

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA APLICADA

LORNA HOSOYA NAME

ESTUDO QUÍMICO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DAS
FOLHAS DE *Calea hispida* Baker

PONTA GROSSA
Março 2014

LORNA HOSOYA NAME

**ESTUDO QUÍMICO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DAS
FOLHAS DE *Calea hispida* Baker**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do título de Mestre em Química ao Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Domingos Sávio Nunes

**PONTA GROSSA
Março 2014**

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

Name, Lorna Hosoya

N174 Estudo químico dos metabólitos
secundários das folhas de *Calea hispida*
Baker/ Lorna Hosoya Name. Ponta Grossa,
2014.
86f.

Dissertação (Mestrado em Química
Aplicada - Área de Concentração: Química),
Universidade Estadual de Ponta Grossa.
Orientador: Prof. Dr. Domingos Sávio
Nunes.

1.Calea hispida. 2.Óleos essenciais.
3.6-acetil-7-hidroxi-2,2-dimetilcromeno.
4.Compostos fenólicos. 5.Quercitrina.
I.Nunes, Domingos Sávio. II. Universidade
Estadual de Ponta Grossa. Mestrado em
Química Aplicada. III. T.

CDD: 547

TERMO DE APROVAÇÃO

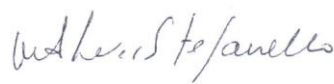
LORNA HOSOYA NAME

“ESTUDO QUÍMICO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DAS FOLHAS DE *Calea Hispida* BAKER.”

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora.

Orientador:


Prof. Dr. Domingos Sávio Nunes
UEPG/PR


Profa. Dra. Maria Élide Alves Stefanello
UFPR/PR


Profa. Dra. Jacqueline Aparecida Marques
UEPG/PR

Ponta Grossa, 14 de março de 2014.

Dedico este Mestrado a minha família pelo incentivo e apoio em todas as minhas escolhas e decisões, pois a vitória desta conquista dedico com todo meu amor, unicamente, a vocês! Obrigada!

AGRADECIMENTOS

Escrever uma dissertação de Mestrado é uma experiência enriquecedora e de plena superação. Modificamo-nos a cada tentativa de buscar respostas às nossas aflições de “pesquisador”. Para aqueles que compartilharam desse momento comigo, parece uma tarefa interminável e enigmática que só torna realizável graças a muitas pessoas que participam, direta ou indiretamente, mesmo sem saber realmente por que nos envolvemos em pesquisa. A essas pessoas eu gostaria de agradecer:

Primeiramente a Deus pelo Dom da vida.

Aos meus queridos pais Munir e Kazuio, pelos momentos de plenitude e apoio familiar incondicional.

Ao meu estimado esposo Dartagnan e amadas filhas Anne Marie e Daphné pelo apoio e paciência nos momentos de inquietação e cansaço, e nos momentos em que não pude estar aos seus lados.

Aos sogros Anísio e Rosi Dalva, pelo apoio e compreensão.

Ao professor orientador, mestre e doutor pela oportunidade de participar do projeto de pesquisa, apoio frente às dificuldades e principalmente pelo ensinamento e paciência.

Às amigas e colegas do Laboratório 12.

Aos professores de todas as matérias cursadas pelo aprendizado que contribuiu para o desenvolvimento da pesquisa.

À CAPES, como instituição, pela bolsa de estudos.

Detesto, de saída, quem é capaz de marchar em formação com prazer ao som de uma banda. Nasceu com cérebro por engano; bastava-lhe a medula espinhal.

Não tentes ser bem sucedido, tenta antes ser um homem de valor.

Nenhum homem realmente produtivo pensa como se estivesse escrevendo uma dissertação.

Albert Einstein

NOTA PRÉVIA

A espécie vegetal estudada nesta pesquisa foi identificada botanicamente como *Calea hispida* Baker, binômio utilizado no decorrer de toda esta dissertação.

Atualmente, no entanto, está sendo feito um grande esforço científico no Brasil para atualizar toda a nomenclatura das plantas nativas ou introduzidas (nomes aceitos *versus* sinônimos) e sua distribuição geográfica, incluindo outras importantes informações sobre formas de vida, substrato e variações de cada táxon. Trata-se do projeto **Lista de Espécies da Flora do Brasil**, que foi iniciado em 2008 e já conta com expressivos resultados (REFLORA, 2014). Contando com a facilidade trazida pela internet, todos os dados são de livre acesso e podem ser consultados na página do projeto: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br>>.

Assim, o nome *Calea hispida* Baker é hoje considerado como um sinônimo botânico heterotípico de *Calea triantha* (Vell.) Pruski, o que significa que este segundo deve ter primazia sobre o primeiro. Esta informação deve se alastrar lentamente pela literatura das outras áreas científicas.

Para a realização do presente trabalho de pesquisa sobre a química dos metabólitos secundários do material em estudo, inicialmente foram feitos levantamentos bibliográficos usando as palavras-chave “*Calea*” e “*Calea hispida*”, principalmente no banco de dados on-line do Chemical Abstracts. Para a palavra-chave “*Calea hispida*”, foi encontrada somente uma referência bibliográfica relacionada a estudos químicos (BOHLMANN et al., 1982). O uso da palavra-chave “*Calea triantha*” ainda não resulta na recuperação de nenhuma referência bibliográfica na área da química.

RESUMO

O presente trabalho de pesquisa teve como objetivo estudar quimicamente as folhas de *Calea hispida* Baker, Asteraceae que cresce *in natura* no Segundo Planalto do Paraná, avaliando a bioatividade potencial dos seus metabólitos secundários. Esta pesquisa foi realizada por tratar-se de uma espécie vegetal pouco estudada e devido à ocorrência de compostos bioativos de diversas classes neste gênero botânico, embora esta não seja conhecida como planta medicinal. As folhas foram hidrodestiladas em triplicata para a obtenção e análise de óleos essenciais por técnicas de CG/EM/DIC. Este foi o primeiro estudo químico do óleo essencial de *C. hispida*, permitindo identificar diversos monoterpenos oxigenados em baixas proporções (como α -terpineol, *cis*-sabinol, verbenona e bornilacetato), sesquiterpenos não-oxigenados em porcentagens individuais abaixo de 5,2% (como β -cubebeno, germacreno D e β -selineno), e sesquiterpenos oxigenados que totalizaram entre 7,86 a 11,46% nas replicatas (como (*E*)-nerolidol, espatulenol e viridiflorol). Além destes, três compostos contendo anel aromático em suas estruturas químicas totalizaram entre 31,43 e 56,20% dos óleos essenciais: 2,6-dibutil-4-metilfenol (0,39 a 1,44%), (*Z*)-3-hexenilbenzoato (0,40 a 0,43%) e um componente majoritário encontrado em proporções entre 30,21 e 54,76%, mas que não pode ser identificado por CG/EM. A substância volátil majoritária não identificada foi isolada por fracionamento do óleo essencial numa coluna cromatográfica, obtendo-se quantidade suficiente para a realização de testes biológicos e para estudo detalhado sobre sua estrutura química através da análise de seus espectros de UV-Vis, IV e RMN de ^1H e ^{13}C , que permitiram identificá-la como 6-acetil-7-hidroxi-2,2-dimetilcromeno. Paralelamente, o cromeno isolado foi fornecido para estudos da sua estrutura cristalina por métodos de difração de Raios-X. Extrações com clorofórmio das soluções aquosas restantes após as hidrodestilações, destinadas a eliminar substâncias menos polares, precederam a obtenção de extratos contendo substâncias fenólicas. Assim, foram realizadas extrações com acetato de etila e com acetato de etila/metanol 30% em pH 8 (para obter concentrados de substâncias fenólicas neutras) e em pH 4 (para obter substâncias fenólicas ácidas). Um extrato obtido com acetato de etila/metanol em pH 8 apresentou uma substância principal, a qual foi identificada como quercetina-3-O-ramnopiranosídeo por meio da análise de seus espectros de UV-Vis, IV e RMN de ^1H e ^{13}C . Análises preliminares de extratos obtidos em pH 4 permitiram concluir que as substâncias fenólicas ácidas são uma importante classe de compostos em *C. hispida*, constituídas principalmente por derivados do ácido cafeico, como os ácidos 3,5-dicafeoilquínico e 4,5-dicafeoilquínico. Este trabalho permitiu também traçar um perfil da bioatividade dos metabólitos secundários das folhas de *C. hispida* através do fornecimento de extratos e compostos isolados para a realização de testes biológicos por outros grupos de pesquisa, tais como medidas do poder antioxidante contra o radical DPPH e da proteção de leucócitos num meio que provoca lise, e avaliação das atividades fungitóxica, alelopática, antimicrobiana e inibitória da acetilcolinesterase.

Palavras-chave: *Calea hispida*. Óleos essenciais. Compostos fenólicos. 6-acetil-7-hidroxi-2,2-dimetilcromeno. Quercitrina. Fungitoxicidade.

ABSTRACT

This research work aimed to study, chemically, the leaves of *Calea hispidula* Baker, Asteraceae, that grows *in natura* in the Second Plateau of Paraná State by assessing the potential bioactivity of its secondary metabolites. This research was carried out because this is a poorly studied plant species and due to the occurrence of several classes of bioactive compounds in plants of this genus, although this plant is not recognized as medicinal. The leaves were hydrodistilled, in triplicate, to obtain the essential oils and analyze their chemical composition by GC/MS/FID standard techniques. This was the first chemical study of the essential oil from *C. hispidula*, allowing the identification of several oxygenated monoterpenes in low proportions, such as α -terpineol, *cis*-sabinol, verbenone, and bornylacetate, not oxygenated sesquiterpenes in individual percentages below 5.2%, such as β -cubebene, germacrene D, and β -selinene, and oxygenated sesquiterpenes that totaled between 7.86 to 11.46% in the replicates, such as (*E*)-nerolidol, spathulenol, and viridiflorol. Additionally, three compounds containing an aromatic ring in their chemical structures totaled between 31.43 and 56.20% of essential oils: 2,6-dibutyl-4-methylphenol (0.39 to 1.44%), (*Z*)-3-hexenyl benzoate (0.40 to 0.43%), and a major compound found in proportions between 30.21 and 54.76% which could not be identified by GC/MS. The major volatile unidentified substance was isolated by fractionation of the essential oil by means of a chromatography column. Its chemical structure was assessed by UV-Vis, FT-IR, ^1H and ^{13}C NMR spectra, which allowed the identification of 6-acetyl-7-hydroxy-2,2-dimethylchromene. In parallel, the isolated chromene was provided for studies of its crystal structure by X-ray diffraction methods. Extractions with chloroform from aqueous solutions that remained after hydrodistillation of leaves aimed to remove less polar substances, so extracts containing phenolic compounds could be obtained. Thus, ethyl acetate and ethyl acetate/methanol 30% extracts were obtained at pH 8 to achieve extracts containing solid neutral phenolic substances, as well as at pH 4 (for acidic phenolic compounds). An ethyl acetate/methanol extract at pH 8 presented only one main phenolic substance which was identified as quercetin-3-O-rhamnopyranoside by analysis of its UV, FT-IR, and ^1H and ^{13}C NMR spectra. Preliminary analyzes of extracts obtained at pH 4 showed that the acidic phenolic compounds are an important class of substances in *C. hispidula*, consisting mainly of caffeic acid derivatives, such as 3,5-dicaffeoylquinic and 4,5-dicaffeoylquinic. This work also allowed the determination of the bioactivity profile of the secondary metabolites from leaves of *C. hispidula* by providing extracts and isolated compounds for biological tests, such as antioxidant capacity against DPPH radical, protection of leukocytes in a medium that causes lysis, and evaluation of fungitoxic, allelopathic, antimicrobial, and inhibitory acetylcholinesterase activities.

Keywords: *Calea hispidula*. Essential oils. 6-acetyl-7-hidroxy-2,2-dimethylchromene. Phenolic compounds. Quercitrin. Fungitoxicity.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Partes aéreas de <i>Calea hispida</i>	16
FIGURA 2 - Compostos presentes em óleos essenciais de espécies do gênero <i>Calea</i>	18
FIGURA 3 - Lactonas sesquiterpênicas de <i>C. harleyi</i> , angelato de 8-desacilacetilchaplantina 10 , e de <i>C. urticifolia</i> , 2,3-epóxi-calealactona A 11 e partenolídeo 12	20
FIGURA 4 - Alguns compostos presentes em <i>C. hispida</i> : os furanoheliangolídeos 13-15 , heliangolídeo 16 , derivado mirtênico 17 e os sesquiterpenos acetilados 18 e 19	20
FIGURA 5 - Estruturas químicas de derivados de timol de <i>C. nelsonii</i> , isobutirato de 10-acetoxi-8,9-desidrotimol 20 , e de <i>C. hispida</i> 21-24	21
FIGURA 6 - Derivado <i>p</i> -hidroxicinamato 25 presente em <i>C. hispida</i>	22
FIGURA 7 - Benzofuranos isolados de <i>C. platylepis</i> : euparina 26 , caleprunina A 27 , caleprunina B 28 e euparona 29	22
FIGURA 8 - Substâncias presentes em <i>C. uniflora</i> : 2-senecioloil-4-(hidroxietil)-fenol 30 e 2-senecioloil-4-(pentadecanoiloxietil)-fenol 31 ; em <i>C. harleyi</i> : 9- <i>o</i> -diidrocalefoliona 32 ; e em <i>C. hispida</i> : dihidroxidesidromentona 33	23
FIGURA 9 - Cromenos de <i>C. hispida</i> : 1-(2,2,7-trimetilcromen-6-il)-propan-1-ona 34 , 6-acetil-7-hidroxi-2,2-dimetilcromeno 35 , 2-hidroxi-1-(2,2,7-trimetilcromen-6-il)-etanona 36 e 2-hidroxi-1-(7-hidroxi-2,2-dimetilcromen-6-il)-etanona 37	24
FIGURA 10 - Glicosídeos de espécies <i>Calea</i> : isoquercitrina 38 de <i>C. uniflora</i> e rutina 39 de <i>C. prunifolia</i>	25
FIGURA 11 - Ácido 3,5-di- <i>O</i> -[<i>E</i>]-cafeoilquínico 40 , isolado de <i>C. prunifolia</i>	26
FIGURA 12 - Esquema de obtenção de óleos essenciais e frações orgânicas de <i>C. hispida</i>	38
FIGURA 13 - Espectros de UV-Vis do óleo essencial de <i>C. hispida</i>	53
FIGURA 14 - Espectro infravermelho do óleo essencial de <i>C. hispida</i>	53
FIGURA 15 - CCD de óleos essenciais de <i>Calea hispida</i>	54
FIGURA 16 - Espectros de UV-Vis da substância CHCR isolada do óleo essencial	55
FIGURA 17 - Espectro de IV do composto CHCR isolado do óleo essencial	55
FIGURA 18 - Estrutura química do 6-acetil-7-hidroxi-2,2-dimetilcromeno 35	57
FIGURA 19 - Análises por CCD da substância isolada CHAM reveladas com H ₂ SO ₄ /MeOH e com FeCl ₃ /MeOH	59
FIGURA 20 - Espectros de UV-Vis da substância CHAM em metanol e com adição de reagentes de deslocamento	60

FIGURA 21 - Espectro de infravermelho da quercitrina 41 isolada, medido em KBr	60
FIGURA 22 - Estrutura química do quercetin-3-O-ramnopiranosídeo 41 e numeração usual de sua cadeia carbônica	61
FIGURA 23 - Estruturas químicas dos ácidos 3,5-dicafeoilquínico 40 , 4,5-dicafeoilquínico 42 e 3-cafeoilquínico 43	63
FIGURA 24 - CCD sobre placas de sílica comparando a quercitrina 41 (CHAM) e o extrato CHA4	64
FIGURA 25 - Espectros de UV-Vis da fração CHA4E	65
FIGURA 26 - Espectro de infravermelho da fração CHA4E medido em KBr	66
FIGURA 27 - Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) em várias concentrações das quatro substâncias testadas <i>in vitro</i> contra <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , com resultados significativos no teste de Tukey	68
FIGURA 28 - Porcentagem de inibição do radical DPPH <i>versus</i> concentração do óleo essencial (CHOE) do cromoeno 35 em comparação com o controle de vitamina C	70
FIGURA 29 - Viabilidade celular de leucócitos <i>versus</i> concentração de substâncias voláteis (óleo essencial CHOE e CHCR 35)	71

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Rendimento das triplicatas do óleo essencial	47
TABELA 2 - Composição química dos óleos essenciais de folhas de <i>C. hispida</i>	48
TABELA 3 - Tratamento estatístico dos resultados dos testes de normalidade, teste F e teste t do óleo essencial	50
TABELA 4 - Deslocamentos químicos nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C do composto CHCR (CDCl_3) isolado, em comparação com dados publicados para o 6-acetil-7-hidroxi-2,2-dimetilcromeno 35	58
TABELA 5 - Rendimentos de todos os extratos obtidos em pH 8	58
TABELA 6 - Deslocamentos químicos nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C da quercitrina 41 isolada de <i>C. hispida</i> , em comparação com dados publicados (CD_3OD)	62
TABELA 7 - Rendimentos de todos os extratos obtidos em pH 4	62
TABELA 8 - Frações da coluna cromatográfica do extrato CHA4	64
TABELA 9 - Resultado do teste de Tukey do efeito do óleo essencial (CHOE), extrato aquoso (CHEA), 6-acetil-7-hidroxi-2,2-dimetilcromeno 35 e quercitrina 41 no experimento sobre o índice de velocidade de crescimento de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em diferentes concentrações	68
TABELA 10 - Resultados das determinações da concentração inibitória mínima em porcentagem (CIM) da quercitrina 41 <i>in vitro</i> contra várias estirpes de bactérias e leveduras, comparando com padrão de cloranfenicol	70

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

CHA4A	<i>Calea hispida</i> acetato de etila pH 4 fração A
CHA4B	<i>Calea hispida</i> acetato de etila pH 4 fração B
CHA4C	<i>Calea hispida</i> acetato de etila pH 4 fração C
CHA4D	<i>Calea hispida</i> acetato de etila pH 4 fração D
CHA4E	<i>Calea hispida</i> acetato de etila pH 4 fração E
CHA4F	<i>Calea hispida</i> acetato de etila pH 4 fração F
CHA4G	<i>Calea hispida</i> acetato de etila pH 4 fração G
CHOE	<i>Calea hispida</i> óleo essencial
CHA4	<i>Calea hispida</i> acetato de etila pH 4
CHApH8	<i>Calea hispida</i> acetato de etila pH 8
CHAM	<i>Calea hispida</i> acetato de etila/metanol pH 8
CHAMpH4	<i>Calea hispida</i> acetato de etila/metanol pH 4
CHEA	<i>Calea hispida</i> extrato aquoso
CHCR	<i>Calea hispida</i> cristal
BDA	Batata, Dextrose, Ágar
BOD	Demanda biológica de oxigênio
CG/EM/DIC	Cromatografia a gás acoplada a detectores de massa e de ionização de chama
DPPH	Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfer
d	Dubleto
Hz	Hertz
IC ₅₀	Concentração inibitória para 50%
IRR _{cal}	Média dos índices de retenção relativa calculado
IRR _{lit}	Índice de retenção relativos publicados
IV	Infravermelho
J	Constante de acoplamento
m	Multipleto
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono-13
s	Singleto
sl	Singleto largo
λ	Comprimento de onda
δ	Deslocamento químico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 BOTÂNICA E OCORRÊNCIA NATURAL DAS ESPÉCIES <i>Calea</i>	17
1.2 ESTUDOS QUÍMICOS SOBRE ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Calea</i>	17
1.2.1 Óleos essenciais	17
1.2.2 Lactonas sesquiterpênicas	19
1.2.3 Derivados do timol	21
1.2.4 Derivado eudesmeno	21
1.2.5 Benzofuranos	22
1.2.6 <i>p</i> -Hidroxiacetofenonas	23
1.2.7 Benzopiranos	24
1.2.8 Flavonoides do gênero <i>Calea</i>	25
1.2.9 Ácidos cafeoilquínicos	26
1.2.10 Toxicidade	26
1.3 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE <i>Calea</i>	27
2 JUSTIFICATIVA	29
3 DELIMITAÇÃO DO PROBLEMA	31
4 HIPÓTESES	32
5 OBJETIVOS	33
5.1 OBJETIVO GERAL	33
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
6 EQUIPAMENTOS E REAGENTES	34
7 MÉTODOS	35
7.1 COLETA, IDENTIFICAÇÃO E PREPARO DE MATERIAIS VEGETAIS	35
7.2 OBTENÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS	35
7.3 ANÁLISE DE ÓLEOS ESSENCIAIS	36
7.4 FRACIONAMENTO DO EXTRATO AQUOSO DE <i>C. hispida</i>	37
7.4.1 Fracionamento do extrato obtido com acetato de etila em pH 4	40
7.5 FRACIONAMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Calea hispida</i>	40
7.6 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS	41

7.6.1 Ação fungitóxica contra <i>Fusarium graminearum</i> e <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	41
7.6.2 Avaliação da bioatividade de substâncias voláteis	42
7.6.3 Avaliação da bioatividade do composto fenólico isolado CHAM	44
7.6.4 Atividade tripanocida e estrutura cristalina	45
7.7 DADOS ESPECTROSCÓPICOS.....	45
7.7.1 Óleo essencial	45
7.7.2 Composto CHCR isolado do óleo essencial	45
7.7.3 Extrato AcOEt/MeOH em pH 8, CHAM	46
7.7.4 Fração CHA4E do extrato AcOEt/MeOH em pH 4	46
8 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
8.1 ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL	47
8.2 ESTRUTURA QUÍMICA DO COMPOSTO CHCR	53
8.3 ESTRUTURA QUÍMICA DO COMPOSTO CHAM	58
8.4 CONSTITUINTES FENÓLICOS ÁCIDOS DE <i>Calea hispida</i>	62
8.5 AÇÃO FUNGITÓXICA DE <i>Calea hispida</i>	67
8.6 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA QUERCETRINA 41	69
8.7 AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DE SUBSTÂNCIAS VOLÁTEIS	70
9 CONCLUSÕES	72
10 REFERÊNCIAS.....	73
11 ANEXOS	79
ANEXO 1 - Espectro de RMN ¹³ C de 6-acetil-7-hidroxi-2,2-dimetilcromeno 35 (CHCR, CDCl ₃ , Tabela 4, item 8.2)	79
ANEXO 2 - Ampliações do espectro de RMN ¹³ C de 6-acetil-7-hidroxi-2,2-dimetilcromeno 35 (CHCR, CDCl ₃ , Tabela 4, item 8.2)	80
ANEXO 3 - Espectro de RMN ¹³ C DEPT135 de 6-acetil-7-hidroxi-2,2-dimetilcromeno 35 (CHCR, CDCl ₃ , Tabela 4, item 8.2)	80
ANEXO 4 - Espectro de RMN ¹ H de 6-acetil-7-hidroxi-2,2-dimetilcromeno 35 (CHCR, CDCl ₃ , Tabela 4, item 8.2)	81
ANEXO 5 – Ampliação do espectro de RMN ¹ H de 6-acetil-7-hidroxi-2,2-dimetilcromeno 35 (CHCR, CDCl ₃ , Tabela 4, item 8.2)	81
ANEXO 6 - Espectro de RMN ¹³ C de quercetin-3-O-ramnopiranosídeo 41 (CHAM, CD ₃ OD, Tabela 6, item 8.3)	82
ANEXO 7 – Ampliações do espectro de RMN ¹³ C de quercetina-3-O-ramnopiranosídeo 41 (CHAM, CD ₃ OD, Tabela 6, item 8.3)	83
ANEXO 8 - Espectro de RMN ¹³ C DEPT90 de quercetina-3-O-ramnopiranosídeo 41 (CHAM, CD ₃ OD, Tabela 6, item 8.3)	84
ANEXO 9 – Ampliação do espectro de RMN ¹³ C DEPT90 de quercetina-3-O-ramnopiranosídeo 41 (CHAM, CD ₃ OD, Tabela 6, item 8.3)	84

ANEXO 10 - Espectro de RMN ^1H de quercetina-3-O-ramnopiranosídeo 41 (CHAM, CD_3OD , Tabela 6, item 8.3)	85
ANEXO 11 – Ampliações do espectro de RMN ^1H de quercetina-3-O-ramnopiranosídeo 41 (CHAM, CD_3OD , Tabela 6, item 8.3)	86

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Calea* pertence à família Asteraceae, com espécies que ocorrem em diversos países das Américas, incluindo o Brasil. Diversas espécies desse gênero têm sido estudadas quimicamente quanto aos seus óleos essenciais, terpenoides, acetofenonas, benzopiranos e flavonoides. As atividades biológicas dos componentes isolados de espécies desse gênero despertam a atenção pelas suas intensidades e diversidades: são compostos ativos sobre o sistema nervoso central, antiinflamatórios, vasodilatadores anti-hipertensivos, antileishmania, antioxidantes, acaricidas, antifúngicos, antimicrobianos, citotóxicos, etc. Os óleos essenciais das várias espécies *Calea* estudadas apresentam tanto terpenoides com atividades biológicas moderadas, como compostos fenólicos derivados do timol, os quais são os principais responsáveis pelas atividades biológicas reportadas para as substâncias voláteis. Também têm sido encontrados muitos germacranolídeos (lactonas sesquiterpênicas) com intensas atividades biológicas. Dentre os compostos isolados de espécies *Calea*, destacam-se os derivados da *p*-hidroxiacetofenona, que podem apresentar atividades antiinflamatória, tripanocida e antifúngica. Além desses, também é comum a ocorrência de 5-desoxiflavonas livres ou como glicosídeos. Apenas em um trabalho relativamente mais recente foi encontrado um derivado do ácido quínico. A espécie *Calea hispida* (Figura 1), objeto de estudo da presente pesquisa, não é conhecida por nenhum uso popular no tratamento de doenças ou sintomas, e suas folhas e raízes já foram anteriormente objeto de estudo químico. É apresentado a seguir um levantamento bibliográfico sobre as características botânicas, a química e as atividades biológicas dos metabólitos secundários encontrados em espécies do gênero *Calea*.

FIGURA 1 - Partes aéreas de *Calea hispida*



Fonte: A autora

1.1 BOTÂNICA E OCORRÊNCIA NATURAL DAS ESPÉCIES *Calea*

A família Asteraceae pertence ao grupo numeroso das Angiospermas, abrangendo cerca de 1.535 gêneros e aproximadamente 25.000 espécies, e representa cerca de 10% da flora mundial (BREMER, 1996), sendo separadas em três subfamílias: Barnadesioideae, Cichorioideae e Asteroideae, com distribuições bem representadas em regiões tropicais, subtropicais e temperadas (BARROSO et al., 1991; JOLY, 1991). A família das Asteraceae vem sendo estudada não somente quanto à sua morfologia, anatomia e ecologia, mas também quanto à sua química.

O gênero *Calea* pertence à tribo Heliantheae e à subtribo Melampodiinae, e a maioria das espécies são encontradas nas regiões subtropicais do continente Americano. Este gênero contém cerca de 110 espécies, com um grande número de ocorrências no México, América do Sul, América Central inclusive no Brasil (NASCIMENTO & SALVADOR, 2004).

1.2 ESTUDOS QUÍMICOS SOBRE ESPÉCIES DO GÊNERO *Calea*

1.2.1 Óleos essenciais

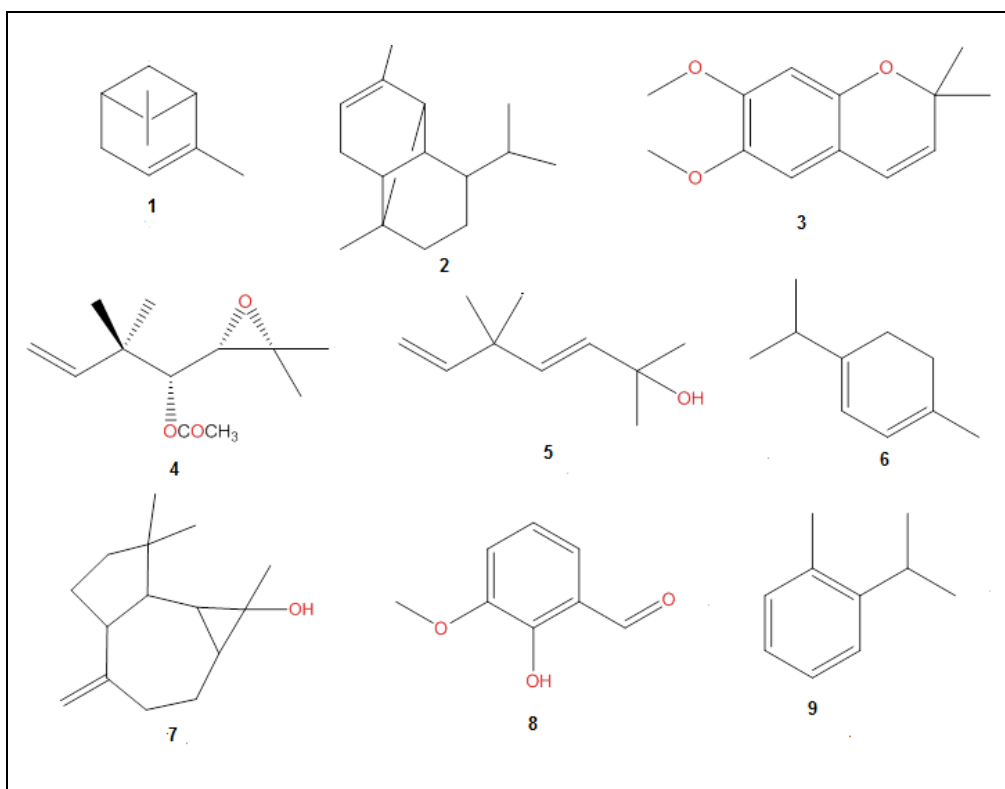
Apenas três estudos sobre a composição química de óleos essenciais de espécies do gênero *Calea* foram publicados. A Figura 1 apresenta exemplos de substâncias voláteis encontradas nesse gênero botânico, as quais são geralmente extraídas por arraste de vapor ou por hidrodestilação.

Os constituintes do óleo essencial de *Calea pinnatifida* Banks ex Steud. foram determinados, obtendo-se rendimento de 0,2%. Monoterpenos tais como α -pineno **1**, sabineno, β -pineno, mirceno e α -felandreno, e os sesquiterpenos α -copaeno **2**, cariofileno, humuleno e α -cadineno foram identificados, além dos voláteis contendo anel aromático *p*-cimeno, *o*-cimeno e *O*-metiltimol (KATO et al., 1994).

O óleo essencial de *Calea serrata* Less. foi analisado para determinação da composição química, obtendo-se um rendimento de 0,1%. Foram identificadas 18 substâncias totalizando 99,1% da composição do óleo essencial, formado principalmente por sesquiterpenos, mas que apresenta 29,6% do cromoeno precoceno II **3** (RIBEIRO et al., 2011).

Foram realizados estudos sobre a composição química de óleos essenciais de *Calea clematidea* Baker obtido por hidrodestilação das folhas e flores. Um composto com atividade antifúngica que aparece em maior proporção nas folhas nessa espécie vegetal foi identificado como clemateol **4**. Outros compostos foram detectados nas folhas em menor proporção, tais como o álcool monoterpênico yomogi **5**, os monoterpenos α -terpineno **6**, *m*-cimeno, os hidrocarbonetos sesquiterpênicos germacreno B, cariofileno e α -gurjuneno, o sesquiterpeno oxigenado espatulenol **7**, além de *o*-vanilina **8**. No óleo essencial das flores de *C. clematidea* apareceu em maior proporção o *O*-metiltimol, detectando-se os monoterpenos clemateol **4** e *o*-cimeno **9** em menor proporção (FLACH et al., 2002).

FIGURA 2 - Compostos presentes em óleos essenciais de espécies do gênero *Calea*



Fonte: A autora

Em alguns estudos, substâncias voláteis não foram extraídas pela técnica de arraste de vapor ou hidrodestilação, mas sim por fracionamento de extratos obtidos com solvente orgânico. Por exemplo, alguns sesquiterpenos foram isolados a partir do extrato éter de petróleo no estudo das folhas de *C. hispida*: germacreno D, cariofileno, humuleno, biciclogermacreno (BOHLMANN et al., 1982). Em outro caso, o sesquiterpeno (+)-4 α ,7 β -aromadendranodiol foi obtido de um extrato

diclorometânico das folhas de *Calea platylepis* Sch.Bip ex Baker (NASCIMENTO et al., 2004a).

Compostos com estruturas de cromenos apresentam importantes bioatividades (item 1.3). Como comentado acima, o precoceno II **3** foi obtido com uso da técnica da hidrodestilação (RIBEIRO et al., 2011), normalmente utilizada no estudo de óleos essenciais. O uso das técnicas de arraste de vapor ou hidrodestilação pode ser considerado recomendável no estudo de cromenos presentes em espécies *Calea*, evitando-se a utilização de extratos com solventes, os quais geralmente levam à obtenção de substâncias de diversas classes de compostos naturais, causando dificuldades nas fases de isolamento e análise.

1.2.2 Lactonas sesquiterpênicas

Alguns estudos sobre a composição química de lactonas sesquiterpênicas presentes em espécies do gênero *Calea* foram publicados, incluindo a espécie *C. hispida* (BOHLMANN et al., 1982), planta estudada na presente pesquisa. As Figuras 3 e 4 apresentam exemplos de lactonas sesquiterpênicas e sesquiterpenos acetilados encontrados nesse gênero botânico.

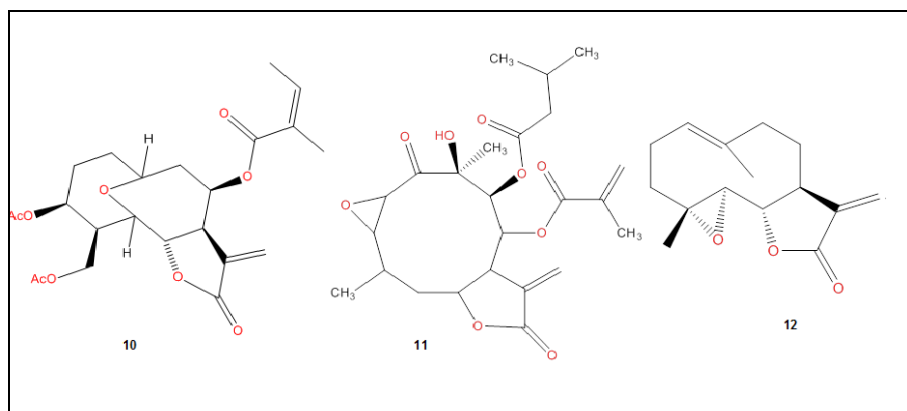
Um estudo químico sobre *Calea prunifolia* Kunth revelou como principais constituintes várias lactonas sesquiterpênicas já identificadas em espécies de outros gêneros botânicos (PUEBLA et al., 2011).

Do extrato obtido com éter de petróleo-metanol das partes aéreas de *Calea harleyi* H.Rob. foram isolados os germacranolídeos angelato de 8-desacilacetilchapiatrina **10**, caleharloide-8-O-[*ent*-2',3'-epoxi-2'-metilbutirato] e caleharloide-8-O-[2'-hidroxi-2'-metil-but-3'-enoato] (BOHLMANN et al., 1984).

Várias lactonas sesquiterpênicas, como calealactona C, caleína D, caleína A, calealactona E e 8 β -angeloxi-9 α -acetiloxicaliculatolídeo, foram isoladas de *Calea zacatechichi* Schltdl. (WU et al., 2011).

As folhas de *Calea urticifolia* DC. também produzem compostos sesquiterpênicos com estruturas químicas do grupo dos germacranolídeos tais como a 2,3-epóxi-calealactona A **11** e partenolídeo **12** (NAKAGAWA et al., 2005).

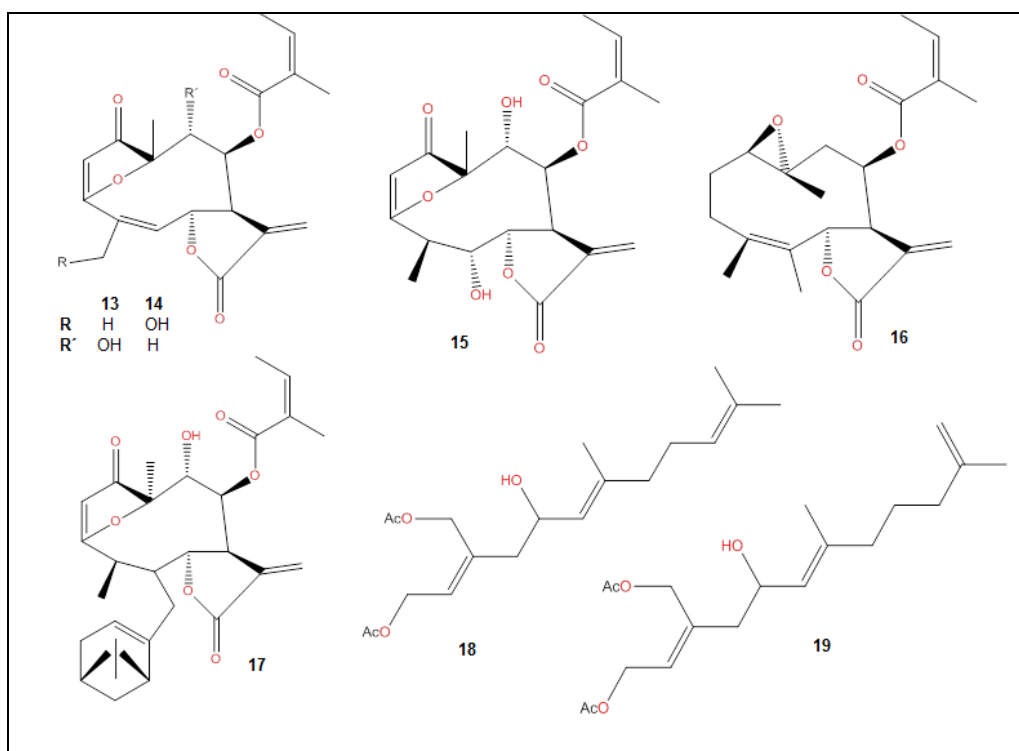
FIGURA 3 - Lactonas sesquiterpênicas de *C. harleyi*, angelato de 8-desacilacetil-chapliantrina **10**, e de *C. urticifolia*, 2,3-epóxi-calealactona A **11** e partenolídeo **12**



Fonte: A autora

Do extrato obtido com éter de petróleo das folhas de *C. hispida* foram isoladas algumas lactonas sesquiterpênicas: os furanoheliangolídeos **13-15**, o heliangolídeo **16**, e um interessante derivado contendo um grupo mirtenila **17**. Também foram encontrados dois sesquiterpenos acetilados derivados do farnesol: 15-acetoxi-5-hidroxifarnesilacetato **18** e 15-acetoxi-5,10-diidroxi-12,13-desidro-10,11-diidrofarnesilacetato **19** (BOHLMANN et al., 1982).

FIGURA 4 - Alguns compostos presentes em *C. hispida*: os furanoheliangolídeos **13-15**, heliangolídeo **16**, derivado mirtenila **17** e os sesquiterpenos acetilados **18** e **19**



Fonte: A autora

1.2.3 Derivados do timol

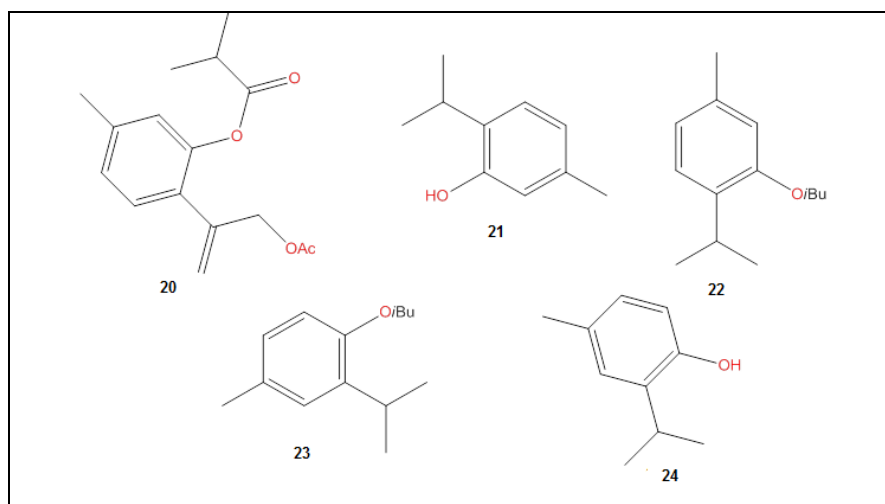
Apenas três estudos sobre a composição química de timóis presentes em espécies do gênero *Calea* foram publicados, incluindo um trabalho sobre *C. hispida*, objeto de estudo na presente pesquisa. A Figura 5 apresenta exemplos de derivados do timol encontrados nesse gênero botânico.

Das partes aéreas de *Calea nelsonii* B.L.Rob. & Greenm. foram isolados compostos derivados de timol tais como isobutirato de 10-acetoxi-8,9-desidrotimol **20**, 10-acetoxi-8-hidroxi-1,9-diisobutiriloxitimol e 7,9-diisobutiriloxi-8-metoxitimol, com uso de extrações em seqüência com hexano, clorofórmio e acetona (MALDONADO et al.,1992).

Um estudo químico sobre *C. harleyi* revelou como principais constituintes vários derivados de timol já identificados em espécies de outros gêneros botânicos (BOHLMANN et al., 1984).

No único estudo químico realizado anteriormente sobre as raízes de *C. hispida*, foram encontrados os derivados de timol **21-24**, que já haviam sido relatados para outras espécies de *Calea* (BOHLMANN et al., 1982).

FIGURA 5 - Estruturas químicas de derivados de timol de *C. nelsonii*, isobutirato de 10-acetoxi-8,9-desidrotimol **20**, e de *C. hispida* **21-24**



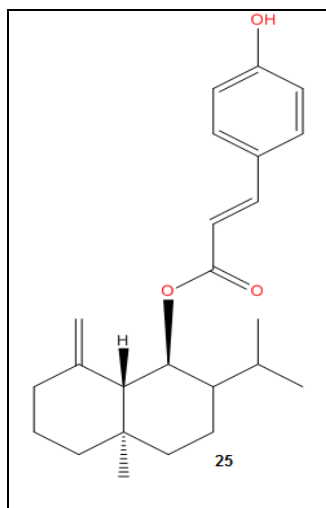
Fonte: A autora.

1.2.4 Derivado eudesmeno

No único estudo químico realizado anteriormente sobre as raízes de *C. hispida*, foi encontrado o derivado eudesmeno **25** (Figura 6), cuja ocorrência ainda

não foi relatada em nenhuma outra espécie vegetal. Essa é uma estrutura incomum formada pela junção entre o *p*-hidroxicinamato e o sesquiterpeno eudesmeno (BOHLMANN et al., 1982).

FIGURA 6 - Derivado *p*-hidroxicinamato **25** presente em *C. hispida*

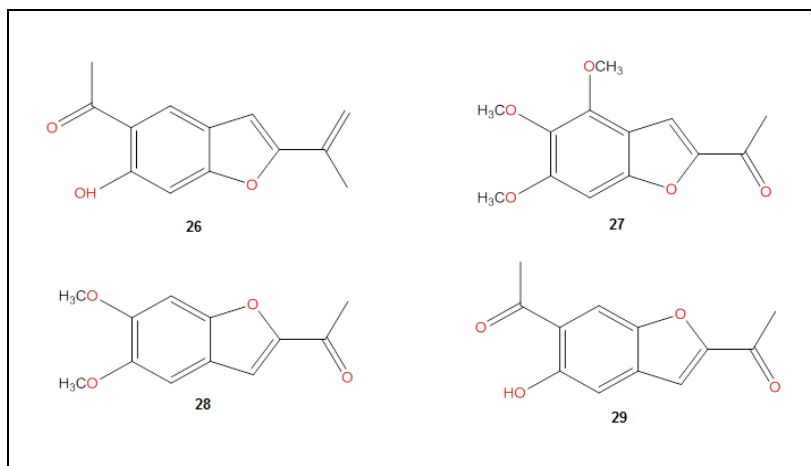


Fonte: A autora

1.2.5 Benzofuranos

Apenas um estudo sobre os compostos da classe dos benzofuranos foi realizado no gênero *Calea*, mais especificamente na espécie botânica *C. platylepis*. Os compostos isolados, a partir do extrato diclorometânico das raízes da planta, são os benzofuranos euparina **26**, caleprunina A **27**, caleprunina B **28** e euparona **29**, cujas estruturas são mostradas na Figura 7 (NASCIMENTO et al., 2004a).

FIGURA 7 - Benzofuranos isolados de *C. platylepis*: euparina **26**, caleprunina A **27**, caleprunina B **28** e euparona **29**



Fonte: A autora

1.2.6 *p*-Hidroxiacetofenonas

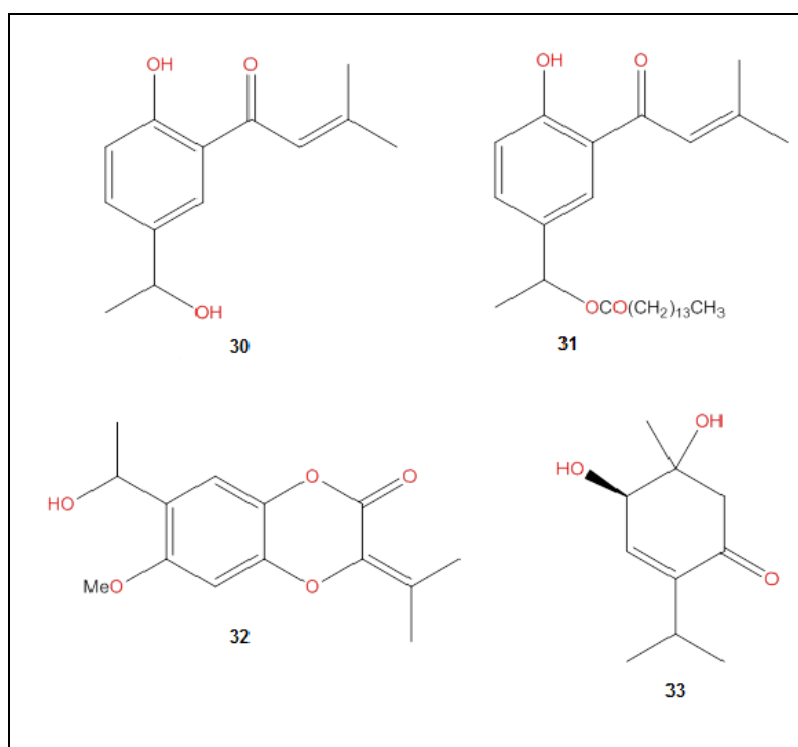
Três estudos sobre a presença de *p*-hidroxiacetofenonas em espécies do gênero *Calea* foram publicados. Um desses relatos é aquele já mencionado artigo de Bohlmann e colaboradores (1982) sobre *C. hispida*. A Figura 8 apresenta exemplos de derivados de *p*-hidroxiacetofenonas encontrados no gênero *Calea*.

A partir do extrato diclorometânico das raízes de *Calea uniflora* Less. foram isolados quatro derivados da *p*-hidroxiacetofenona novos e duas substâncias já conhecidas, o 2-senecioil-4-(hidroxietil)-fenol **30** e 2-senecioil-4-(angeloxietil)-fenol, além de duas novas substâncias: o 2-senecioil-4-(metoxietil)-fenol e 2-senecioil-4-(pentadecanoiloxietil)-fenol **31** (NASCIMENTO et al., 2004b).

Há um relato sobre a presença de dois derivados de *p*-hidroxiacetofenona nas partes aéreas de *C. harleyi*, os quais foram isolados do extrato éter de petróleo: 9-*o*-diidrocalefoliona **32** e angelato de 9-*o*-diidrocalefoliona (BOHLMANN et al., 1984).

No estudo anterior sobre a composição química de partes aéreas de *C. hispida*, foi isolado e identificado um derivado novo da *p*-hidroxiacetofenona, a dihidroxidesidromentona **33** (BOHLMANN et al., 1982).

FIGURA 8 - Substâncias presentes em *C. uniflora*: 2-senecioil-4-(hidroxietil)-fenol **30** e 2-senecioil-4-(pentadecanoiloxietil)-fenol **31**; em *C. harleyi*: 9-*o*-diidrocalefoliona **32**; e em *C. hispida*: dihidroxidesidromentona **33**



Fonte: A autora

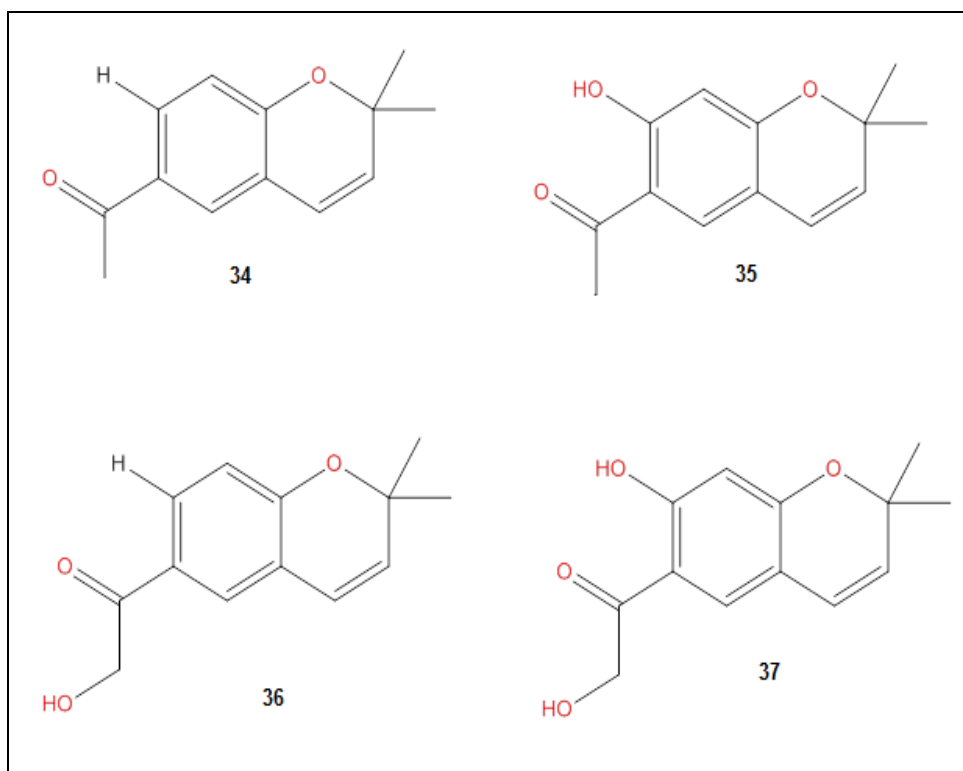
1.2.7 Benzopiranos

Dois estudos sobre a composição química do grupo dos benzopiranos de espécies do gênero *Calea* foram publicados, incluindo a espécie *C. hispida*, planta de interesse para esta pesquisa. A Figura 9 apresenta exemplos de benzopiranos encontrados no gênero *Calea*.

Os cromenos são derivados de benzopiranos, os quais representam uma classe de produtos naturais importante pelas suas propriedades biológicas. Um estudo das folhas e caules de *C. serrata* foi realizado a fim de isolar o precoceno II **3** do óleo essencial dessa espécie (RIBEIRO et al., 2011).

De particular importância para a pesquisa desenvolvida no presente estudo, foram isolados derivados de cromenos das raízes de *C. hispida*: 1-(2,2,7-trimetilcromen-6-il)-propan-1-ona **34**, 6-acetil-7-hidroxi-2,2-dimetilcromeno **35**, 2-hidroxi-1-(2,2,7-trimetilcromen-6-il)-etanona **36** e 2-hidroxi-1-(7-hidroxi-2,2-dimetilcromen-6-il)-etanona **37** (BOHLMANN et al., 1982). Essa classe de compostos foi encontrada somente nas duas mencionadas espécies do gênero *Calea*.

FIGURA 9 - Cromenos de *C. hispida*: 1-(2,2,7-trimetilcromen-6-il)-propan-1-ona **34**, 6-acetil-7-hidroxi-2,2-dimetilcromeno **35**, 2-hidroxi-1-(2,2,7-trimetilcromen-6-il)-etanona **36** e 2-hidroxi-1-(7-hidroxi-2,2-dimetilcromen-6-il)-etanona **37**



Fonte: A autora

1.2.8 Flavonoides do gênero *Calea*

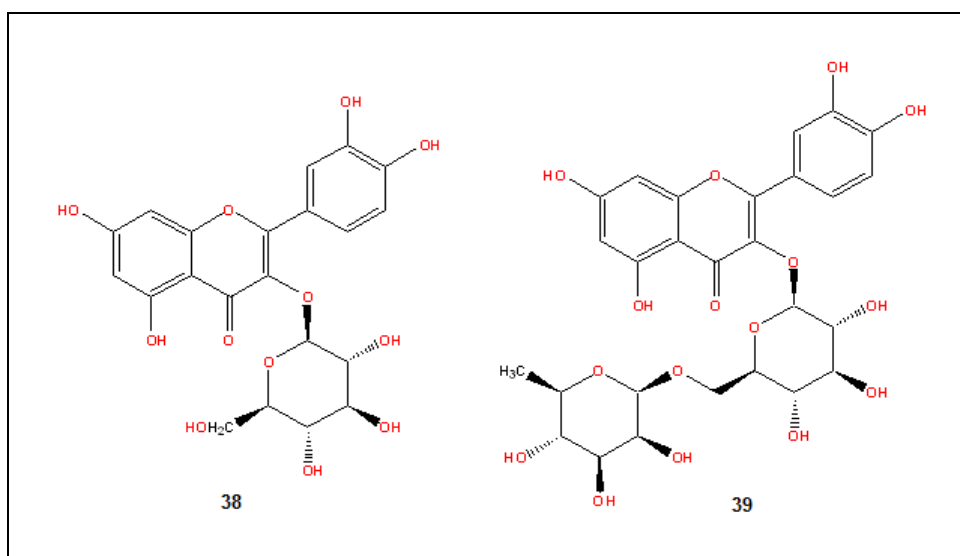
Os flavonoides são os compostos de maior ocorrência, sendo considerados bons marcadores quimiotaxonômicos para os mais baixos níveis hierárquicos da família Asteraceae (VERDI et al., 2005).

Aproximadamente 2% de todos os carbonos fotossintetizados por plantas são convertidos em flavonoides, sendo os taninos também convertidos nestas substâncias. Os flavonoides são constituintes do largo grupo que reúne os chamados fenóis naturais. Os flavonoides ocorrem em variadas formas estruturais, incluindo as que estão ligadas a moléculas de carboidratos. As hidroxilas presentes em certas posições, tais como C₇ e C₃, tem grande probabilidade de glicosilação por uma ou mais moléculas de açúcar (MARKHAM, 1982).

No estudo do extrato diclorometânico-etanólico das partes aéreas de *C. uniflora* foram isolados e identificados quatro glicosídeos de flavonoides: 3',4',7-triidroxiflavona-7-O-β-glucopiranosídeo; 2',4-diidroxí-3-metoxichalcona-4'-O-β-glucopiranosídeo e quercetina-3-O-β-glucopiranosídeo **38**, também conhecida como isoquercitrina (Figura 10). As estruturas desses glicosídeos foram determinadas com base nos espectros de RMN ¹H e ¹³C (NASCIMENTO & SALVADOR, 2004).

Foi isolado do extrato etanólico das folhas de *C. prunifolia* o flavonol glicosídeo rutina **39** (Figura 10), identificado por comparação dos espectros de RMN ¹H e ¹³C com dados publicados (PUEBLA et al., 2011).

FIGURA 10 – Glicosídeos de espécies *Calea*: isoquercitrina **38** de *C. uniflora* e rutina **39** de *C. prunifolia*

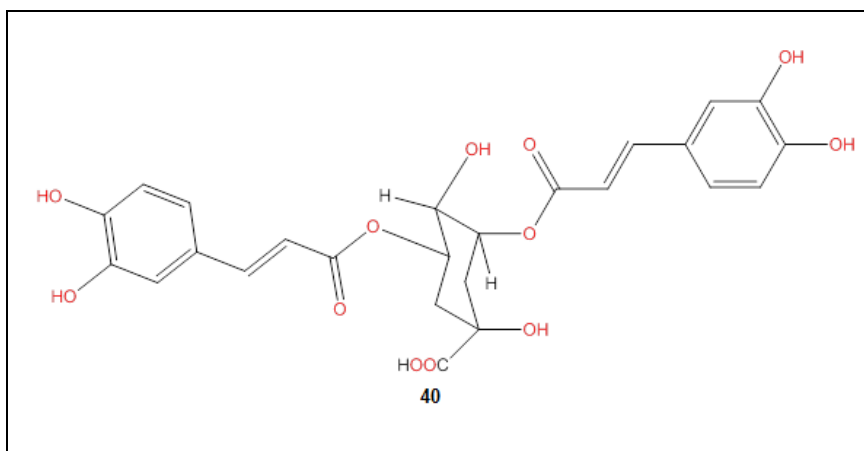


Fonte: A autora

1.2.9 Ácidos cafeoilquínicos

Até agora, somente em um estudo publicado sobre o gênero *Calea* foram encontrados ácidos cafeoilquínicos. O fracionamento do extrato etanólico das folhas de *C. prunifolia* permitiu o isolamento e identificação do ácido 3,5-di-O-[*E*]-cafeoilquínico **40** (Figura 11) por comparação dos dados espectroscópicos de RMN ^1H e ^{13}C com resultados publicados (PUEBLA et al., 2011).

FIGURA 11 - Ácido 3,5-di-O-[*E*]-cafeoilquínico **40**, isolado de *C. prunifolia*



Fonte: A autora

1.2.10 Toxicidade

Alguns estudos foram publicados sobre os componentes de espécies do gênero *Calea* que apresentam efeitos tóxicos e/ou citotóxicos em seres vivos.

Estudos sobre a toxicidade de *C. serrata* foram realizados, especialmente a respeito dos precocenos, os quais têm se mostrado causadores de hepatotoxicidade em ratos. A toxicidade de *C. serrata* foi atribuída aos cromenos ou às interações sinérgicas entre estes componentes e outros constituintes do óleo essencial da planta (RIBEIRO et al., 2011).

Em ensaios de citotoxicidade utilizados na procura por substâncias anticancerígenas possivelmente presentes em diversas espécies de diferentes gêneros, extratos da espécie *Calea glomerata* Klatt incluída naquele estudo apresentaram resultados negativos (ROYERO et al., 2010).

O estudo químico de *C. urticifolia* foi realizado, testando-se a atividade biológica de seis lactonas sesquiterpênicas em ensaios de citotoxicidade. Os

germacranolídeos apresentaram atividade contra várias culturas de células de câncer humano. Os arucanolídeos induziram maior citotoxicidade, inclusive superior ao partenolídeo **12**, que tem sido considerado potencialmente anticancerígeno. Segundo o autor, os arucanolídeos são agentes citotóxicos mais potentes que o germacranolídeo partenolídeo **12** (NAKAGAWA et al., 2005).

A toxicidade encontrada para o extrato *n*-hexânico de *C. serrata* pode estar associada à presença de precoceno II **3**, pois este é o principal componente do extrato. Este composto inibiu *in vitro* a AChE (acetilcolinesterase) em diversas áreas do cérebro de ratos Wistar, sugerindo-se a ocorrência de efeitos colaterais e toxicidade em mamíferos devidos a esse extrato (RIBEIRO et al., 2012).

1.3 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Calea*

O gênero *Calea* é conhecido por algumas atividades farmacológicas de seus extratos e substâncias isoladas, tais como atividades antimicrobiana, vasodilatadora, antiinflamatória (GÓMEZ et al., 2011; NASCIMENTO et al., 2004a). Uma investigação química da espécie *C. prunifolia* foi realizada com objetivo de utilizá-la no tratamento de hipertensão arterial, febre alta e malária. Alguns compostos foram reportados pela primeira vez para essa espécie e são importantes para a quimiotaxonomia da família Asteraceae (PUEBLA et al., 2011).

O estudo químico das folhas e caules de *C. zacatechichi* levou ao isolamento de germacranolídeos com importante atividade antileishmania. Estes compostos foram avaliados biologicamente com ensaios antimicrobianos e antiprotozoários. A planta é empregada contra distúrbios gastrointestinais, disenterias, antitérmico, e também são citadas algumas informações sobre efeitos psicotrópicos, os quais deram origem ao interesse pelos constituintes do gênero botânico (WU et al., 2011).

Os extratos vegetais e óleos essenciais de *C. serrata* têm mostrado atividades diversas contra algumas espécies de carrapatos. Essa planta apresenta cromenos (eupatoriocromeno e precoceno II **3**) como componentes principais do extrato *n*-hexânico. O precoceno II **3** pode afetar o sistema endócrino dos insetos e tem um grande potencial acaricida (RIBEIRO et al., 2012). O extrato hexânico de *C. serrata*

apresentou atividade contra fêmeas de ácaros e esse efeito pode ser atribuído aos cromenos encontrados na planta (RIBEIRO et al., 2008).

Os agentes antifúngicos atualmente utilizados em tratamentos terapêuticos têm efeitos tóxicos severos, possuem baixa atividade e baixa solubilidade, e muitas vezes não são eficazes por originarem cepas resistentes (NASCIMENTO et al., 2004a). O desenvolvimento de drogas resistentes a fungos, a interação medicamentosa e biodisponibilidade insuficiente de drogas antifúngicas convencionais têm incentivado a pesquisa por novas alternativas entre os produtos naturais (ROYERO et al., 2010).

As plantas são geralmente utilizadas na medicina popular como agentes antimicrobianos e os óleos essenciais e extratos de *C. glomerata* são conhecidos por possuir atividade antifúngica (ROYERO et al., 2010). O óleo essencial das folhas de *C. clematidea* também foi avaliado como antifúngico e apresentou atividade moderada (FLACH et al., 2002).

Os compostos derivados de *p*-hidroxiacetofenona são ativos contra fungos, parasitas de tecidos queratinizados tais como cabelos e unhas. Os extratos diclorometânicos de folhas e flores de *C. platylepis* mostraram atividade antimicrobiana contra um amplo espectro de microorganismos (bactérias e fungos) (NASCIMENTO et al., 2004a). Dois compostos derivados de *p*-hidroxiacetofenonas isolados do extrato bruto de *C. uniflora* apresentaram atividade contra *Trypanosoma cruzi*. Esses resultados corroboram os efeitos tripanocidas de outros derivados de *p*-hidroxiacetofenonas obtidos de *Senecio graveolens* Wedd. (NASCIMENTO et al., 2004b).

Um estudo sobre o uso de plantas medicinais no tratamento de hipertensão relacionado a atividades vaso-relaxadoras incluiu extratos de *C. glomerata* que apresentaram resultados promissores (GUERRERO et al., 2002).

2 JUSTIFICATIVA

A espécie brasileira *Calea hispida* foi anteriormente estudada apenas uma vez, relatando-se a ocorrência de várias substâncias novas (BOHLMANN et al., 1982). Aquele estudo foi realizado na Alemanha com material vegetal coletado no nordeste brasileiro, não tendo sido especificados com exatidão o local e a época de coleta. Essa espécie vegetal ocorre nos Campos Gerais do Paraná, sendo encontrada na região de Ponta Grossa. Um novo estudo químico dessa espécie vegetal, muito embora não seja conhecida como planta medicinal, justifica-se por tratar-se de uma planta pouco estudada e pela ocorrência de compostos bioativos em outras espécies do gênero. Devido ao crescente interesse pelo desenvolvimento de medicamentos, a ocorrência de substâncias bioativas em plantas tem sido amplamente estudada nos últimos anos por meio de análises químicas e ensaios de atividades biológicas. O aumento do conhecimento científico sobre a flora brasileira facilita o estabelecimento de ações que objetivem a conservação ambiental.

O fato de que as plantas de ocorrência natural contêm compostos bioativos nos levou a procurar interação com outros grupos de pesquisa para a realização de testes com extratos e substâncias isoladas neste trabalho (Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais; Laboratório de Bioquímica Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria; Laboratório de Fitopatologia do Departamento de Agronomia da UEPG; e Laboratório de Purificação de Proteínas do Departamento de Química da UEPG). Os testes de atividades proporcionados por essas parcerias são: potencial antioxidante e viabilidade de leucócitos, atividades antifúngica, alelopática, antimicrobiana, inibitória da acetilcolinesterase, além da possibilidade de estabelecimento de estruturas cristalinas. Os compostos isolados que são testados com atividades biológicas podem trazer conhecimento científico suficiente para o desenvolvimento de novos produtos nas mais diversas áreas. Pela ampla ocorrência de compostos voláteis e fenólicos no gênero *Calea*, este estudo permitirá testar a utilização de métodos de fracionamento de extratos desenvolvidos nos últimos anos em nosso laboratório especificamente para espécies do gênero *Baccharis*, também pertencente à família Asteraceae. O desenvolvimento da presente pesquisa vai permitir o uso e o aprendizado de técnicas analíticas e preparativas, tais como CG/EM/DIC, fracionamento de extratos em colunas

cromatográficas e identificação de compostos isolados por técnicas espectrométricas como UV, IV, RMN ^1H e ^{13}C .

3 DELIMITAÇÃO DO PROBLEMA

A espécie *Calea hispida* foi aqui estudada quimicamente com propósito de isolar e identificar compostos químicos das folhas da planta.

As plantas foram coletadas em locais próximos ao Campus, na Rodovia PR-513, Ponta Grossa – Itaiacoca e no Capão da Onça, e identificadas no Herbário da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Na primeira parte da pesquisa foram estudados os metabólitos secundários voláteis de *C. hispida* obtidos por hidrodestilação em triplicata do óleo essencial das folhas, totalizando três amostras do óleo essencial.

Conforme o método utilizado na obtenção de extratos, após a obtenção dos óleos essenciais por hidrodestilação, as águas restantes foram extraídas com clorofórmio (para obter extratos com terpenoides, livrando a fase aquosa da presença de substâncias pouco polares); acetato de etila em pH 8 (para obter extratos flavonoídicos e outros fenóis neutros); acetato de etila/metanol em pH 8 (para obter extratos contendo glicosídeos de flavonoides ou compostos neutros mais polares), acetato de etila em pH 4 (para obter extratos contendo ácidos) e acetato de etila/metanol em pH 4 (para obter compostos ácidos ainda mais polares).

Os compostos voláteis foram analisados por CG/EM/DIC, prevendo-se o isolamento de componentes para a determinação completa da estrutura química por métodos espectroscópicos como UV, IV, RMN ^1H e ^{13}C unidimensionais e bidimensionais. Da mesma forma, constituintes fenólicos isolados foram analisados pelos mencionados métodos espectroscópicos. O isolamento de componentes foi realizado por cristalização direta a partir do óleo essencial, ou a substância foi obtida com bom grau de pureza na própria fração orgânica por extração líquido-líquido, ou por fracionamento cromatográfico de extratos em colunas de sílica analisando-se as frações por CCD (cromatografia de camada delgada).

Foi prevista também a determinação da estrutura cristalina de substâncias isoladas por difração de Raios-X.

Com algumas substâncias isoladas e extratos brutos foram realizados testes químicos (potencial antioxidante) e biológicos *in vitro* (viabilidade de leucócitos, atividades antifúngica, alelopática, antimicrobiana e inibitória da acetilcolinesterase).

4 HIPÓTESES

A principal hipótese deste estudo referiu-se à identificação de substâncias com atividade biológica potencial, que podem vir a tornar-se uma alternativa aos produtos sintéticos atualmente utilizados ou ainda servindo como protótipos para indústria química.

Como espécie *Calea hispida* não tinha estudos químicos sobre o seu óleo essencial, havia a possibilidade de contribuir com informações relevantes para possíveis aplicações em fármacos, fragrância em cosméticos, aromatizantes de alimentos, bebidas e produtos de utilidade doméstica, novos inseticidas, fungicidas, acaricidas e antimicrobianos.

Tendo em vista o método de fracionamento dos componentes presentes no vegetal em estudo, havia a possibilidade de se obter substâncias novas ou diferentes das já encontradas na pesquisa anteriormente publicada sobre *C. hispida*.

Outra hipótese em questão era a possibilidade da separação de flavonoides e derivados do ácido cafeoilquínico em extratos específicos, sendo considerada possível a identificação dos compostos fenólicos principais presentes em *C. hispida* utilizando métodos espectroscópicos como UV, IV e RMN de ^1H e ^{13}C .

Também surgiu como hipótese neste estudo que a aplicação de ensaios químicos e de bioatividade de compostos isolados, tais como potencial antioxidante e viabilidade de leucócitos, atividades antifúngica, alelopática, antimicrobiana, inibitória da acetilcolinesterase, poderia trazer conhecimento científico suficiente para encorajar o desenvolvimento de novos produtos.

Como existem vários fatores que contribuem para a alteração dos metabólitos secundários presentes nas espécies vegetais em geral, as coletas de espécies botânicas feitas no mesmo local ou em locais próximos, devem levar à obtenção de extratos com composições qualitativamente e quantitativamente similares entre si, supondo-se que espécimes da mesma espécie vegetal crescendo próximos entre si devem apresentar similaridade genética e metabólica.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Estudar quimicamente as folhas da espécie *Calea hispida* Baker, especialmente seus compostos voláteis e fenólicos, contribuindo para o conhecimento científico a respeito dos metabólitos secundários produzidos por esta espécie vegetal crescendo ao natural no Segundo Planalto do Paraná.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar por CG/EM/DIC o óleo essencial das folhas de *C. hispida*, identificando qualitativamente e quantitativamente os seus componentes voláteis em triplicatas, incluindo a aplicação de análise estatística dos dados;
- Fracionar o extrato aquoso das folhas de *C. hispida*, visando o isolamento e a identificação de substâncias fenólicas neutras e ácidas;
- Isolar e identificar flavonoides ou outros compostos fenólicos neutros presentes em extratos obtidos em pH 8 e compostos fenólicos ácidos de extratos obtidos em pH 4;
- Identificar os componentes químicos isolados por meio de técnicas espectroscópicas de UV-Vis, IV, RMN ^1H e ^{13}C , e difração de Raios-X;
- Complementar o estudo químico de compostos isolados e de extratos, encaminhando amostras para testes químicos de seu poder antioxidante contra o radical livre DPPH e viabilidade de leucócitos, atividades antifúngica, alelopática, antimicrobiana e inibitória da acetilcolinesterase.

6 EQUIPAMENTOS E REAGENTES

Os reagentes e solventes utilizados tiveram procedências variadas: Nuclear®, Merck®, Reagen® e Synth®. A água utilizada foi purificada no ultra-purificador Gehaka. Resistividade: 18,2 Mohm cm a 25 °C; condutividade: 0,054 µS/cm a 25 °C; TOC: < 3 ppb; bactérias heterotróficas: < 0,1 UFC/mL; partículas menores que 0,05 µm < 1 partícula/mL; endotoxina: < 0,125 EU/mL (<0,001EU/mL com filtro apirogênico opcional).

As análises por espectrofotometria UV-Vis foram realizadas num espectrofotômetro CARY- 50 Varian® e as análises de infravermelho obtidas num espectrômetro Shimadzu IR Prestige-21® com Transformada de Fourier, software IR Solution®, em pastilhas de KBr. Esses equipamentos pertencem ao Complexo de Laboratórios Multiusuários da Universidade Estadual de Ponta Grossa (C-LABMU-UEPG).

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C das substâncias isoladas de *C. hispida* foram obtidos na Universidade Estadual de Ponta Grossa no espectrofotômetro da Bruker modelo AVIII400, operando a 400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C . Todos os espectros foram registrados utilizando-se tetrametilsilano (TMS) como padrão de referência interno e utilizando-se clorofórmio ou metanol deuterados como solventes. Os deslocamentos químicos (δ) são expressos em ppm (partes por milhão) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz).

As cromatografias em camada delgada foram realizadas sobre cromatofolhas de alumínio pré-preparadas com sílica gel HF-254, Macharey & Nagel.

As amostras de óleo essencial foram analisadas por CG/EM/DIC (cromatografia a gás acoplada a detectores de massa e de ionização de chama) num cromatógrafo GCMS-QP2010 Plus Shimadzu, software GC Solution® GC/MS Workstation 5.51, e num cromatógrafo GCFID 2010 Shimadzu, no Laboratório de Cromatografia da Fundação Universidade Regional de Blumenau.

7 MÉTODOS

7.1 COLETA, IDENTIFICAÇÃO E PREPARO DE MATERIAIS VEGETAIS

Foram obtidas amostras botânicas às margens da Rodovia PR-513, Ponta Grossa – Itaiacoca, no dia 03 de dezembro de 2012 às 9:00 horas em condições climáticas de alta umidade e temperatura de 17 °C. A coleta foi realizada na posição das coordenadas 25°06'25" sul 50°02'14" oeste, a 1.030 m de altitude, em solo de características de boa fertilidade.

A segunda coleta foi realizada no dia 22 de março de 2013 entre as 9:30h e 10:30 horas, com temperatura em torno de 22 °C, tempo seco com umidade relativa do ar de 57%. A coleta foi realizada nas coordenadas 25°06'16" sul 50°01'33" oeste, a 980 m de altitude. As amostras foram coletadas em solo arenoso sobre uma camada de arenito em que escorre água constantemente, em Ponta Grossa - Capão da Onça.

A identificação botânica de exsicatas foi realizada pelo Herbário da Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, Paraná, depositando-se uma amostra sob o número 19062.

As folhas livres de impurezas foram acondicionadas em frascos hermeticamente fechados, sendo uma porção processada imediatamente. As outras duas porções foram armazenadas em geladeira a 7 °C, sendo processadas em poucos dias.

7.2 OBTENÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS

A massa bruta do material vegetal coletado foi de 2,24 kg. Após a separação do material, a massa das partes aéreas foi determinada resultando em 252 g de caules, 70 g de flores e 728 g de folhas. As folhas foram separadas em três porções de 262 g cada uma.

De cada porção de folhas de *C. hispida*, foram triturados em liquidificador aproximadamente 120 g e hidrodestilados por duas horas e trinta minutos em um

balão de 2 L acoplado a uma aparelhagem de vidro conforme Stahl & Schild (1981) contendo 1 L de água destilada, obtendo-se triplicatas do óleo essencial. Os óleos essenciais foram recolhidos em éter etílico, decantando-se os restos de água e evaporando-se o solvente à temperatura ambiente. Após a evaporação do solvente, os óleos foram pesados para obter o rendimento e refrigerados a 7 °C até o envio para análise.

7.3 ANÁLISE DE ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais obtidos de três amostras de folhas de *Calea hispidula* foram submetidos a análises por CG/EM e CG/DIC, realizando-se três injeções para as determinações quantitativas com o detector DIC.

Para a identificação qualitativa por CG/EM dos componentes presentes nos óleos essenciais, as amostras foram diluídas em éter e injetadas (1 µL), usando-se uma coluna capilar apolar RTx-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), hélio como gás de arraste num fluxo de 1 mL min⁻¹, injeção em modo *split* com razão de 1:20; espectrômetro operando em modo de varredura (*scan*) de 40 a 550 uma (unidades de massa atômica) por impacto de elétrons (70 eV). O programa de aquecimento utilizado foi: temperatura do injetor e da fonte de íons, 250 °C; temperatura da interface, 280 °C; temperatura do forno de 60 °C por 5 min seguido de aquecimento de 3 °C min⁻¹ até 240 °C, permanecendo aí por 5 min. Cada pico dos cromatogramas obtidos por CG/EM foi analisado com o mesmo *software* do equipamento, identificando-se qualitativamente os componentes pelos seus espectros de massas associados aos respectivos índices de retenção relativos (IRR) calculados com base nos tempos de retenção (R_t) de uma série de *n*-alcanos (C₉-C₂₅).

Para a identificação quantitativa por CG/DIC, as amostras foram diluídas em éter e injetadas (1 µL) usando-se uma coluna capilar apolar OV-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), hélio como gás de arraste num fluxo de 1 mL min⁻¹, injeção em modo *split* com razão de 20:1. O programa de aquecimento utilizado foi: temperatura do injetor, 250 °C; temperatura do detector, 280 °C; temperatura do forno de 60 °C por 5 min seguido de aquecimento de 3 °C min⁻¹ até 240 °C, permanecendo aí por 5 min. Foram calculados novamente os IRR de cada componente usando a mesma série de *n*-alcanos. Os IRR das substâncias identificadas qualitativamente (CG/EM)

serviram para encontrar e quantificar cada composto presente nos cromatogramas obtidos por CG/DIC.

Para o tratamento de dados estatísticos referentes às amostras de óleos essenciais utilizou-se o teste de normalidade por meio do resultado de p_{valor} , teste t (Student) e teste F com auxílio do *software* Action 2.5.

Os espectros de infravermelho foram obtidos com uso de 1 mg de amostra em pastilhas de 100 mg de KBr na faixa de 4.000 cm^{-1} a 450 cm^{-1} .

Na análise de UV-Vis, o clorofórmio ou metanol foram utilizados como solventes ajustando-se a intensidade da absorbância a um nível inferior a 1,0. Os espectros foram geralmente medidos entre comprimentos de onda de 200 a 800 nm.

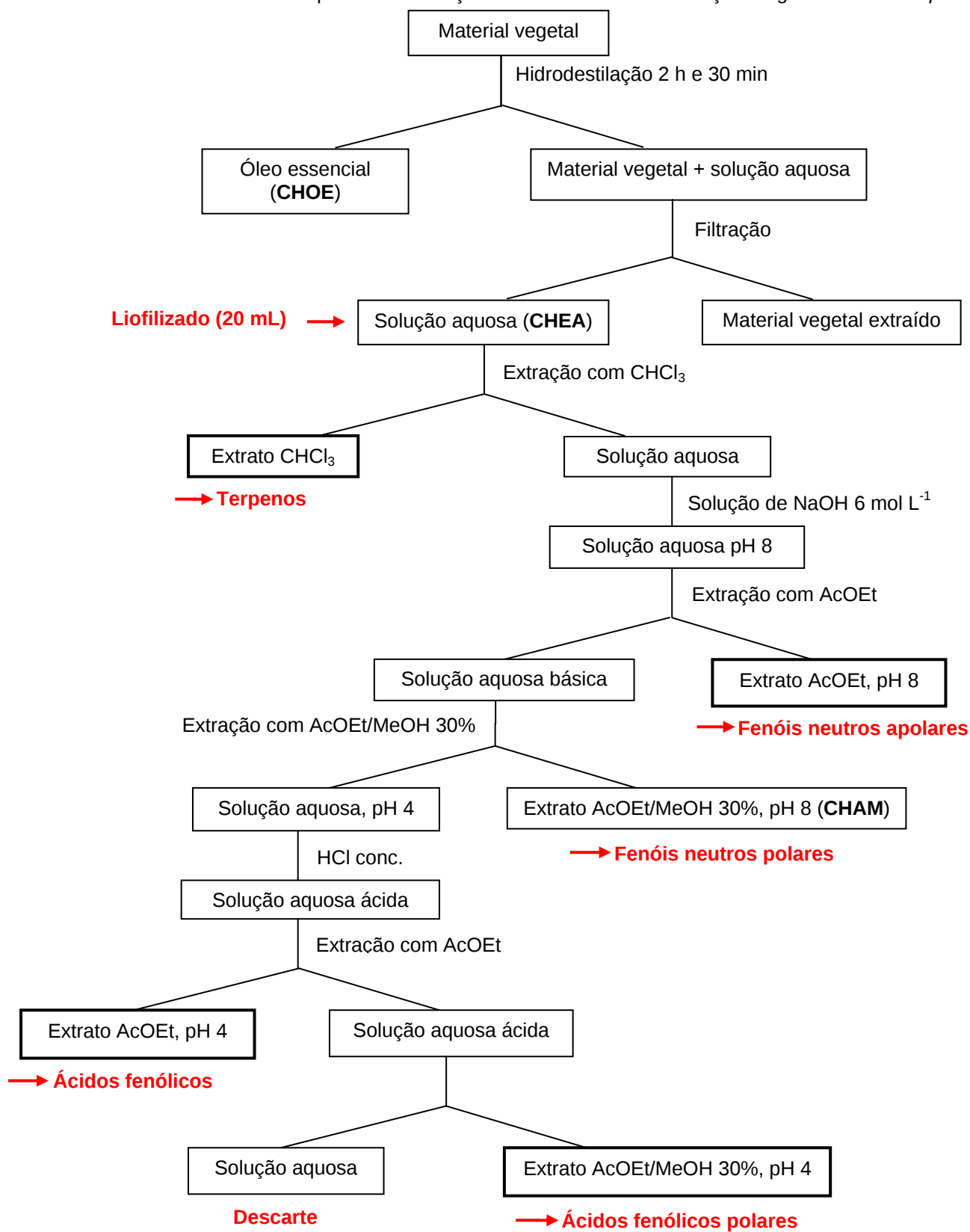
7.4 FRACIONAMENTO DO EXTRATO AQUOSO DE *C. hispida*

Após a obtenção dos óleos essenciais da primeira e da segunda amostra de folhas, os materiais vegetais contidos nas respectivas soluções aquosas foram filtrados obtendo-se soluções aquosas límpidas (Figura 12). Cada solução aquosa obtida foi primeiro extraída com duas porções de 200 mL de CHCl_3 , lavando-se pelo menos uma vez com água as fases orgânicas reunidas e secando-se com Na_2SO_4 anidro, concentrando-se à secura em evaporador rotativo a vácuo e calculando-se o rendimento em relação à massa do material vegetal.

Após as extrações com CHCl_3 , foi medido o pH das soluções aquosas restantes em cada caso e adicionando-se solução de NaOH 6 mol/L até pH 8. As extrações foram realizadas com três porções de 200 mL com AcOEt. As fases orgânicas foram concentradas em evaporador rotativo e pesadas.

Para cada uma das amostras, a solução aquosa básica foi submetida a três extrações com porções de 200 mL de uma mistura de AcOEt/MeOH 30%, concentrando-se as fases orgânicas em evaporador rotativo.

A cada solução aquosa básica foi acidificado HCl concentrado até pH 4. No caso da primeira amostra, a solução aquosa ácida foi extraída com três porções de 200 mL da mistura de AcOEt/MeOH 30%, utilizando-se apenas AcOEt nas extrações da segunda amostra. As fases orgânicas foram reunidas e evaporadas em evaporador rotativo, obtendo-se os extratos AcOEt/MeOH 30% (primeira amostra tratada) e AcOEt (segunda amostra) em pH 4.

FIGURA 12 - Esquema de obtenção de óleos essenciais e frações orgânicas de *C. hispida*

Após a última extração com AcOEt como descrito na Figura 12, a solução aquosa ácida da segunda amostra foi submetida à extração com três porções de 200 mL da mistura de AcOEt/MeOH 30% e as fases orgânicas foram reunidas e concentradas, obtendo-se o respectivo extrato em pH 4.

Os extratos obtidos com AcOEt e com a mistura de AcOEt/MeOH 30% em pH ácido e básico foram analisados por UV-Vis na faixa de comprimentos de onda de 200 a 450 nm utilizando-se metanol como solvente e os reagentes de deslocamento AcONa, H_3BO_3 , solução aquosa saturada de $AlCl_3$ e de HCl 4 mol/L, e os dados foram interpretados de acordo com a literatura (MARKHAN,1982). O fluxograma da Figura 12 representa esquematicamente o processo de obtenção do óleo essencial e em seguida dos extratos com $CHCl_3$, AcOEt e a mistura de AcOEt/MeOH 30% em pH 8, com AcOEt e a mistura de AcOEt/MeOH 30% em pH 4.

Os extratos obtidos no fracionamento descrito acima foram analisados por CCD com uso de vários sistemas eluentes constituídos por misturas de $CHCl_3$ /MeOH (10:0; 9,9:0,1; 9,8:0,2; 9,5:0,5; 9,0:1,0) e de AcOEt/MeOH/ H_2O (8,0:1,5:0,5; 7,0:2,5:0,5) sobre placas de sílica pré-preparadas. Após o desenvolvimento, os cromatogramas foram observados e registrados fotograficamente sob luz UV de 254 e 360 nm e em seguida revelados primeiro com H_2SO_4 /MeOH (1:1) seguindo-se aquecimento sobre chapa térmica a 120 °C por 10 minutos ou então com uma solução de $FeCl_3$ a 5% em metanol.

Os extratos obtidos da amostra coletada em dezembro de 2012 (1ª amostra, item 7.1) com a mistura de AcOEt/MeOH 30% em pH 4 e pH 8 foram analisados por CCD utilizando sistema eluente AcOEt/MeOH/ H_2O (8,0:1,5:0,5) em comparação com padrões dos ácidos 3-cafeoilquínico, 3,5-dicafeoilquínico e 4,5-dicafeoilquínico. As placas prontas foram observadas e fotografadas sob luz UV de 254 e 360 nm, reveladas com H_2SO_4 /MeOH (1:1) e com solução metanólica de $FeCl_3$. O extrato obtido com a mistura de AcOEt/MeOH 30% em pH 4 apresentou uma única mancha na placa cromatográfica, substância que recebeu o código CHAM. Os espectros de RMN 1H e ^{13}C (CD_3OD), UV-Vis e IV da substância CHAM e estes são apresentados nos itens 7.7.3 e 8.3, na Tabela 6, Figuras 20 e 21 e Anexos 6 a 11.

7.4.1 Fracionamento do extrato obtido com acetato de etila em pH 4

Parte do extrato obtido com AcOEt em pH 4 conforme o esquema mostrado na Figura 12 (~1,4 g, segunda amostra) foi fracionado em coluna cromatográfica montada com 100 g de Sílica gel 60 (0,04 - 0,063 mm, 23-240 mesh ASTM) de 2,5 cm de diâmetro e 20 cm de altura. Uma suspensão de sílica foi preparada em 80 mL de uma mistura de AcOEt/MeOH/H₂O (8,0:2,0:0,5). A amostra do extrato foi dissolvida em 5 mL da mistura de solventes e a solução foi adicionada ao topo da coluna, a qual foi eluída com ~250 mL da mesma mistura de solventes com um fluxo de 5 mL min⁻¹, coletando-se 25 frações de 10 mL cada uma. Em seguida, a polaridade do eluente foi aumentada usando-se ~300 mL de uma mistura de AcOEt/MeOH/H₂O (7,0:2,5:0,5), coletando-se mais 25 frações de 10 mL. As frações foram aplicadas sobre placas cromatográficas eluídas com AcOEt/MeOH/H₂O (8,0:2,0:0,5), visualizando-se os cromatogramas sob luz ultravioleta de 254 e 360 nm, revelando-se em seguida com H₂SO₄/MeOH (1:1) seguindo-se o aquecimento em chapa térmica a 120 °C por 10 minutos. As frações que apresentaram manchas similares por CCD foram agrupadas, evaporadas e seus respectivos rendimentos foram calculados.

O composto fenólico mais polar presente no extrato bruto foi observado entre as frações 36 a 39 (R_f = 0,44, 83,5 mg, ~ 6% de rendimento em relação ao extrato) e codificado como CHA4E, apresentando-se com impurezas.

Os dados dos espectros de RMN ¹H e ¹³C, UV-Vis e IV da substância CHA4E são mostrados nos itens 7.7.4 e 8.4, Figuras 25 e 26.

7.5 FRACIONAMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Calea hispid*

Análises preliminares por CCD foram realizadas para determinar as condições para o fracionamento em coluna cromatográfica visando o isolamento da principal substância presente no óleo essencial. Os cromatogramas prontos foram visualizados sob luz ultravioleta de 254 e 360 nm, revelando-se com uma mistura de H₂SO₄/MeOH (1:1) e aquecendo-se em chapa térmica a 120 °C por 10 minutos ou com solução de FeCl₃ 5% em metanol.

O óleo essencial da primeira coleta foi fracionado numa coluna cromatográfica de 1,5 cm de diâmetro e 12 cm de altura montada com de uma

suspensão de ~100 g sílica gel 60 (0,04 - 0,063 mm / 23-240 mesh ASTM) em mistura de hexano:CHCl₃ (1:1). Uma massa de 340 mg de porções reunidas do óleo essencial foi diluída em 3 mL de éter etílico utilizando-se mais 2 mL desse solvente para lavagem. Inicialmente a coluna foi eluída com 250 mL do mesmo eluente. O fluxo da coluna foi de 5 mL min⁻¹, colhendo-se 25 frações de 10 mL cada uma. A polaridade da mistura de solventes foi aumentada usando-se mais ~300 mL de uma mistura de hexano:CHCl₃ (7,0:3,0). O composto principal presente no óleo essencial foi isolado em forma cristalina nas frações 19 a 35 (150 mg, ~44,12% de rendimento em relação ao óleo essencial). A substância sólida isolada apresentou um R_f = 0,35 e foi codificada como CHCR.

A mesma substância CHCR também cristalizou de amostras do próprio óleo essencial, sendo daí separada, lavando-se os cristais com hexano frio, totalizando mais 120 mg do composto isolado. Os dados dos espectros de UV-Vis, IV, RMN ¹H e ¹³C, DEPT90 e DEPT135 (CDCl₃) da substância isolada CHCR são apresentados nos itens 7.7.2 e 8.2, Tabela 4, Figuras 16 e 17, e Anexos 1 a 5.

7.6 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS

7.6.1 Ação fungitóxica contra *Fusarium graminearum* e *Sclerotinia sclerotiorum*

Foram realizados dois experimentos visando avaliar a ação fungitóxica com substâncias isoladas (CHAM, item 7.4; CHCR, item 7.5) e extratos (CHEA e CHOE, item 7.4) sobre o crescimento micelial dos fungos fitopatogênicos *Fusarium graminearum* (experimento 1) e *Sclerotinia sclerotiorum* (experimento 2). Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fitopatologia da UEPG, Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade. As soluções com concentração de 0,1 mg mL⁻¹ foram preparadas pesando-se 0,3 mg de cada substância, as quais foram dissolvidas em 3 mL de solvente (água para CHEA e CHAM; éter etílico para CHOE e CHCR). Cada solução concentrada foi utilizada para obter diluições a 10, 30, 50, 70 e 100 ppm.

Discos de micélio de 0,7 cm de diâmetro dos fungos cultivados em meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA), foram transferidos para o centro de placas de Petri de 90 mm de diâmetro, contendo meio BDA. Foram depositados em quatro pontos equidistantes de cada placa, 5 µL de cada solução diluída das substâncias

nas várias concentrações testadas. Foi utilizada como testemunha água destilada esterilizada. Os tratamentos constaram de 5 repetições, sendo cada placa com as colônias considerada como uma repetição, no delineamento inteiramente ao acaso no arranjo fatorial 5 (doses) x 4 (substâncias). As placas foram vedadas e incubadas em DBO (Demanda Biológica de Oxigênio) a 20 ± 2 °C, em fotoperíodos de 12 horas de claro e 12 horas de escuro. As avaliações foram realizadas diariamente determinando-se o diâmetro médio das colônias em milímetros em duas medidas diametralmente opostas, com auxílio de régua até o tratamento testemunha atingir os bordos da placa de Petri.

Os dados de crescimento das colônias (mm) foram utilizados para o cálculo do Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) utilizando-se a fórmula adaptada por Oliveira (1991), descrita abaixo:

$$\text{IVCM} = \sum (D - D_a) / N$$

Onde: IVCM = Índice de Velocidade de Crescimento Micelial;

D = diâmetro médio atual;

D_a = diâmetro médio anterior;

N = Número de dias após repicagem.

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias de IVCM, quando significativas, foram comparadas com o teste de Tukey a 5% de probabilidade para as substâncias e análise de regressão para as concentrações, com auxílio do *software* ASSISTAT Versão 7.7 beta. Os dados de IVCM foram transformados em log (x).

7.6.2 Avaliação da bioatividade de substâncias voláteis

Uma avaliação da bioatividade do óleo essencial CHOE e da substância sólida isolada CHCR foi realizada em colaboração com pesquisadores do Laboratório de Bioquímica Toxicológica da UFSM por testes do poder antioxidante contra o radical livre DPPH e viabilidade de leucócitos.

Para a avaliação da atividade antioxidante, foi usado o método fotolorimétrico do DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazila) com base no método de Choi e

colaboradores (2002), usando de ácido ascórbico como padrão de comparação. A porcentagem de inibição de cada substância testada frente ao DPPH foi determinada pela seguinte equação:

$$\% \text{ inibição} = \left[100 - \frac{(Ab_{\text{amostra}} - Ab_{\text{branco}})}{Ab_{\text{controle}}} \times 100 \right]$$

Onde:

Ab_{amostra} = absorbância da amostra;

Ab_{branco} = absorbância do branco;

Ab_{controle} = absorbância do controle.

O controle foi feito com 1,0 mL da solução de DPPH 0,3 mM mais 2,5 mL de etanol. O branco foi a própria solução em cada concentração a ser testada. Foram preparadas soluções de 125; 62,5; 31,25; 15,6 e 7,8 µg/mL de cada amostra em etanol. Adicionou-se 1 mL da solução de DPPH 0,3 mM em etanol a 2,5 mL das soluções de cada amostra. Após 30 minutos foram feitas leituras das absorbâncias a 518 nm. Uma solução de DPPH (1 mL, 0,3 mM) em etanol (2,5 mL) foi usada como controle negativo e uma preparação de ácido ascórbico foi utilizada como padrão (controle positivo) nas mesmas concentrações das frações. O etanol foi usado para zerar o espectrofotômetro (Shimadzu, UV-1021), tendo como brancos as soluções testes de cada fração (sem a adição do DPPH). As determinações foram efetuadas em triplicata, sendo determinados o desvio padrão e o coeficiente de variação percentual (CV%) para cada uma das determinações.

Para a avaliação da viabilidade celular, foi utilizado o método do Tripan blue. Para o isolamento dos leucócitos foi pipetado 2 mL de dextrana 0,5% (1 g/20 mL de PBS). O frasco foi deixado inclinado 45° esperando-se 35 min, e então mais 10 min na vertical. Após retirar o sobrenadante, o frasco foi centrifugado a 2.000 rpm por 10 min, e o sobrenadante resultante foi descartado. Foi precipitado foi re-suspenso em 1 mL de solução lisante (NH₄Cl 150 mM; NaHCO₃ 10mM; EDTA 1 mM), homogeneizado, deixado na vertical por 5 minutos em repouso, centrifugado por 2 min a 2.000 rpm, descartando-se o sobrenadante; a operação foi repetida 3 vezes sem deixar em repouso, mas descartando o sobrenadante. Por fim, o precipitado foi re-suspenso em 2 mL de solução de Hank. Uma amostra de 25 µL foi passada para um frasco Eppendorf e adicionado 500 µL do reagente de Turk, homogeneizado, e realizada a contagem em Câmara de Neubauer, na objetiva de aumento de 40

vezes, pipetando 10 µL da amostra na câmara e ajustando o volume para que contivesse 2.000 leucócitos na amostra. Utilizou-se a fórmula:

$$C_i \cdot V_i = C_f \cdot V_f$$

Onde:

Nº de leucócitos da amostra: $V_i = 2.000 \times 500 \mu\text{L}$

$V_i = x \mu\text{L} / \text{amostra}$ (multiplicar pelo nº de amostras + 1)

A incubação foi realizada colocando-se 497,5 µL da amostra de leucócitos diluída com solução de Hank em um frasco Eppendorf e adicionando-se 2,5 µL do composto na concentração desejada. Foi incubado por 3 horas a 37 °C.

Após a incubação foram retirados os frascos Eppendorf do banho-maria e passados para outros frascos limpos, em duplicata para cada amostra: 30 µL da solução de Hank + 40 µL de amostra + 50 µL de Tripan blue, esperando-se 5 minutos para realizar a contagem das células viáveis e não viáveis, expressando-se a viabilidade celular em porcentagem.

7.6.3 Avaliação da bioatividade do composto fenólico isolado CHAM

Uma interação com o grupo de pesquisas do Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, permitiu a avaliação da bioatividade do composto fenólico isolado CHAM **41** através da determinação das atividades antimicrobiana, inibidora da acetilcolinesterase e alelopática.

A atividade inibidora de acetilcolinesterase foi medida pelo método colorimétrico de Ellman adaptado para microplacas de 96 poços em ensaios a 25 °C (Ellman et al., 1961).

O composto CHAM **41** também foi avaliado quanto à sua atividade contra estirpes dos microorganismos *Bacillus cereus* (ATCC 11778); *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313); *Staphylococcus aureus* (ATCC 29212); *Candida albicans* (ATCC 18804); *Escherichia coli* (ATCC 25922); *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853); *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) e *Candida glabrata* (isolada no próprio laboratório) (LANA et al., 2003).

A atividade alelopática do composto fenólico CHAM **41** foi avaliada de acordo com a metodologia de Vieira e colaboradores utilizando *Lactuca sativa* L. (VIEIRA et al., 2005).

7.6.4 Atividade tripanocida e estrutura cristalina

Uma interação com pesquisadores do Departamento de Química - UEPG, Laboratório de Purificação de Proteínas, permitiu desenvolver um estudo visando determinar a estrutura cristalina da substância CHCR **35** por difração de Raios-X e encaminhamento de amostras para avaliação de atividades antimicrobianas, incluindo atividade tripanocida.

Foi selecionado um monocristal para a coleta de dados por difração de Raios-X. Os dados foram obtidos num difratômetro Bruker modelo D8 Venture, com radiação monocromática CuKalpha. A estrutura cristalina está sendo resolvida por métodos diretos usando o programa SHELX 97 (SHELDRICH, 1997) e refinando anisotropicamente com o programa HELXL-97 do pacote de programas WingX.

7.7 DADOS ESPECTROSCÓPICOS

7.7.1 Óleo essencial

IV (KBr, cm⁻¹): 3.052, 2.970, 2.930, 1.647, 1.577, 1.439, 1.266, 825 cm⁻¹.

UV-Vis: $\lambda_{\text{máx}}$ (MeOH, nm): 256,3; 349,6.

$\lambda_{\text{máx}}$ (MeOH+NaOH, nm): 259,0; 357,6.

$\lambda_{\text{máx}}$ (MeOH+NaOH+HCl, nm): 257,7; 348,8.

7.7.2 Composto CHCR isolado do óleo essencial

IV (KBr, cm⁻¹): 3.056, 2.969, 2.922, 1.649, 1.582, 1.489, 1.281, 826.

UV-Vis: $\lambda_{\text{máx}}$ (MeOH, nm): 256,6; 349,2.

$\lambda_{\text{máx}}$ (MeOH+NaOH, nm): 262,0; 372,8.

$\lambda_{\text{máx}}$ (MeOH+NaOH+HCl, nm): 257,4; 349,2.

RMN ¹H e ¹³C: Tabela 4, item 8.2, Anexos 1 a 5.

7.7.3 Extrato AcOEt/MeOH em pH 8, CHAM

IV (KBr, cm^{-1}): 3.381, 2.921, 1.698, 1.658, 1.606, 1.507, 1455, 1.272, 1.067.

UV-Vis: $\lambda_{\text{máx}}$ (MeOH, nm): 259,1; 348,6.

$\lambda_{\text{máx}}$ (MeOH+AcONa, nm): 264,1; 352,8.

$\lambda_{\text{máx}}$ (MeOH+AcONa+H₃BO₃, nm): 261,3; 366,1.

$\lambda_{\text{máx}}$ (MeOH+AlCl₃, nm): 270,3; 385,7.

$\lambda_{\text{máx}}$ (MeOH+AlCl₃+HCl, nm): 269,0; 402,8.

RMN ^1H e ^{13}C : Tabela 6, item 8.3, Anexos 6 a 11.

7.7.4 Fração CHA4E do extrato AcOEt/MeOH em pH 4

IV (KBr, cm^{-1}): 3.397, 2.929, 1.696, 1.602, 1.448, 1.273, 1.073, 1.606, 1.515.

UV-Vis: $\lambda_{\text{máx}}$ (MeOH, nm): 271,2; 330,8.

$\lambda_{\text{máx}}$ (MeOH+AcONa, nm): 268,1; 330,1.

$\lambda_{\text{máx}}$ (MeOH+AcONa+H₃BO₃, nm): 288,0; 328,3.

$\lambda_{\text{máx}}$ (MeOH, nm): 294,8; 329,4.

$\lambda_{\text{máx}}$ (MeOH+AlCl₃, nm): 271,1; 333,9.

$\lambda_{\text{máx}}$ (MeOH+AlCl₃+HCl, nm): 298,7; 330,8.

RMN ^1H e ^{13}C : Item 8.4.

8 RESULTADOS E DISCUSSÃO

8.1 ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL

O óleo essencial de *C. hispida*, cuja análise não foi reportada na literatura anteriormente, apresentou coloração amarela clara, com odor forte e característico da planta. A Tabela 1 apresenta os dados das amostras em triplicatas: quantidade de material vegetal e rendimentos dos óleos essenciais calculados em relação às massas de material vegetal após a secagem.

TABELA 1 - Rendimento das triplicatas do óleo essencial

AMOSTRA	MATERIAL VEGETAL (g)	RENDIMENTO (%)
CHOE1	121,0	0,21
CHOE2	150,0	0,29
CHOE3	160,0	0,36
C _v (%)	-	26,2

Nota: CHOE1; CHOE2; CHOE3; C_v = coeficiente de variação.

O coeficiente de variação percentual do rendimento em relação à proporção de material vegetal utilizada foi de 26,2%, sendo considerado médio (MONTGOMERY, 2004). A variabilidade encontrada nos rendimentos é, provavelmente, devida a diversos fatores, principalmente à época e ao local de coleta (item 7.1). A amostra CHOE1 foi coletada às margens da rodovia PR-513 (início de dezembro), enquanto que CHOE2 e CHOE3 cresceram em solo arenoso e úmido (coletadas no final de março).

A Tabela 2 apresenta os resultados das análises de óleos essenciais por CG/EM/DIC das amostras de folhas em triplicata, com seus índices de retenção relativos calculados (IRR_{cal}) e índices de retenção relativos da literatura (IRR_{lit}) (ADAMS, 1995; AHMAD et al., 2003; CAREDDA et al., 2002; YUSUF et al., 1998).

Os sesquiterpenos oxigenados (repetição 1: 14,07%; repetição 2: 24,53% e repetição 3: 22,32%) apareceram como os constituintes majoritários. Os sesquiterpenos não-oxigenados seguem na sequência como a segunda classe dos principais componentes do óleo essencial nas três repetições (7,86%, 11,46% e 10,96%). Em proporção minoritária, estão presentes no óleo essencial da planta os monoterpenos oxigenados, respectivamente 1,41% e 1,57% da composição total da segunda e da terceira amostra (Tabela 2).

TABELA 2 - Composição química dos óleos essenciais de folhas de *C. hispida*

COMPONENTES	1	2	3	IRR _{cal} *	IRR _{lit} **
	%				
eucaliptol	-	-	0,09	1.030	1.033
artemisia alcool	-	-	0,12	1.083	1.083
<i>cis</i> -sabinol	-	0,11	0,10	1.137	1.140
<i>cis</i> -verbenol	-	0,23	0,19	1.143	1.140
terpinen-4-ol	-	0,30	0,30	1.175	1.177
α -terpineol	-	0,15	0,15	1.189	1.189
verbenona	-	0,50	0,51	1.207	1.204
bornilacetato	-	0,12	0,11	1.285	1.285
β -cubebeno	5,19	3,89	3,74	1.389	1.390
β -cariofileno	-	0,91	0,80	1.418	1.418
<i>cis</i> -thujopseno	-	0,09	0,08	1.428	1.429
humuleno	-	0,14	0,13	1.452	1.454
alloaromadendreno	-	0,38	0,33	1.460	1.461
β -cadineno	-	0,50	0,44	1.474	1.473
germacreno D	0,52	1,35	1,07	1.480	1.480
β -selineno	-	0,74	0,70	1.485	1.485
biciclogermacreno	0,81	2,37	2,27	1.496	1.494
(S)-(Z)- α -bisaboleno	1,18	0,61	0,56	1.504	1.504
α -amorfeno	-	-	0,13	1.506	1.506 [#]
δ -cadineno	0,16	0,48	0,44	1.523	1.524
1,4-cadinadieno	-	-	0,17	1.531	1.532
3,7-selinadieno	-	-	0,10	1.542	1.542
2,6-dibutil-4-metilfenol	1,44	0,39	0,79	1.512	1.512
(E)-nerolidol	5,29	0,20	-	1.563	1.564
(Z)-3-hexenilbenzoato	-	0,40	0,43	1.567	1.570
espatulenol	2,43	6,35	6,54	1.578	1.576
β -oplophenone	1,94	4,59	4,61	1.584	1.579 [#]
viridiflorol	0,45	3,43	3,48	1.592	1.590
M ⁺ = m/z 218 (ni)	0,82	0,98	-	1.602	-
M ⁺ = m/z 220 (ni)	-	0,95	0,42	1.623	-
<i>cis</i> -isolongifolanona	0,58	-	0,97	1.603	1.606
M ⁺ = m/z 222 (ni)	-	-	0,61	1.613	-
dillapiol	-	-	0,29	1.619	1.622
M ⁺ = m/z 220 (ni)	-	-	0,95	1.636	-
M ⁺ = m/z 218 (ni)	2,46	11,08	11,25	1.646	-
M ⁺ = m/z 220 (ni)	-	-	2,49	1.648	-
M ⁺ = m/z 202 (ni)	4,32	2,47	4,60	1.652	-
α -cadinol	2,29	8,19	4,15	1.657	1.653 [#]
M ⁺ = m/z 220 (ni)	0,79	1,79	1,85	1.668	-
14-hidroxi-9-epi- β -cariofileno	-	-	0,20	1.664	1.663
M ⁺ = m/z 206 (ni)	-	2,05	2,11	1.670	-
<i>cis</i> - α -santalol	-	-	0,29	1.679	1.678
M ⁺ = m/z 220 (ni)	-	0,85	0,88	1.686	-
M ⁺ = m/z 222 (ni)	-	0,55	0,56	1.691	-
M ⁺ = m/z 220 (ni)	0,73	0,43	0,44	1.705	-
M ⁺ = m/z 220 (ni)	0,46	0,40	0,42	1.710	-
<i>cis</i> - β -santalol	1,09	1,77	1,79	1.716	1.720
M ⁺ = m/z 218 (ni)	54,76	30,96	30,21	1.769	-
Monoterpenos oxigenados	0,00	1,41	1,57		
Sesquiterpenos não-oxigenados	7,86	11,46	10,96		
Sesquiterpenos oxigenados	14,07	24,53	22,32		
Aromáticos	1,44	0,79	1,22		
Total identificado	23,37	38,19	36,07		

Nota: * IRR_{cal} = média dos índices de retenção relativa calculados para cada componente; ** IRR_{lit} = índices de retenção relativa publicados (ADAMS, 1995); 1.506[#] (AHMAD et al., 2003); 1.579[#] (CAREDDA et al., 2002); 1.653[#] (YUSUF et al., 1998); 1 = primeira amostra; 2 = segunda amostra; 3 = terceira amostra; % = porcentagens relativas dos componentes (médias calculadas para os resultados de três injeções de cada amostra no CG/DIC).

Não foram detectados monoterpenos não-oxigenados nas réplicas analisadas (Tabela 2). As análises dos óleos essenciais mostraram um componente principal, o qual apresentou íon molecular $M^{+} = m/z$ 218, correspondendo à fórmula molecular $C_{13}H_{14}O_3$. Esse componente atingiu uma proporção relativa de quase 55% em CHOE1 e acima de 30% em CHOE2 e CHOE3. A identificação não foi possível por meio dessas análises porque esse componente não se encontra nos bancos de dados de espectros de massas utilizados pelo *software* GCMSsolution® (item 6: NIST21, NIST107 e WILEY8). O índice de retenção relativo desse composto foi calculado pela primeira vez nesta pesquisa (Tabela 2) e para o estabelecimento da estrutura química foi necessário isolar essa substância, que passou a ser codificada como CHCR (itens 7.5 e 8.2).

Nenhum monoterpeno oxigenado foi detectado na primeira réplica do óleo essencial. Na segunda réplica, foram detectados *cis*-sabinol, *cis*-verbenol, α -terpineol, terpinen-4-ol, verbenona e bornilacetato, todos presentes em pequenas proporções. Na terceira réplica, foram encontrados os mesmos compostos da segunda, além de eucaliptol e artemisia álcool em proporções mínimas.

Dentre os sesquiterpenos não-oxigenados, destacam-se em maior proporção o β -cubebeno, germacreno D e biciclogermacreno, e os outros componentes foram detectados em proporção menor que 1%.

Foram identificados vários sesquiterpenos oxigenados em proporções variáveis entre 0,45% e 8,19%: espatulenol 7, β -oplophenone, viridiflorol, α -cadinol e β -santalol. (*E*)-nerolidol também foi encontrado em porcentagem pouco acima de 5% na primeira amostra. Diversos outros sesquiterpenos oxigenados, que não foram identificados, apareceram em porcentagens abaixo de 1%, destacando-se uma substância com íon molecular $M^{+} = m/z$ 222 ($C_{15}H_{26}O$ e $IRR_{cal} = 1.646$) em proporções acima de 11% nas amostras CHOE2 e CHOE3.

Foram aplicados testes estatísticos para os dados analíticos do óleo essencial analisado em triplicata. Para análise quantitativa dos dados foram aplicados: o teste de normalidade; o teste F, que permite calcular homocedasticidade das variâncias; e o teste t para determinar a homocedasticidade das médias entre as repetições. Cada amostra da triplicata foi analisada três vezes por CG/DIC, estabelecendo-se um nível de confiança de 95% nos três testes estatísticos mencionados.

TABELA 3 - Tratamento estatístico dos resultados dos testes de normalidade, teste F e teste t do óleo essencial

COMPONENTES	1	2	3	4	5
<i>cis</i> -sabinol	-	0,41	0,11	0,05	13,27
<i>cis</i> -verbenol	-	0,48	6,25	0,05	12,61
terpinen-4-ol	-	1,00	1,00	0,00	488,22
α -terpineol	-	0,66	3,06	0,01	90,83
verbenona	-	-	-	0,01	106,20
bornilacetato	-	0,28	20,25	0,04	17,90
β -cubebeno	0,18	-	-	0,01	9,26
β -cariofileno	-	0,92	1,27	0,04	15,25
<i>cis</i> -thujopseno	-	-	-	0,02	34,44
humuleno	-	1,00	1,00	0,03	19,68
alloaromadendreno	-	0,75	2,25	0,05	14,01
β -cadineno	-	-	-	0,04	17,00
germacreno D	0,63	-	-	0,06	4,04
β -selineno	-	0,35	12,25	0,01	44,72
biciclogermacreno	0,11	-	-	0,07	3,62
(S)-(Z)- α -bisaboleno	-	-	-	0,06	3,95
δ -cadineno	-	-	-	0,10	2,87
1,4-cadinadieno	0,24	-	-	0,07	3,61
3,7-selinadieno	-	0,41	9,00	-	-
2,6-dibutil-4-metilfenol	0,14	-	-	-	-
(E)-nerolidol	-	0,01	29070,25	0,48	1,08
(Z)-3-hexenilbenzoato	-	0,59	4,00	0,02	29,70
espatulenol	0,08	-	-	0,06	3,82
β -oplophenone	0,01	-	-	0,05	4,19
viridiflorol	0,03	-	-	0,13	2,46
M ⁺ = m/z 220 (IRR _{cal} = 1.623)	-	0,65	3,24	-	-
<i>cis</i> -isolongifolanona	-	-	-	0,06	11,28
M ⁺ = m/z 222 (IRR _{cal} = 1.613)	-	-	-	0,16	4,01
M ⁺ = m/z 222 (IRR _{cal} = 1.646)	0,03	-	-	0,10	2,85
M ⁺ = m/z 202 (IRR _{cal} = 1.652)	0,23	-	-	0,19	3,32
α -cadinol	0,60	-	-	0,11	2,81
M ⁺ = m/z 220 (IRR _{cal} = 1.668)	0,10	-	-	0,05	4,33
M ⁺ = m/z 206 (IRR _{cal} = 1.670)	-	0,21	0,03	0,01	75,06
M ⁺ = m/z 220 (IRR _{cal} = 1.686)	-	0,52	0,18	0,01	74,37
M ⁺ = m/z 222 (IRR _{cal} = 1.691)	-	0,41	9,00	0,00	214,35
M ⁺ = m/z 220 (IRR _{cal} = 1.705)	0,08	-	-	0,03	5,48
M ⁺ = m/z 220 (IRR _{cal} = 1.710)	0,60	-	-	0,00	24,62
<i>cis</i> - β -santalol	0,03	-	-	0,02	6,80
M ⁺ = m/z 218 (CHCR 35)	0,05	-	-	0,04	4,79

Nota: 1 = p_{valor} normalidade; 2 = p_{valor} teste F; 3 = F_{calculado}; 4 = p_{valor} teste t; 5 = T_{calculado}

Para dados em que o componente do óleo essencial não apareceu nas três amostras, mas somente em duas, utilizou-se o teste F para calcular se havia possibilidade de semelhança ou diferença entre duas variâncias. Se o valor de $F_{\text{calculado}} \leq F_{\text{tabelado}}$, não há diferença significativa entre as variâncias; mas se $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$, existe diferença significativa entre as variâncias. Após calcular o teste de normalidade e o teste F, foi calculado o teste t (Student) para verificar se há homocedasticidade entre os valores das médias das triplicatas e duplicatas. Se $t_{\text{calculado}} \leq t_{\text{tabelado}}$, não há diferença significativa entre as médias das triplicatas ou duplicatas; se $t_{\text{calculado}} > t_{\text{tabelado}}$, há diferença significativa entre as médias das triplicatas ou duplicatas.

A Tabela 3 apresenta os dados estatísticos calculados, destacando-se alguns valores em caracteres negrito e *itálico* que serão discutidos logo a seguir, excluindo-se dos cálculos os componentes que só aparecem em uma das amostras.

O teste de normalidade Shapiro-Wilk foi calculado quando as três réplicas apresentavam qualitativamente a mesma substância, como por exemplo, no caso do β -cubebeno, germacreno D, biciclogermacreno, 1,4-cadinadieno, 2,6-dibutil-4-metilfenol, espatulenol, β -oplophenone, viridiflorol, α -cadinol, *cis*- β -santalol, $M^{+} = m/z$ 222 (ni, $IRR_{cal} = 1.646$), $M^{+} = m/z$ 202 (ni, $IRR_{cal} = 1.652$), $M^{+} = m/z$ 220 (ni, $IRR_{cal} = 1.668$), $M^{+} = m/z$ 220 (ni, $IRR_{cal} = 1.705$), $M^{+} = m/z$ 220 (ni, $IRR_{cal} = 1.716$) e do composto $M^{+} = m/z$ 218 (ni, CHCR, $IRR_{cal} = 1.769$). Observando os resultados de p_{valor} (Tabela 3) do teste de normalidade, verifica-se que as porcentagens relativas dos componentes β -oplophenone, viridiflorol, *cis*- β -santalol e $M^{+} = m/z$ 222 (ni, $IRR_{cal} = 1.646$) não seguem a normalidade, pois apresentam p_{valor} menor que 0,05.

O teste F foi calculado quando duas réplicas apresentavam qualitativamente o mesmo composto. Os resultados de p_{valor} e $F_{calculado}$ (colunas 2 e 3 da Tabela 3) demonstram se há diferença significativa das variâncias entre os valores de cada composto do óleo essencial nas réplicas. O valor de $F_{tabelado}$ para o grau de liberdade é $\alpha = 1,00$ é 19,00 (95% de confiabilidade). Os compostos que estão presentes somente em duas réplicas são: *cis*-sabinol, *cis*-verbenol, terpinen-4-ol, α -terpineol, bornilacetato, β -cariofileno, humuleno, alloaromadendreno, β -selineno, (*E*)-nerolidol, 3,7-selinadieno, (*Z*)-3-hexenil-benzoato, $M^{+} = m/z$ 220 ($IRR_{cal} = 1.623$), $M^{+} = m/z$ 206 ($IRR_{cal} = 1.670$), $M^{+} = m/z$ 220 ($IRR_{cal} = 1.686$) e $M^{+} = m/z$ 222 ($IRR_{cal} = 1.691$). O resultado de p_{valor} e o valor de $F_{calculado}$ mostram que os compostos bornilacetato e (*E*)-nerolidol não seguem a normalidade, pois apresentam $p_{valor} < 0,05$ e valores de $F_{calculado} < F_{tabelado}$.

O teste t tem por finalidade determinar se há diferença significativa entre os valores das médias das triplicatas ou duplicatas, pelo resultado de p_{valor} e $t_{calculado}$ (Tabela 3), calculados quando as réplicas apresentam qualitativamente o mesmo composto. O valor de $t_{tabelado}$ para o grau de liberdade $\alpha = 1,00$ é 12,704 (compostos com duplicatas, 95% de confiabilidade) e para o grau de liberdade $\alpha = 2,00$ é 4,303 (compostos com triplicatas, 95% de confiabilidade). Todos os compostos que apresentam duas ou três réplicas, têm valores de p_{valor} e $t_{calculado}$ mostrados na Tabela 3. Os valores de p_{valor} e $t_{calculado}$ não foram calculados nos casos em que os

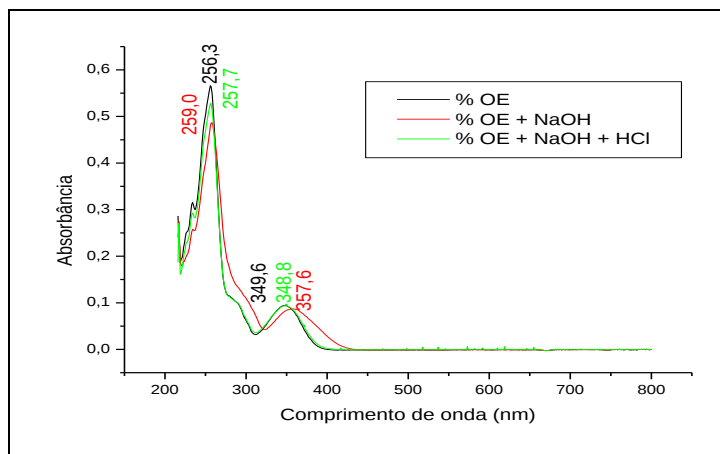
componentes foram detectados em apenas uma das réplicas. O resultado de p_{valor} e o valor de $t_{\text{calculado}}$ mostram que as porcentagens de cada um dos compostos (Tabela 2) *cis*-sabinol, terpinen-4-ol, α -terpineol, verbenona, bornilacetato, β -cariofileno, humuleno, *cis*-thujopseno, β -cadineno, β -selineno, (*Z*)-3-hexenilbenzoato, alloaromadendreno, $M^+ = m/z$ 206 ($IRR_{\text{cal}} = 1.670$), $M^+ = m/z$ 220 ($IRR_{\text{cal}} = 1.686$) e $M^+ = m/z$ 222 ($IRR_{\text{cal}} = 1.691$) e $M^+ = m/z$ 220 ($IRR_{\text{cal}} = 1.710$) apresentam diferenças significativas entre as médias de cada réplica, pois apresentam p_{valor} menor ou igual a 0,05, e valores de $t_{\text{calculado}} > t_{\text{tabelado}}$.

O espectro de UV-Vis do óleo essencial (Figura 13) apresenta absorções que confirmam a presença de componentes fenólicos, nomeadamente o conhecido antioxidante 2,6-dibutil-4-metilfenol e o (*Z*)-3-hexenilbenzoato, que aparecem em baixas porcentagens relativas (entre 0,39 e 1,44%) e a substância principal CHCR **35** (entre 30,21 e 54,76%). Observam-se nos espectros de UV-Vis, a ocorrência de deslocamento batocrômico após a adição da solução diluída de NaOH, que é anulado pela adição de HCl. A utilização de uma base forte propicia a formação de fenolato, como observado no espectro pelo deslocamento da banda de absorção a 349,6 nm, que passa para 357,6 nm. A adição de HCl forma novamente o grupo OH fenólico e o espectro retorna à posição inicial. Com adição da solução diluída de NaOH observa-se também uma diminuição da intensidade de absorção e um pequeno deslocamento da banda em 256,3 nm para 259,0 nm, efeito que também é anulado com adição de HCl (NAME et al., 2013a).

O espectro de IV do óleo essencial (Figura 14) não mostra a esperada banda de absorção que seria devida ao grupo OH fenólico sugerido pelos espectros de UV-Vis e revelação de cromatogramas especificamente para fenóis. Em vista da grande proporção do composto CHCR **35** no óleo, as absorções mais intensas observadas no espectro de IV provavelmente se devem a esta substância, permanecendo a dúvida sobre a presença de uma hidroxila fenólica na estrutura. Observa-se também uma banda forte de absorção em 1.647 cm^{-1} , atribuída a uma carbonila. A banda de absorção em 3.052 cm^{-1} pode ser atribuída às vibrações axiais de ligações C-H sp^2 . As vibrações das ligações C=C de anel aromático são observadas em 1.577 cm^{-1} . A banda a 1.266 cm^{-1} pode ser atribuída a vibrações axiais das ligações simples C-O. Observam-se também bandas em 2.970 cm^{-1} e 2.930 cm^{-1} relativamente mais fracas, e em 1.439 cm^{-1} , devidas a vibrações axiais e deformações angulares de ligações C-H sp^3 respectivamente (NAME et al, 2013b).

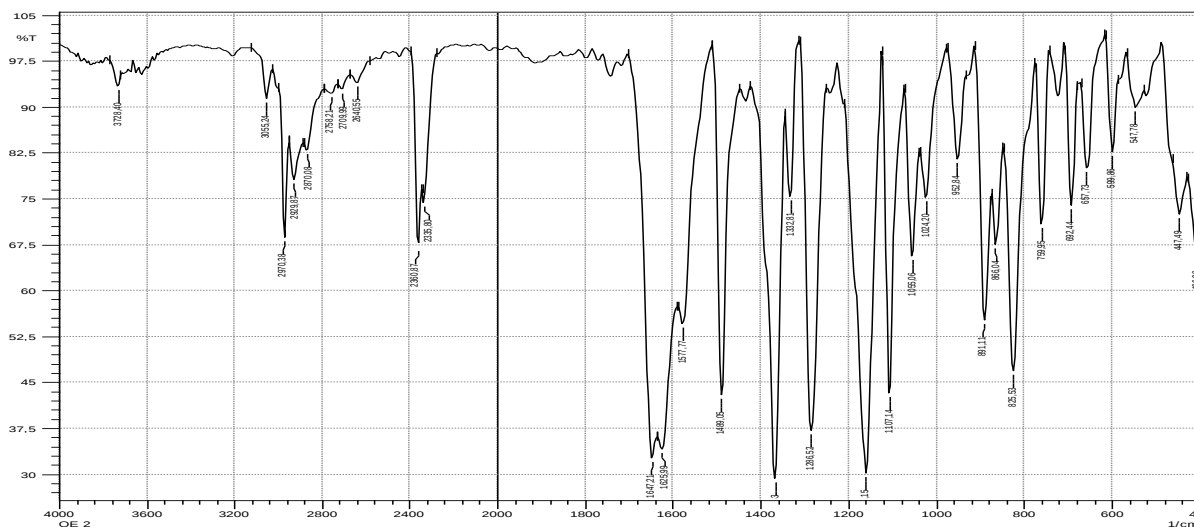
Os dados dos espectros de UV-Vis e IV do óleo essencial podem ser considerados como devidos principalmente à presença de alta proporção do composto CHCR **35**.

FIGURA 13 - Espectros de UV-Vis do óleo essencial de *C. hispida*



Fonte: A autora

FIGURA 14 - Espectro infravermelho do óleo essencial de *C. hispida*



Fonte: A autora.

8.2 ESTRUTURA QUÍMICA DO COMPOSTO CHCR

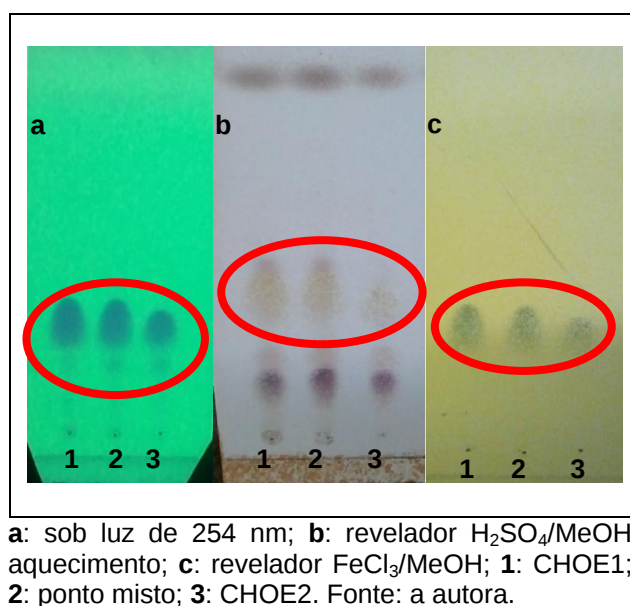
As análises de óleo essencial por CG/EM/DIC (item 8.1) indicaram a presença de uma substância fenólica como componente principal nas três amostras (54,76%, 30,96% e 30,21%). A Figura 15 apresenta análises cromatográficas comparando amostras dos óleos essenciais CHOE1 e CHOE2 sobre placas de sílica

HF254 utilizando como fase móvel uma mistura de hexano:CHCl₃ (1:1). Sob luz UV de 254 nm, a substância principal aparece como manchas de fluorescência azul com R_f de ~ 0,35 (cromatograma **a**).

Quando os cromatogramas foram revelados com a mistura de H₂SO₄/MeOH (1:1) seguido de aquecimento a ~120°C, o componente principal apresentou coloração amarelada, observando-se também manchas de componentes mais polares e menos polares (cromatograma **b**). O uso do revelador de FeCl₃ a 5% em MeOH (cromatograma **c**) comprovou que a substância principal contém hidroxila fenólica, mostrando manchas de coloração índigo.

Por meio destas análises também foi estabelecido o sistema eluente para utilização no fracionamento cromatográfico visando o isolamento da substância principal. Uma amostra do óleo essencial CHOE1 foi submetida a um fracionamento em coluna de sílica (item 7.4), permitindo obter quantidade suficiente para a realização de análises visando o estabelecimento da estrutura química do componente principal e realização de testes para avaliação da bioatividade. Nesse primeiro estudo sobre componentes voláteis de *C. hispida* foi possível isolar pela primeira vez a substância CHCR **35** a partir do óleo essencial das folhas.

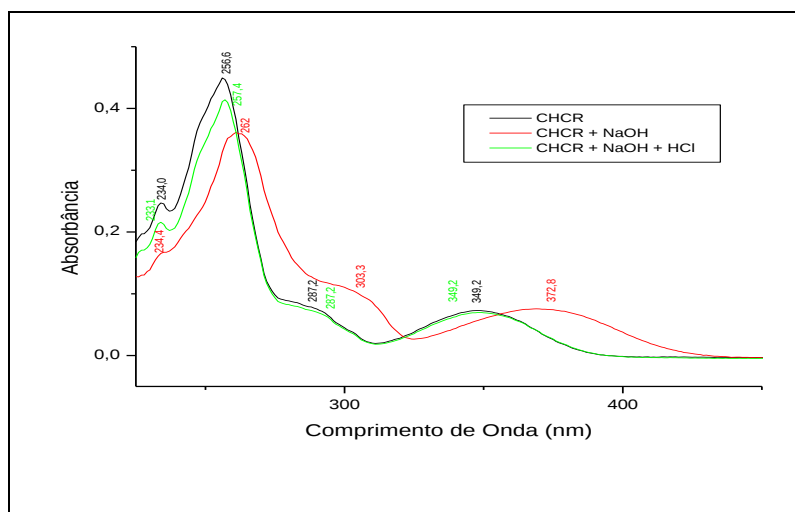
FIGURA 15 - CCD de óleos essenciais de *Calea hispida* (vide texto para detalhes)



O espectro de UV-Vis de CHCR **35** isolado (Figura 16) está de acordo com o espectro do óleo bruto mostrado na Figura 13 (item 8.1), apresentando absorções

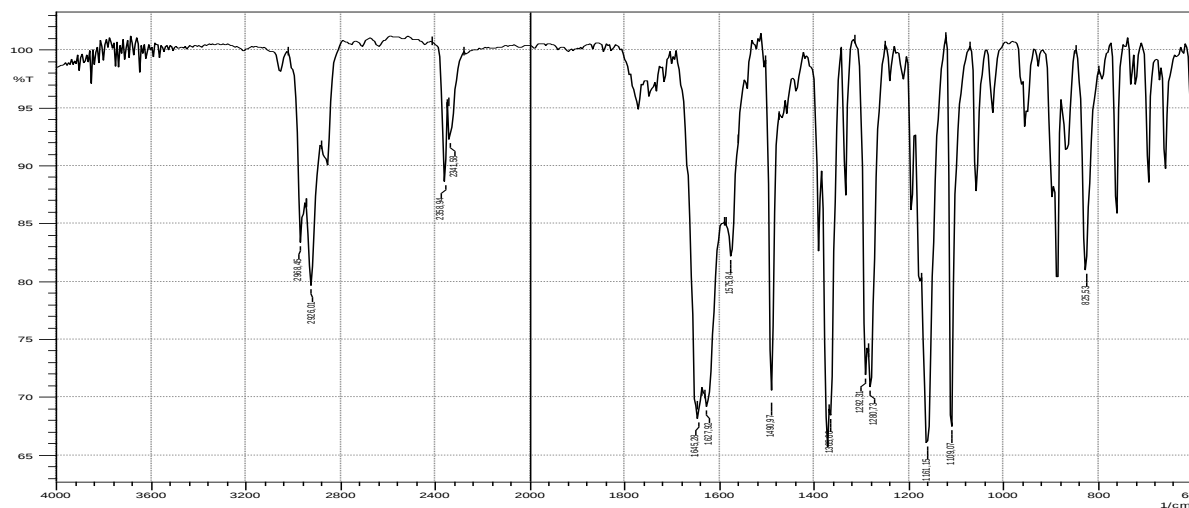
muito similares e confirmando a presença de uma hidroxila fenólica na estrutura, como indicado pela reação com FeCl_3 e pelos deslocamentos batocrômicos observados após a adição da solução diluída de NaOH, os quais são anulados pela adição de HCl. A utilização de uma base forte propicia a formação de fenolato, como pode ser observado no espectro pelo deslocamento da banda de absorção a 349,2 nm passando para 372,8 nm. A adição de HCl forma novamente grupo OH fenólico e o espectro retorna à posição inicial. Com adição da solução diluída de NaOH observa-se uma diminuição da intensidade de absorção e um deslocamento batocrômico da banda a 256,6 nm para 262,0 nm, retornando a 257,4 nm após adição de HCl.

FIGURA 16 - Espectros de UV-Vis da substância CHCR isolada do óleo essencial



Fonte: a autora.

FIGURA 17 - Espectro de IV do composto CHCR isolado do óleo essencial



Fonte: a autora.

Da mesma forma, o espectro de IV do CHCR **35** isolado (Figura 17) está de acordo com o espectro do óleo bruto mostrado na Figura 14 (item 8.1). No espectro de IV da substância isolada também não aparece a esperada banda causada por uma provável hidroxila fenólica como sugerido pela revelação de cromatogramas com FeCl_3 em solução metanólica e pelos espectros de UV-Vis.

A banda em 3.056 cm^{-1} pode ser atribuída a vibrações axiais de ligações C-H sp^2 , observando-se também as bandas em 2.969 cm^{-1} , 2.922 cm^{-1} e em 1.489 cm^{-1} devidas a vibrações axiais e deformações angulares de ligações C-H sp^3 . Observa-se uma banda forte de absorção em 1.649 cm^{-1} , atribuída a uma carbonila ligada a ligações duplas conjugadas ou a anel aromático, ou apresentando fortes ligações de hidrogênio. As vibrações das ligações C=C são observadas em 1.582 cm^{-1} . A banda a 1.281 cm^{-1} pode ser atribuída à vibração axial de ligações simples C-O.

Bohlmann e colaboradores (1982) isolaram diversas substâncias fenólicas a partir de extratos preparados com mistura de éter etílico/éter de petróleo (1:2) das raízes e das partes aéreas de *C. hispida*: timol **21** e 2-isopropil-4-metilfenol **24** (item 1.2.3); o *p*-hidroxicinamato **25** (item 1.2.4); e os cromenos **35** e **37** (item 1.2.7). Nas análises por CG/EM/DIC realizadas na presente pesquisa, o composto CHCR **35** apresentou $\text{M}^+ = \text{m/z}$ 218, correspondente à fórmula molecular $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{O}_3$. Dentre as substâncias fenólicas isoladas de *C. hispida* anteriormente, só o 6-acetil-7-hidroxi-2,2-dimetilcromeno **35** tem esta fórmula molecular (BOHLMANN et al., 1982).

O composto **35** já havia sido isolado anteriormente ao mencionado primeiro estudo de *C. hispida*, a partir de um extrato preparado com a mistura de éter etílico/éter de petróleo (1:2) das raízes da Asterácea *Helianthella uniflora* A.Grey e sua estrutura química foi então estabelecida com base em espectros de UV, IV, EM e RMN ^1H (BOHLMANN & GRENZ, 1970).

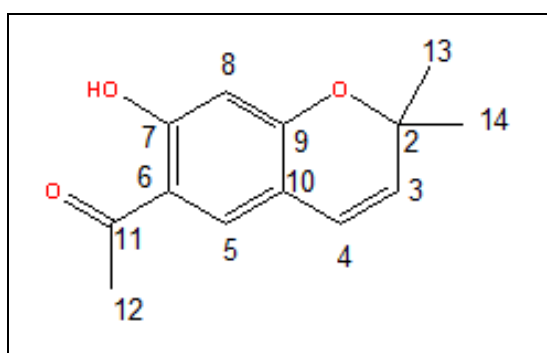
Os espectros de UV, IV, EM e RMN ^1H do composto CHCR **35**, este último medido agora a 400 MHz (Tabela 4), coincidem com os obtidos por Bohlmann e Grenz (1970). Os deslocamentos químicos e respectivas constantes de acoplamento dos hidrogênios H3 (δ 5,57 d, $J = 10\text{ Hz}$) e H4 (δ 6,28 d, $J = 10\text{ Hz}$) dão suporte à posição da ligação dupla do anel B do cromeno **35**. E da mesma forma que a ausência da absorção típica para a hidroxila fenólica no espectro de IV, os deslocamentos químicos dos singletos de H5 (δ 7,30) e H8 (δ 6,32) estão de acordo com os grupos OH e CH_3CO em posição relativa *orto* no anel aromático, indicando que estes dois hidrogênios só podem estar na única possível posição relativa *para*.

Desde então, estudos químicos sobre três espécies de gêneros diferentes dessa família botânica também levaram ao isolamento de **35**. Foram isolados de *Lagascea rigida* Stuessy, além de várias *p*-hidroxiacetofenonas, também alguns cromenos, incluindo **35** (BOHLMANN & JAKUPOVIC, 1978). Quatro cromenos conhecidos, entre eles o composto **35**, além de um cromeno-glicosídeo novo, foram isolados de *Tithonia diversifolia* A.Gray (ZHAI et al., 2010). Num estudo mais recente, a substância **35** e outro cromeno similar foram isolados das raízes de *Ageratina arsenei* R.M.King & H.Rob., sendo suas estruturas determinadas por análises espectroscópicas e por difração de Raios-X (GÓMEZ-HURTADO et al., 2012).

As atribuições dos deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C do cromeno **35** isolado de *C. hispida* são comparados na Tabela 4 com os dados publicados nos últimos anos para o 6-acetil-7-hidroxi-2,2-dimetilcromeno **35**, observando-se uma total concordância (ZHAI et al., 2010; GÓMEZ-HURTADO et al., 2012). As atribuições de deslocamentos químicos dos espectros de CHCR **35** foram facilitadas pela análise dos espectros DEPT90 e DEPT135.

Em conjunto, os dados analisados acima levaram ao estabelecimento da estrutura do 6-acetil-7-hidroxi-2,2-dimetilcromeno **35** para a substância cristalina CHCR **35** isolada do óleo essencial de *C. hispida* (Figura 18).

FIGURA 18 - Estrutura química do 6-acetil-7-hidroxi-2,2-dimetilcromeno **35**



Fonte: A autora

TABELA 4 - Deslocamentos químicos nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C do composto CHCR (CDCl_3) isolado, em comparação com dados publicados para o 6-acetil-7-hidroxi-2,2-dimetilcromeno **35**

Posição	RMN ^1H (δ)			RMN ^{13}C (ppm)		
	CHCR	REF ¹	REF ²	CHCR	REF ¹	REF ²
2 C	-	-	-	77,89	78,2	77,9
3 CH	5,57 d, 1H, J = 10 Hz	5,57 d, 1H, J = 10,2 Hz	5,57d, J = 9,96 Hz	128,88	129,1	128,8
4 CH	6,28 d, 1H, J = 10 Hz	6,27 d, 1H, J = 10,2 Hz	6,26 d, J = 9,96 Hz	120,99	121,4	120,9
5 CH	7,30 s	7,31 d, 1H, J = 1,8 Hz	7,29 s	128,57	129,7	128,5
6 C	-	-	-	113,93	114,6	113,9
7 C	-	-	-	165,10	165,1	165,0
8 CH	6,32 s	6,33 d, 1H, J = 1,8 Hz	6,33 s	104,48	104,5	104,4
9 C	-	-	-	160,45	160,7	160,4
10 C	-	-	-	113,55	114,0	113,5
11 C	-	-	-	202,32	203,1	202,3
12 CH ₃	2,53 s, 3H	2,54 s, 3H	2,52 s	26,19	26,3	26,2
13 e 14 CH ₃	1,44 s, 6H	1,45 s, 6H	1,43 s	28,54	28,4	28,5
OH	12,70 s, 1H		12,70 s	-	-	-

Nota: REF¹ = ZHAI et al., 2010; REF² = GÓMEZ-HURTADO et al., 2012.

8.3 ESTRUTURA QUÍMICA DO COMPOSTO CHAM

Para tornar possível uma comparação preliminar, são apresentados na Tabela 5 os rendimentos dos extratos contendo componentes fenólicos neutros obtidos em pH 8 com a mistura AcOEt/MeOH (30%) a partir das fases aquosas após a hidrodestilação das folhas coletadas em dezembro de 2012 e com AcOEt e a mistura AcOEt/MeOH (30%) da coleta feita em março de 2013 (item 7.4).

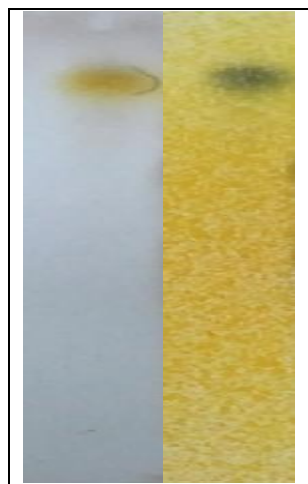
TABELA 5 - Rendimentos de todos os extratos obtidos em pH 8

Frações	Rendimentos	
	1ª Coleta	2ª coleta
AcOEt pH 8	90 mg (0,07%)	218 mg (0,14%)
AcOEt/MeOH pH 8	160 mg (0,13%)	153 mg (0,10%)

A solução aquosa restante após a hidrodestilação das folhas da primeira coleta, quando extraída com a mistura AcOEt/MeOH 30% em pH 8,0, produziu um extrato com rendimento de 0,1% (0,1531g). Análise cromatográfica desse extrato por CCD demonstrou a presença maciça de um componente, como mostram os cromatogramas revelados com solução de $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{MeOH}$ (1:1) seguido de

aquecimento e depois com solução de FeCl_3 5% em MeOH (Figura 19). A maior polaridade do solvente necessário para extrair essa substância a partir da solução aquosa em pH 8 sugeriu tratar-se de um composto neutro contendo em sua estrutura um grande número de grupos hidroxila.

FIGURA 19 - Análises por CCD da substância isolada CHAM reveladas com $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{MeOH}$ (esquerda) e com $\text{FeCl}_3/\text{MeOH}$ (direita)



Fonte: a autora.

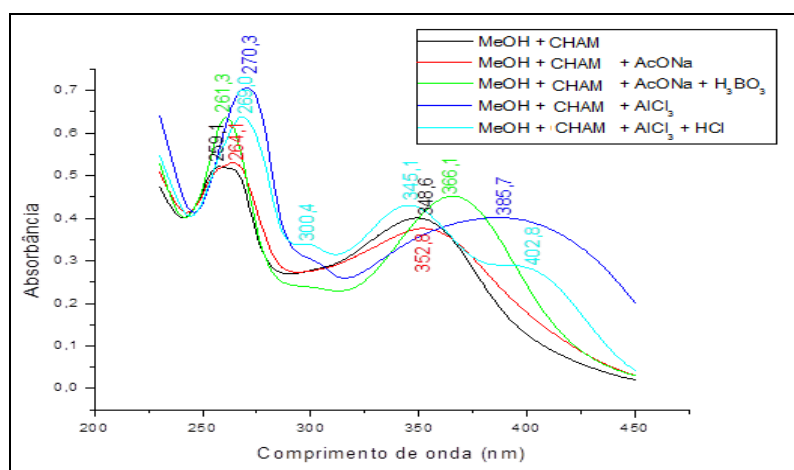
A Figura 20 mostra o espectro de UV-Vis da substância CHAM **41** obtido em MeOH, que apresenta absorções características de flavonoide, possivelmente um flavonol, principalmente pela banda II em 259,1 nm e banda I em 348,6 nm. Os demais espectros foram obtidos com adição de reagentes de deslocamento que permitem realizar uma abordagem inicial sobre o tipo de esqueleto carbônico e distribuição de hidroxilas fenólicas na estrutura (MARKHAM, 1982).

Na segunda medida, o deslocamento da banda II para 264,1 nm com adição de AcONa (+5 nm) indicou a presença de OH na posição C7 do anel A. Em seguida, com a adição de H_3BO_3 à solução metanólica contendo AcONa, observou-se um deslocamento batocrômico de +17,5 nm da banda I em relação ao espectro medido em metanol, indicando dois grupos *orto*-di-OH no anel B. Na quarta medida, adicionou-se uma gota de solução aquosa de AlCl_3 10% a uma nova porção da solução metanólica da amostra, causando um deslocamento da banda I de +37,1 nm e confirmando a presença de grupos *orto*-di-OH no anel B. Por último, repetiu-se a medida do espectro após adição de HCl, destruindo o complexo formado pelo AlCl_3 com as hidroxilas do anel B e confirmando a presença de OH na posição 5 (MARKHAM, 1982). As observações feitas na análise dos espectros de UV-Vis

permitem propor que o composto CHAM **41** tem a estrutura de uma flavona com pelo menos quatro hidroxilas fenólicas localizadas nas posições C3', C4', C5 e C7.

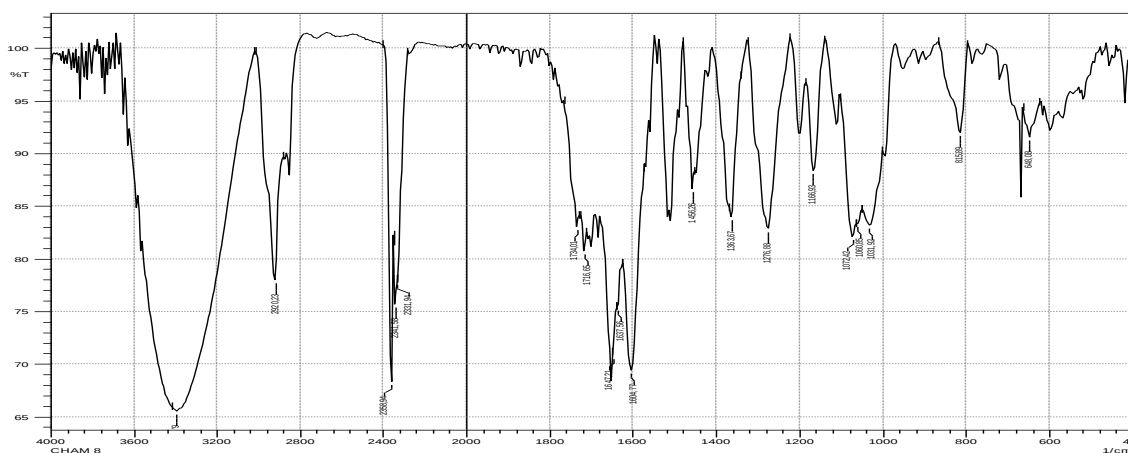
O espectro de infravermelho do flavonoide CHAM **41** (Figura 21) mostrou uma forte absorção em 3.381 cm^{-1} característica de vibrações axiais de ligações O-H que encobre a esperada banda devida aos grupos C-H sp^2 em torno de 3.080 cm^{-1} . As bandas de absorção observadas em 2.921 cm^{-1} e em $\sim 2.850\text{ cm}^{-1}$, devidas às vibrações de estiramento das ligações C-H sp^3 , indicam a presença de carbonos saturados de um substituinte ligado ao flavonoide. A banda de absorção em 1.658 cm^{-1} foi atribuída à aril-cetona ligada por ligação de hidrogênio à hidroxila em C5, e em 1.606 cm^{-1} e 1.507 cm^{-1} devidas às ligações C=C do sistema aromático. As bandas em 1.272 e 1.067 cm^{-1} podem ser atribuídas a deformações angulares de ligações C-O (NAME et al, 2013b).

FIGURA 20 - Espectros de UV-Vis da substância CHAM em metanol e com adição de reagentes de deslocamento



Fonte: a autora.

FIGURA 21 - Espectro de infravermelho da quercitrina **41** isolada, medido em KBr



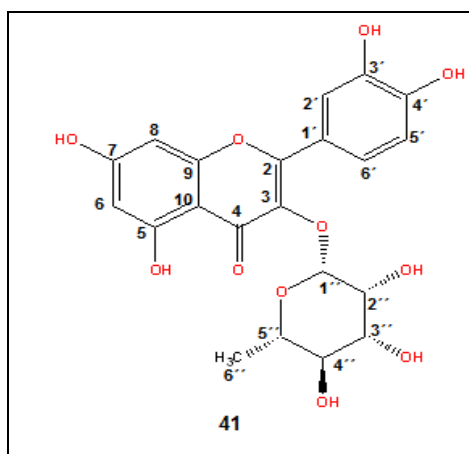
Fonte: a autora.

O flavonoide isolado foi analisado por RMN ^1H e ^{13}C (CD_3OD , Anexos 6 a 11). Os dois sinais de prótons do anel A apareceram como dubletos em δ 6,30 (H6) e δ 6,36 (H8) com constante de acoplamento de 2,0 Hz característica de acoplamento *meta*. No anel B, o próton H2' (δ 7,33) aparece como dubleto com $J = 2,0$ Hz e o H5' (δ 6,91) também como dubleto com $J = 8,4$ Hz, enquanto que o H6' (δ 6,21) forma um duplo dubleto com constantes de acoplamento de 8,4 Hz e 2,0 Hz, confirmando a substituição por duas hidroxilas nas posições C3' e C4'. Não é visto o sinal correspondente a um próton na posição C3, passando-se a supor que esta posição deveria estar portando um açúcar, o que conferiria a observada maior polaridade ao composto. A presença dos dubletos em δ 0,94 (3H) com constante $J = 6$ Hz e em δ 5,34 (1H) com $J = 1,6$ Hz, sugeriu tratar-se de um 3-O-ramnosídeo.

Assim, considerando todos os dados analíticos obtidos para a substância, os demais sinais do espectro de RMN ^1H (CD_3OD) foram atribuídos em comparação com a literatura para a quercetina-3-O-ramnopiranosídeo, também conhecido como quercitrina **41** (JUNG & PARK, 2007). Os deslocamentos químicos dos espectros de RMN ^{13}C do flavonoide isolado, inclusive espectros DEPT, também foram comparados dados da literatura obtidos no mesmo solvente (CD_3OD), mostrando total concordância (JUNG & PARK, 2007; WU et al., 1994).

Os dados referentes aos espectros de RMN ^1H e ^{13}C da quercitrina **41** isolada neste trabalho estão dispostos na Tabela 6, ao lado de valores de deslocamentos químicos e constantes de acoplamento publicados. A Figura 22 apresenta a estrutura do flavonoide glicosídeo, bem como a numeração de seu esqueleto carbônico.

FIGURA 22 - Estrutura química do quercetin-3-O-ramnopiranosídeo **41** e numeração usual de sua cadeia carbônica



Fonte: a autora.

TABELA 6 - Deslocamentos químicos nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C da quercitrina **41** isolada de *C. hispida*, em comparação com dados publicados (CD_3OD)

Posição	RMN ^1H (δ)		RMN ^{13}C (ppm)	
	41	REF ¹	41	REF ²
2 C	-		157,92	158,5
3 C	-		134,85	136,3
4 C=O	-		178,26	179,6
5 C	-		161,81	163,2
6 CH	6,30 d, 1H, J = 2,0 Hz	6,24 d, 1H, J = 2,2 Hz	98,41	99,9
7 C	-		164,45	165,8
8 CH	6,36 d, 1H, J = 2,0 Hz	6,41 d, 1H, J = 2,2 Hz	93,32	94,8
9 C	-		157,13	159,4
10 C	-		104,51	105,9
1' C	-		121,47	123,0
2' CH	7,33 d, 1H, J = 2,0 Hz	7,38 d, 1H, J = 2,1 Hz	114,98	116,4
3' C	-		145,01	146,4
4' C	-		148,39	149,8
5' CH	6,91 d, 1H, J = 8,4 Hz	6,95 d, 1H, J = 8,3 Hz	115,55	117,0
6' CH	7,30 dd, 1H, J = 8,4; 2,0 Hz	7,35 dd, 1H, J = 8,4; 2,0 Hz	121,58	123,0
1'' CH	5,34 d, 1H, J = 1,6 Hz	5,40 d, 1H, J = 1,7 Hz	102,15	103,6
2'' CH	4,22 dd, 1H, J = 1,6; 3,2 Hz	4,26 dd, 1H, J = 1,7; 3,4 Hz	70,63	72,0
3'' CH	3,75 dd, 1H, J = 3,2; 9,2 Hz	3,79 dd, 1H, J = 3,4; 9,3 Hz	70,73	72,1
4'' CH	3,32 - 3,37 m, 1H	3,37 d, 1H, J = 9,6 Hz	71,86	73,3
5'' CH	3,38 - 3,46 m, 1H	3,46 dq, 1H, J = 6,0; 9,6 Hz	70,50	71,8
6'' CH ₃	0,94 d, 3H, J = 6 Hz	0,98 d, 3H, J = 6 Hz	16,25	17,7

Nota: REF¹ = JUNG & PARK, 2007; REF² = WU et al., 1994.

8.4 CONSTITUINTES FENÓLICOS ÁCIDOS DE *Calea hispida*

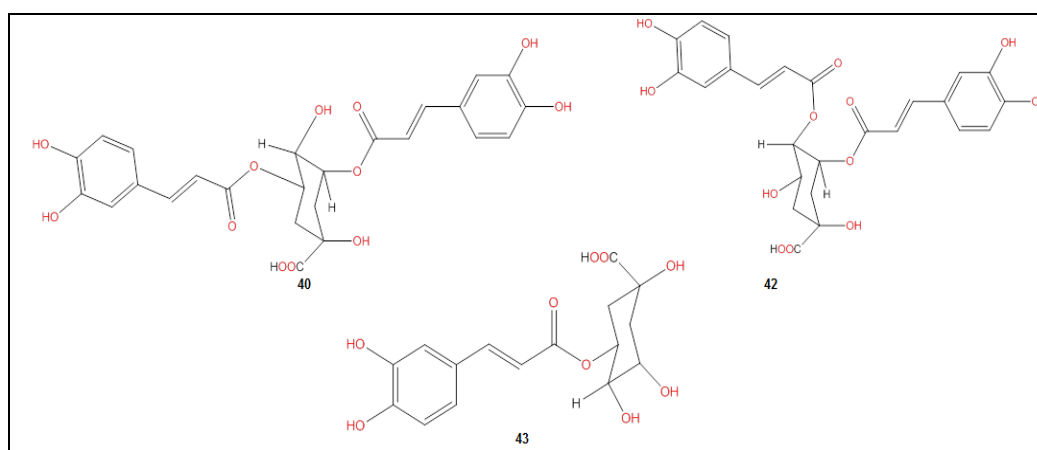
Os rendimentos dos diversos extratos obtidos em pH 4 com AcOEt e com a mistura AcOEt/MeOH 30% a partir de soluções aquosas restantes após as hidrodestilações das folhas da primeira e da segunda coletas (dezembro de 2012 e março de 2013, respectivamente; item 7.4) são mostrados na Tabela 7.

TABELA 7 - Rendimentos de todos os extratos obtidos em pH 4

Frações	Rendimentos	
	1ª Coleta	2ª coleta
AcOEt pH 4	-	1,39 g (0,93%)
AcOEt/MeOH 30% pH 4	1,88 g (1,55%)	7,60 g (5,16%)

A partir da solução aquosa restante após a obtenção do óleo essencial por hidrodestilação das folhas da segunda coleta botânica, foi obtido o extrato obtido com AcOEt em pH 4 (CHA4, item 7.4), obtendo-se um rendimento de 0,92% (1,398 g). Uma análise cromatográfica desse extrato por CCD é mostrada na Figura 24, em comparação com o composto CHAM (quercitrina **41**, item 8.2). O flavonoide **41** apresentou $R_f = 0,90$ e aparece como componente minoritário no extrato CHA4, como se observa pelo ponto misto, além de três outros componentes fenólicos com R_f de 0,82, 0,70 e 0,50. Uma comparação desse extrato por CCD com os ácidos 3,5-dicafeoilquínico **40** e 4,5-dicafeoilquínico **42** isolados anteriormente de *Baccharis uncinella* DC. em nosso laboratório (JASINSKI, 2010), permitiu identificar tentativamente os componentes de polaridade intermediária: **40** ($R_f = 0,82$) e **42** ($R_f = 0,70$).

FIGURA 23 - Estruturas químicas dos ácidos 3,5-dicafeoilquínico **40**, 4,5-dicafeoilquínico **42** e 3-cafeoilquínico **43**

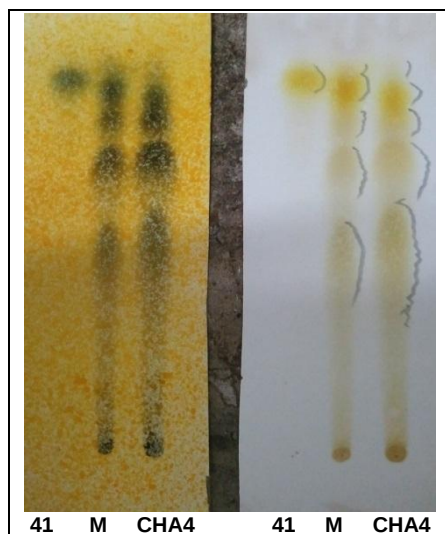


Fonte: A autora

O composto fenólico mais polar do extrato ($R_f = 0,50$, Figura 24) mostrou-se cromatograficamente semelhante ao ácido 3-cafeoilquínico **43**, embora os R_f s de ambos não coincidissem totalmente nas condições analíticas utilizadas.

A massa de 1,3 g do extrato AcOEt obtido em pH 4 (CHA4) foi fracionada em coluna cromatográfica visando isolar este componente. As frações da coluna de fracionamento foram analisadas por CCD, agrupadas conforme Tabela 8 e seus respectivos rendimentos foram calculados. A tentativa de isolar o componente fenólico mais polar do extrato CHA4 levou à obtenção de uma substância codificada como CHA4E contendo impurezas, reunida nas frações 11 a 15 (83 mg, 5,97% de rendimento).

FIGURA 24 - CCD sobre placas de sílica comparando a quercitrina **41** (CHAM) e o extrato CHA4



Eluente: AcOEt/MeOH/H₂O (8,0:2,0:0,5);
 à esquerda: revelador FeCl₃/MeOH 5%;
 à direita: CCD revelada com mistura de
 H₂SO₄/MeOH (1:1) e aquecimento.
 Fonte: a autora.

TABELA 8 - Frações da coluna cromatográfica do extrato CHA4

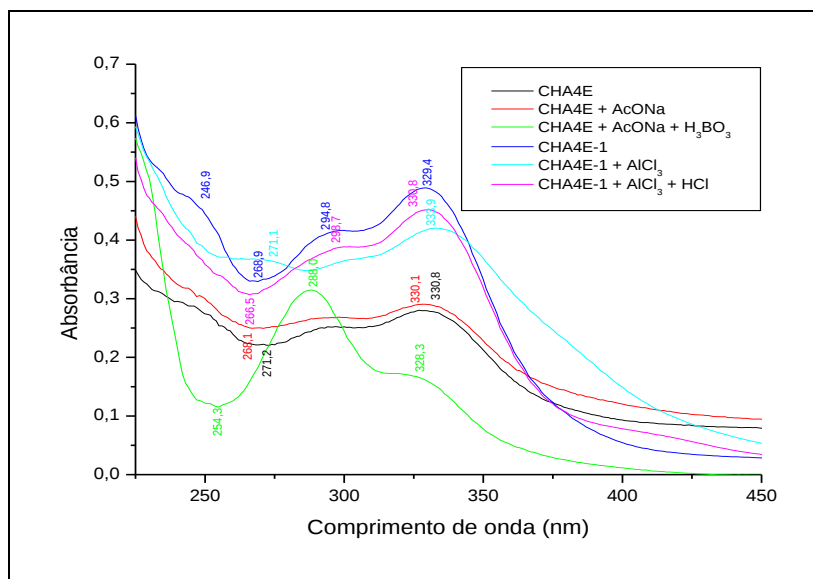
Fração	Amostras reunidas	Massa (mg)	Rendimento (%)
CHA4A	1 – 2	11,00	0,76
CHA4B	3	292,00	20,90
CHA4C	4 – 7	704,50	50,37
CHA4D	8 – 10	152,20	10,88
CHA4E	11 – 15	83,50	5,97
CHA4F	16 – 23	5,07	3,63
CHA4G	24 – 50	3,23	2,34

Nota: Rendimento das frações em relação à amostra inicial.

A Figura 25 mostra os espectros de UV-Vis da substância CHA4E utilizando-se os reagentes de deslocamento normalmente empregados para flavonoides (MARKHAM, 1982). O primeiro espectro, medido em metanol sem nenhum aditivo, é típico do cromóforo formado pelas conjugações da estrutura do ácido cafeico, apresentando máximo de absorção em 330,8 nm e um ombro em próximo de 300 nm (SDBS, 2013). Com adição de AcONa, não houve alteração em comparação com o espectro medido em metanol, sugerindo a inexistência de algum grupo OH ácido, como ocorre por exemplo nas 7-hidroxiflavonas. O terceiro espectro foi medido após a adição de H₃BO₃ e deu origem às seguintes absorções: uma banda

mais intensa em 288,0 nm e um ombro em 328,3 nm, o que não se observa nos sistemas *orto*-di-OH de flavonoides (MARKHAM, 1982) ou de ácidos dicafeoilquínicos (BESTEN, 2012; SIMIONI, 2013). A adição de AlCl_3/HCl não causou nenhuma alteração em relação ao espectro inicial obtido em metanol, sugerindo a existência de um substituinte em uma das hidroxilas do grupamento *orto*-di-OH.

FIGURA 25 - Espectros de UV-Vis da fração CHA4E (Tabela 8)



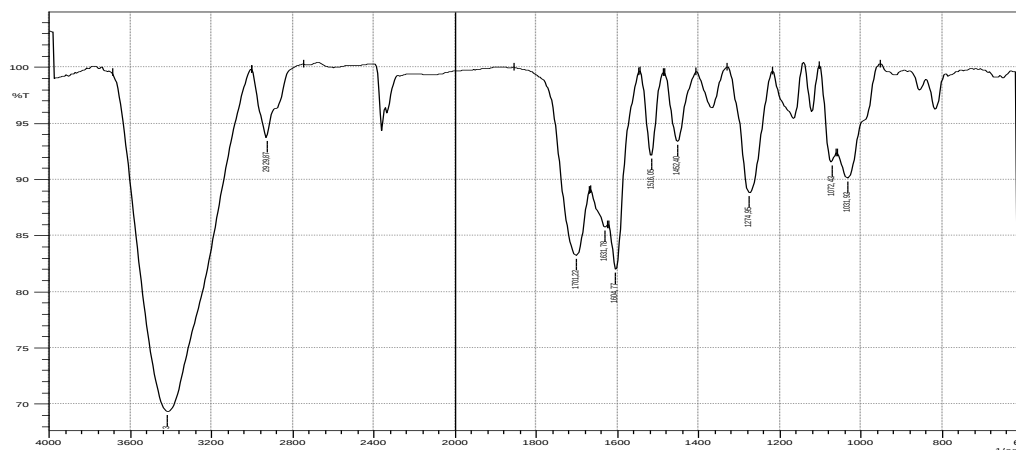
Fonte: A autora

O espectro de infravermelho (Figura 26) da fração CHA4E mostrou uma banda forte em 3.397 cm^{-1} característica de vibrações axiais de ligações O-H. Foi também observada uma banda de absorção em 2.929 cm^{-1} devida à vibração de ligações C-H sp^3 . A banda em 1.696 cm^{-1} refere-se à vibração axial de carbonila α,β -insaturada, podendo ser devida a um éster, já que não se observa a banda larga característica da ligação O-H de ácido carboxílico. Observa-se uma banda forte em 1.606 cm^{-1} e outra de média intensidade em 1.515 cm^{-1} , devidas à vibração axial das ligações C=C de sistema aromático. A banda em 1.273 cm^{-1} pode ser atribuída às deformações angulares de ligações C-O.

Considerando todos os dados discutidos acima relativos ao composto fenólico da fração CHA4E, pode-se sugerir que se trata de um éster do ácido cafeico. No espectro de infravermelho (Figura 26), não é observada a banda larga entre 3.300 e 2.500 cm^{-1} típica de ácidos carboxílicos. Isto afasta também a possibilidade de se tratar de um éster cafeoil do ácido quínico, sugerindo que as

fortes absorções no espectro de infravermelho devidas às ligações O-H se devem não só à sua natureza fenólica, mas também à presença de uma porção de açúcar na molécula do principal componente da fração CHA4E.

FIGURA 26 - Espectro de infravermelho da fração CHA4E medido em KBr



Fonte: A autora

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C da fração CHA4E são de difícil análise, parecendo mostrar a presença de várias substâncias. Nos espectros de ^1H , os sinais aparecem acumulados em multipletos, sugerindo a presença de mistura de isômeros, mas distribuídos em deslocamentos químicos característicos dos ésteres do ácido cafeico (CHOI et al., 2004). Os dubletos em δ 6,29 e δ 7,56 com constantes de acoplamento $J=15,6$ Hz podem ser atribuídos aos hidrogênios da dupla ligação *trans* entre o anel aromático e a carbonila. Os sinais em δ 7,05 s, δ 6,78 d $J = 7,6$ Hz e δ 6,94 d $J = 7,2$ Hz caracterizam o anel aromático do éster cafeoil. A complexidade do espectro nas regiões entre δ 3,0 e δ 4,5, onde absorvem os prótons de diversos açúcares, não permite uma atribuição específica. Além disto, os sinais complexos entre δ 2,7 e δ 0,7 também não podem ser atribuídos.

No espectro de RMN ^{13}C são observados sinais que podem ser atribuídos a carbonos sp^2 de um éster do ácido cafeico (CHOI et al., 2004): 167,47, 115,15 e 145,68 ppm atribuíveis a uma carbonila α,β -insaturada; 113,83, 113,92 e 121,63 ppm que são os sinais dos três carbonos aromáticos ligados a hidrogênios; 126,42, 145,46 e 148,13 ppm, três carbonos aromáticos quaternários. Açúcares podem estar ligados a uma das hidroxilas fenólicas na forma de glicosídeo e ao oxigênio do éster.

Os espectros DEPT90 e DEPT135 confirmaram a presença dos quatro carbonos quaternários, três grupos CH aromáticos e mais dois CH sp^2 da dupla

trans, todos atribuíveis a um éster cafeoil. Dois carbonos saturados CH₂ em 61,34 e 61,06 ppm, são possivelmente de porções de açúcares, e um terceiro CH₂ saturado em 36,93 ppm, o qual isoladamente não pertence a alguma porção de ácido quínico em estruturas de ácidos cafeoilquínicos conhecidos (TATEFUGI et al., 1996).

Desta forma, os dados dos espectros de RMN ¹H e ¹³C apenas confirmaram claramente a existência do éster cafeoil ligado a açúcar, sem permitir maiores esclarecimentos sobre a estrutura do composto principal presente na fração CHA4E.

8.5 AÇÃO FUNGITÓXICA DE *Calea hispida*

Este estudo teve como propósito avaliar a inibição do crescimento micelial dos fitopatógenos *Fusarium graminearum* e *Sclerotinia sclerotiorum*, testando-se as substâncias isoladas 6-acetil-7-hidroxi-2,2-dimetilcromeno **35**, quercitrina **41**, o óleo essencial CHOE e o extrato aquoso CHEA (itens 7.2, 7.4 e 7.5).

Estudos anteriores sobre óleos essenciais e extratos aquosos de outras plantas pertencentes ao gênero *Calea* demonstraram ação fungitóxica sobre diferentes fitopatógenos. Os óleos essenciais de *C. glomerata* (ROYERO et al., 2010) e *C. clematidea* (FLACH et al., 2002) são conhecidos por possuir atividade antifúngica. O extrato aquoso de *C. glomerata* também possui atividade antifúngica conforme relato pelos autores Royero e colaboradores (2010).

Conforme mostrado no esquema para a obtenção de extratos adotado na presente pesquisa (item 7.4, página 38), o extrato aquoso de *C. hispida* (CHEA) já estava destituído dos componentes do óleo essencial, como o cromeno **35**.

Até o momento não foi encontrado nenhum relato de estudo de ação fungitóxica do cromeno **35**. No presente estudo, o óleo essencial de *C. hispida* apresentou este cromeno em alta proporção e este foi isolado do óleo, permitindo a realização de testes com esta substância isolada. O flavonoide quercitrina **41**, em concentrações abaixo de 225 ppm apresentou apenas atividade moderada *in vitro* contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (CURIR et al., 1996).

Um experimento preliminar foi realizado utilizando as quatro amostras de substâncias de *C. hispida* contra o fitopatógeno *F. graminearum*. Não houve efeito inibitório do crescimento micelial causado por nenhuma das substâncias nas concentrações avaliadas, de 10 ppm, 30 ppm, 50 ppm, 70 ppm e 100 ppm.

O segundo experimento foi realizado utilizando as quatro substâncias contra o fitopatógeno *S. sclerotiorum* constatando-se uma boa relação dose-efeito e resultados estatisticamente significativos, como mostrado na Tabela 9.

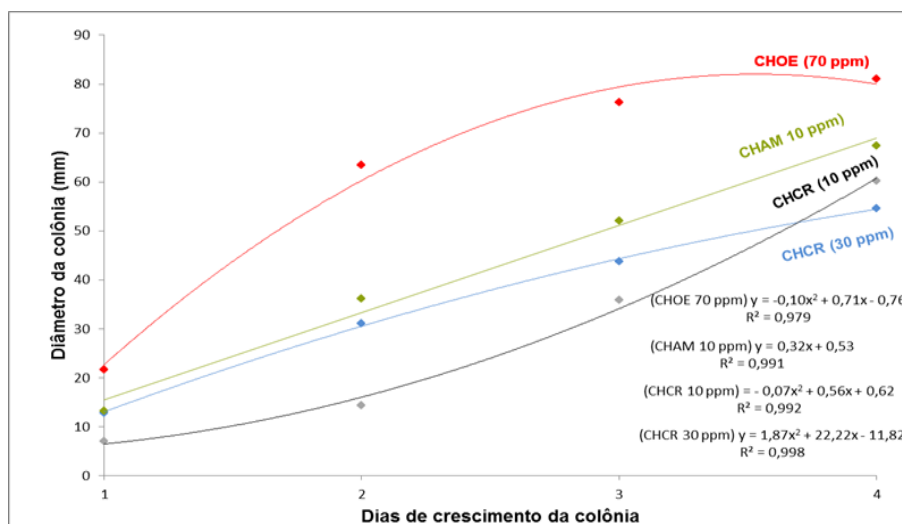
TABELA 9 - Resultado do teste de Tukey do efeito do óleo essencial (CHOE), extrato aquoso (CHEA), 6-acetil-7-hidroxi-2,2-dimetilcromeno **35** e quercitrina **41** no experimento sobre o índice de velocidade de crescimento de *Sclerotinia sclerotiorum* em diferentes concentrações

Substância	Concentração (ppm)				
	10	30	50	70	100
CHOE	15,50 aAB	18,10 abA	15,68 aAB	14,85 bB	16,90 aAB
CHEA	13,65 aA	16,35 bcA	15,10 aA	15,47 bA	14,67 aA
35	10,45 bC	13,55 CB	16,45 aB	19,83 aA	14,55 aB
41	13,30 abc	19,55 aA	17,43 aAB	15,67 bBC	14,92 aBC
C.V.%	11,02				

NOTA: Médias seguidas da mesma letra minúscula na mesma linha e maiúscula na mesma coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; C.V.= coeficiente de variação.

Observou-se inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* causado pelo óleo essencial CHOE, pelas substâncias **35** e **41**, mas não pelo o extrato aquoso CHEA. O efeito de **35** nas doses 10 ppm e 30 ppm foi estatisticamente mais significativo, mas a 50 ppm e 100 ppm nenhuma substância difere entre si estatisticamente. Na concentração 70 ppm, CHOE, CHEA e **41** não diferem entre si estatisticamente, mas diferem estatisticamente de **35**.

FIGURA 27 - Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) em várias concentrações das quatro substâncias testadas *in vitro* contra *Sclerotinia sclerotiorum*, com resultados significativos no teste de Tukey



Fonte: A autora. CHOE = óleo essencial; CHCR = **35**; CHAM = **41**.

O efeito fungitóxico da quercitrina **41** sobre o desenvolvimento de *S. sclerotiorum* foi observado somente na concentração de 10 ppm, enquanto que para o óleo essencial (CHOE) observou-se somente na concentração a 70 ppm (Tabela 9 e Figura 27). No presente estudo, o extrato aquoso de *C. hispida* não teve efeito antifúngico nas concentrações testadas.

Embora os resultados obtidos *in vitro* sejam favoráveis ao emprego destas substâncias (CHCR, CHAM e CHOE) no controle do fungo fitopatogênico *S. sclerotiorum*, estudos futuros desenvolvidos a campo serão necessários para a avaliação da fungitoxicidade das substâncias *in vivo*.

8.6 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA QUERCITRINA **41**

Os resultados dos testes biológicos apresentados a seguir para a quercitrina **41** foram realizados em cooperação com um grupo de pesquisas do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais.

A atividade inibidora de acetilcolinesterase *in vitro* foi medida para a quercitrina **41**, que apresentou $93,16 \pm 0,4$ % de inibição, bem próximo ao resultado obtido para a eserina usada como controle positivo ($93,6 \pm 0,3\%$). Por tratar-se de uma substância polar, que não ultrapassa as barreiras de proteção cerebral, estes resultados sugerem que derivados menos polares de **41** poderiam servir, por exemplo, para tratamento sintomático da doença de Alzheimer (YANG et al., 2012).

A quercitrina **41** também foi avaliada quanto à sua atividade contra diversas estirpes de microorganismos, apresentando-se muito ativa contra *C. glabrata* em comparação com o controle, como mostrado na Tabela 10.

A atividade alelopática do composto fenólico quercitrina **41** foi avaliada com uso de um teste que mede o crescimento radicular de *Lactuca sativa* e liberação dessa substância no solo pela planta. Numa concentração de 0,01 mmol L⁻¹, **41** apresentou uma atividade estimulante do crescimento radicular entre 30 e 35% maior em relação ao branco. Foi observado um efeito estimulador da germinação de *L. sativa* utilizando a mesma concentração de **41**. De acordo com Macías e colaboradores (2000), substâncias alelopáticas testadas em bioensaios tendem a ter efeitos inibidores (potenciais herbicidas), apenas em doses mais elevadas. Em

concentrações mais baixas, normalmente o efeito inibidor diminui e, por vezes, pode alcançar um efeito estimulador (Macías et al., 2000).

TABELA 10 - Resultados das determinações da concentração inibitória mínima em porcentagem (CIM) da quercitrina **41** *in vitro* contra várias estirpes de bactérias e leveduras, comparando com padrão de cloranfenicol

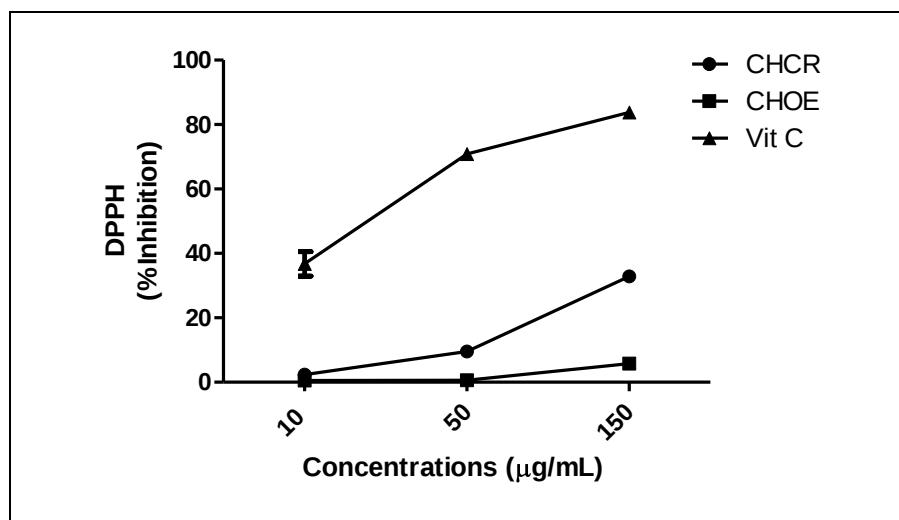
Microorganismo	41	Cloranfenicol
<i>Bacillus cereus</i>	17,1 ± 0,30	94,2 ± 1,55
<i>Listeria monocytogenes</i>	54,0 ± 1,25	89,7 ± 11,1
<i>Staphylococcus aureus</i>	24,7 ± 3,40	96,4 ± 5,16
<i>Candida albicans</i>	19,2 ± 0,98	72,8 ± 9,21
<i>Escherichia coli</i>	21,6 ± 0,33	97,7 ± 1,04
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18,1 ± 1,58	94,5 ± 3,38
<i>Salmonella typhimurium</i>	25,5 ± 1,17	95,1 ± 5,02
<i>Candida glabrata</i>	40,9 ± 1,23	45,9 ± 1,27

Nota: 5 µg mL⁻¹ de quercitrina **41** e de cloranfenicol.

8.7 AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DE SUBSTÂNCIAS VOLÁTEIS

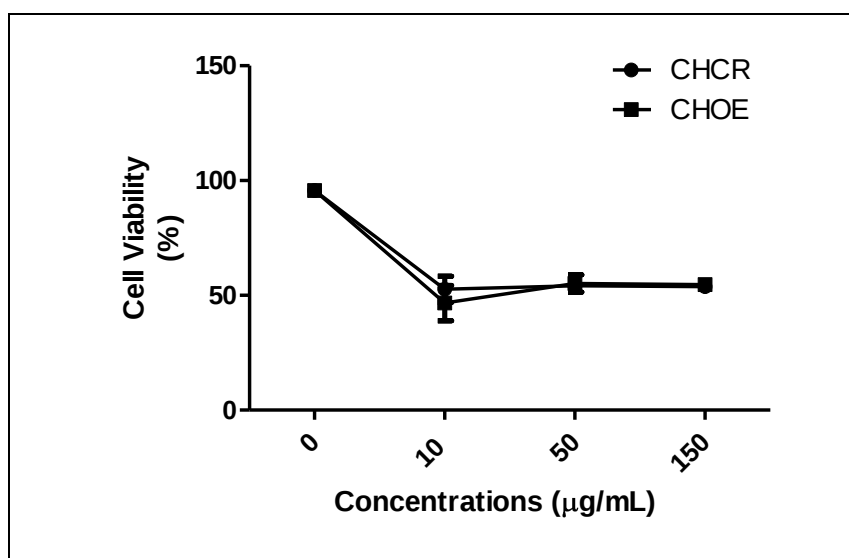
Os resultados da avaliação do poder antioxidante do óleo essencial de *C. hispida* (CHOE) e do cromeno **35** (CHCR) isolado do óleo são apresentados na Figura 28. O composto fenólico **35** mostrou um maior poder antioxidante contra o radical livre DPPH do que o óleo essencial bruto, sugerindo que a atividade desse último se deve à presença maciça do cromeno.

FIGURA 28 - Porcentagem de inibição do radical DPPH *versus* concentração do óleo essencial (CHOE) do cromeno **35** em comparação com o controle de vitamina C



No teste da viabilidade celular, uma maior atividade indica que a substância testada protege os leucócitos contra condições que levam à lise (item 7.6.2). Geralmente, as substâncias fenólicas são protetoras das células devido à sua atividade antioxidante, mas observa-se neste caso, que nem o cromeno **35** e nem o óleo essencial apresentam efeitos positivos nas doses testadas. Pelo contrário, diminuem a viabilidade celular de modo similar nas três doses (Figura 29).

FIGURA 29 - Viabilidade celular de leucócitos *versus* concentração de substâncias voláteis (óleo essencial CHOE e CHCR **35**)



Os resultados preliminares dos testes apresentados acima foram realizados em cooperação com pesquisadores da Universidade Federal de Santa Maria.

9 CONCLUSÕES

Os métodos empregados para as coletas, preparação dos materiais vegetais, obtenção e análise dos óleos essenciais e substâncias isoladas do extrato aquoso de *C. hispida* permitiu observar algumas similaridades entre as amostras de óleos essenciais das folhas. No entanto, a primeira coleta de material vegetal foi feita em local e época diferente das outras duas coletas, observando-se diferenças notáveis nas porcentagens relativas de alguns componentes dos óleos essenciais quando são comparados os voláteis das duas proveniências.

O óleo essencial das folhas de *C. hispida* foi estudado pela primeira vez nesta pesquisa. Pela primeira vez, o cromeno 6-acetil-7-hidroxi-2,2-dimetilcromeno **35** foi obtido por hidrodestilação de um material vegetal.

Com os métodos empregados nessa pesquisa para extração dos metabólitos secundários, foi possível obter a quercitrina **41** com um bom grau de pureza numa fração do extrato aquoso separada com solvente orgânico. Assim, o método de extração permitiu separar flavonoides e ácidos fenólicos já nos extratos brutos. Os métodos químicos utilizados permitiram mostrar que *C. hispida* é uma fonte vegetal importante para a obtenção dos compostos fenólicos **35** e **41**.

O extrato obtido com acetato de etila em pH 4 a partir das folhas de *C. hispida* permitiu demonstrar a ocorrência de ácidos cafeoilquínicos, classe de compostos naturais anteriormente encontrada em apenas uma outra espécie desse gênero. Assim, o método de fracionamento empregado no presente estudo, que foi inicialmente desenvolvido em nosso laboratório para o estudo químico de espécies do gênero *Baccharis*, abre caminho para a pesquisa de compostos fenólicos dessa classe presentes em espécies de outros gêneros da família Asteraceae.

O desenvolvimento da presente pesquisa permitiu também traçar um perfil da bioatividade da *C. hispida* através da realização de testes biológicos tanto de extratos brutos (óleo essencial e extrato aquoso) como de suas respectivas substâncias majoritárias. Os resultados do presente estudo demonstraram um bom potencial para a quercitrina **41**, para o 6-acetil,7-hidroxi-2,2-dimetilcromeno **35** e para o próprio óleo essencial bruto no controle alternativo do Mofo Branco por apresentarem efeitos fungitóxicos diretos sobre *Sclerotinia sclerotiorum*.

10 REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by Gas Chromatography - Mass Spectroscopy**. 1^a ed, Allured: Carol Stream, 1995.
- AHMAD, B. F; JANTAN, B. I. Chemical constituents of the essential oils of *Goniiothalamus uvarioides* KING. **Flavour Frag. J.**, v. 18, p. 128-130, 2003.
- BARROSO, G. M.; PEIXOTO, A. L.; ICHASO, C. L. F.; COSTA, C. G.; GUIMARÃES, E. F.; LIMA, H. C. **Sistemática das angiospermas do Brasil**. Editora Universitária UFV: Viçosa, v. 3, 1991.
- BESTEN, M. A. **Estudo químico de três espécies do gênero *Baccharis*: *B. trimera*, *B. milleflora* e *B. pentaptera* (Seção Caulopterae)**. 2012. 121 f. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2012.
- BOHLMANN, F.; GRENZ, M. Neue isopentenyl-acetophenon-derivate aus *Helianthella uniflora*. **Chem. Ber.**, v. 103, p. 90-96, 1970.
- BOHLMANN, F.; JAKUPOVIC, J.; Über neue chromene und andere inhaltsstoffe von *Lagascea rigida*. **Phytochemistry**, v. 17, p. 1677-1878, 1978.
- BOHLMANN, F.; GUPTA, R. K.; JAKUPOVIC, J.; KING, R. M.; ROBINSON, H. Furanoheliangolides and farnesol derivatives from *Calea hispida*. **Phytochemistry**, v. 21, n. 12, p. 2899-2903, 1982.
- BOHLMANN, F.; MOHAMMADI, D.; MOHAMMADI, P. S.; JAKUPOVIC, J.; KING, R. M.; ROBINSON, H. Germacranolides related to chapliantrin from *Calea Harleyi*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 5, p. 1095-1097, 1984.
- BREMER, K. Major clades and grades of the Asteraceae. In *Compositae: Systematics. Proceedings of the International Compositae Conference*, Kew, 1994 (D. J. N. Hind & H. J. Beentje, eds.) **Royal Botanic Gardens**, Kew, v. 1, p. 1-7, 1996.
- CAREDDA, A.; MARONGIU, B.; PORCEDDA, S.; SORO, C. Supercritical carbon dioxide extraction and characterization of *Laurus nobilis* essential oil. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, p. 1492-1496, 2002.
- CAS. **Chemical Abstracts System**. Disponível em: <<https://www.cas.org/>>. Acesso em: 21 ago 2013.
- CHOI, C. W.; KIM, S. C.; HWANG, S. S.; CHOI, B. K.; AHN, H. J.; LEE, M. Y.; PARK, S. H.; KIM, S. K. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. **Plant Sci.**, v. 153, p. 1161-1168, 2002.

CHOI, S. Z.; CHOI, S. U.; LEE, K. R. Phytochemical constituents of the aerial parts from *Solidago virgaurea* var. *gigantea*. **Arch. Pharm. Res.**, v. 27, n. 2, p. 164-168, 2004.

CURIR, P.; MARCHESINI, A.; DANIELI, B.; MARIANI, F. 3-Hydroxiacetophenone in carnations is a phytoanticipin active against *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. **Phytochemistry**, v. 41, n. 2, p. 447-450, 1996.

DINIZ, A. C. B.; ASTARITA, L. V.; SANTARÉM, E. R. Alteração dos metabólitos secundários em plantas *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae) submetidas à secagem e ao congelamento. **Acta Bot. Bras.**, v. 21, n. 2, p. 443-450, 2007.

ELLMAN, G. L., COURTNEY, K. D., ANDRES, V., FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem. Pharmacol.**, v. 7, p. 88-95, 1961.

FLACH, A.; GREGEL, B.; SIMIONATTO, E.; SILVA, U. F. da; ZANATTA, N.; MOREL, A. F.; LINARES, C. E. B.; ALVES, S. H. Chemical analysis and antifungal activity of the essential oil of *Calea clematidea*. **Planta Med.**, v. 68, p. 836-838, 2002.

GÓMEZ-HURTADO, M. A.; AVIÑA-VERDUZCO, J.; GONZÁLEZ-CAMPOS, B.; LÓPEZ-CASTRO, Y.; RODRÍGUEZ-GARCIA, G.; CERDA-GARCÍA-ROJAS, C. M.; RIO, R. E. del. X-Ray diffraction and NMR studies of two chromenes from the roots of *Ageratina arsenei*. **Rev. Latinoam. Quím.**, 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. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 22, n. 12, p. 2391-2395, 2011.

GUERRERO, M. F.; PUEBLA, P.; CARRÓN, R.; MARTÍN, M. L.; ARTEAGA, L.; ROMÁN, L. S. Assessment of the antihypertensive and vasodilator effects of ethanolic extracts of some Colombian medicinal plants. **J. Ethnopharmacol.**, v. 80, p. 37-42, 2002.

IPNI. **The International Plant Names Index**. 2014. Disponível em: <<http://www.ipni.org/>>. Acesso em: 03 fev 2014.

IUPAC. **International Union of Pure and Applied Chemistry**. 1999. Disponível em: <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/sectionF/terpenoid/terp7.html>>. Acesso em: 22 nov 2013.

JASINSKI, V. C. G. **Óleos essenciais e compostos fenólicos de espécimes masculinos e femininos de *Baccharis uncinella* DC.**. 2010. 95 f. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2010.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 10^a ed, Cia Editora Nacional: São Paulo. 1991.

JUNG, M.; PARK, M. Acetylcholinesterase inhibition by flavonoids from *Agrimonia pilosa*. **Molecules**, v. 12, p. 2130-2139, 2007.

KATO, E. T. M.; AKISUE, M. K.; MATOS, F. J. A.; CRAVIEIRO, A. A.; ALENCAR, J. M. Constituents of *Calea pinnatifida*. **Fitoterapia**, v. 65, n. 4, p. 377, 1994.

LANA, E. J. L., CARAZZA, F., TAKAHASHI, J. A. Antibacterial evaluation of some new 2-aryl-3,5-dimethoxy-1,4-benzoquinone derivatives. **J. Agric. Food Chem.**, v. 54, p. 2053, 2003.

MACÍAS, F. A., CASTELLANO, D., MOLINILLO, J. M. G. Search for a standard phytotoxic bioassay for allelochemicals. Selection of standard target species. **J. Agric. Food Chem.**, v. 48, p. 2512-2521, 2000.

MALDONADO, E.; MÁRQUEZ, C. L.; ORTEGA, A. A thymol derivative from *Calea nelsonii*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 7, p. 2527-2528, 1992.

MARKHAM, K. R. **Techniques of flavonoid identification**. 1ª ed, Academic Press: Londres.1982.

MONTGOMERY, D. C. **Introdução ao controle estatístico da qualidade**. 4ª ed. LTC-Livros Técnicos e científicos. Rio de Janeiro. 2004.

NAKAGAWA, Y.; INUMA, M.; MATSUURA, N.; YI, K.; NAOI, M.; NAKAYAMA, T.; NOZOWA, Y.; AKAO, Y. A potent apoptosis-inducing activity of a sesquiterpene lactone, arucanolide, in HL60 cells: a crucial role of apoptosis-inducing factor. **J. Pharmacol. Sci.**, v. 97, p. 242-252, 2005.

NAME, L. H.; NUNES, D. S.; BESTEN, M. A.; Óleo essencial das folhas de *Calea hispida*. In: XII Encontro de Pesquisas da UEPG, 2013, Ponta Grossa. **XII EUEPG - Resumos**. Ponta Grossa: UEPG, p. 1654, 2013a.

NAME, L. H.; NUNES, D. S.; BESTEN, M. A.; Cromeno isolado do óleo essencial das folhas de *Calea hispida*. In: XX SBQ-Sul Sociedade Brasileira de Química da Região Sul, 2013, Lajeado. **Anais da XX Encontro de Química da Região Sul**: Lajeado: Editora Univates, p. 307, 2013b.

NAME, L. H.; NUNES, D. S.; BESTEN, M. A.; Isolamento do flavonoide quercitrina das folhas de *Calea hispida*. In: XX SBQ-Sul Sociedade Brasileira de Química da Região Sul, 2013, Lajeado. **Anais da XX Encontro de Química da Região Sul**: Lajeado: Editora Univates, p. 350, 2013c.

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

NASCIMENTO, A. M. do; SALVADOR, M. J.; CANDIDO, R. C.; ALBUQUERQUE, S.; OLIVEIRA, D. C. R. Trypanocidal and antifungal activities of *p*-hydroxyacetophenone derivatives from *Calea uniflora* (Heliantheae, Asteraceae). **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 56, p. 663-669, 2004b.

NASCIMENTO, A. M. do; OLIVEIRA, D. C. R. A 5-deoxyflavone glycoside from *Calea uniflora* L. (Asteraceae). **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 32, p. 1079-1081, 2004c.

OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes e no controle de tratamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) e pimentão (*Capsicum annuum* L.)**.1991. 111 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 1991.

PEREIRA, M. C.; VILELA, G. R.; COSTA, L. M. A. S.; SILVA, R. F. da; FERNANDES, A. F.; FONSECA, E. W. N. da; PICCOLI, R. H. Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. **Ciênc. Agrotec.**, v. 30, n. 4, p. 731-738, 2006.

PUEBLA, P.; ARANGUREN, N.; RINCÓN, J.; ROJAS, M.; GUERRERO, M.; FELICIANO, A. S. Polar compounds isolated from the leaves of *Calea prunifolia* H.B.K. and their anti-adrenergic related vasodilator activity. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 22, n. 12, p. 2281-2285, 2011.

REFLORA, **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 16 Mar. 2014.

RIBEIRO, V. L. S.; AVANCINI, C.; GONÇALVES, K.; TOIGO, E.; POSER, G. L. von. Acaricidal activity of *Calea serrata* (Asteraceae) on *Boophilus microplus* and *Rhipicephalus sanguineus*. **Vet. Parasitol.**, v. 151, p. 351-354, 2008.

RIBEIRO, V. L. S.; SANTOS, J. C. dos; MARTINS, J. R.; SCHRIPSEMA, J.; SIQUEIRA, I. R.; POSER, J. L. von.; APEL, M. A. Acaricidal properties of the essential oil and precocene II obtained from *Calea serrata* (Asteraceae) on the cattle tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae). **Vet. Parasitol.**, v. 179, p. 195-198, 2011.

RIBEIRO, V. L. S.; VANZELLA, C.; MOISÉS, F. S.; SANTOS, J. C. dos; MARTINS, J. R. S.; SIQUEIRA, I. R.; POSER, J. L. von. Effect of *Calea serrata* Less. n-hexane extract on acetylcholinesterase of larvae ticks and brain of Wistar rats. **Vet. Parasitol.**, v. 189, p. 322-326, 2012.

RODRIGUES, E.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; FIORITUTIDA, A. C. G.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S. Fungitoxidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de alface em sistema de cultivo orgânico contra *Sclerotinia sclerotiorum* pelo extrato de gengibre. **Summa Phytopathol.**, v. 33, n. 2, p. 124, 2007.

ROYERO, J. C.; TANGARIFE, V.; DURÁN, C.; STASHENKO, E.; ARANGO, A. M. *In vitro* antifungal activity and cytotoxic effect of essential oils and extracts of medicinal and aromatic plants against *Candida krusei* and *Aspergillus fumigatus*. **Braz. J. Pharmacogn.**, v. 20, n. 5, p. 734-740, 2010.

SDBS, Spectral Database for Organic Compounds. Disponível em: <<https://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb/>>. Acesso em: 25 out 2013.

SHELDRIK, G. M.; SCHNEIDER, T. R. SHELXL: High-resolution refinement. **Macromolec. Crystalogr.**, v. 277, p. 319-343, 1997.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. **Spectrometric identification of Organic Compounds**. 6^a ed, John Wiley and Sons: Nova Iorque. 1991.

SIMIONI, R. E. **Contribuição ao conhecimento químico dos metabólitos secundários de três espécies *Baccharis* da seção *Cylindricae*: *B. pentodonta*, *B. tridentata* e *B. rufescens***. 2013. 115 f. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2013.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. Introdução à espectroscopia de absorção molecular no ultravioleta/visível. In: **Princípios de Análise Instrumental**. 5^a ed, Bookman: Porto Alegre. 2002.

STAHL, E.; SCHILD, W. **Pharmazeutische Biologie, 4: Drogenanalyse II – Inhaltsstoffe und Isolierungen**. Gustav Fischer Verlag: Stuttgart. 1981.

TAKANO, E. H.; BUSSO, C.; GONÇALVES, E. A. L.; CHIERICE, G. O.; CATANZARO-GUIMARÃES, S. A.; CASTRO-PRADO, M. A. A. de. Inibição do desenvolvimento de fungos fitopatogênicos por detergente derivado de óleo da mamona (*Ricinus communis*). **Ciênc. Rural**, v. 37, n. 5, p. 1235-1240, 2007.

TATEFUJI, T.; IZUMI, N.; OHTA, T.; ARAI, S.; IKEDA, M.; KURIMOTO, Y. Isolation and identification of compounds from Brazilian propolis which enhance macrophage spreading and mobility. **Biol. Pharm. Bull.**, v.19, n. 7, p. 966-970, 1996.

VERDI, L. G.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Quím. Nova**, v. 28, n. 1, p. 85-94, 2005.

VIEIRA, H. S., TAKAHASHI, J. A., PIMENTA, L. P. S., BOAVENTURA, M. A. D. Effects of kaurane diterpene derivatives on germination and grow of *Lactuca sativa* seedlings. **Z. Naturforsch. C**, v. 60, p. 72-78, 2005.

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

WU, T. S.; CHAN, Y. Y. Constituents of leaves of *Uncaria hirsutai* Haviland. **J. Chin. Chem. Soc.**, v. 41, p. 209-212, 1994.

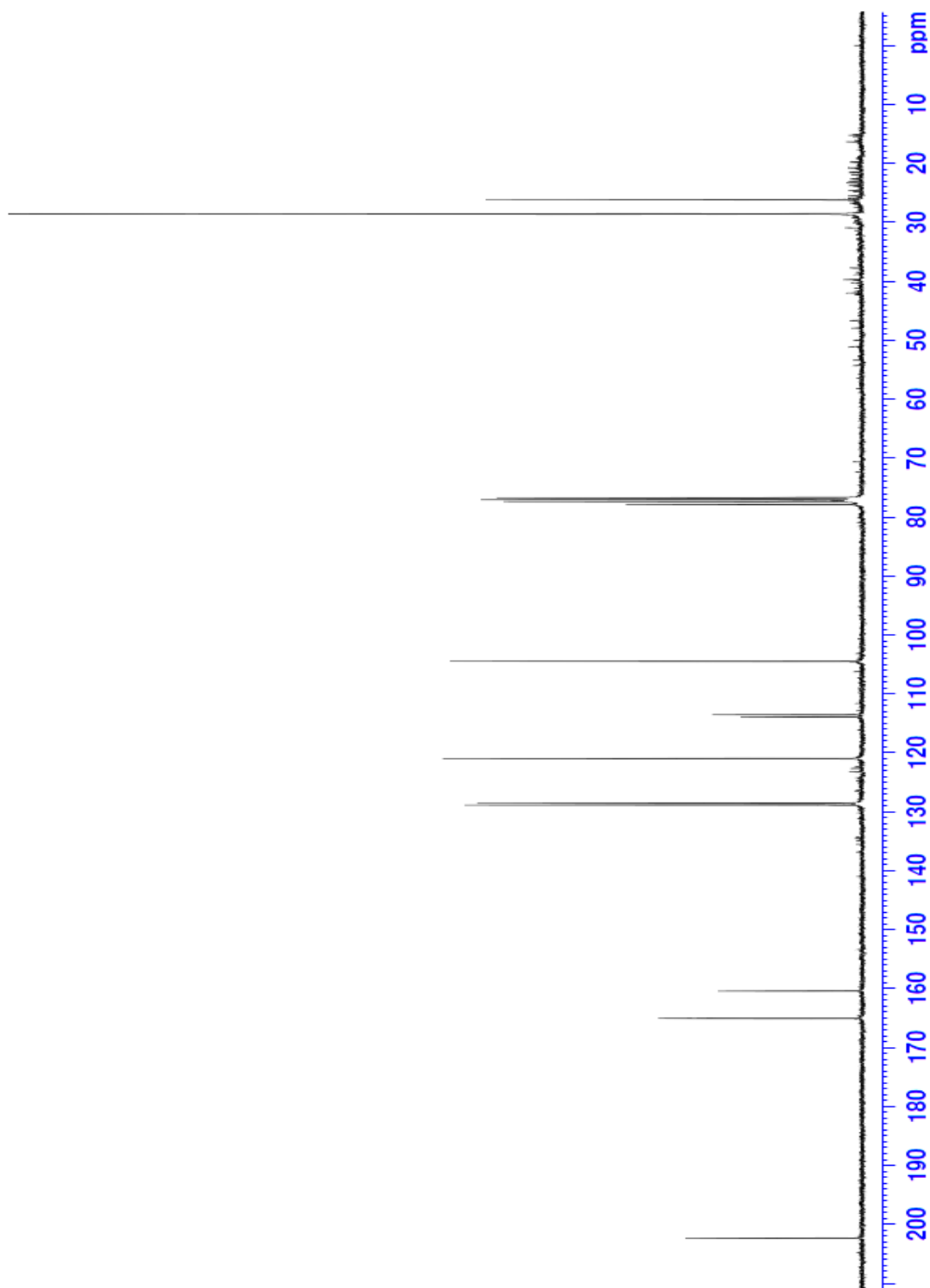
YANG, Z. D., DUAN, D. Z., XUE, W.-W., YAO, X. J., LI, S. Steroidal alkaloids from *Holarrhena antidysenterica*'s acetylcholinesterase inhibitors and the investigation for structure–activity relationships. **Life Sci.**, v. 90, p. 929, 2012.

YUSUF, M. P.; BEGUM, J.; MONDELLO, L.; STAGNO I., D'ALCONTRES, I. S. Studies on the essential oil bearing plants of Bangladesh. Part VI. Composition of the oil of *Ocimum gratissimum* L. **Flavour Fragr. J.**, v. 13, p. 163-166, 1998.

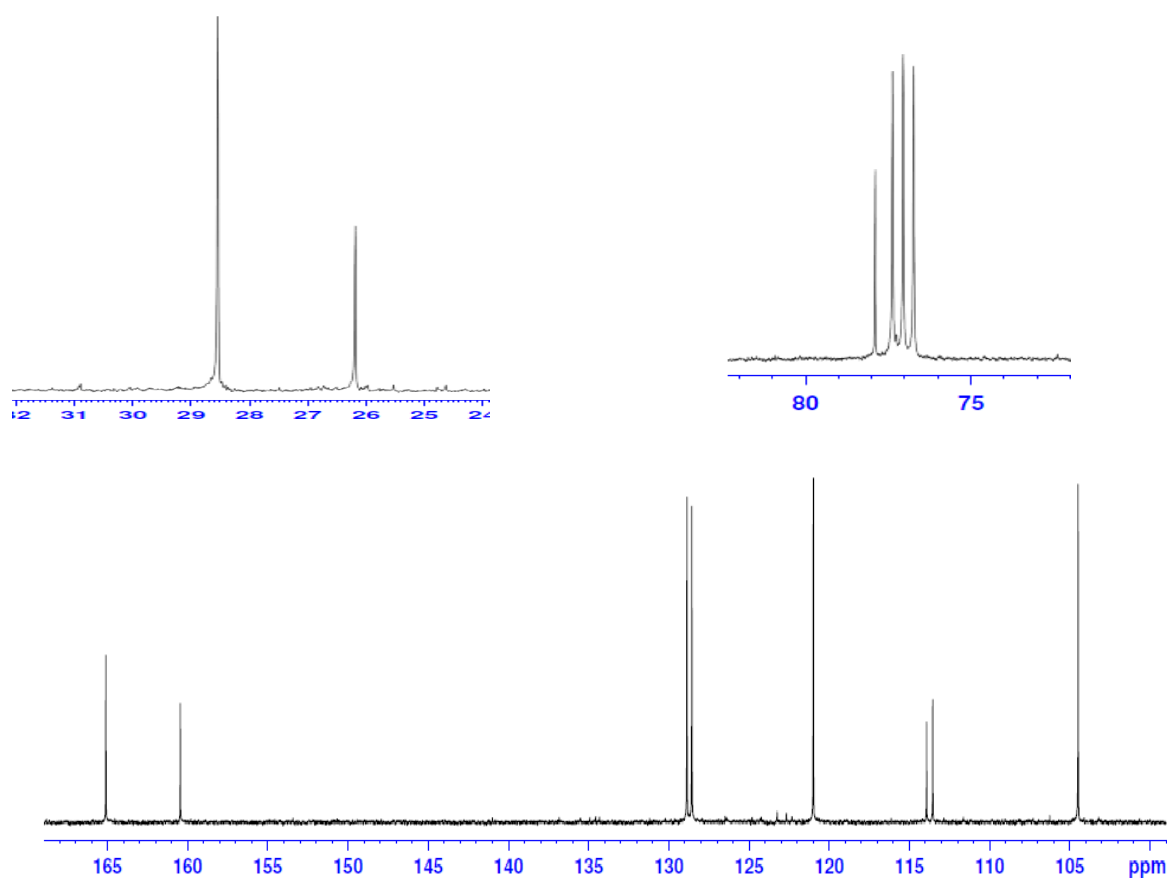
ZHAI, H.; ZHAO, G.; YANG, G.; SUN, H.; YI, B.; SUN, L.; CHEN, W.; ZHENG, S. A new chromene glycoside from *Tithonia diversifolia*. **Chem. Nat. Compd.**, v. 46, n. 2, p. 198-200, 2010.

11 ANEXOS

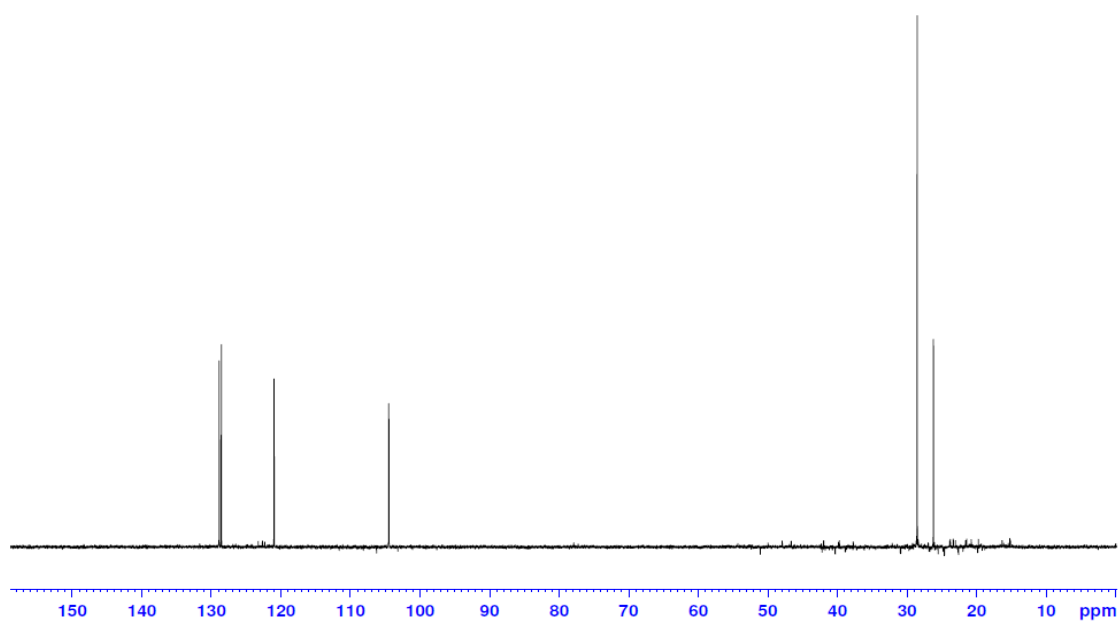
ANEXO 1 - Espectro de RMN ^{13}C de 6-acetil-7-hidroxi-2,2-dimetilcromeno **35**
(CHCR, CDCl_3 , Tabela 4, item 8.2)



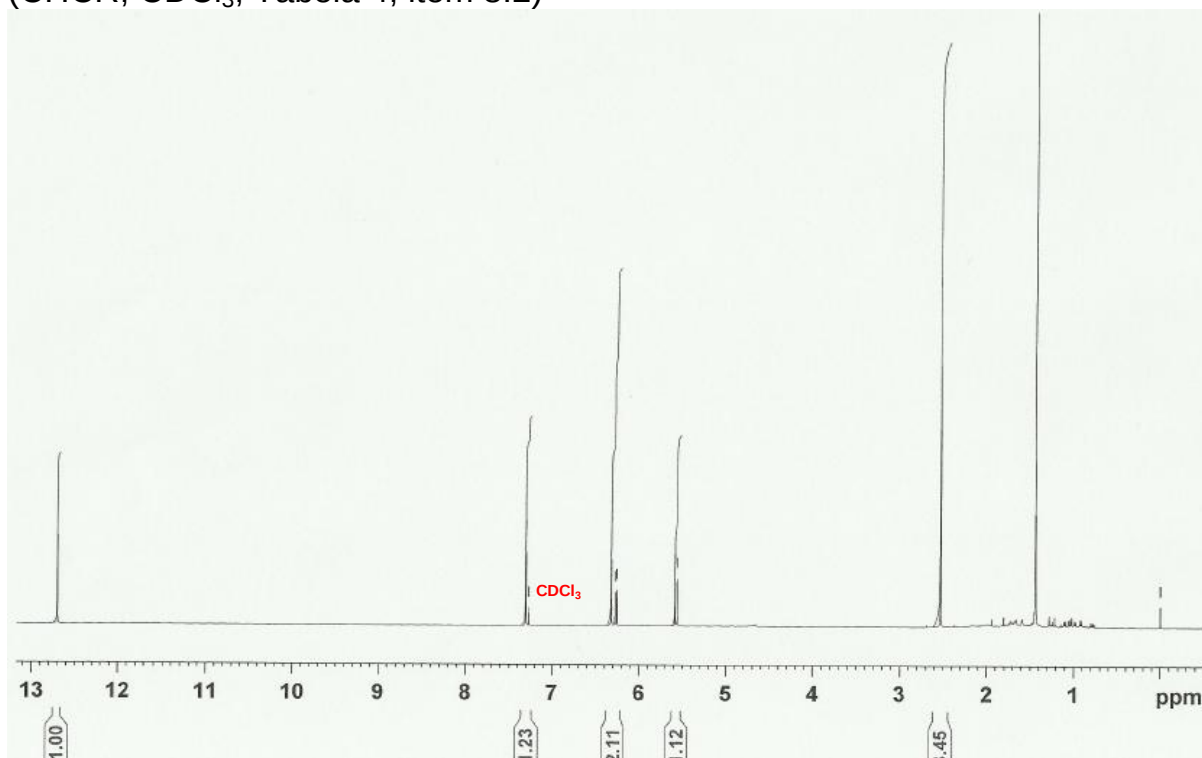
ANEXO 2 - Ampliações do espectro de RMN ^{13}C de 6-acetil-7-hidroxi-2,2-dimetilcromeno **35** (CHCR, CDCl_3 , Tabela 4, item 8.2)



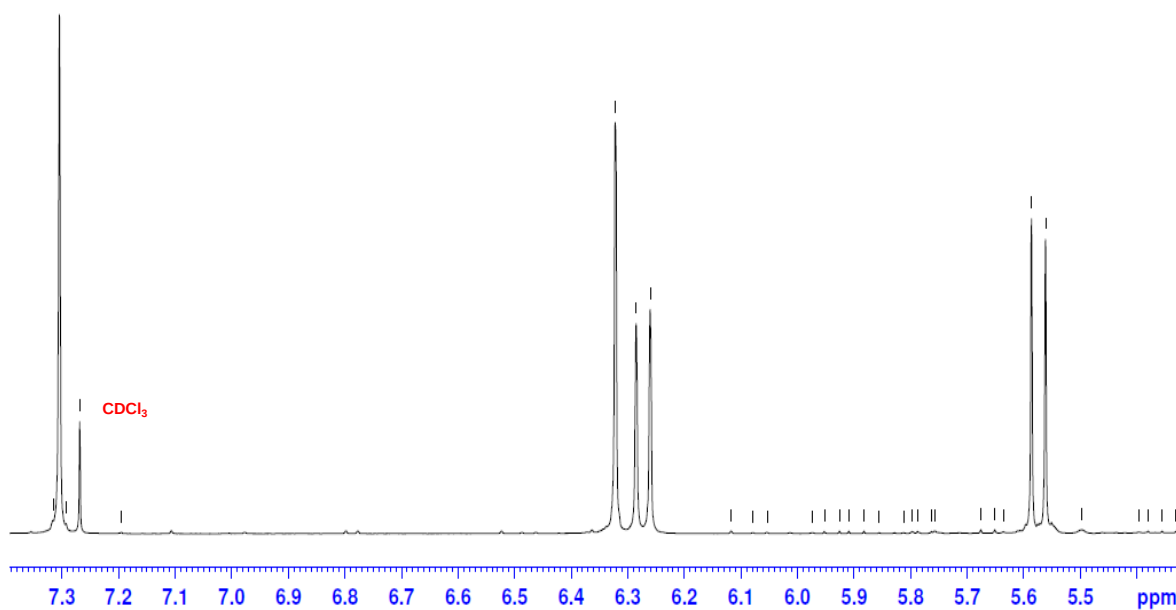
ANEXO 3 - Espectro de RMN ^{13}C DEPT135 de 6-acetil-7-hidroxi-2,2-dimetilcromeno **35** (CHCR, CDCl_3 , Tabela 4, item 8.2)



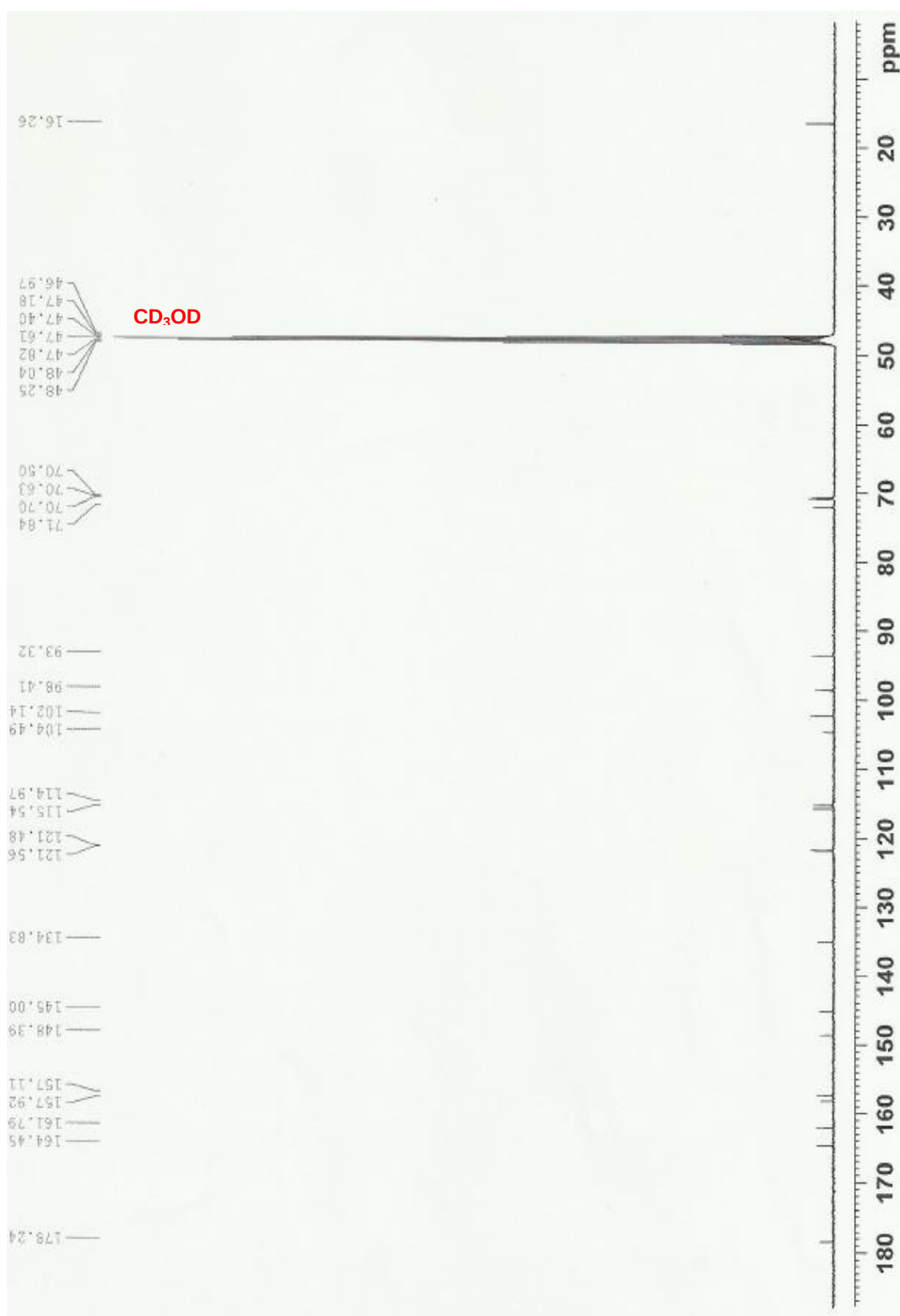
ANEXO 4 - Espectro de RMN ^1H de 6-acetil-7-hidroxi-2,2-dimetilcromeno **35** (CHCR, CDCl_3 , Tabela 4, item 8.2)



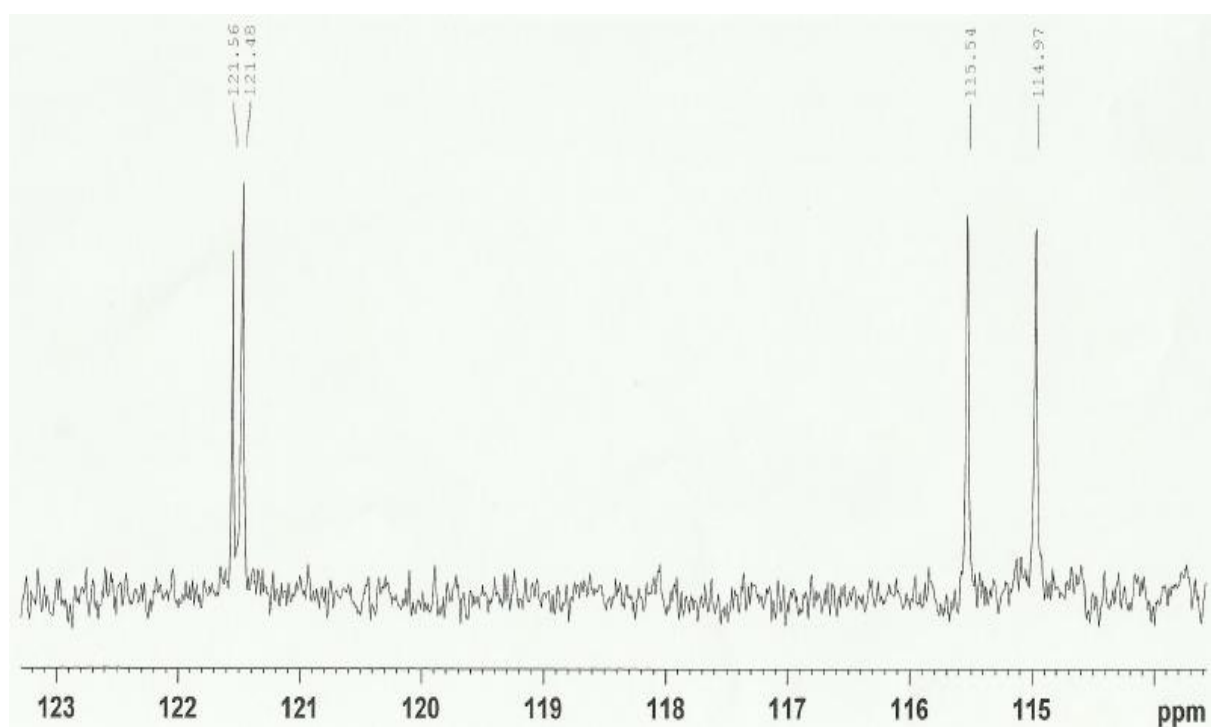
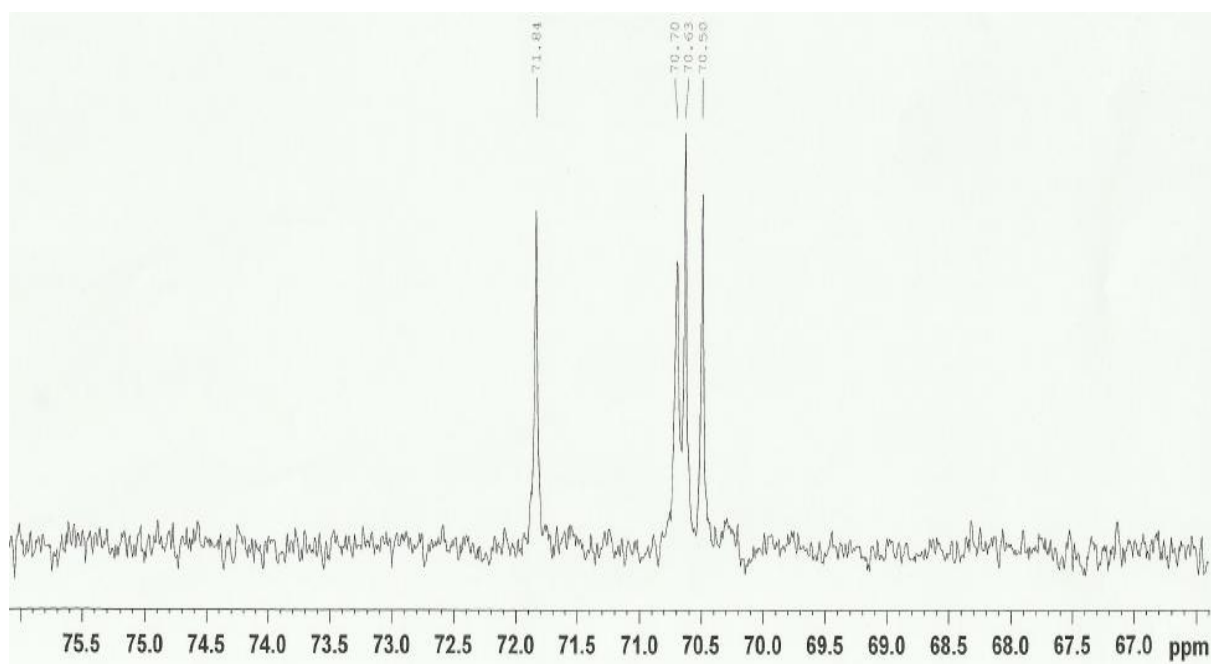
ANEXO 5 – Ampliação do espectro de RMN ^1H de 6-acetil-7-hidroxi-2,2-dimetilcromeno **35** (CHCR, CDCl_3 , Tabela 4, item 8.2)



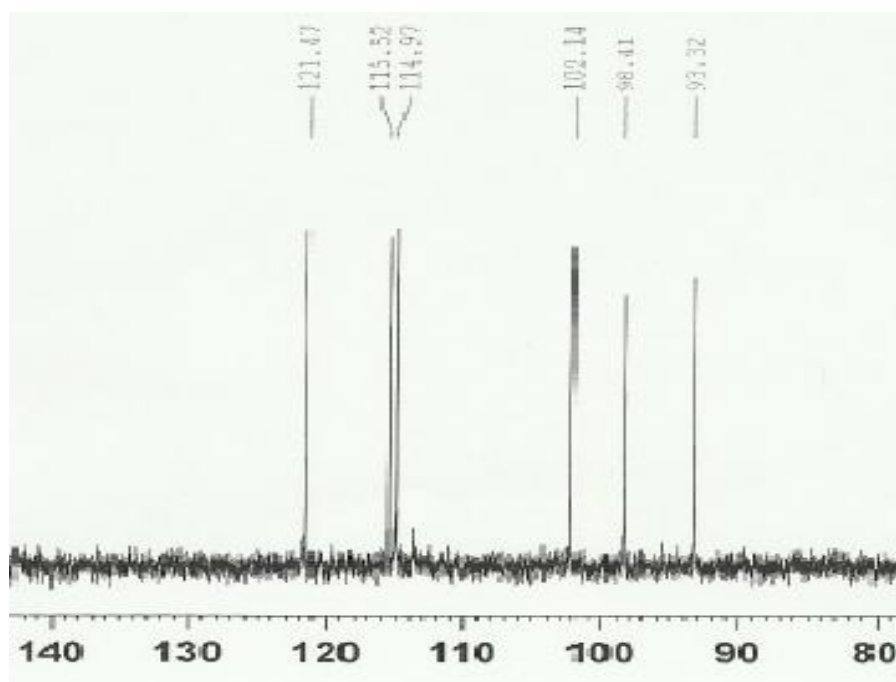
ANEXO 6 - Espectro de RMN ^{13}C de quercetin-3-O-ramnopiranosídeo **41**
(CHAM, CD_3OD , Tabela 6, item 8.3)



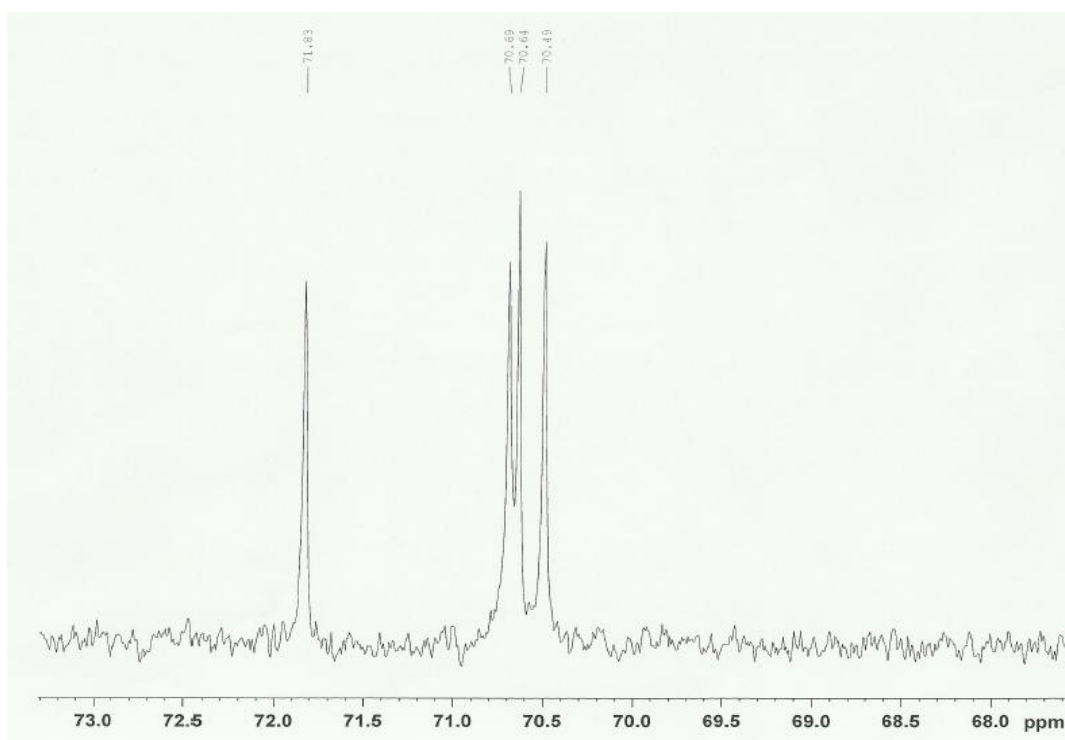
ANEXO 7 – Ampliações do espectro de RMN ^{13}C de quercetina-3-O-ramnopiranosídeo **41** (CHAM, CD_3OD , Tabela 6, item 8.3)



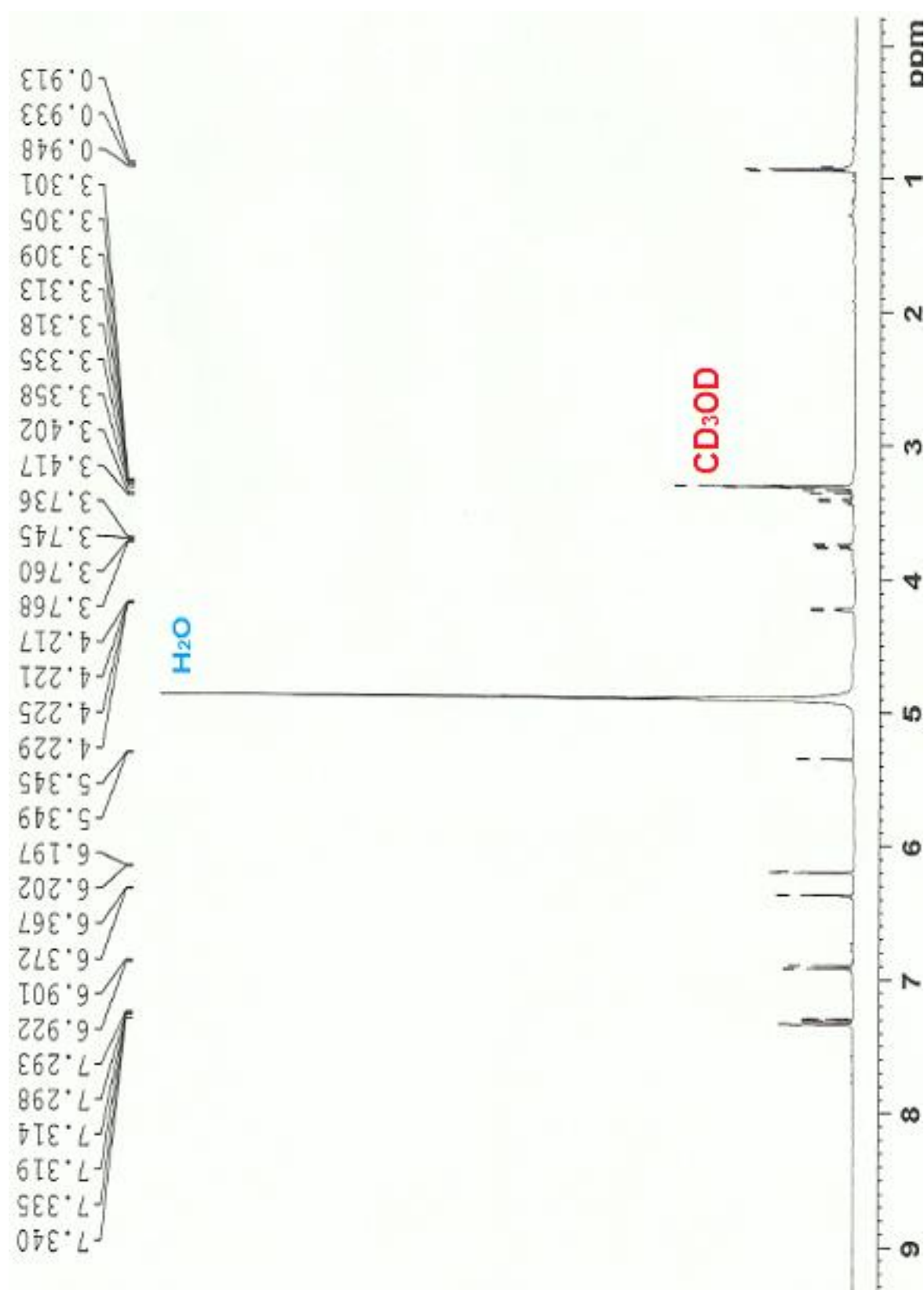
ANEXO 8 - Espectro de RMN ^{13}C DEPT90 de quercetina-3-O-ramnopiranosídeo **41** (CHAM, CD_3OD , Tabela 6, item 8.3)



ANEXO 9 – Ampliação do espectro de RMN ^{13}C DEPT90 de quercetina-3-O-ramnopiranosídeo **41** (CHAM, CD_3OD , Tabela 6, item 8.3)



ANEXO 10 - Espectro de RMN ^1H de quercetina-3-O-ramnopiranosídeo **41** (CHAM, CD_3OD , Tabela 6, item 8.3)



ANEXO 11 – Ampliações do espectro de RMN ^1H de quercetina-3-O-ramnopiranosídeo **41** (CHAM, CD_3OD , Tabela 6, item 8.3)

