnassia palustris* Linn. (HU et al., 2013) e *Anthemis tinctoria* L. (PAPAIOANNOU et al., 2007). Além disso, também foram investigadas algumas propriedades biológicas para esse composto, a exemplo das atividades antioxidante, citotóxica (VELLOSA et al., 2011), antihipertensiva (GASPAROTTO JÚNIOR et al., 2011), antitumoral (AMADO et al., 2009), antiviral (KIM; NARAYANAN; CHANG, 2010), hipolipidêmica (ZHOU et al., 2014a), anti-inflamatória (ROGÉRIO et al., 2007) e antiasmática (FERNANDEZ et al., 2005).

Figura 149 – Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, MeOD- d_4) do composto CUT12 (quercetina-3-*O*- β -glicopiranosídeo).

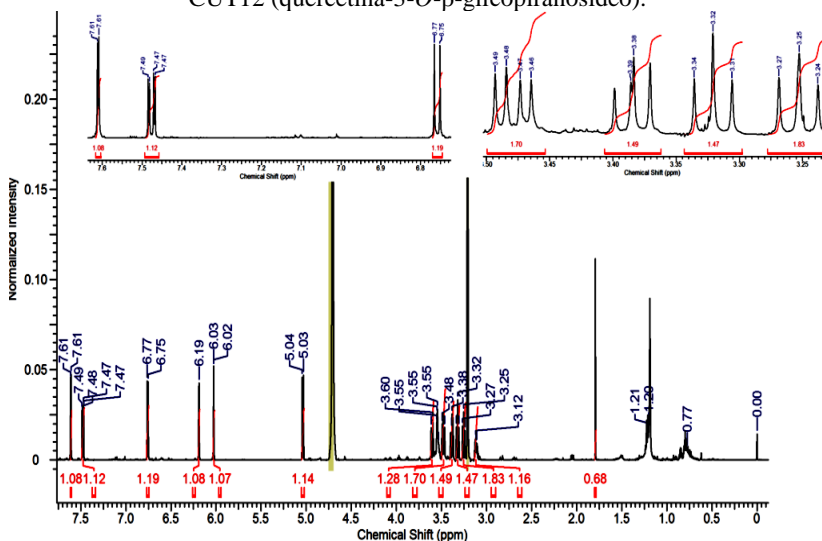


Figura 150 – Mapa de correlação HSQC (600 MHz, MeOD- d_4) do composto CUT12 (quercetina-3-*O*- β -glicopiranosídeo).

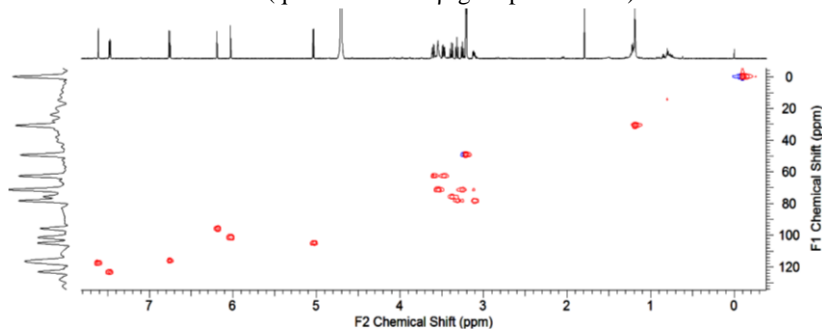


Figura 151 – Mapa de correlação HSQC (600 MHz, MeOD- d_4) do composto CUT12 (quercetina-3-*O*- β -glicopiranosídeo).

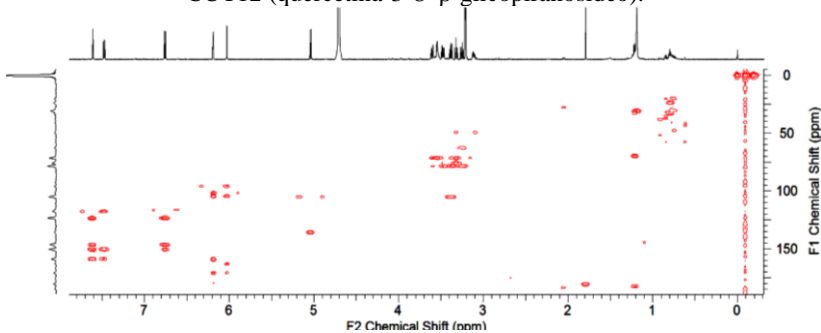


Figura 152 – Representação de algumas correlações HMBC do composto CUT12 (quercetina-3-*O*- β -glicopiranosídeo).

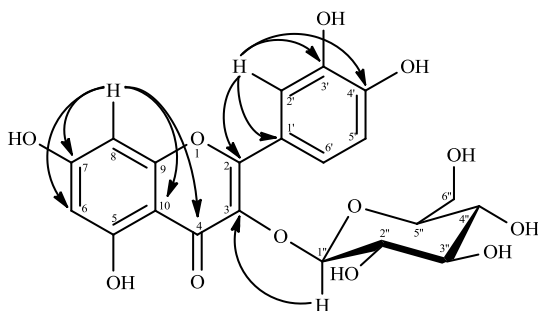


Tabela 29 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (600 e 150 MHz, MeOD- d_4) da quercetina-3-*O*-glicopiranosídeo (isoquercitrina) em comparação com dados da literatura.

Posição	δ_{H} (mult., J Hz) 400 MHz	δ_{C} 100 MHz	HMBC	GUVENALP; DEMIREZER, (2005), MeOD- d_4	
				δ_{H} (mult., J Hz) 300 MHz	δ_{C} 75 MHz
				2	-
3	-	135,9	-	-	135,1
4	-	170,9	-	-	178,9
5	-	163,0	-	-	163,2
6	6,03 (d; 2,1)	101,5	4/5/8/10	6,10 (d; 2,0)	101,4
7	-	159,1	-	-	167,3
8	6,19 (d; 2,1)	95,9	4/6/7/10	6,26 (d; 2,0)	95,4
9	-	159,1	-	-	158,6
10	-	104,9	-	-	105,2
1'	-	123,4	-	-	123,0
2'	7,61 (d; 2,2)	117,6	2/1'/3'/4'	7,70 (d; 2,0)	116,2
3'	-	146,3	-	-	145,9
4'	-	150,4	-	-	149,5
5'	6,76 (d; 8,5)	116,1	1'/3'/4'	6,85 (d; 8,0)	117,4
6'	7,48 (dd; 8,5; 2,2)	123,3	2/2'/4'	7,57 (dd; 7,5; 2,0)	122,7
1''	5,04 (d; 7,8)	104,9	3/3''	5,10 (d; 7,7)	101,4
2''	3,38 (dd; 9,1; 7,8)	75,8	1''/3''/4''	3,30-3,80 (m)	74,3
3''	3,32 (dd; 9,1; 8,9)	78,5	2''/4''	3,30-3,80 (m)	76,8
4''	3,25 (dd; 9,6; 8,9)	71,3	3''/5''/6''	3,30-3,80 (m)	70,3
5''	3,11 (ddd; 9,6; 5,3; 2,5)	78,5	4''	3,30-3,80 (m)	77,5
6''a	3,60 (dd; 11,9; 2,5)	62,6	4''/5''	3,30-3,80 (m)	61,3
6''b	3,48 (dd; 11,9; 5,3)	62,6	4''/5''	3,30-3,80 (m)	61,3

5.3.3 Atividade leishmanicida e tripanocida dos compostos isolados

No presente estudo foi avaliada a atividade antiprotozoária *in vitro* dos compostos isolados das espécies *C. uniflora* e *C. pinnatifida* contra *Leishmania amazonensis*, o agente etiológico da leishmaniose cutânea; e *Trypanosoma cruzi*, um protozoário tripanossomatídeo causador da doença de Chagas. Todos os compostos foram avaliados frente às formas amastigotas intracelulares e os mesmos estão sendo investigados pela primeira vez contra esses protozoários parasitas.

Os resultados dos ensaios leishmanicida e tripanocida foram expressos em percentagem de inibição de crescimento dos parasitas e estão sumarizados na Tabela 30. A habilidade dos compostos em inibir o crescimento dos parasitas foi avaliada na concentração de 50 μM . DMSO foi empregado como controle negativo na concentração máxima de 1% e não interferiu no crescimento dos parasitas em nenhum dos bioensaios. Anfotericina B na concentração de 2,0 μM foi utilizada como controle positivo contra *L. amazonensis*, produzindo 82,4% de inibição; e benznidazol 20 μM , fármaco de primeira escolha para o tratamento da doença de Chagas, foi usado como controle positivo contra *T. cruzi*, causando 82,7% de efeito inibitório no crescimento parasitário.

Considerando a atividade leishmanicida, a lactona 11,13-diidroxicalaxina foi o composto mais bioativo, com 81,8% de inibição do crescimento parasitário na concentração de 50 μM ; seguido da ovatifolina, inibindo em 59,9% a carga parasitária de *L. amazonensis*. Os compostos eupatoriocromeno, enecalinol, cafeato de etila, ácido 3,5-di-*O-E*-cafeoilquínico e a mistura de buteína+orobol revelaram atividade leishmanicida moderada, inibindo o crescimento do parasita intracelular em 39,3; 32,3; 29,5; 25,3 e 24,7%, respectivamente.

Com relação à atividade tripanocida, a lactona 11,13-diidroxicalaxina também foi o composto mais potente, inibindo em 94,3% a carga parasitária de *T. cruzi*; seguido do cafeato de etila e da mistura de buteína+orobol, com um efeito inibitório no crescimento das amastigotas de *T. cruzi* de 76,1 e 73,3%, respectivamente. Os compostos desacetileupaserrina e a α -hidroxi-buteína exibiram efeito tripanocida moderado (36,8 e 36,2% de efeito inibitório no crescimento do parasita, respectivamente).

Tabela 30 – *Screening* leishmanicida e tripanocida dos compostos isolados de *C. uniflora* e *C. pinnatifida* frente às formas amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* e *T. cruzi*, respectivamente.

Compostos Concentração (50 µM)	% Inibição de crescimento <i>L. amazonensis</i>	% Inibição de crescimento <i>T. cruzi</i>
Eupatoriocromeno (CPT1)	39,3 (±7,8)	2,4 (±0,02)
Metileupatoriocromeno (CPT2)	Sem atividade	3,5 (±0,4)
Encecalinol (CPT3)	32,3 (±5,7)	-
Etil encecalol (CPT4)	Sem atividade	-
12-Hidroxi-encecalina (CPT5)	Sem atividade	4,7 (±0,8)
Fitol (CPT6)	Sem atividade	2,3 (±0,5)
Vanilina (CPT7)	12,9 (±0,4)	2,4 (±0,6)
Cafeato de etila (CPT9)	29,5 (±1,0)	76,1 (±3,1)
Ácido cafeico (CUT1)	9,9 (±1,2)	Sem atividade
Noreugenina (CUT2)	10,9 (±1,3)	Sem atividade
Buteína+orobol (CUT3)	24,7 (±3,4)	73,3 (±0,3)
α-Hidroxi-buteína (CUT4)	8,2 (±0,5)	36,2 (±4,4)
Buteína-4'- <i>O</i> -β-glicopiranosídeo (CUT11)	11,7 (±0,9)	Sem atividade
Quercetina-3'- <i>O</i> -β-glicopiranosídeo (CUT12)	8,6 (±2,7)	Sem atividade
Ácido 3,4-di- <i>O-E</i> -cafeoilquínico (CPT11)	3,4 (±0,1)	1,7 (±0,2)
Ácido 3,5-di- <i>O-E</i> -cafeoilquínico (CPT10)	25,3 (±3,6)	Sem atividade
Ácido 4,5-di- <i>O-E</i> -cafeoilquínico (CPT12)	3,2 (±0,4)	1,8 (±0,1)
11,13-diidroxi-calaxina (CPT8)	81,8 (±2,1)	94,3 (±0,4)
Desacetileupaserrina (CUT5)	19,4 (±2,5)	36,8 (±1,8)
2α-hidroxi-8β-2',3',5'-trihidroxi- angeloiloxi-costunolídeo (CUT6)	14,4 (±1,5)	Sem atividade
2α-hidroxi-8β-3'-hidroxi-2',5'-epoxi- angeloiloxi-costunolídeo (CUT7)	13,4 (±2,0)	Sem atividade
Ovatifolina (CUT8)	59,9 (±1,8)	5,0 (±1,1)
Controle negativo (DMSO 1%)	0	0
Controle positivo (Anfotericina B 2 µM)	82,4 (±1,9)	-
Controle positivo (Benzonidazol 20 µM)	-	82,7 (±0,9)

Um critério extremamente importante que deve ser avaliado na pesquisa por novos compostos bioativos com potencial terapêutico contra protozoários parasitas é detectar um possível efeito tóxico inespecífico que afete igualmente os parasitas e as células do hospedeiro. Entre os 23 compostos avaliados, cinco exibiram uma percentagem de inibição do crescimento dos parasitas superior a 50%, sendo selecionados para a obtenção da CI_{50} (concentração capaz de inibir em 50% o crescimento dos parasitas) e CC_{50} (concentração citotóxica 50%). A citotoxicidade para linhagem celular TPH-1 e para os protozoários *T. cruzi* e *L. amazonensis* foi comparada utilizando-se o índice de seletividade (IS), o qual foi mensurado dividindo o valor da CC_{50} pelo valor da CI_{50} (CC_{50}/CI_{50}). Os valores de CI_{50} , CC_{50} e IS obtidos estão apresentados na Tabela 31.

Tabela 31 – Valores de CI_{50} , CC_{50} e IS para os compostos 11,13-diidroxi-calaxina, ovatifolina, cafeato de etila e a mistura de buteína+orobol.

Compostos	CI_{50} (μ M) <i>L. amazonensis</i>	CI_{50} (μ M) <i>T. cruzi</i>	CC_{50} (μ M)	Índice de Seletividade
11,13-Diidroxi-calaxina (CPT8)	8,3 (\pm 0,6)	5,3 (\pm 0,2)	<15,6	-
Ovatifolina (CUT8)	Perdeu atividade	-	68,4 (\pm 0,7)	-
Cafeato de etila (CPT9)	-	18,3 (\pm 0,3)	236,7 (\pm 0,2)	12,95
Mistura de buteína+orobol (CUT3)	-	26,5 (\pm 0,5)	95,9 (\pm 0,2)	3,61

A lactona 11,13-diidroxi-calaxina, o cafeato de etila e a mistura de buteína+orobol demonstraram uma interessante atividade tripanocida frente às formas amastigotas de *T. cruzi*, exibindo valores de CI_{50} de 5,3; 18,3 e 26,5 μ M, respectivamente. Da mesma forma, a lactona 11,13-diidroxi-calaxina também exibiu um ótimo efeito leishmanicida, com uma CI_{50} = 8,3 μ M. Apesar de ter demonstrado um interessante efeito leishmanicida, a lactona ovatifolina tornou-se inativa. Essa ausência do efeito pode ser justificada, provavelmente, devido a um problema na estabilidade desse composto. A CC_{50} dos compostos avaliados variou de 15,6 a 236,7 μ M, sendo que o cafeato de etila foi o composto mais seletivo (IS = 12,95).

As LST são descritas na literatura por possuírem atividade frente a diferentes espécies de protozoários parasitas, tais como *Leishmania amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. donovani*, *Trypanosoma brucei rhodesiense* e *T. cruzi* (KARIOTI et al, 2009; ODONNE et al., 2011;

SOSA et al., 2016; TOLEDO et al., 2014). Por exemplo, Wu e colaboradores (2011a) avaliaram a atividade anti-*Leishmania* de seis lactonas sesquiterpênicas (germacranolídeos) isoladas de *Calea zacatechichi* contra a espécie *Leishmania donovani*. Todas as lactonas testadas demonstraram uma interessante atividade anti-*Leishmania*, sendo que a calealactona C ($CI_{50} = 1,9 \mu\text{M}$) e a caleína D (arucanolídeo) ($CI_{50} = 2,2 \mu\text{M}$) foram as substâncias mais bioativas, revelando uma atividade superior ao controle positivo pentamidina ($CI_{50} = 2,9 \mu\text{M}$). Realizando uma comparação rápida entre a 11,13-diidroxi-calaxina (CPT8), a calealactona C [45] e a caleína D [48], é possível perceber que as três possuem em sua estrutura química um grupamento metacrilato (cadeia lateral éster), bem como apresentam sistemas carbonílicos α,β -insaturados adicionais. Esses sistemas carbonílicos α,β -insaturados são descritos na literatura como elementos estruturais chave capazes de reagir em adições do tipo Michael com nucleófilos biológicos, tais como grupos sulfidrilas, e várias atividades biológicas das LST têm sido primariamente atribuídas a presença dos mesmos (PADILLA-GÓZALEZ; SANTOS; DA COSTA, 2016).

Os produtos naturais, especialmente aqueles oriundos de fontes vegetais, têm demonstrado um grande potencial na pesquisa por novos e seletivos agentes para o tratamento de importantes doenças causadas por protozoários parasitas. Diversas classes de metabólitos secundários já foram isoladas de espécies do gênero *Calea*, tais como flavonoides, lactonas sesquiterpênicas, cromonas, cromenos, poliacetilenos; e algumas dessas classes químicas têm se mostrado bioativas nos ensaios leishmanicida e tripanocida a que foram submetidas (DO NASCIMENTO; DE OLIVEIRA; ALBUQUERQUE, 2002; DO NASCIMENTO et al., 2004; 2007; WU et al., 2011a).

Os protozoários patogênicos do gênero *Leishmania* apresentam dois estágios morfológicos principais durante o seu ciclo de vida: a forma promastigota flagelada e extracelular, localizada no tubo digestivo do inseto vetor; e a forma amastigota intracelular e sem flagelo externo, encontrada no interior de células fagocitárias do hospedeiro vertebrado (LEOPOLDO et al., 2006; SHAHA et al., 2006; VENDRAMETTO et al., 2010). Além das diferenças morfológicas existentes entre estas duas formas evolutivas do parasita, as mesmas também apresentam diferenças bioquímicas, expressando um repertório variado de proteínas e enzimas em suas membranas celulares, diferentes vias metabólicas e resistência variada em ambientes ácidos. Essas diferenças entre os estágios promastigotas e amastigotas são, provavelmente, as principais responsáveis pela diferente sensibilidade e

susceptibilidade observada entre essas duas formas morfológicas frente a compostos com atividade anti-*Leishmania* reportados na literatura (CUNNINGHAM, 2002; FUMAROLA; SPINELLI; BRANDONISIO, 2004).

A forma promastigota é a mais amplamente utilizada nos ensaios anti-*Leishmania* devido à rapidez, baixo custo, e facilidade de obtenção e manipulação *in vitro*, no entanto, as mesmas são menos sensíveis do que as formas amastigotas intracelulares, podendo ocasionar a exclusão de compostos com atividade anti-*Leishmania*. Logo, considerando que a forma amastigota encontrada no hospedeiro mamífero é o estágio do parasita clinicamente relevante, o emprego de metodologias com amastigotas são mais recomendáveis, pois estas mimetizam melhor a condição intracelular do parasita no hospedeiro, sendo de elevada importância para pesquisas bioguiadas objetivando o desenvolvimento de novos candidatos a fármacos (KAYSEL-CRUZ et al., 2009; MUYLDER et al., 2011).

Ainda, o ciclo de vida do protozoário flagelado *T. cruzi* é relativamente complexo e requer a participação de um hospedeiro vertebrado e outro invertebrado. O mesmo é caracterizado por três estágios de desenvolvimento morfológicamente distintos e bem definidos, a saber: (1) amastigota, que é a forma proliferativa intracelular encontrada no hospedeiro vertebrado; (2) epimastigota, que é o estágio presente no inseto vetor; e (3) tripomastigota, que é originada a partir da forma amastigota no final do ciclo de replicação intracelular e depois é liberada para a corrente sanguínea (TEIXEIRA et al., 2012). Na infecção por *T. cruzi*, ambas as formas amastigotas e tripomastigotas são encontradas dentro do hospedeiro humano. Assim, todas as fases do ciclo de vida do parasita de *T. cruzi* podem ser utilizadas em bioensaios para investigar o potencial anti-*Trypanosoma cruzi* de compostos, no entanto, as formas infectivas humanas do parasita (amastigota e tripomastigota) são os alvos mais apropriados e clinicamente relevantes, sendo considerados de importância primordial em muitos ensaios (JONES et al., 2013).

6 CONCLUSÕES

✓ As análises por UHPLC-DAD-MS dos extratos brutos e frações orgânicas de *C. pinnatifida* e *C. uniflora* permitiram a desreplificação de 10 substâncias, incluindo ácidos clorogênicos, flavonoides e outros derivados fenólicos;

✓ A investigação química das folhas de *C. pinnatifida* resultou no isolamento e caracterização de 12 substâncias, sendo cinco cromenos, um diterpeno, um aldeído fenólico, uma lactona sesquiterpênica inédita na literatura e quatro derivados de ácido hidroxi-cinâmico;

✓ O estudo fitoquímico do extrato etanólico das folhas de *C. uniflora* culminou no isolamento e elucidação estrutural de 13 substâncias, incluindo quatro lactonas sesquiterpênicas, três chalconas, um flavonol heterosídico, uma isoflavona, uma cromona e três derivados de ácido hidroxi-cinâmico;

✓ Todos os compostos isolados estão sendo descritos pela primeira vez para as espécies *C. pinnatifida* e *C. uniflora*;

✓ Os resultados do estudo fitoquímico evidenciaram a diversidade química do táxon *Calea* e ratificaram que os cromenos e as lactonas sesquiterpênicas são duas classes de metabólitos secundários características nesse gênero;

✓ A avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* frente às formas amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* demonstrou o potencial leishmanicida da lactona 11,13-diidroxi-calaxina, com $CI_{50} = 8,3 \mu\text{M}$;

✓ Os compostos 11,13-diidroxi-calaxina, cafeato de etila e a mistura de buteína+orobol exibiram uma atividade tripanocida significativa frente às formas amastigotas intracelulares de *T. cruzi*, com CI_{50} de 5,3 μM , 18,3 μM e 26,5 μM , respectivamente;

✓ O cafeato de etila não apresentou citotoxicidade ($CC_{50} = 236,7 \mu\text{M}$) frente a macrófagos murinos (linhagem celular TPH-1) e foi o composto com maior índice de seletividade ($IS=12,95$).

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

O presente trabalho cumpriu o seu objetivo principal, o qual se fundamentou em analisar a composição química das espécies *C. uniflora* e *C. pinnatifida*, bem como avaliar o potencial biológico (atividades leishmanicida e tripanocida) dos compostos isolados. Através de métodos cromatográficos (CLV, CC, CCDP, CLMP e CLAE) e técnicas espectroscópicas (IV, RMN 1D e 2D) e espectrométricas (HRMS) foi possível isolar e caracterizar 23 metabólitos secundários provenientes de diferentes classes químicas, dentre elas: lactonas sesquiterpênicas, flavonoides, derivados do ácido hidróxi-cinâmico, cromonas, diterpenos e cromenos. É importante ressaltar que todos os compostos isolados estão sendo descritos pela primeira vez para as espécies em estudo e a maioria para o gênero *Calea*, fato que denota a relevância desse estudo. Ainda, entre as substâncias isoladas, foi obtida uma lactona sesquiterpênica inédita na literatura, denominada 11,13-diidróxi-calaxina (CPT8). A 11,13-diidróxi-calaxina pertence à classe dos heliangolídeos, uma classe de lactonas bastante comum no gênero *Calea*.

No tocante aos ensaios biológicos, a lactona 11,13-diidróxi-calaxina demonstrou uma interessante atividade tripanocida e leishmanicida frente às espécies *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania amazonensis*, respectivamente, com valores de $CI_{50} < 10 \mu M$. Além disso, essa substância também foi avaliada frente a duas linhagens de células tumorais, em parceria com o professor Dr. Gilberto Carlos Franchi Júnior (Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP), e apresentou uma notável atividade antiproliferativa (dados não mostrados). Com relação a citotoxicidade dos compostos isolados frente à linhagem celular TPH-1, o cafeato de etila (CPT9) foi o composto mais seletivo, com $IS = 12,95$.

Diante dos dados apresentados, é possível concluir que os resultados obtidos com o estudo fitoquímico de *C. uniflora* e *C. pinnatifida*, e a avaliação da atividade leishmanicida e tripanocida dos compostos isolados foram promissores, denotando a importância da continuidade dos estudos com essas duas espécies. Como perspectivas futuras, pretende-se investigar o potencial biológico dos compostos isolados frente a outros tipos de atividades biológicas (antiproliferativa e anti-inflamatória), bem como investigar a composição química das frações metanol de *C. pinnatifida*, e das frações hexano e metanol de *C. uniflora*, uma vez que ainda não foram isolados metabólitos secundários da classe dos poliacetilenos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AACHOUI, Y.; et al. Synthetic adjuvants for vaccine formulations: evaluation of new phytol derivatives in induction and persistence of specific immune response. **Cellular Immunology**, v. 271, p. 308-318, 2011.

ABDELMOHSEN, U. R.; et al. Dereplication strategies for targeted isolation of new antitrypanosomal Actinosporins A and B from a marine sponge associated-*Actinokineospora sp.* EG49. **Marine Drugs**, v. 12, p. 1220-1244, 2014.

ABOUZID, S.; ORIHARA, Y. Biosynthesis of polyacetylenes in *Ambrosia maritima* hairy roots. **Planta Medica**, v. 73, n. 12, p. 1327-1329, 2007.

ADEBAYO, A. H.; et al. A new chromene isolated from *Ageratum conyzoides*. **Natural Product Communications**, v. 6, n. 9, p. 1263-1265, 2011.

AGUILAR-GUADARRAMA, B.; et al. Active compounds against tinea pedis dermatophytes from *Ageratina pichinchensis* var. *bustamenta*. **Natural Product Research**, v. 23, n. 16, p. 1559-1565, 2009.

AHMED, F. A.; et al. Biflavonoids from flowers of *Butea monosperma* (Lam.) Taub. **Heterocycles**, v. 83, n. 9, p. 2079-2089, 2011.

AHMED, S. M.; ABDELGALEIL, S. A. M. Antifungal activity of extracts and sesquiterpene lactones from *Magnolia grandiflora* L. (Magnoliaceae). **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 7, n. 4, p. 638-642, 2005.

ALBAGLI, S. **Amazônia: fronteira geopolítica da biodiversidade**. Parcerias Estratégicas (Brasília), v. 4, p. 5-19, 2001.

ALBUQUERQUE, U. P.; et al. Are ethnopharmacological surveys useful for the discovery and development of drugs from medicinal plants? **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 24, p. 110-115, 2014.

ALI, A. A.; et al. Chromones and flavans from *Pancretzum maritimum*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 2, p. 625-627, 1990.

ALIZADEH, B. H.; et al. Leishmanicidal evaluation of novel synthetic chromenes. **Archiv der Pharmazie (Weinheim, Germany)**, v. 341, n. 12, p. 787-793, 2008.

AL-MUSAYEIB, N. M.; et al. New thiophene and flavonoid from *Tagetes minuta* leaves growing in Saudi Arabia. **Molecules**, v. 19, n. 3, p. 2819-2828, 2014.

ALVARENGA, E. S.; et al. Síntese e avaliação da atividade fototóxica de derivados da α -santonina. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 401-406, 2009.

ALVARENGA, S. A. V.; et al. Chemosystematic studies of natural compounds isolated from Asteraceae: characterization of tribes by principal component analysis. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 56, p. 27-37, 2001.

ALVES, A. C. S.; et al. Aspectos botânicos, químicos, farmacológicos e terapêuticos do *Hypericum perforatum* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 3, p. 596-606, 2014.

AMADO, N. G.; et al. Isoquercitrin isolated from *Hyptis fasciculata* reduces glioblastoma cell proliferation and changes beta-catenin cellular localization. **Anti-Cancer Drugs**, v. 20, p. 543-552, 2009.

AMOAH, S. K. S.; et al. Sesquiterpene lactones from the leaves of *Hedyosmum brasiliense* (Chloranthaceae). **Phytochemistry**, v. 87, p. 126-132, 2013.

ANDERSEN, O. M.; MARKRAM, K. R. **Flavonoids. Chemistry, Biochemistry and Applications**. New York: CRC Press Taylor & Francis; 2006.

ANH, D. T. P.; DUONG, T. B.; HOANG, V. D. A new chromone from *Hymenocallis littoralis* Salisb. (Amaryllidaceae). **Natural Product Research**, v. 28, n. 21, p. 1869-1872, 2014.

AN, R.; et al. *In vitro* hepatoprotective compounds from *Suaeda glauca*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 31, n. 5, p. 594-597, 2008.

ANVISA. **Publicada norma que cria o Produto Nacional Fitoterápico.** Disponível em:

<<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/anvisa+portal/anvisa/sala+de+im+prensa/menu++noticias+anos/2013+noticias/publicada+norma+que+cria+o+produto+tradicional+fitoterapico>>. Acesso em 22 de Maio de 2015.

ARSININGTYAS, I. S.; et al. Identification of α -glucosidase inhibitors from the leaves of *Pluchea indica* (L.) Less., a traditional Indonesian herb: promotion of natural product use. **Natural Product Research**, v. 28, n. 17, p. 1350-1353, 2014.

AZOFEIFA, G.; et al. Antioxidant and anti-inflammatory *in vitro* activities of phenolic compounds from tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichos*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 24, p. 5798-5804, 2013.

BANDARA, B. M.; et al. An antifungal chromene from *Eupatorium riparium*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 6, p. 1983-1985, 1992.

BANERJEE, S.; et al. Chromenes from *Ageratina riparia*. **Phytochemistry**, v. 24, n. 11, p. 2681-2683, 1985.

BARRETO, S. S.; et al. Fungos em sementes de plantas ornamentais. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 33, n. 3, p. 561-573, 2011.

BARROS, M.; et al. Pharmacological reports about gastroprotective effects of methanolic extract from leaves of *Solidago chilensis* (Brazilian arnica) and its components quercitrin and afzelin in rodents. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 389, n. 4, p. 403-417, 2016.

BATISTA JR., J. M.; et al. Natural chromenes and chromene derivatives as potential anti-trypanosomal agents. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 3, p. 538-540, 2008.

BAYER, R. J.; STARR, J. R. Tribal phylogeny of the Asteraceae based on two non-coding chloroplast sequences, the trnL intron and trnL/trnF intergenic spacer. **Annals of the Missouri Botanical Garden Missouri Botanical Garden**, v. 85, p. 242-256, 1998.

BENYAHIA, S.; BENAYACHE, F.; BENAYACHE, S. Flavonoids from *Artemisia arborescens*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 49, n. 6, p. 1132-1133, 2014.

BHATT, B. Chemical constituents of *Solanum xanthocarpum*. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 3, n. 3, p. 176-181, 2011.

BOHLMANN, F.; BARUAH, R. N.; JAKUPOVIC, J. New melampolides from *Inula germanica*. **Planta Medica**, v. 3, p. 261-262, 1985.

BOHLMANN, F.; BURKHARDT, T.; ZDERO, C. **Naturally Occurring Acetylenes**. Academic Press, London, 1973.

BOHLMANN, F.; et al. Fourteen heliangolides from *Calea* species. **Phytochemistry**, v. 20, n. 4, p. 743-749, 1981a.

BOHLMANN, F.; et al. Eudesmanolides and heliangolides from *Calea rotundifolia*. **Phytochemistry**, v. 20, n. 7, p. 1635-1637, 1981b.

BOHLMANN, F.; et al. Heliangolides, and nerolidol and *p*-hydroxyacetophenone derivatives from *Calea* species. **Phytochemistry**, v. 20, n. 7, p. 1643-1647, 1981c.

BOHLMANN, F.; et al. New heliangolides from *Calea oxylepis*. **Phytochemistry**, v. 21, n. 5, p. 1164-1166, 1982a.

BOHLMANN, F.; et al. Germacrane and eudesmane derivatives from *Calea reticulata*. **Phytochemistry**, v. 21, n. 7, p. 1793-1794, 1982b.

BOHLMANN, F.; et al. Furanoheliangolides and other compounds from *Calea hymenolepis*. **Phytochemistry**, v. 21, n. 8, p. 2045-2048, 1982c.

BOHLMANN, F.; et al. Two furanoheliangolides from *Calea angusta*. **Phytochemistry**, v. 21, n. 8, p. 2117-2118, 1982d.

BOHLMANN, F.; et al. Three furanoheliangolides from *Calea villosa*. **Phytochemistry**, v. 21, n. 10, p. 2593-2595, 1982e.

BOHLMANN, F.; et al. Furanoheliangolides and farnesol derivatives from *Calea hispida*. **Phytochemistry**, v. 21, n. 12, p. 2899-2903, 1982f.

BOHLMANN, F.; et al. Four heliangolides and other sesquiterpenes from *Brasilia sickii*. **Phytochemistry**, v. 22, n. 5, p. 1213-1218, 1983.

BOHLMANN, F.; et al. Germacranolides related to chaplatrin from *Calea harleyi*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 5, p. 1095-1097, 1984.

BOHLMANN, F.; JAKUPOVIC, J. Neue germacranolide aus *Calea urticifolia*. **Phytochemistry**, v. 18, p. 119-123, 1979.

BOHLMANN, F.; JAKUPOVIC, J. New chromenes and other constituents of *Lagascea rigida*. **Phytochemistry**, v. 17, n. 9, p. 1677-1678, 1978.

BOHLMANN, F.; ZDERO, C. C17-acetylene compounds from *Calea integrifolia*. **Phytochemistry**, v. 15, n. 7, p. 1177, 1976.

BOHLMANN, F.; ZDERO, C. New macrolides from *Calea zacatechichi*. **Phytochemistry**, v. 16, n. 7, p. 1065-1068, 1977.

BORGES, C. C.; et al. *Bidens pilosa* L. (Asteraceae): traditional use in a community of southern Brazil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu**, v. 15, n. 1, p. 346-340, 2013.

BORGES DEL CASTILLO, J.; et al. Juanislamin and other components of *Calea parviflora*. **Revista Latinoamericana de Quimica**, v. 17, n. 1-2, p. 34-35, 1986.

BORGES DEL CASTILLO, J.; et al. Salvadorian compositae. II. Juanislamin and 2,3-epoxy-juanislamin, two new sesquiterpenic lactones from *Calea urticifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 44, n. 3, p. 348-350, 1981.

BORK, P. M.; et al. Sesquiterpene lactone containing Mexican Indian medicinal plants and pure sesquiterpene lactones as potent inhibitors of transcription factor NF- κ B. **FEBS Letters**, v. 402, n. 1, p. 85-90, 1997.

BOSELLI, E.; et al. Ethyl caffeate from Verdicchio wine: chromatographic purification and *in vivo* evaluation of its antifibrotic

activity. **Journal of Separation Science**, v. 32, n. 21, p. 3585-3590, 2009.

BOSI, C. F.; et al. Pyrrolizidine alkaloids in medicinal tea of *Ageratum conyzoides*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 3, p. 425-432, 2013.

BRANDÃO, H. N.; et al. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.

BRANDÃO, M. G; et al. Brazilian medicinal plants described by 19th century European naturalists and in the Official Pharmacopoeia. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 2, p. 141-148, 2008.

BRASIL, Ministério da Saúde. Portaria nº 971 de 03 de Maio de 2006. **Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNIC) no Sistema Único de Saúde**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 04 de Maio de 2006a.

BRASIL, Ministério da Saúde. Decreto nº 5813 de 22 de Junho de 2006. **Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 23 de Junho de 2006b.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, p. 317-338, 1998.

BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 229-239, 2010.

BREMER, K. **Asteraceae: Cladistics and Classification**. Timber Press, Portland, OR; 1994.

BRITO, A.; et al. HPLC-UV-MS profiles of phenolic compounds and antioxidant activity of fruits from three citrus species consumed in northern Chile. **Molecules**, v. 19, p. 17400-17421, 2014.

BUCKNER, F.; et al. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing

galactosidase. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 40, p. 2592-2597, 1996.

BUDEL, J. M.; et al. Caracteres anatômicos de folha e caule de *Calea uniflora* Less., Asteraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n. 1, p. 53-60, 2006.

BULLETIN OF THE WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Regulatory situation of herbal medicines**. A worldwide review, Geneva, 1998.

BURCU, B.; AYSEL, U.; NURDAN, S. Antimicrobial, antioxidant, antimutagenic activities, and phenolic compounds of *Iris germanica*. **Industrial Crops and Products**, v. 61, p. 526-530, 2014.

BURKHARDT, G.; et al. Bioactive chromenes from *Rhyncholacis penicillata*. **Phytochemistry**, v. 37, n. 6, p. 1593-1597, 1994.

BUTTURINI, E.; et al. Costunolide and dehydrocostuslactone, two natural sesquiterpene lactones, ameliorate the inflammatory process associated to experimental pleurisy in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 730, p. 107-115, 2014.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal and Biological Research**, v. 33, p. 179-189, 2000.

CAMPOS, F. R.; et al. *Baccharis* (Asteraceae): Chemical constituents and biological activities. **Chemistry & Biodiversity**, v. 13, p. 1-17, 2016.

CAROLA, C.; et al. Tiliroside and dihydroxy methylchromone: from nature to cosmetic applications. **Journal of Applied Cosmetology**, v. 28, n. 3, p. 109-123, 2010.

CARTAGENA, E.; MONTANARO, S.; BARDON, A. Improvement of the antibacterial activity of sesquiterpene lactones. **Revista Latinoamericana de Quimica**, v. 36, n. 2, p. 43-51, 2008.

CARTAXO, S. L.; SOUZA, M. M.; DE ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid

northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, n. 2, p. 326-342, 2010.

CARVALHO, C. C.; et al. Biological *screening* of extracts of Brazilian Asteraceae plants. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 7, n. 28, p. 2000-2005, 2013.

CARVALHO, C. C.; et al. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil from Brazilian plants *Acanthospermum australe*, *Calea fruticosa* and *Mikania glauca*. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 8, n. 14, p. 392-398, 2014.

CASADO, M.; et al. Two new alkamides from roots of *Acmella decumbens*. **Natural Product Research**, v. 23, n. 14, p. 1298-1303, 2009.

CASTILLO, J. B.; et al. Salvadorian Compositae. II. Juanislamin and 2,3-Epoxy-juanislamin. Two new sesquiterpenic lactones from *Calea urticifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 44, n. 3, p. 348-350, 1981.

CASTRO, M. M.; LEITÃO-FILHO, H. F.; MONTEIRO, W. R. Utilização de estruturas secretoras na identificação dos gêneros de Asteraceae de uma vegetação de cerrado. **Revista Brasileira de Botucatu**, v. 20, n. 2, p. 163-174, 1997.

CASTRO, V.; JAKUPOVIC, J.; BOHLMANN, F. A new type of sesquiterpene and acorane derivative from *Calea prunifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 47, n. 5, p. 802-808, 1984.

CASTRO, V.; TAMAYO-CASTILLO, G.; JAKUPOVIC, J. Sesquiterpene lactones and other constituents from *Calea prunifolia* and *C. peckii*. **Phytochemistry**, v. 28, n. 9, p. 2415-2418, 1989.

CAVALCANTE, M. G. B.; et al. Furanoflavones and other chemical constituents of *Lonchocarpus obtusos*. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 2, p. 301-305, 2012.

CÉLINE, V.; et al. Medicinal plants from the Yanasha (Peru): Evaluation of the leishmanicidal and antimalarial activity of selected extracts **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, p. 413-422, 2009.

CERRUTTI, P.; ALZAMORA, S. M. Inhibitory effects of vanillin on some food spoilage yeasts in laboratory media and fruit purees. **Food Microbiology**, v. 29, p. 379-386, 1996.

CERRUTTI, P.; ALZAMORA, S. M.; VIDALES, S. L. Vanillin as an antimicrobial for producing shelf-stable strawberry puree. **Journal of Food Science**, v. 62, n. 3, p. 608-610, 1997.

CESPEDES, C. L.; et al. Anti-inflammatory activity of *Aristolochia chilensis* molecular (Stuntz) (Elaeocarpaceae). **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas**, v. 9, n. 2, p. 127-135, 2010.

CESPEDES, C. L.; et al. Anti-inflammatory activity of ovatifolin. **Revista Latinoamericana de Química**, v. 28, n. 3, p. 125-130, 2000.

CESPEDES, C. L.; et al. Comparative Study of ovatifolin antioxidant and growth inhibition activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4243-4251, 2001.

CHANG, S. L.; et al. Flavonoids, centaurein and centaureidin, from *Bidens pilosa*, stimulate IFN-gamma expression. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, n. 2, p. 232-236, 2007.

CHANG, S. W.; et al. Phytochemical constituents of *Bistorta manshuriensis*. **Natural Product Science**, v. 15, n. 4, p. 234-240, 2009.

CHAO, C. Y.; et al. Anti-glycative and anti-inflammatory effects of caffeic acid and ellagic acid in kidney of diabetic mice. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 54, n. 3, p. 388-395, 2010.

CHATURVEDI, D. Sesquiterpene lactones: Structural diversity and their biological activities. *In Opportunity, Challenge and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry, Volume 10*. **India: Research Signpost**, p. 313-334, 2011.

CHEN, Y.; et al. Chemical constituents from *Sappan lignum*. **Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences**, v. 17, p. 82-86, 2008.

CHEYNIER, V. Polyphenols in foods are more complex than often thought. **The American Journal of Clinican Nutrition**, v. 81, p. 223S-229S, 2005.

CHIANG, Y. M.; et al. Ethyl caffeate suppresses NF- κ B activation and its downstream inflammatory mediators, iNOS, COX-2, and PGE₂ *in vitro* or in mouse skin. **British Journal of Pharmacology**, v. 146, n. 3, p. 352-363, 2005.

CHIRINOS, R.; et al. HPLC-DAD characterization of phenolic compounds from Andean oca (*Oxalis tuberosa* Mol.) tubers and their contribution to the antioxidant capacity. **Food Chemistry**, v. 113, p. 1243-1251, 2009.

CHO, S. G.; WOO, S. M.; KO, S. G. Butein suppresses breast cancer growth by reducing a production of intracellular reactive oxygen species. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 33, n. 51, p. 1-11, 2014.

CHRISTENSEN, L. P.; LAM, J. Acetylenes and related compounds in Heliantheae. **Phytochemistry**, v. 30, n. 1, p. 11-49, 1991.

CIRIC, A.; et al. Sesquiterpene lactones from *Centaurea zuccariniana* and their antimicrobial activity. **Chemistry & Biodiversity**, v. 9, n. 12, p. 2843-2853, 2012.

CLIFFORD, M. N.; et al. Hierarchical scheme for LC-MSⁿ identification of chlorogenic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n.10, p. 2900-2911, 2003.

CLIFFORD, M. N.; et al. Profiling the chlorogenic acids and other caffeic acid derivatives of herbal *Chrysanthemum* by LC-MSⁿ. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 929-936, 2007.

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

CLIFFORD, M. N.; ZHENG, W.; KUHNERT, N. Profiling the chlorogenic acids of Aster by HPLC-MSⁿ. **Phytochemical Analysis**, v. 17, p. 384-393, 2006.

CONFORTI, F.; et al. Metabolite profile and *in vitro* activities of *Phagnalon saxatile* (L.) Cass. relevant to treatment of Alzheimer's disease. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 1, p. 97-104, 2010.

CONSTANTINO, M. G.; et al. Simulação de desdobramentos complexos de espectros de RMN de ¹H. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 160-167, 2006.

CORRADINI, E.; et al. Flavonoids: chemical properties and analytical methodologies of identification and quantitation in foods and plants. **Natural Product Research**, v. 25, p. 469-495, 2011.

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

COSTA, J. P.; et al. Anxiolytic-like effects of phytol: possible involvement of GABAergic transmission. **Brain Research**, v. 1547, p. 34-42, 2014.

COSTA, M. A. G. **Aspectos etnobotânicos do trabalho com plantas medicinais realizado por curandeiros no município de Itaporanga, SP**. 2002. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrônômicas do Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2002.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York, Columbia, University Press; 1981, p. 1261.

CUNNINGHAM, A. C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 72, p. 132-141, 2002.

DA COSTA, F. B. **Quimiotaxonomia e potencial farmacológico de Asteraceae do cerrado**. In: SIMPÓSIO ESTUDOS MULTIDISCIPLINARES DE ASTERACEAE. 58º Congresso Nacional de Botânica, São Paulo, 2007, p. 246-250.

DANIEWSKI, W. M.; et al. Constituents of *Helianthus mollis* and their antifeedant activity. **Polish Journal of Chemistry**, v. 67, n. 7, p. 1255-1259, 1993.

DA SILVA, T. M. S. Estudo espectroscópico em elucidação estrutural de flavonoides de *Solanum jabrense* Agra & Nee E *S. paludosum* Moric. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1119-1128, 2009.

DAUGSCH, A.; PASTORE, G. Obtenção de vanilina: oportunidade biotecnológica. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 642-645, 2005.

DE MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. Método para análise de ácido clorogênico. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 586-592, 2004.

DETTMER, K.; ARONOV, P. A.; HAMMOCK, B. D. Mass spectrometry-based metabolomics. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 26, n. 1, 51-78, 2007.

DE VIVAR, A. R. et al. The germacranolides of *Viguiera buddleiaeforms* structures of Budlein-A and -B. **Phytochemistry**, v. 15, p. 525-527, 1976.

DHARMARATNE, H. R. W.; et al. Inhibition of HIV-1 reverse transcriptase and HIV-1 replication by *Calophyllum* coumarins and xanthenes. **Planta Medica**, v. 68, n. 1, p. 86-87, 2002.

DIAS, T.; et al. The flavonoid-rich fraction of *Coreopsis tinctoria* promotes glucose tolerance regain through pancreatic function recovery in streptozotocin-induced glucose-intolerant rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 132, n. 2, p. 483-490, 2010.

DOAN, N. T.; et al. Targeting thapsigargin towards tumors. **Steroids**, v. 97, p. 2-7, 2015.

DOMINGUEZ, X. A.; EL DAHMI, S.; ROMBOLD, C. Hydroxyacetophenone derivatives from *Baccharis glutinosa*. **Journal of Natural Products**, v. 49, n. 1, p. 143-144, 1986.

DO NASCIMENTO, A. M.; DE OLIVEIRA, D. C. R.; ALBUQUERQUE, S. Evaluation of trypanocidal activity from *Calea*

uniflora (Heliantheae-Asteraceae) extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 49-50, 2002.

DO NASCIMENTO, A. M.; DE OLIVEIRA, D. C. R. A 5-deoxyflavone glycoside from *Calea uniflora* L. (Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, n. 11, p. 1079-1081, 2004.

DO NASCIMENTO, A. M.; DE OLIVEIRA, A. R.; CAMILO, D. A new 5-deoxyflavone glycoside from the aerial parts of *Calea clauseniana*. **Carbohydrate Research**, v. 342, n. 9, p. 1261-1263, 2007.

DO NASCIMENTO, A. M.; et al. Antimicrobial activity of extracts and some compounds from *Calea platylepis*. **Fitoterapia**, v. 75, n. 5, p. 514-519, 2004a.

DO NASCIMENTO, A. M.; et al. Chromanones with leishmanicidal activity from *Calea uniflora*. **Zeitschrift fuer Naturforschung**, v. 62, n. 5-6, p. 353-356, 2007.

DO NASCIMENTO, A. M.; et al. Trypanocidal and antifungal activities of *p*-hydroxyacetophenone derivatives from *Calea uniflora* (Heliantheae, Asteraceae). **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, n. 5, p. 663-669, 2004b.

DO NASCIMENTO, A. M.; DE OLIVEIRA, D. C. R. Three new chromanones from *Calea clauseniana*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 97, n. 1, p. 146-150, 2014.

DO NASCIMENTO, A. M.; SILVA, F. S.; DE OLIVEIRA, D. C. R. Constituentes of *Calea platylepis* Sch. Bip. ex Baker. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, n. 10, p. 993-996, 2002.

DUDEK-MAKUCH, M.; MATLAWSKA, I. Flavonoids from the flowers of *Aesculus hippocastanum*. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 68, n. 3, p. 403-408, 2011.

DUTRA, R. C.; et al. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, doi: 10.1016/j.phrs.2016.01.021, 2016.

EMERENCIANO, V. P.; et al. Principal component analysis of Heliantheae (Asteraceae) *Sensu* Stuessy and Karis and Ryding based on chemical data. **Natural Product an Indian Journal**, v. 2, p. 33-35, 2006.

EMERENCIANO, V. P.; et al. Self-organizing maps in chemotaxonomic studies of Asteraceae: a classification of tribes using flavonoid data. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 5, p. 891-899, 2007.

ERASTO, P.; GRIERSON, D. S.; AFOLAYAN, A. J. Bioactive sesquiterpene lactones from the leaves of *Vernonia amygdalina*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, n. 1, p. 117-120, 2006.

EROSA-REJON, G. J.; et al. Benzochromenes from the roots of *Bourreria pulchra*. **Phytochemistry Letters**, v. 3, n. 1, p. 9-12, 2010.

FABIAN, L.; et al. *In silico* study of structural and geometrical requirements of natural sesquiterpene lactones with trypanocidal activity. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 10, p. 1407-1414, 2013.

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

FANG, N.; YU, S.; MABRY, T. J. Chromenes from *Ageratina arsenii* and revised structures of two epimeric chromene dimers. *Phytochemistry*, v. 27, n. 6, p. 1902-1905, 1988.

FAN, L.; et al. Antioxidant and antimicrobial phenolic compounds from *Setaria viridis*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 50, n. 3, p. 433-437, 2014.

FARAGO, P. V.; et al. Anatomia da folha e do caule de *Calea longifolia* (Asteraceae). **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 25, n. 4, p. 512-517, 2006.

FARAG, S. F.; et al. Phytochemical investigation of *Wedelia prostrata* Hook et Arn. (Hemsl.); II- the ethyl acetate soluble fraction of the

methanol extract. **Bulletin of Pharmaceutical Sciences, Assiut University**, v. 20, n. 1, p. 37-46, 1997.

FARAH, A.; DONANGELO, C. M. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, n. 1, p. 23-36, 2006.

FARHOOSH, R. Antioxidant activity and mechanism of action of butein in linoleic acid. **Food Chemistry**, v. 93, n. 4, p. 633-639, 2005.

FÉLIX, S.; et al. Anti-inflammatory drimane sesquiterpene lactones from an *Aspergillus* species. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 11, p. 2912-2918, 2014.

FERNANDEZ, J.; et al. Isoquercitrin from *Argemone platyceras* inhibits carbachol and leukotriene D4-induced contraction in guinea-pig airways. **European Journal of Pharmacology**, v. 522, p. 108-115, 2005.

FERRARI, F. C.; et al. Toxicological evaluation of ethanolic extract of *Lychnophora trichocarpa*, Brazilian arnica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 5, p. 1104-1110, 2012.

FERRAZ, A. B. F.; et al. Pharmacological and genotoxic evaluation of *Calea clematidea* and *Calea uniflora*. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, n. 6, p. 858-862, 2009.

FERREIRA, D.; VAN DER MERWE, J. P.; ROUX, D. G. Phytochemistry of the gum copal tree, *Trachylobium verrucosum* (Gaertn.) Oliv. The first natural α -hydroxychalcone and 2,3-*cis*- and 2,3-*trans*-3-methoxyflavanones. **Journal of Chemical Society Perkin Transactions 1**, v. 12, p. 1492-1498, 1974.

FERREIRA, M. J. P.; et al. Neural networks in chemosystematic studies of Asteraceae: a classification based on a dichotomic approach. **Chemical & Biodiversity**, v. 2, n. 5, p. 633-643, 2005.

FERREIRA, Z.; et al. Medicinal compounds of Brazil: chemical study of *Calea pinnatifida*. **Ciencia e cultura**, v. 32, p. 83-85, 1980a.

FERREIRA, Z.; et al. The chemistry of Brazilian Compositae. Part 1. Structural clarification of germacranolides from *Calea* species. **Phytochemistry**, v. 19, n. 7, p. 1481-1484, 1980b.

FIDLER, B.; GOLDBERG, T. Ingenol mebutate gel (Picato): a novel agent for the treatment of actinic keratosis. **P & T: a Peer-Reviewed Journal for Formulary Management**, v. 30, n. 1, p. 40-46, 2014.

FIGUEIREDO-RINHEL, A. S. G.; et al. Inhibition of the human neutrophil oxidative metabolism by *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) is influenced by seasonality and the ratio of caffeic acid to other phenolic compounds. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, n. 2, p. 655-664, 2013.

FISHER, N. H.. **Sesquiterpene lactones: biogenesis and biomimetic transformations**. In: Towers, G.; Towers, H.; editors. *Biochemistry of the Mevalonic Acid Pathway to Terpenoids*, New York, Plenum Press, p. 161, 1990.

FLACH, A.; et al. Chemical analysis and antifungal activity of the essential oil of *Calea clematidea*. **Planta Medica**, v. 68, n. 9, p. 836-838, 2002.

FLEMMING, M.; et al. Revisited anti-inflammatory activity of matricine *in vitro*: Comparison with chamazulene. **Fitoterapia**, v. 106, p. 122-128, 2015.

FORTUNA, A. M.; et al. Antimicrobial activities of sesquiterpene lactones and inositol derivatives from *Hymenoxys robusta*. **Phytochemistry**, v. 72, n. 18, p. 2413-2418, 2011.

FRANÇA, V. C.; et al. Estudo fitoquímico das partes aéreas de *Aristolochia birostris* Ducht. (Aristolochiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 326-330, 2005.

FREDERICE, R. **Fluorescência molecular em nanopartículas de sílica marcadas com quercetina e rodamina B**. 2009. Dissertação de Mestrado em Ciências (Físico-Química) – Instituto de Química de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

FUMAROLA, L. A.; SPINELLI, R. B.; BRANDONISIO, O. *In vitro* assays for evaluation of drug activity against *Leishmania* spp. **Research in Microbiology**, v. 155, p. 224-230, 2004.

FUNK, V. A.; et al. Everywhere but Antarctica: Using a super tree to understand the diversity and distribution of the Compositae. **Biologiske Skrifter**, v. 55, p. 343-374, 2005.

FURUKAWA, M.; et al. Monoterpene glucosides from *Ziziphora clinopodioides* (Labiatae). **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 60, n. 3, p. 397-401, 2012.

GADETSKAYA, A. V.; et al. Sulfated phenolic compounds from *Limonium caspium*: Isolation, structural elucidation, and biological evaluation. **Fitoterapia**, v. 104, p. 80-85, 2015.

GALLUCCI, M. N.; et al. *In vitro* activity of natural phenolic compounds against fluconazole-resistant *Candida* species: a quantitative structure-activity relationship analysis. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, n. 4, p. 795-804, 2014.

GAMARO, G. D.; et al. Effect of rosmarinic and caffeic acids on inflammatory and nociception process in rats. **ISRN Pharmacology**, v. 30, p. 1-6, 2011.

GAO, C. Y.; et al. Phenolic composition, DNA damage protective activity and hepatoprotective effect of free phenolic extract from *Sphallerocarpus gracilis* seeds. **International Immunopharmacology**, v. 20, n. 1, p. 238-247, 2014.

GASPAROTTO JÚNIOR, A.; et al. Antihypertensive effects of isoquercitrin and extracts from *Tropaeolum majus* L.: evidence for the inhibition of angiotensin converting enzyme. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 134, p. 363-372, 2011.

GEBHARDT, P.; et al. Quercinol, an anti-inflammatory chromene from the wood-rotting fungus *Daedalea quercina* (Oak Mazegill). **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, n. 9, p. 2558-2560, 2007.

GHANTOUS, A.; et al. What made sesquiterpene lactones reach cancer clinical trials? **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 15, p. 668-678, 2010.

GIORDANO, O. S.; et al. Structure-activity relationship in the gastric cytoprotective effect of several sesquiterpene lactones. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 35, n. 13, p. 2452-2458, 1992.

GNECCO, S.; et al. Sesquiterpene lactones from *Podanthus ovatifolius*. **Phytochemistry**, v. 12, n. 10, p. 2469-2477, 1973.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Online identification of chlorogenic acids, sesquiterpene lactones, and flavonoids in the Brazilian arnica *Lychnophora ericoides* Mart. (Asteraceae) leaves by HPLC-DAD-MS and HPLC-DAD-MS/MS and a validated HPLC-DAD method for their simultaneous analysis. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, v. 56, p. 1193-1204, 2008.

GOKBULUT, A.; et al. Antioxidant and antimicrobial activities, and phenolic compounds of selected *Inula* species from Turkey. **Natural Product Communications**, v. 8, n. 4, p. 475-478, 2013.

GÓMEZ-HURTADO, M. A.; et al. X-ray diffraction and NMR studies of two chromenes from the roots of *Ageratina arsenei*. **Revista Latinoamericana de Quimica**, v. 40, n. 3, p. 199-209, 2012.

GÓMEZ, M.; GIL, J. F. Topical anti-inflammatory activity of *Calea prunifolia* HBK (Asteraceae) in the TPA model of mouse ear inflammation. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 12, p. 2391-2395, 2011.

GONÇALVES, A. E.; et al. The antidepressant-like effect of *Hedyosmum brasiliense* and its sesquiterpene lactone, podoandin in mice: evidence for the involvement of adrenergic, dopaminergic and serotonergic systems. **European Journal of Pharmacology**, v. 674, n. 2-3, p. 307-314, 2012.

GONZALEZ, A. G.; et al. Chromenes and benzofurans from *Ageratina glechonophylla*. **Phytochemistry**, v. 28, n. 9, p. 2520-2522, 1989.

GONZALEZ, A. G.; et al. Chromenes from *Ageratum conyzoides*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 4, p. 1137-1139, 1991.

GOPFERT, J. C.; et al. Cytological development and sesquiterpene lactone secretion in capitate glandular trichomes of sunflower. **Plant Biology**, v. 2, p. 148-155, 2005.

GRAZIOSE, R.; et al. Antiplasmodial activity of aporphine alkaloids and sesquiterpene lactones from *Liriodendron tulipifera* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 1, p. 26-30, 2011.

GUERRERO, M. F.; et al. Assessment of the antihypertensive and vasodilator effects of ethanolic extracts of some Colombian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 80, p. 37-42, 2002.

GUIMARÃES, L. G. L.; et al. Chemical analyses of the essential oils from leaves of *Mikania glauca* Mart. ex Baker. **The Journal of Essential Oil Research**, v. 24, n. 6, p. 599-604, 2012.

GUO, H.; et al. Synthesis and antinociceptive activity of seselin derivatives. **Yaoxue Xuebao**, v. 43, n. 9, p. 930-933, 2008.

GUVENALP, Z.; DEMIREZER, L. O. Flavonol glycosides from *Asperula arvensis* L. **Turkish Journal of Chemistry**, v. 29, p. 163-169, 2005.

HALBWIRTH, H. The creation and physiological relevance of divergent hydroxylation patterns in the flavonoid pathway. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, p. 595-621, 2010.

HAMMAD, H. M.; et al. Biological activities of the hydro-alcoholic and aqueous extracts of *Achillea fragrantissima* (Forssk.) grown in Jordan. **Natural Science**, v. 6, n. 1, p. 23-30, 2014.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 52, p. 481-504, 2000.

HAREL, D.; et al. Encecalol angelate, an unstable chromene from *Ageratum conyzoides* L.: Total synthesis and investigation of its antiprotozoal activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 620-625, 2011.

HAREL, D.; et al. Natural product derived antiprotozoal agents: synthesis, biological evaluation, and structure-activity relationships of

novel chromene and chromane derivatives. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, p. 7442-7448, 2013.

HARIDAS NIDHINA, P. A.; POULOSE, N.; GOPALAKRISHNAPILLAI, A. Vanillin induces adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells by activating extracellular signal regulated kinase 42/44. **Life Sciences**, v. 88, n. 15-16, p. 675-680, 2011.

HARUNA, M.; SAKAKIBARA, Y.; ITO, K. Structure and conformation of eupafortunin, a new germacrene-type sesquiterpene lactone from *Eupatorium fortunei* Turcz. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 34, n. 12, p. 5157-5160, 1986.

HASHIDA, K.; et al. Phenolic extractives in the trunk of *Toxicodendron vernicifluum*: chemical characteristics, contents and radial distribution. **Journal of Wood Science**, v. 60, n. 2, p. 160-168, 2014.

HEO, S.; et al. Chromene induces apoptosis via caspase-3 activation in human leukemia HL-60 cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 9, p. 1998-2004, 2011.

HEO, S.; et al. Chromene suppresses the activation of inflammatory mediators in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 67, p. 169-175, 2014.

HERZ, W.; DE GROOTE, R. Desacetyleupaserrin and nevadensin from *Helianthus pumilus*. **Phytochemistry**, v. 16, p. 1307-1308, 1977.

HERZ, W.; KUMAR, N; BLOUNT, J. F. A thiol-containing ester side chain in a sesquiterpene lactone from *Eupatorium mikanioides*. Absolute configuration of deacetyleupaserrin and its congeners. **Journal of Organic Chemistry American Chemical Society**, v. 45, n. 3, p. 489-493, 1980.

HERZ, W.; KUMAR, N. Minor sesquiterpene lactones of *Helianthus pumilus*. **Phytochemistry**, v. 20, n. 6, p. 1339-1341, 1981.

HERZ, W.; KUMAR, N. Sesquiterpene lactones of *Calea zacatechichi* and *C. urticifolia*. **Phytochemistry**, v. 19, n. 4, p. 593-597, 1980.

HOENEISEN, M.; SICVA, M.; BOHLMANN, F. Sesquiterpene lactones of *Podanthus mitiqui*. **Phytochemistry**, v. 19, n. 12, p. 2765-2766, 1980.

HOU, C. C.; et al. Antidiabetic dimeric guianolides and a lignan glycoside from *Lactuca indica*. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 5, p. 625-629, 2003.

HUANG, D.; et al. Four new sesquiterpene lactones from the stem bark of *Illicium burmanicum*. **Fitoterapia**, v. 92, p. 194-199, 2014.

HUANG, Z.; et al. A new naphtho- γ -pyrone from mangrove endophytic fungus zsu-h26. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 46, n. 1, p. 15-18, 2010.

HU, C. Q.; et al. Anti-aids agents, 10. Acacetin-7-*O*- β -D-galactopyranoside, an anti-HIV principle from *Chrysanthemum morifolium* and a structure-activity correlation with some related flavonoids. **Journal of Natural Products**, v. 57, n. 1, p. 42-51, 1994.

HUSSAIN, S. H.; et al. Phytochemicals from the aerial parts of *Ligularia thomsonii* and their radical scavenging activity. **Phytochemistry Letters**, v. 7, p. 6-10, 2014.

HU, T.; HE, X. W.; JIANG, J. G. Functional analyses on antioxidant, anti-inflammatory, and antiproliferative effects of extracts and compounds from *Ilex latifolia* Thunb., a chinese bitter tea. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 34, p. 8608-8615, 2014.

HU, Y. L.; et al. Flavonols from *Parnassia palustris* Linn. (Saxifragaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 48, p. 70-72, 2013.

IBRAHIM, M.; et al. Acetyl and butyryl cholinesterase inhibitory sesquiterpene lactones from *Amberboa ramosa*. **Chemistry Central Journal**, v. 7, n. 116, p. 1-5, 2013.

IINUMA, M.; et al. Sesquiterpenoid derivatives from *Calea* having adipocyte differentiation inhibitory effect. **PCT Int. Appl.**, WO 2003015765 A1 20030227, 2003.

IKEDA, K. O.; et al. Inhibition of multiplication of herpes simplex virus by caffeic acid. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 28, n. 4, p. 595-598, 2011.

ISAZA, J. H.; ITO, H.; YOSHIDA, T. A flavonol glycoside-lignan ester and accompanying acylated glucosides from *Monochaetum multiflorum*. **Phytochemistry**, v. 58, p. 321-327, 2001.

ITOH, T.; et al. Inhibitory effects of sesquiterpene lactones isolated from *Eupatorium chinense* L. on IgE-mediated degranulation in rat basophilic leukemia RBL-2H3 cells and passive cutaneous anaphylaxis reaction in mice. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 8, p. 3189-3197, 2009.

IWASHIMA, M.; et al. Antioxidant and antiviral activities of plastoquinones from the brown alga *Sargassum micracanthum*, and a new chromene derivative converted from the plastoquinones. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 2, p. 374-337, 2005.

JAISWAL, R.; et al. Identification and characterization of chlorogenic acids, chlorogenic acid glycosides and flavonoids from *Lonicera henryi* L. (Caprifoliaceae) leaves by LC-MSⁿ. **Phytochemistry**, v. 108, p. 252-263, 2014.

JAKUPOVIC, J.; et al. Twenty-one acylphloroglucinol derivatives and further constituents from south African *Helichrysum* species. **Phytochemistry**, v. 28, n. 4, p. 1119-1131, 1989.

JANDA, B.; et al. Phenolics in aerial parts of Persian Clover *Trifolium resupinatum*. **Natural Products Communications**, v. 4, n. 12, p. 1661-1664, 2009.

JANG, J. H.; et al. Inhibitory effect of butein on tumor necrosis factor- α -induced expression of cell adhesion molecules in human lung epithelial cells via inhibition of reactive oxygen species generation, NF- κ B activation and Akt phosphorylation. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 30, n. 6, p. 1357-1364, 2012.

JANSEN, R. K.; et al. Phylogenetic analysis of chloroplast DNA restriction site data at higher taxonomic levels - an example from the Asteraceae. **Evolution**, v. 44, p. 2089-2105, 1990.

JESKE, F.; HUNECK, S.; JAKUPOVIC, J. Further sesquiterpene lactones from *Inula salsoloides*. **Phytochemistry**, v. 41, n. 6, p. 1539-1542, 1996.

JIA, Q.; et al. Sesquiterpene lactones and their derivatives inhibit high glucose induced NF- κ B activation and MCP-1 and TGF- β 1 expression in rat mesangial cells. **Molecules**, v. 18, n. 10, p. 13061-13077, 2013.

JOHNSON, A. J.; et al. Antipyretic, analgesic, anti-inflammatory and antioxidant activities of two major chromenes from *Melicope lunu-ankenda*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, n. 2, p. 267-271, 2010.

JONES, A. J.; et al. Trypanocidal activity of marine natural products. **Marine Drugs**, v. 11, p. 4058-4082, 2013.

JÚLIO, P. G. S.; OLIVEIRA, D. M. T. Morfoanatomia comparada e ontogênese do pericarpo de *Bidens gardneri* Baker e *B. pilosa* L. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Botucatu**, v. 32, n. 1, p. 109-116, 2009.

KANG, W. Y.; LI, G. H.; HAO, X. J. Two new triterpenes from *Neonauclea sessilifolia*. **Acta Botanica Sinica**, v. 45, n. 8, p. 1003-1007, 2003.

KARIOTI, A.; et al. Trypanocidal, leishmanicidal and cytotoxic effects of anthecotulide-type linear sesquiterpene lactones from *Anthemis auriculata*. **Phytomedicine**, v. 16, n. 8, p. 783-787, 2009.

KARIS, P. O.; RYDING, O. Tribe Heliantheae. In Bremer, K. (ed.) **Asteraceae. Cladistics and Classification**. Portland: Timber Press; 1994, p. 559-625.

KASIM, L. S.; UKPO, G. E.; ODUKOYA, O. A. Vernodalinol isolated from *Struchium sparganophora* (Linn) Asteraceae. **Journal of Microbiology and Antimicrobials**, v. 5, n. 10, p. 106-109, 2013.

KATINAS, L.; GUTIÉRREZ, D. G.; CRISCI, J. V. Panorama de la familia Asteraceae (=Compositae) em la Republica Argentina. **Boletín Sociedad Argentina de Botânica**, v. 42, n. 1-2, p. 113-129, 2007.

KATO, E. T. M.; et al. Constituents of *Calea pinnatifida*. **Fitoterapia**, v. 65, n. 4, p. 377, 1994.

KAYSEL-CRUZ, A. et al. Current treatment and drug discovery against *Leishmania* spp. and *Plasmodium* spp.: a Review. **Current Drug Targets**, v. 10, n. 3, p. 178-192, 2009.

KHAN, A. L.; et al. Secondary metabolites from *Inula britannica* L. and their biological activities. **Molecules**, v. 15, p. 1562-1577, 2010.

KHUSHBAKTOVA, Z. A.; SYROV, V. N.; BATIROV, E. K. Effects of flavonoids on the course of hyperlipidemia and atherosclerosis. **Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal**, v. 25, n. 4, p. 53-57, 1991.

KIM, J. H.; et al. Anti-angiogenic effect of caffeic acid on retinal neovascularization. **Vascular Pharmacology**, v. 51, n. 4, p. 262-267, 2009.

KIM, Y.; NARAYANAN, S.; CHANG, K. O. Inhibition of influenza virus replication by plant-derived isoquercetin. **Antiviral Research**, v. 88, p. 227-235, 2010.

KLOCKE, J. A.; et al. Insecticidal chromenes from the volatile oil of *Hemizonia fitchii*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 11, p. 701-712, 1985.

KODOMA, M.; et al. 3,5-Di-*O*-caffeoylquinic acid, an infection-inhibiting factor from *Pyrus pyrifolia* induced by infection with *Alternaria alternata*. **Phytochemistry**, v. 47, n. 3, p. 371-373, 1998.

KOHLER, I.; et al. *In vitro* antiplasmodial investigation of medicinal plants from El Salvador. **Zeitschrift fur Naturforschung C**, v. 57, n. 3-4, p. 277-281, 2002.

KRASTANOV, A. Metabolomics - The State of Art. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 24, n. 1, p. 1537-1543, 2010.

KRETSCHMER, N.; et al. Cytotoxic furanogermacranolides from the flowers of *Helianthus angustifolius*. **Planta Medica**, v. 77, n. 17, p. 1912-1915, 2011.

KREUGER, M. R. O., et al. Effects of the topical application of an ethyl acetate fraction from *Vernonia scorpioides* on excisional wounds infected with *Staphylococcus aureus* in rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 1, p. 123-130, 2012.

KUETE, V.; et al. Cytotoxicity and modes of action of 4'-hydroxy-2',6'-dimethoxychalcone and other flavonoids toward drug-sensitive and multidrug-resistant cancer cell lines. **Phytomedicine**, v. 21, n. 12, p. 1651-1657, 2014.

KUMAR, A.; et al. UPLC/MS/MS method for quantification and cytotoxic activity of sesquiterpene lactones isolated from *Saussurea lappa*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, n. 2, p. 1393-1397, 2014.

KUNZE, A.; MUELLER, C.; PROKSCH, P. Chemical variation and defense of *Encelia farinosa*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 23, n. 4, p. 355-363, 1995.

KUPCHAN, S. M.; ASHMORE, J. W.; SNEDEN, A. T. Structure-activity relationships among *in vivo* active germacranolides. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 67, n. 6, p. 865-867, 1978.

KUPCHAN, S. M.; et al. Tumor inhibitors. LXXXIV. Isolation and structural elucidation of eupaserrin and deacetyeupaserrin, new antileukemic sesquiterpene lactones from *Eupatorium semiserratum*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 38, n. 7, p. 1260-1264, 1973.

KURCUBIC, V. S.; et al. Antioxidant and antimicrobial activity of *Kitaibelia vitifolia* extract as alternative to the added nitrite in fermented dry sausage. **Meat Science**, v. 97, n. 4, p. 459-467, 2014.

LAI, W. C.; et al. Bioactive constituents of *Cirsium japonicum* var. *australe*. **Journal of Natural Products**, v. 77, n. 7, p. 1624-1631, 2014.

LALL, N.; KISHORE, N. J. Are plants used for skin care in South Africa fully explored? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 153, n. 1, p. 61-84, 2014.

LAMBERT, M.; et al. A High-throughput UHPLC-QqQ-MS method for polyphenol profiling in rosé wines. **Molecules**, v. 20, p. 7890-7914, 2015.

LAN, M. S.; et al. Chemical constituents in *Blumea aromica* of Zhuang medicine. **Chinese Traditional and Hebs Drugs**, v. 43, n. 9, p. 1708-1711, 2012.

LEE, C.; et al. Inhibitory constituents of the heartwood of *Dalbergia odorifera* on nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 14, p. 4263-4266, 2013a.

LEE, H. N.; et al. A mechanistic study on the anti-cancer activity of ethyl caffeate in human ovarian cancer SKOV-3 cells. **Chemico-Biological Interactions**, v. 219, p. 151-158, 2014.

LEE, I. Y.; et al. Two sesquiterpene lactones of *Calea ternifolia* var. *calyculata*. **Phytochemistry**, v. 21, n. 9, p. 2313-2316, 1982.

LEE, Y. J.; et al. Polyphenol composition and antioxidant activity from the vegetable plant *Artemisia absinthium* L. **Australian Journal of Crop Science**, v. 7, n. 12, p. 1921-1926, 2013b.

LEITE, A. C. R. M. **Efeitos antiinflamatórios e antinociceptivos do fitol, um ativador de NADPH oxidase, e tadalafil, um inibidor de 5-fosfodiesterase, em modelos experimentais**. 2010. Tese de Doutorado em Ciências Médicas - Universidade Federal do Ceará, 2010.

LEONTI, M. The future is written: Impact of scripts on the cognition, selection, knowledge and transmission of medicinal plant use and its implications for ethnobotany and ethnopharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 134, p. 542-555, 2011.

LEOPOLDO, V. T.; et al. Differential effects of antigens from *L. brasiliensis* isolates from disseminated and cutaneous leishmaniasis on *in vitro* cytokine production. **BMC Infectious Diseases**, v. 25, p. 75-80, 2006.

LIAO, X. L.; LUO, J. G.; KONG, L. Y. Flavonoids from *Millettia nitida* var. *hirsutissima* with their anticoagulative activities and

inhibitory effects on NO production. **Journal of Natural Medicines**, v. 67, n. 4, p. 856-861, 2013.

LIBARDI, S. H. **Atividade antioxidante da vanilina e do ácido vanílico e o efeito da complexação por proteínas do soro do leite na desativação de radicais e ferrilmioglobina em condições simulando o trato gastrointestinal**. 2010. Dissertação de Metrado em Ciências - Instituto de Química de São Carlos, São Paulo, 2010.

LIU, J. F.; et al. Henrylactones A-E and anti-HBV constituents from *Illicium henryi*. **Planta Medica**, v. 76, n. 2, p. 152-158, 2010.

LIU, X. G.; et al. *In vivo* antidepressant activity of sesquiterpenes from the roots of *Valeriana fauriei* Briq. **Fitoterapia**, v. 83, n. 3, p. 599-603, 2012.

LIU, Y.; et al. Hesperetin inhibits rat coronary constriction by inhibiting Ca^{2+} influx and enhancing voltage-gated K^+ channel currents of the myocytes. **European Journal of Pharmacology**, v. 735, p. 193-201, 2014.

LI, W.; et al. Anti-inflammatory and antioxidant activities of phenolic compounds from *Desmodium caudatum* leaves and stems. **Archives of Pharmacal Research**, v. 37, n. 6, p. 721-727, 2014.

LI, Y. L.; et al. Flavonoids and a new polyacetylene from *Bidens parviflora* Willd. **Molecules**, v. 13, n. 8, p. 1931-1941, 2008.

LOURENÇO, T. O.; GOKITHI, A.; ROQUE, N. F. Reduced acetophenone derivatives from *Calea cuneifolia*. **Phytochemistry**, v. 20, n. 4, p. 773-776, 1981.

LUCENA, R. F. P.; ARAÚJO, E. L.; ALBUQUERQUE, U. P. Does the local availability of woody caatinga plants (Northeastern Brazil). Explain their use value? **Economic Botany**, v. 61, p. 347-361, 2007.

LU, T.; et al. A new chromone from the twig of *Mallotus apelta*. **Natural Product Research**, v. 28, n. 21, p. 1864-1868, 2014.

MACÍAS, F. A.; et al. Sesquiterpene lactone as allelochemicals. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 795-800, 2006.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR., V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MALAN, E.; ROUX, D. G. (+)-2,3-*Trans*-pubeschin, the first catechin analogue of peltogynoids from *Peltogyne pubescens* and *P. venosa*. **Phytochemistry**, v. 13, p. 1575-1579, 1974.

MALDONADO, E.; MARQUEZ, C. L.; ORTEGA, A. A thymol derivative from *Calea nelsonii*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 7, p. 2527-2528, 1992.

MALDONADO, E. M.; et al. A novel cytotoxic terpenoid from the flowers of *Kaunia lasiophthalma* Griseb. **Phytochemistry Letters**, v. 8, p. 105-108, 2014a.

MALDONADO, E. M.; et al. Cytotoxic sesquiterpene lactones from *Kauna lasiophthalma* Griseb. **Scientia Pharmaceutica**, v. 82, n. 1, p. 147-160, 2014b.

MACHADO FILHO, J. Aruca, amebicida ideal. **Arquivos de Biologia**, v. 34, p. 95-98, 1930.

MALHADO FILHO, J. Novo antidisenterico vegetal; *Calea pinnatifida* Less. **Arquivos de Cirurgia Clínica e Experimental**, v. 31, n. 278, p. 43, 1947.

MAMADALIEVA, N. Z.; et al. Phytochemical analysis and bioactivity of the aerial parts of *Abutilon theophrasti* (Malvaceae), a medicinal weed. **Natural Product Research**, v. 28, n. 20, p. 1777-1779, 2014.

MANACH, C. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, p. 727-747, 2004.

MANOSROI, A.; et al. Biological activities of phenolic compounds and triterpenoids from the galls of *Terminalia chebulay*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 10, n. 8, p. 1448-1463, 2013.

MARCHETTI, G. M. **Atividade antitumoral do arucanolídeo: germacranolídeo isolado de *Calea pinnatifida***. 2012. Tese Doutorado

em Citologia Celular e Estrutural) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

MARCHETTI, G. M.; et al. The anticancer activity of dichloromethane crude extract obtained from *Calea pinnatifida*. **Journal of Experimental Pharmacology**, v. 4, p. 157-162, 2012.

MARTINEZ, M.; ESQUIVEL, B.; ORTEGA, A. Two caleines from *Calea zacatechichi*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 7, p. 2104-2106, 1987.

MARTINEZ, M. V.; NAVEDA-DIAZ, E.; JOSEPH-NATHAN, P. Thymol derivatives from *Calea zacatechichi* Schdl. **Revista Latinoamericana de Química**, v. 19, n. 2, p. 56-57, 1988.

MARTINEZ, M. V.; SANCHEZ, F.; JOSEPH-NATHAN, P. Thymol derivatives from *Calea nelsonii*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 9, p. 2577-2579, 1987.

MARTINS, E. R.; et al. **Plantas medicinais**. Editora UFV. Universidade de Viçosa, MG, Brasil; 2000, p. 220.

MARTINS, L. R. R.; et al. Estudo morfoanatómico preliminar do caule e da folha de *Acanthospermum australe* (Loefl.) Kuntze (Asteraceae-Heliantheae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 1, p. 42-52, 2006.

MATSUURA, N.; et al. Inhibition of preadipocyte differentiation by germacranolides from *Calea urticifolia* in 3T3-L1 cells. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 6, n. 12, p. 2470-2474, 2005.

MAYAGOITIA, L.; DIAZ, J. L.; CONTRERAS, C. M. Psychopharmacologic analysis of an alleged oneirogenic plant: *Calea zacatechichi*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 18, n. 3, p. 229-243, 1986.

MCGINTY, D.; LETIZIA, C. S.; API, A. M. Fragrance material review on phytol. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 59-63, 2010.

MEDEIROS, P. M.; et al. Does the selection of medicinal plants by Brazilian local populations suffer taxonomic influence? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 146, p. 842-852, 2013.

MEDRADO, H. H. S.; et al. Distribuição, atividade biológica, síntese e métodos de purificação de podofilotoxina e seus derivados. **Química Nova**, v. 38, n. 2, p. 243-258, 2015.

MELEK, F. R.; et al. Sesquiterpene lactones of *Helianthus gracilentus*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 10, p. 2277-2279, 1984.

MELOS, J. L. R.; et al. Constituintes químicos e avaliação do potencial alelopático de *Adiantum tetraphyllum* Humb. & Bonpl. Ex. Willd (Pteridaceae). **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 292-297, 2007.

MERCADO, M. I.; et al. Variability in sesquiterpene lactones from the leaves of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) accessions of different geographic origin. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 61, n. 6, p. 1209-1217, 2014.

MERFORT, I.; PABREITER, C. M.; WILLUHN, G. Chromenes from *Arnica lessingii* and *A. amplexicaulis*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 20, n. 6, p. 590-590, 1992.

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

METUNO, R.; et al. Chemical constituents of *Treculia acuminata* and *Treculia africana* (Moraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 36, p. 48-52, 2008.

MICHALAK, A. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 15, n. 4, p. 523-530, 2006.

MINIATI, E. Assessment of phenolic compounds in biological samples. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanità**, v. 43, n. 4, p. 362-368, 2007.

MIRANDA, M. L. D.; et al. Constituintes químicos das folhas de *Riedeliella graciliflora* Harms (Leguminosae). **Química Nova**, v. 35, n. 7, p. 1306-1311, 2012.

MISHRA, B. B.; TIWARI, V. K. Natural products: an evolving role in future drug discovery. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 4769-4807, 2011.

MIYAZAKI, C. M. S.; et al. Coumarin isolation and comparative study of biological activities of *Pterocaulon alopecuroides* DC and *Pterocaulon lorentzii* Malme. **International Journal of Phytomedicine**, v. 5, n. 3, p. 298-301, 2013.

MLADENOVIC, J.; et al. Cytotoxicity and biological activity of natural compounds of *Lycopersicon esculentum* Mill. **Oxidation Communications**, v. 37, n. 1, p. 279-289, 2014.

MMA (Ministério do Meio Ambiente). **Primeiro relatório nacional para a Convenção sobre Diversidade Biológica**. Ministério do Meio Ambiente (MMA), Brasília, 1998. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira>. Acesso em: 10 de Abril de 2014.

MOHAMMED, M. M. D.; CHRISTENSEN, L. P.; COLLA, P. L. Isolation and anti-HIV-1 activity of a new sesquiterpene lactone from *Calocephalus brownii* F. Muell. **Natural Product Research**, v. 28, n. 4, p. 221-229, 2014.

MONDIN, C. A.; BRINGEL JR., J. B. A. *Calea*. In: Forzza R.C. et al. (eds.). **Lista de espécies da flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. Disponível em <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB103751>>. Acesso em 19 Abril 2014.

MONDIN, C. A. **Levantamento da Tribo Heliantheae Cass. (Asteraceae), sensu stricto, no Rio Grande do Sul, Brasil**. 2004. Tese (Doutorado em Botânica) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

MONKS, N. R.; et al. *In vitro* cytotoxicity of extracts from Brazilian Asteraceae. **Pharmaceutical Biology**, v. 40, n. 7, p. 494-500, 2002.

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

MORAES, J.; et al. Phytol, a diterpene alcohol from chlorophyll, as a drug against neglected tropical disease *Schistosomiasis mansoni*. **PLOS Neglected Tropical Disease**, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2014.

MORAIS, L. A. S.; CASTANHA, R. F. Composição química do óleo essencial de duas amostras de carqueja (*Baccharis* sp.) coletadas em Paty do Alferes - Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, p. 628-632, 2011.

MOREIRA, D. L.; GUIMARÃES, E. F.; KAPLAN, M. A. C. A chromene from *Piper aduncum*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 6, p. 1075-1077, 1998.

MORIMURA, K.; et al. Daedalin A, a metabolite of *Daedalea dickinsii*, inhibits melanin synthesis in an in vitro human skin model. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 73, n. 3, p. 627-632, 2009.

MORS, W. B.; RIZZINI, C. T.; PEREIRA, N. A. **Medicinal Plants of Brazil**. Algonac: Reference Publications; 2000, p. 57.

MUYLDER, G.; et al. A Screen against *Leishmania* intracellular amastigotes: comparison to a promastigote screen and identification of a host cell-specific hit. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 7, p. 1-9, 2011.

NADANASABAPATHI, S.; RUFIA J.; MANJU, V. *In vitro* free radical scavenging activity and bioavailability of dietary compounds caffeine, caffeic acid and their combination. **International Food Research Journal**, v. 20, n. 6, p. 3159-3165, 2013.

NAKAGAWA, Y.; et al. A potent apoptosis-inducing activity of a sesquiterpene lactone, arucanolide, in HL60 cells: a crucial role of apoptosis-inducing factor. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 97, n. 2, p. 242-252, 2005.

NEGRELLE, R. R. B.; FORNAZZARI, K. R. C. Estudo etnobotânico em duas comunidades rurais (Limeira e Ribeirão Grande) de Guaratuba (Paraná, Brasil). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu**, v. 9, n. 2, p. 36-54, 2007.

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, p. 311-335, 2012.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, p. 629-661, 2016.

OBER, A. G.; FISCHER, N. H.; PARODI, F. Jamaicolides A-D, four sesquiterpene lactones from *Calea jamaicensis*. **Phytochemistry**, v. 25, n. 4, p. 877-881, 1986.

OBER, A. G.; FISCHER, N. H. Sesquiterpene lactones from *Calea septuplinervia*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 3, p. 848-849, 1987.

OBER, A. G.; FRONCZEK, F. R.; FISCHER, N. H. Three benzofurans and a 1,4-dioxin derivative from *Calea* species: the molecular structures of calebertin and caleteucin. **Journal of Natural Products**, v. 48, n. 2, p. 242-248, 1985a.

OBER, A. G.; FRONCZEK, F. R.; FISCHER, N. H. Sesquiterpene lactones of *Calea divaricata* and the molecular structure of leptocarpin acetate. **Journal of Natural Products**, v. 48, n. 2, p. 302-306, 1985b.

OBER, A. G.; FRONCZEK, F. R.; FISCHER, N. H. The molecular structure of a new eudesmanolide, subcordatolide B, from *Calea subcordata*. **Journal of Natural Products**, v. 47, n. 4, p. 626-629, 1984a.

OBER, A. G.; FRONCZEK, F. R.; FISCHER, N. H. The molecular structure of subcordatolide C, a eudesmanolide from *Calea subcordata*. **Journal of Natural Products**, v. 47, n. 6, p. 920-923, 1984b.

OBER, A. G.; FRONCZEK, F. R.; FISCHER, N. H. Two new sesquiterpene lactones from *Calea subcordata* and the molecular structure and absolute configuration of subcordatolide D. **Journal of Natural Products**, v. 50, n. 4, p. 604-611, 1987.

OBER, A. G.; QUIJANO, L.; FISCHER, N. H. Eudesmanolides, trichomatolides B-E, and a heliangolide from *Calea trichomata*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 7, p. 1439-1443, 1984.

OBER, A. G.; URBATSCH, L. E.; FISCHER, N. H. Guaianolides and chromenes from *Calea* species. **Phytochemistry**, v. 24, n. 4, p. 795-799, 1985a.

OBER, A. G.; URBATSCH, L. E.; FISCHER, N. H. Germacranolides, calbertolides A, B and C, from *Calea berteriana*. **Phytochemistry**, v. 24, n. 8, p. 1743-1745, 1985b.

OBER, A. G.; URBATSCH, L. E.; FISCHER, N. H. Sesquiterpene lactones from *Calea leptcephala*. **Phytochemistry**, v. 23, p. 467-469, 1986.

OBER, A. G.; URBATSCH, L. E.; FISCHER, N. H. Two guaianolides from *Calea solidaginea*. **Phytochemistry**, v. 24, n. 11, p. 2728-2730, 1985c.

ODONNE, G.; et al. 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.

OHGUCHI, K.; et al. Effects of sesquiterpene lactones on melanogenesis in mouse B16 melanoma cells. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 32, n. 2, p. 308-310, 2009.

OLENNIKOV, D. N.; KASHCHENKO, N. I. Componential profile and amylase inhibiting activity of phenolic compounds from *Calendula officinalis* L. leaves. **Scientific World Journal**, p. 1-9, 2014.

ONGUÉNÉ, A. P.; et al. The potential of anti-malarial compounds derived from African medicinal plants. Part I: a pharmacological evaluation of alkaloids and terpenoids. **Malaria Journal**, v. 12, n. 449, p. 1-25, 2013.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Estratégia da OMS sobre medicina tradicional 2014-2023**. Genebra; p. 67, 2014. Disponível em http://www.who.int/medicines/publications/traditional/trm_strategy14_23/en/. Acesso em: 02 de Maio de 2015.

ORTEGA, A.; LOPEZ, J. D.; MALDONADO, E. A trisnorsesquiterpene lactone and other sesquiterpenes from *Calea crocinervosa*. **Phytochemistry**, v. 28, n. 10, p. 2735-2736, 1989.

OTOGURO, K.; et al. *In vitro* antitrypanosomal activity of plant terpenes against *Trypanosoma brucei*. **Phytochemistry**, v. 72, n. 16, p. 2024-2030, 2011.

OTOGURO, K.; et al. *In vitro* antitrypanosomal activity of some phenolic compounds from propolis and lactones from Fijian Kawa (*Piper methysticum*). **Journal of Natural Medicines**, v. 66, n. 3, p. 558-561, 2012.

PADILLA-GONZALEZ, G. F.; SANTOS, F. A.; DA COSTA, F. B. Sesquiterpene lactones: more than protective plant compounds with high toxicity. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 0, n. 0, p. 1-20, 2016.

PAN, E.; et al. Antiplasmodial and antiproliferative pseudoguaianolides of *Athroisma proteiforme* from the Madagascar Dry Forest. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 10, p. 2174-2180, 2011.

PANERO, J. L.; FUNK, V. A. The value of sampling anomalous taxa in phylogenetic studies: major clades of the Asteraceae revealed. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 47, p. 757-782, 2008.

PAPAIOANNOU, P.; et al. Phenolic compounds with antioxidant activity from *Anthemis tinctoria* L. (Asteraceae). **Z Naturforsch C**, v. 62, n. 5-6, p. 326-330, 2007.

PARK, M. H.; et al. Inhibitory effect of *Rhus verniciflua* Stokes extract on human aromatase activity; butin is its major bioactive component. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, n. 7, p. 1730-1733, 2014.

PARRA, J. E.; DELGADO, W. A.; CUCA, L. E. Cumanensic acid, a new chromene isolated from *Piper cf. cumanense* Kunth. (Piperaceae). **Phytochemistry Letters**, v. 4, n. 3, p. 280-282, 2011.

PARVEEN, M.; et al. Two new phenolic compounds from *Ficus rumphii* and their antiproliferative activity. **Natural Product Research**, v. 28, n. 9, p. 646-652, 2014.

PASSREITER, C. M.; STÖBER, S.; ORTEGA, A. Furanoheliangolides from leaves of *Neurolaena macrocephala*. **Z Naturforsch**, v. 55c, p. 1026-1029, 2000.

PEARCE, J.; GERSHENZON, J.; MABRY, T. J. Sesquiterpene lactones and diterpene carboxylic acids from *Helianthus divaricatus*, *H. resinosus* and *H. salicifolius*. **Phytochemistry**, v. 25, n. 1, p. 159-165, 1986.

PEDERSEN, M. M.; et al. Antimalarial sesquiterpene lactones from *Distephanus angulifolius*. **Phytochemistry**, v. 70, n. 5, p. 601-607, 2009.

PENISSI, A. B.; et al. Gastroduodenal mucosal protection induced by dehydroleucodine: mucus secretion and role of monoamines. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 43, n. 4, p. 791-798, 1998.

PENSO, J.; et al. Vasorelaxant activity of 7- β -*O*-glycosides biosynthesized from flavonoids. **European Journal of Pharmacology**, v. 733, p. 75-78, 2014.

PIMENTEL, V.; et al. Biodiversidade brasileira como fonte da inovação farmacêutica: uma nova esperança? **Revista do BNDES**, v. 43, p. 41-89, 2015.

PIO CORRÊA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional; 1984, p. 123-148.

PLYUTA, V.; et al. Effect of plant phenolic compounds on biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. **APMIS**, v. 121, n. 11, p. 1073-1081, 2013.

POLLO, L. A. E.; et al. Polyacetylenes from the leaves of *Vernonia scorpioides* (Asteraceae) and their antiproliferative and antiherpetic activities. **Phytochemistry**, v. 95, p. 375-383, 2013.

POLYANSKAYA, E. V.; KOROLYUK, E. A.; TKACHEV, A. V. Composition of essential oil from *Artemisia glauca* from western Siberia. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 43, n. 5, p. 544-547, 2007.

PONOMARENKO, L. P.; et al. Chemical constituents of *Ligularia alticola* Worosch. leaves and their biological activities. **Phytochemistry Letters**, v. 15, p. 46-52, 2016.

PRACHYAWARAKORN, V.; MAHIDOL, C.; RUCHIRAWAT, S. Longeracemosones A-F, aromatase inhibitors from *Dunbaria longeracemosa*. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 20-21, p. 3803-3808, 2011.

PRIESTAP, H. A.; BENNETT, B. C.; QUIRKE, J. M. E. Investigation of the essential oils of *Bidens pilosa* var. minor, *Bidens alba* and *Flaveria linearis*. **Journal of Essential Oil Research**, v. 20, n. 5, p. 396-402, 2008.

PROKSCH, P.; et al. Phototoxic and insecticidal activities of chromenes and benzofurans from *Encelia*. **Journal of Natural Products**, v. 46, n. 3, p. 331-334, 1983.

PRUSKI, J. F.; URBATSCH, L. E. Five new species of *Calea* (Compositae: Heliantheae) from planaltine Brazil. **Brittonia**, v. 40, n. 4, p. 341-356, 1988.

PUEBLA, P.; et al. Polar compounds isolated from the leaves of *Calea prunifolia* H.B.K. and their anti-adrenergic related vasodilator activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 12, p. 2281-2285, 2011.

QIN, S.; et al. Pestalotheoils E-H: Antimicrobial metabolites from an endophytic fungus isolated from the tree *Arbutus unedo*. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 26, p. 5163-5166, 2011.

QUIJANO, L.; CALDERON, J. S.; RIOS, T. The constituents of *Calea zacatechichi*. Structures of caleochromenes A and B. **Revista Latinoamericana de Quimica**, v. 8, n. 2, p. 90-93, 1977.

RAGASA, C. Y.; JAVIER, E. S. C.; TAN, A. G. Antimutagenic terpenes and sterol from *Vitex parviflora*. **Philippine Journal of Science**, v. 132, n. 1, p. 21-25, 2003.

RAJENDRAN, P.; et al. Suppression of signal transducer and activator of transcription 3 activation by butein inhibits growth of human hepatocellular carcinoma *in vivo*. **Clinical Cancer Research**, v. 17, n. 6, p. 1425-1439, 2011.

RAO, G.; et al. Studies on the chemical constituents of the leaves of *Polygonum multiflorum*. **Zhongyaocai**, v. 32, n. 6, p. 891-893, 2009.

RASHED, K.; et al. Antibacterial and antifungal activities of methanol extract and phenolic compounds from *Diospyros virginiana* L. **Industrial Crops and Products**, v. 59, p. 210-215, 2014.

RATTANABURI, S.; et al. A new chromone from the leaves of *Melaleuca cajuputi* Powell. **Natural Product Research**, v. 27, n. 3, p. 221-225, 2013.

RIBEIRO, V. L. S.; et al. Acaricidal activity of *Calea serrata* (Asteraceae) on *Boophilus microplus* and *Rhipicephalus sanguineus*. **Veterinary Parasitology**, v. 151, n. 2-4, p. 351-354, 2008.

RIBEIRO, V. L. S.; et al. Acaricidal properties of the essential oil and precocene II obtained from *Calea serrata* (Asteraceae) on the cattle tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 179, n. 1-3, p. 195-198, 2011.

RIBEIRO, V. L. S.; et al. Effect of *Calea serrata* Less. *n*-hexane extract on acetylcholinesterase of larvae ticks and brain Wistar rats. **Veterinary Parasitology**, v. 199, n. 2-4, p. 322-326, 2012.

RIOS, M. Y.; AGUILAR-GUADARRAMA, A. B.; NAVARRO, V. Two new benzofurans from *Ageratina pichinchensis* var. *bustamenta* and their antimicrobial activity. **Planta Medica**, v. 69, p. 967-970, 2004.

RIOS, V.; et al. Sesquiterpene lactones from *Mikania micrantha* and *Mikania cordifolia* and their cytotoxic and anti-inflammatory evaluation. **Fitoterapia**, v. 94, p. 55-163, 2014.

ROBARDS, K.; ANTOLOVICH, M. Analytical chemistry of fruit bioflavonoids: a Review. **Analyst**, v. 122, p. 11R-34R, 1997.

ROGÉRIO, A. P.; et al. Anti-inflammatory activity of quercetin and isoquercitrin in experimental murine allergic asthma. **Inflammation Research**, v. 56, p. 402-408, 2007.

ROMANO, E.; et al. Characterization and crystal structure of 2*R*-(-)-6 hydroxytremetone from *Xenophyllum poposum* (Phil.) V.A. Funk. **Natural Product Research**, v. 22, n. 2, p. 124-135, 2008.

RONTANI, J. F.; VOLKMAN, J. K. Phytol degradation products as biogeochemical tracers in aquatic environments. **Organic Geochemistry**, v. 34, p. 1-35, 2003.

ROQUE, N.; CARVALHO, V. C. Estudos taxonômicos do gênero *Calea* (Asteraceae, Neurolaeneae) no estado da Bahia, Brasil. **Rodriguésia**, v. 62, n. 3, p. 547-561, 2011.

ROSLUND, M. U.; et al. Complete assignments of the ^1H and ^{13}C chemical shifts and $J_{\text{H,H}}$ coupling constants in NMR spectra of D-glucopyranose and all D-glucopyranosyl-D-glucopyranosides. **Carbohydrate Research**, v. 343, p. 101-112, 2008.

ROSSINI, M.; et al. Sesquiterpene lactones with anti-hepatitis C virus activity using molecular descriptors. **Letters in Drug Design & Discovery**, v. 9, n. 9, p. 881-890, 2012.

ROSS, J. A.; KASUME, C. M. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. **Annual Review Nutrition**. v. 22, p. 19-34, 2002.

RUEFER, C. E.; KULLING, S. E. Antioxidant activity of isoflavones and their major metabolites using different *in vitro* assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 8, p. 2926-2931, 2006.

RUPASINGHE, H. P. V.; et al. Vanillin inhibits pathogenic and spoilage microorganisms *in vitro* and aerobic microbial growth in fresh-cut apples. **Food Research International**, v. 39, p. 575-580, 2006.

SAGA, K. R. O.; et al. Chromenes from *Peperomia serpens* (Sw.) Loudon (Piperaceae). **Phytochemistry**, v. 67, n. 21, p. 2398-2402, 2006.

SAIKIA, D.; et al. Antitubercular potential of some semisynthetic analogues of phytol. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 2, p. 508-512, 2010.

SAKAMOTO, H. T.; et al. Sesquiterpene lactones from *Lychnophora ericoides*. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 693-695, 2003.

SALAGA, M.; et al. *Calea zacatechichi* dichloromethane extract exhibits antidiarrheal and antinociceptive effects in mouse models mimicking irritable bowel syndrome. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 388, n. 10, p. 1069-1077, 2015.

SALAGA, M.; et al. Neuropharmacological characterization of the oneirogenic Mexican plant *Calea zacatechichi* aqueous extract in mice. **Metabolomic Brain Disease**, doi: 10.1007/s11011-016-9794-1, 2016.

SALAPOVIC, H.; GEIER, J.; REZNICEK, G. Quantification of sesquiterpene lactones in Asteraceae plant extracts: evaluation of their allergenic potential. **Scientia Pharmaceutica**, v. 81, n. 3, p. 807-810, 2013.

SALEM, M. M.; et al. Antiparasitic Activity of C-geranyl flavonoids from *Mimulus bigelovii*. **Phytotherapy Research**, v. 25, n. 8, p. 1246-1249, 2011.

SÁNCHEZ-TORANZO, G.; et al. Effect of different types of sesquiterpene lactones on the maturation of *Rhinella arenarum* oocytes. **Zygote**, v. 13, p. 1-6, 2014.

SANG, Z. C.; SANG, U. C.; KANG, R. L. Phytochemical constituents of the aerial parts of the *Solidago virga-aurea* var. *gigantea*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 27, n. 2, p. 164-168, 2004.

SANTOS, C. C. M. P.; et al. Antinociceptive and antioxidant activities of phytol *in vivo* and *in vitro* models. **Neuroscience Journal**, p. 1-9, 2013.

SANTOS, M. D.; et al. Analgesic activity of dicaffeoylquinic acids from roots of *Lychnophora ericoides* (arnica-da-serra). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 545-549, 2005.

SANTOS, P. A.; et al. Production of an antiproliferative furanoheliangolide by *Lychnophora ericoides* cell culture. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 52, n. 12, p. 1433-1435, 2004.

SAVOIA, D. Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics. **Future Microbiology**, v. 7, n. 8, p. 979-990, 2012.

SATAKE, T.; et al. The anti-thrombotic active constituents from *Centella asiatica*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 5, p. 935-940, 2007.

SATOH, A.; et al. Antimicrobial benzopyrans from the receptacle of sunflower. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 60, n. 4, p. 664-665, 1996.

SAÚDE, D. A.; et al. Constituents from the aerial parts of *Lychnophora trichocarpa*. **Fitoterapia**, v. 69, p. 90-91, 1998.

SCHILLING, E. E.; PANERO, J. L.; STORBECK, T. A. Flavonoids of *Helianthus* series Microcephali. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 15, n. 6, p.671-672, 1987.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; et al. A myrtenylfuroheliangolide from *Calea rupicola*. **Phytochemistry**, v. 25, n. 7, p. 1753-1754, 1986.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; et al. Further sesquiterpene lactones from *Calea* and *Viguiera* species. **Phytochemistry**, v. 24, n. 9, p. 2019-2022, 1985.

SCHMIDT, T. J. Toxic activities of sesquiterpene lactones structural and biochemical aspects. **Current Organic Chemistry**, v. 3, v. 6, p. 577-608, 1999.

SCHWENDE, H.; et al. 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.

SCOTTI, M. T.; et al. Self-organizing maps of molecular descriptors for sesquiterpene lactones and their application to the chemotaxonomy of the Asteraceae family. **Molecules**, v. 17, p. 4684-4702, 2012.

SEAMAN, F. C. Sesquiterpene lactones as taxonomic characters in the Asteraceae. **The Botanical Review**, v. 48, p. 123-551, 1982.

SELLAMI, H. K.; et al. Influence of growing conditions on metabolite profile of *Ammi visnaga* umbels with special reference to bioactive furanochromones and pyranocoumarins. **Phytochemistry**, v. 95, p. 197-206, 2013.

SERAGENT, T.; et al. Characterization of black locust (*Robinia pseudoacacia* L.) heartwood extractives: identification of resveratrol and piceatannol. **Wood Science and Technology**, v. 48, n. 5, p. 1005-1017, 2014.

SERRA-BARCELONA, C.; et al. *Smallanthus macroscyphus*: A new source of antidiabetic compounds. **Chemico-Biological Interactions**, v. 209, p. 35-47, 2014.

SHAHA, C.; et al. Apoptosis in *Leishmania* species e its relevance to disease pathogenesis. **Indian Journal of Medical Research**, v. 123, n. 6, p. 233-244, 2006.

SHAUGHNESSY, D. T.; SETZER, R. W.; DEMARINI, D. M. The antimutagenic effect of vanillin and cinnamaldehyde on spontaneous mutation in *Salmonella* TA104 is due to a reduction in mutations at GC but not AT sites. **Mutation Research**, v. 480-481, p. 55-69, 2001.

SHI, Z. R.; et al. Structurally novel C17-sesquiterpene lactones from *Ainsliaea pertyoides*. **RSC Advances**, v. 5, p. 91640-91644, 2015.

SILVA, A. G.; et al. A Clinical trial with Brazilian Arnica (*Solidago chilensis* Meyen) glycolic extract in the treatment of tendonitis of flexor and extensor tendons of wrist and hand. **Phytotherapy Research**, v. 29, p. 864-869, 2015.

SILVA, F. A. M.; et al. Phenolic acids and derivatives: studies on the relationship among structure, radical scavenging activity, and

physicochemical parameters. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 6, p. 2122-2126, 2000.

SILVA, R. O.; et al. Phytol, a diterpene alcohol, inhibits the inflammatory response by reducing cytokine production and oxidative stress. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 28, n. 4, p. 455-464, 2013.

SILVA, V. S.; et al. Potencial fitotóxico de *Dicranopteris flexuosa* (Schrad.) Underw. (Gleicheniaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 25, n. 1, p. 95-104, 2011.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 5 ed., Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro; 1994.

SIMÃO DA SILVA, K. A. B.; et al. Anti-inflammatory and anti-hyperalgesic evaluation of the condiment laurel (*Litsea guatemalensis* Mez.) and its chemical composition. **Food Chemistry**, v. 132, n. 4, p. 1980-1986, 2012.

SINGH, H.; et al. Evaluation of total phenolic compounds and insecticidal and antioxidante activities of tomato hairy root extract. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 12, p. 2588-2594, 2014.

SINGH, P.; et al. Acanthospermolides and other constituents from *Blainvillea acmella*. **Phytochemistry**, v. 24, n. 9, p. 2023-2028, 1985.

SONG, N. J.; et al. Butein is a novel anti-adipogenic compound. **Journal of lipid Research**, v. 54, p. 1385-1396, 2013.

SOSA, A. M.; et al. Active sesquiterpene lactones against *Leishmania amazonensis* and *Leishmania braziliensis*. **Natural Product Research**, v. 12, p. 1-5, 2016.

SOUZA, C. M. P.; et al. Utilização de plantas medicinais com atividade antimicrobiana por usuários do Serviço Público de Saúde em Campina Grande – Paraíba. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Campinas**, v. 15, n. 2, p. 188-193, 2013.

SOUZA-MOREIRA, T. M.; SALGADO, H. R. N.; PIETRO, R. C. L. R. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 435-440, 2010.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Botânica Sistemática. **Guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II**. 2ª ed. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora; 2008, p. 704.

SRIVASTAVA, R. P.; PROKSCH, P. Insecticidal and antifeedant effects of compounds of plant origin against insect pests. **Indian Journal of Plant Protection**, v. 21, n. 2, p. 234-239, 1993.

STEELINK, C.; MARSHALL, G. P. Structures, synthesis, and chemotaxonomic significance of some new acetophenone derivatives from *Encelia farinosa* Gray. **Journal of Organical Chemistry**, v. 44, n. 9, p. 1429-1433, 1979.

STEINBECK, C.; et al. Identification of two chromenes from *Calea serrata* by semiautomatic structure elucidation. **Journal of Natural Products**, v. 60, n. 6, p. 627-628, 1997.

STEWART, E.; GERSHENZON, J.; MABRY, T. J. Sesquiterpene lactones of one chemical race of *Helianthus maximiliani*. **Journal of Natural Products**, v. 47, n. 4, p. 748-50, 1984.

STOJAKOWSKA, A.; et al. Root tubers of *Lactuca tuberosa* as a source of antioxidant phenolic compounds and new furofuran lignans. **Food Chemistry**, v. 138, n. 2-3, p. 1250-1255, 2013.

SUN, R.; et al. Bioactive aromatic compounds from leaves and stems of *Vanilla fragrans*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 5161-5164, 2001.

SYROV, V. N.; et al. Isolation, chemical analysis, and study of the hepatoprotector and biligenic activity of total flavonoid preparations from *Thermopsis dolichocarpa* and *Vexibia alopecuroides*. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 35, n. 1, p. 30-34, 2001.

SZUSTER-CIESIELSKA, A.; et al. Butein inhibits ethanol-induced activation of liver stellate cells through TGF- β , NF κ B, p38, and JNK

signaling pathways and inhibition of oxidative stress. **Journal of Gastroenterology**, v. 48, n. 2, p. 222-237, 2013.

TABASSUM, N.; HAMDANI, M. Plants used to treat skin diseases. **Pharmacognosy Reviews**, v. 8, n. 15, p. 52-60, 2014.

TANG, L.; et al. Chemical constituents of *Hyptis rhomboidea* and their antifungal. **China Journal of Chinese Materia Medica**, v. 39, n. 12, p. 2284-2288, 2014.

TANG, Y.; et al. Characterization of phenolics, betanins and antioxidant activities in seeds of three *Chenopodium quinoa* Willd. genotypes. **Food Chemistry**, v. 166, p. 380-388, 2015.

TEIXEIRA, D. E.; et al. Interactive multimedia to teach the life cycle of *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 8, p. 1-14, 2012.

TEKLEHAYMANOT, T.; GIDAY, M. Ethnobotanical study of medicinal plants used by people in Zegie Peninsula, Northwestern Ethiopia. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 3, p. 1-11, 2007.

TEWTRAKUL, S.; et al. Anti-inflammatory constituents from *Eclipta prostrata* using RAW264.7 macrophage cells. **Phytotherapy Research**, v. 25, n. 9, p. 1313-1316, 2011.

THEODORI, R.; et al. Linear sesquiterpene lactones from *Anthemis auriculata* and their antibacterial activity. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 4, p. 662-664, 2006.

THIRUVENGADAM, M.; et al. Production of anthraquinones, phenolic compounds and biological activities from hairy root cultures of *Polygonum multiflorum* Thunb. **Protoplasma**, v. 251, n. 3, p. 555-566, 2014.

THOMAS, N.; ZACHARIAH, S. M. Pharmacological activities of chromene derivatives: an overview. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 6, n. 2, p. 11-15, 2013.

TIDJANI, S.; et al. Analysis of pyrrolizidine alkaloids and evaluation of some biological activities of Algerian *Senecio delphinifolius* (Asteraceae). **Natural Product Communications**, v. 8, n. 4, p. 439-440, 2013.

TISSIER, A. Glandular trichomes: what comes after expressed sequence tags? **The Plant Journal**, v. 70, p. 51-68, 2012.

TOLARDO, R.; et al. Evaluation of behavioral and pharmacological effects of *Hedyosmum brasiliense* and isolated sesquiterpene lactones in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, n. 1, p. 63-70, 2010.

TOLEDO, J. S.; et al. *In vitro* leishmanicidal activities of sesquiterpene lactones from *Tithonia diversifolia* against *Leishmania braziliensis* promastigotes and amastigotes. **Molecules**, v. 19, n. 5, p. 6070-6079, 2014.

TOMAZZONI, M. I.; NEGRELLE, R. R. B.; CENTA, M. L. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. **Texto & Contexto Enfermagem**, v. 15, n. 1, p. 115-121, 2006.

TORRES, V. R. N. **Avaliação fitoquímica, citotóxica e farmacológica de *Calea uniflora* Less.** 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) - Universidade do Extremo sul Catarinense - UNESC, Criciúma, 2014.

TOYODA, K.; YAOITA, Y.; KIKUCHI, M. Constituents of the leaves and roots of *Ligularia stenocephala* Matsum. et Koidz. **Journal of Natural Medicines**, v. 60, n. 4, p. 329-330, 2006.

TRIANA, J. Furanoheliangolides and flavonoids from *Louthergia ballotaefolia*. **Phytochemistry**, v. 23, p. 2072-2074, 1984.

UMEMURA, K.; et al. Preconditioning by sesquiterpene lactone enhances H₂O₂-induced Nrf2/ARE activation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 368, n. 4, p. 948-954, 2008.

URIBURU, M. L.; et al. Constituents of two *Flourensia* species. **Phytochemistry**, v. 65, n. 14, p. 2039-2043, 2004.

USAMI, K.; SAKAIDA, T.; ADACHI, H. *Calea urticifolia* extracts as hyaluronidase inhibitors and their uses. **Japan Kokai Tokkyo Koho, JP 2011116669 A 20110616**, 2011.

VALLI, M.; et al. Development of a Natural Products Database from the Biodiversity of Brazil. **Journal of Natural Products**, v. 76, p. 439-444, 2013.

VAN DER MERWE, J. P.; et al. Immediate biogenetic precursors of mopanol and peltogynol. **Journal of the Chemical Society Chemical Communications**, v. 9, p. 521-522, 1972.

VAN OTTERLO, W. A. L.; et al. Ring-closing metathesis for the synthesis of 2*H*- and 4*H*-chomenes. **Tetrahedron**, v. 61, p. 9996-10006, 2005.

VELLOSA, J. C. R.; et al. Antioxidant and cytotoxic studies for kaempferol, quercetin and isoquercitrin. **Eclética Química**, v. 26, n. 2, p. 7-20, 2011.

VENDRAMETTO, M. C.; et al. Evaluation of antileishmanial activity of eupatemoide-5, a compound isolated from leaves *Piper regnellii* var. *pallescens*. **Parasitology International**, v. 59, p. 154-158, 2010.

VENDRUSCOLO, G. S.; SIMÕES, C. M. O.; MENTZ, L. A. Etnobotânica no Rio Grande do Sul: análise comparativa entre o conhecimento original e atual sobre as plantas medicinais nativas. **Pesquisas Botânicas, São Leopoldo, RS**, v. 56, p. 285-320, 2005.

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

VENKATESWARA, G. R.; et al. Antimicrobial and melanin synthesis inhibitory activities of the roots of *Inula racemosa* Hook F. **Archives of Applied Science Research**, v. 5, n. 2, p. 104-110, 2013.

VERDI, L. G.; BRIGHENTE, I. M.; PIZZOLLATTI, M. G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): Aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química nova**, v. 28, n. 1, p. 85-94, 2005.

VICHNEWSKI, W.; GOULART, E. G.; HERZ, W. A heliangolide from *Calea lantanoides*. **Phytochemistry**, v. 21, n. 2, p. 464-465, 1982.

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

VILLAS-BÔAS, S. G.; GOMBERT, A. K. Análise do Metaboloma: uma ferramenta biotecnológica emergente na era pós-genômica. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, v. 36, p. 58-69, 2006.

VOGT, T.; TAYLOR, L. P. Flavonol 3-*O*-glycosyl-transferases associated with *Petunia* pollen produce gametophyte-specific flavonol diglycoside. **Plant Physiology**, v. 111, p. 903-911, 1995.

WAGENITZ, G. Systematics and phylogeny of the Compositae (Asteraceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 125, p. 29-46, 1976.

WANG, H.; et al. Endothelium-dependent and independent vasorelaxant actions and mechanisms induced by total flavonoids of *Elsholtzia splendens* in rat aortas. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 38, n. 2, p. 453-459, 2014.

WANG, J.; et al. Caffeoyl quinic acid derivatives from *Bidens parviflora* and their antihistamine release activities. **Zhongcaoyao**, v. 37, n. 7, p. 966-970, 2006a.

WANG, J.; et al. Structures and anti-histamine activity of chalcones & aurones compounds from *Bidens parviflora* Willd. **Asian Journal of Traditional Medicines**, v. 2, n. 1, p. 23-29, 2007.

WANG, L.; et al. Structural characterization of phenolic compounds and antioxidant activity of the phenolic-rich fraction from defatted adlay (*Coix lachryma-jobi* L. var. ma-yuen Stapf) seed meal. **Food Chemistry**, v. 196, p. 509-517, 2016.

WANG, S.; et al. Structural characterization and identification of major constituents in Jitai tablets by High-Performance Liquid Chromatography/Diode-Array Detection coupled with Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. **Molecules**, v. 17, p. 10470-10493, 2012.

WANG, W.; et al. Isolation, identification and antioxidante activity of bound phenolic compounds present in rice bran. **Food Chemistry**, v. 171, p. 40-49, 2015.

WANG, Y. B.; et al. Chromone glycosides from *Knoxia corymbosa*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 8, n. 7, p. 663-670, 2006b.

WU, H.; et al. Antileishmanial germacranolides from *Calea zacatechichi*. **Planta Medica**, v. 77, n. 7, p. 749-753, 2011a.

WU, M. C.; et al. Antitubercular chromones and flavonoids from *Pisonia aculeate*. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 5, p. 976-982, 2011b.

XIANG, M.; et al. 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.

XU, Q.; et al. Phenolic constituents from the roots of *Mikania micrantha* and their allelopathic effects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 30, p. 7309-7314, 2013.

YAMADA, M.; et al. Germacranolides from *Calea urticifolia*. **Phytochemistry**, v. 65, n. 23, p. 3107-3111, 2004.

YAMASHITA, Y.; KAWADA, S.; NAKANO, H. Induction of mammalian topoisomerase II dependent DNA cleavage by nonintercalative flavonoids, genistein and orobol. **Biochemical Pharmacology**, v. 39, n. 4, p. 737-744, 1990.

YANG, G.; et al. Caffeic acid directly targets ERK1/2 to attenuate solar UV-induced skin carcinogenesis. **Cancer Prevention Research**, v. 7, n. 10, p. 1056-1066, 2014.

YANG, W. S.; et al. IRAK1/4-targeted anti-inflammatory action of caffeic acid. **Mediators of Inflammation**, p. 1-12, 2013a.

YANG, W. Z.; et al. Rapid characterization of flavonoids from *Sophora alopecuroides* L. by HPLC/DAD/ESI-MSⁿ. **Natural Product Research**, v. 27, n. 4-5, p. 323-330, 2013b.

YAO, L. H.; et al. Flavonoids in food and their health benefits. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 59, p. 113-122, 2004.

YULIANA, N. D.; et al. Metabolomics for bioactivity assessment of natural products. **Phytotherapy Research**, v. 25, p. 157-169, 2011.

ZABKA, M.; PAVELA, R. Antifungal efficacy of some natural phenolic compounds against significant pathogenic and toxinogenic filamentous fungi. **Chemosphere**, v. 93, n. 6, p. 1051-1056, 2013.

ZAINUDDIN, N.; et al. Antimicrobial activities of marine fungi from Malaysia. **Botanica Marina**, v. 53, n. 6, p. 507-513, 2010.

ZANK, S. **O conhecimento sobre plantas medicinais em unidades de conservação de uso sustentável no litoral de SC: da etnobotânica ao empoderamento de comunidades rurais**. 2011. Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

ZDERO, C.; BOHLMANN, F.; SCOTT, R. Germacranolides, guaianolides and eudesmanolides from *Greenmaniella resinosa*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 7, p. 1999-2006, 1987.

ZHAI, H.; et al. A new chromene glycoside from *Tithonia diversifolia*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 46, n. 2, p. 198-200, 2010.

ZHANG, B. Y.; et al. Chemical constituents of *Euphorbia tangutica*. **Natural Product Research**, v. 26, n. 24, p. 2309-2315, 2012.

ZHAO, P. P.; et al. Purification of butin and butein from *Vernonia anthelmintica* willd and their effects on proliferation and melanogenesis of A375 human melanoma cells. **Zhongguo Yaoxue Zazhi**, v. 48, n. 20, p. 1724-1727, 2013.

ZHAO, Y.; et al. Polyacetylenes and anti-hepatitis B virus active constituents from *Artemisia capillaris*. **Fitoterapia**, v. 95, p. 187-193, 2014.

ZHENG, Z.; LIANG, J.; HU, L. Water-Soluble Constituents of *Cudrania tricuspidata* (Carr.) Bur. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 48, n. 8, p. 996-1000, 2006.

ZHOU, J.; et al. Isoquercitrin activates the AMP-activated protein kinase (AMPK) signal pathway in rat H4IIE cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 42, p. 1-10, 2014a.

ZHOU, X. J.; et al. Structural characterisation and antioxidant activity evaluation of phenolic compounds from cold-pressed *Perilla frutescens* var. *arguta* seed flour. **Food Chemistry**, v. 164, p. 150-157, 2014b.

ZHU, N.; et al. Constituents from aerial parts of *Bidens ceruna* L. and their DPPH radical scavenging activity. **Chemical Research Chinese Universities**, v. 25, n. 3, p. 328-331, 2009.

ZHU, X.; ZHANG, H.; LO, R. Phenolic compounds from the leaf extract of Artichoke (*Cynara scolymus* L.) and their antimicrobial activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 24, p. 7272-7278, 2004.

APÊNDICE 1 – Resumos apresentados em anais de congressos.

1. **Lima, T. C.**; Santos, A. D. C.; Barison, A.; Biavatti, M. W. CHROMENES FROM *Calea pinnatifida* Banks, ASTERACEAE. São Paulo Advanced School on Bioorganic Chemistry, 2013, Araraquara, São Paulo.
2. **Lima, T. C.**; Santos, A. D. C.; Barison, A.; Biavatti, M. W. PHENOLIC COMPOUNDS FROM *Calea uniflora* Less. (HELIANTHEAE, ASTERACEAE). 4th Brazilian Conference on Natural Products and the XXX Meeting on Micromolecular, Evolution, Systematic and Ecology (RESEM), 2013, Natal, Rio Grande do Norte.
3. Lima, T. C.; **Souza, R. J.**; Santos, A. D. C.; Barison, A.; Biavatti, M. W. CHROMONE FROM *Calea uniflora* Less., ASTERACEAE. 4th Brazilian Conference on Natural Products and the XXX Meeting on Micromolecular, Evolution, Systematic and Ecology (RESEM), 2013, Natal, Rio Grande do Norte.
4. **Lima, T. C.**; Souza, R. J.; Santos, A. D. C.; Barison, A.; Biavatti, M. W. ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF THE SESQUITERPENE LACTONE DESACETYLEUPASERRIN FROM *Calea uniflora* Less. (ASTERACEAE). 1^o Simpósio do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina, 2014, Florianópolis, Santa Catarina.
5. Lima, T. C.; **Souza, R. J.**; Santos, A. D. C.; Barison, A.; Biavatti, M. W. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS POLARES DE *Calea uniflora* Less. (ASTERACEAE). VII Simpósio Iberoamericano de Plantas Medicinais e II Simpósio Iberoamericano de Investigação em Câncer, 2014, Ilhéus, Bahia.
6. Lima, T. C.; **Souza, R. J.**; Santos, A. D. C.; Barison, A.; Biavatti, M. W. CHALCONE DE LAS HOJAS DE *Calea uniflora* Less. (ASTERACEAE). IV Congreso Iberoamericano de Productos Naturales en Patagonia: La diversidad Química y Biológica, 2014, Patagônia, Argentina.
7. Tamires C. Lima; **Rafaela J. Souza**; Alan D. C. Santos; Andersson Barison; Maique W. Biavatti. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE

METABÓLITOS FENÓLICOS DA ESPÉCIE *Calea pinnatifida* (R. BR.) LESS. (HELIANTHEAE, ASTERACEAE). X Simpósio Brasileiro de Farmacognosia e V Simpósio de Plantas Medicinais do Vale do São Francisco, 2015, Juazeiro, Bahia.

ANEXO 1 – Artigo publicado no periódico Brazilian Journal of Pharmacognosy no ano de 2015.

Revista Brasileira de Farmacognosia 25 (2015) 7–10



Revista Brasileira
de Farmacognosia

BRAZILIAN JOURNAL OF PHARMACOGNOSY

www.sbfgnosia.org.br/revista



Original Article

Chromenes from leaves of *Calea pinnatifida* (R. Br.) Less. and evaluation of their leishmanicidal activity



Tamires C. Lima^a, Alan Diego C. Santos^b, Danielle T.M. Costa^c, Rafaela J. Souza^a,
Andersson Barison^b, Mário Steindel^c, Maique W. Biavatti^{a,*}

^a Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

^b Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brazil

^c Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 October 2014

Accepted 26 January 2015

Available online 12 February 2015

Keywords:

Asteraceae

Calea pinnatifida

Chromenes

Leishmanicidal activity

ABSTRACT

Calea pinnatifida (R. Br.) Less., Asteraceae, is popularly known as “quebra-tudo”, “cipó-cruz” or “aruca”. This species is used in the folk medicine for the treatment of stomach pain, giardiasis and amoebiasis. The aim of this study was to isolate and identify chromenes from leaves of *C. pinnatifida* and evaluate their leishmanicidal activity. A fraction from leaves of *C. pinnatifida* was analyzed for their chemical constituents, resulting in the isolation and characterization of four known chromenes: 6-acetyl-7-hydroxy-2,2-dimethylchromene (1), 6-acetyl-7-methoxy-2,2-dimethylchromene (2), 6-(1-hydroxyethyl)-7-methoxy-2,2-dimethylchromene (3) and 6-(1-ethoxyethyl)-7-methoxy-2,2-dimethylchromene (4). Structure identification of isolated compounds involved analysis of spectral data of 1D and 2D-NMR. The isolated compounds are here reported for the first time in *C. pinnatifida*, and the chromenes 1 and 3 show a moderate leishmanicidal activity.

© 2014 Sociedade Brasileira de Farmacognosia. Published by Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

ANEXO 2 – Artigo publicado no periódico Natural Product Research no ano de 2015.

Natural Product Research, 2015

<http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2015.1030740>

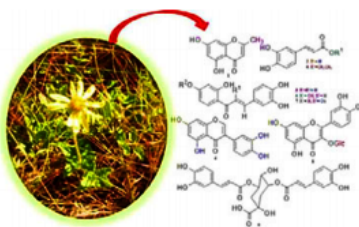


Evaluation of leishmanicidal and trypanocidal activities of phenolic compounds from *Calea uniflora* Less.

Tamires C. Lima^a, Rafaela J. Souza^a, Alan D.C. Santos^b, Milene H. Moraes^c, Nicole E. Biondo^c, Andersson Barison^b, Mário Steindel^c and Maique W. Biavatti^{a,*}

^aDepartamento de Ciências Farmacêuticas, CCS, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, Brazil; ^bDepartamento de Química, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, PR, Brazil; ^cDepartamento de Microbiologia e Parasitologia, CCB, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, Brazil

(Received 9 December 2014; final version received 10 March 2015)



ANEXO 3 – Artigo aceito para publicação no periódico Journal of the Brazilian Chemical Society no ano de 2016.

PROOF

doi number

J. Braz. Chem. Soc., Vol. 00, No. 00, 1-10, 2016
 Printed in Brazil - ©2016 Sociedade Brasileira de Química
 0103 - 5053 \$6.00+0.00

Article



1	A New Furanoheliangolide Sesquiterpene Lactone from <i>Calea pinnatifida</i> (R. Br.)	52
2	Less. (Asteraceae) and Evaluation of Its Trypanocidal and Leishmanicidal Activities	53
3		54
4	Tamires Cardoso Lima,^a Rafaela de Jesus Souza,^a Milene Hoehr de Moraes,^b	55
5	Mário Steindel^a and Maíque Weber Biavatti^{a,*}	56
6		57
7	<i>^aDepartamento de Ciências Farmacêuticas, CCS and ^bDepartamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia,</i>	58
8	<i>CCB, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), 88040-900 Florianópolis-SC, Brazil</i>	59
9		60
10		61
11	<i>Calea pinnatifida</i> (R. Br.) Less. is commonly known in Brazil as “cipó-cruz”, “quebra-tudo”	62
12	or “aruca”. This species is employed in folk medicine as giardicidal, amoebicidal and to treat	63
13	digestive disorders. The present paper describes the isolation and structure determination of a new	64
14	furanoheliangolide sesquiterpene lactone named 11,13-dihydroxy-calaxin, in addition to seven	65
15	known compounds: ethyl caffeate, vanillin, 12-hydroxy-eneccalin, phytol, 3,4-di- <i>O</i> -caffeoylquinic	66
16	acid, 3,5-di- <i>O</i> -caffeoylquinic acid and 4,5-di- <i>O</i> -caffeoylquinic acid from the ethanol extract of	67
17	<i>C. pinnatifida</i> leaves. Additionally, 11,13-dihydroxy-calaxin, vanillin, 12-hydroxy-eneccalin,	68
18	phytol, 3,4-di- <i>O</i> -caffeoylquinic acid, 4,5-di- <i>O</i> -caffeoylquinic acid and the mixture of 3,4-di- <i>O</i> -	69
19	caffeoylquinic, 3,5-di- <i>O</i> -caffeoylquinic and 4,5-di- <i>O</i> -caffeoylquinic acids were assayed against	70
20	the amastigote forms of <i>Leishmania amazonensis</i> and <i>Trypanosoma cruzi</i> , and the sesquiterpene	71
21	lactone 11,13-dihydroxy-calaxin exhibited a promising trypanocidal and leishmanicidal activity,	72
22	displaying IC ₅₀ values of 5.27 and 8.30 μM, respectively.	73
--		--
	Keywords: <i>Calea pinnatifida</i> , furanoheliangolide, phenolic compounds, leishmanicidal,	
	trypanocidal	