



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

Layzon Antonio Lemos da Silva

Lactonas sesquiterpênicas em espécies selecionadas de Vernoniae (Asteraceae):
semissíntese e avaliação do potencial biológico (*in vitro*)

Florianópolis

2019

Layzon Antonio Lemos da Silva

Lactonas sesquiterpênicas em espécies selecionadas de Vernoniae (Asteraceae):
semissíntese e avaliação do potencial biológico (*in vitro*)

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

Orientadora: Profa. Maique Weber Biavatti, Dra.

Coorientador: Prof. Louis Pergaud Sandjo, Dr.

Florianópolis

2019

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

Silva, Layzon Antonio Lemos da
Lactonas sesquiterpênicas em espécies selecionadas de
Vernonieae (Asteraceae) : semissíntese e avaliação do
potencial biológico (in vitro) / Layzon Antonio Lemos da
Silva ; orientadora, Maique Weber Biavatti, coorientador,
Louis Pergaud Sandjo, 2019.
335 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Lactonas sesquiterpênicas. 3.
Vernonieae. 4. Semissíntese. 5. Avaliação biológica. I.
Biavatti, Maique Weber . II. Sandjo, Louis Pergaud. III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós
Graduação em Farmácia. IV. Título.

Layzon Antonio Lemos da Silva

Lactonas sesquiterpênicas em espécies selecionadas de Vernoniae (Asteraceae):

semissíntese e avaliação do potencial biológico (*in vitro*)

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Flávio Henrique Reginatto, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Profa. Fabíola Branco Filippin Monteiro, Dra.

Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Profa. Angela Malheiros, Dra.

Universidade do Vale do Itajaí - UNIVALI

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Farmácia.

Profa. Elenara Maria Teixeira Lemos Senna, Dra.

Coordenadora do Programa

Profa. Maique Weber Biavatti, Dra.

Orientadora

Florianópolis, 2019.

DEDICATÓRIA

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

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Professora Dra. Maique Weber Biavatti e Professor Dr. Louis Pergaud Sandjo por todo o acolhimento, suporte, aprendizado e parceria ao longo de todos esses anos de convívio e desenvolvimento deste trabalho.

À UFSC e ao Programa de Pós-graduação em Farmácia pela estrutura e aporte necessários para o desenvolvimento desse trabalho, e aos meus professores por todos os ensinamentos.

À CAPES pela bolsa de estudo.

À técnica de laboratório Claudinha por toda a ajuda, amizade e carinho.

Aos professores Dr. Ademir Reis, Dr. Marcos Sobral e César P. Simionato pela ajuda na coleta e identificação do material vegetal.

Ao professor Dr. Giovanni F. Caramori, ao David e a Alechania, pela realização dos experimentos computacionais.

Ao professor Dr. Andersson Barison, e às Dra. Maria e Lívia, da UFPR, que gentilmente contribuíram para a realização das análises de RMN em baixa temperatura.

Ao professor Dr. Mário Steindel e a Dra. Milene pela realização dos ensaios de avaliação da atividade antiparasitária.

Ao Dr. Gilberto Franchi Jr., da UNICAMP, pela realização dos ensaios de avaliação da atividade citotóxica.

À professora Dra. Tania Beatriz Creczynski Pasa e à Dra. Laura pela realização dos ensaios de avaliação da atividade citotóxica.

Ao professor Dr. Eduardo Monguilhott Dalmarco, à Eduarda e ao Yeo Jim, pela realização dos ensaios de avaliação da atividade anti-inflamatória.

Aos colegas e amigos de laboratório, Larissa G, Luiz, Larissa F, Amanda, Erlon, Giovana, Ingrid, Gabriele, Ana, e à tantos outros amigos, nos laboratórios vizinhos e parceiros, aos presentes e àqueles que já seguiram por outros caminhos, obrigado por todos os momentos felizes e agradáveis que passamos juntos e por me auxiliarem nos momentos difíceis, vocês tornaram essa jornada ainda mais prazerosa.

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

E, principalmente, agradeço aos meus pais, Carlos e Elair, minha mana Talissa, e minha mana de coração Aline, por todo o amor e carinho que sempre tiveram por mim, pela paciência nos momentos difíceis, pelo suporte, pelo incentivo, por acreditarem em mim e por abrirem mão dos seus sonhos para que eu fosse em busca dos meus. Amo muito vocês, sempre!

RESUMO

As lactonas sesquiterpênicas (LS), compostos característicos da família Asteraceae, destacam-se por suas propriedades anti-inflamatória, citotóxica e antiparasitária. Derivados semissintéticos de LS têm demonstrado propriedades farmacológicas melhoradas em relação ao produto de partida. Diante da necessidade do desenvolvimento de alternativas terapêuticas para o tratamento de neoplasias, leishmanioses e doença de Chagas, o objetivo deste trabalho foi isolar LS a partir de espécies selecionadas de Vernonieae (Asteraceae) para a modificação estrutural por semissíntese visando o desenvolvimento de derivados bioativos. A otimização do processo de extração por lavagem foliar em desenho experimental fatorial 4x4 a partir da espécie *Vernonanthura tweediana* indicou como condições ideais de extração das LS a acetona como líquido extrator durante 10 minutos. Foi estabelecida uma estratégia de diferenciação por ESI-EM e EM/EM entre as LS do tipo hirsutinolídeo e glaucolídeo com base nas diferenças entre seus respectivos perfis de ionização, formação de adutos e fragmentação, sendo a primeira vez que o mecanismo de fragmentação para as LS do tipo glaucolídeo é detalhadamente discutido. A análise de desreplicação por CLUE-EM do extrato bruto de lavagem foliar (ELF) de *V. tweediana* permitiu a identificação de 14 compostos (7 LS e 7 flavonoides). A partir dos ELF das espécies *Lepidaploa chamissonis* e *Cyrtocymura scorpioides* e da espécie *Vernonanthura condensata*, foram isoladas em grande quantidade por cromatografia de partição centrífuga (CPC) as LS glaucolídeo B e vernodalina, respectivamente. A extração por lavagem foliar mostrou-se um método seletivo para a extração de LS, enquanto que a técnica CPC foi uma ferramenta simples e eficiente para o isolamento desses constituintes com alto rendimento. Considerando que as condições ácido-base do meio extrativo/cromatográfico vêm sendo relacionadas à conversão estrutural e à formação de diferentes subtipos de LS, a estratégia baseada na ciclização transanular empregando catalizadores com variadas propriedades ácido-base, associada à condições reacionais complementares, mostrou-se uma abordagem eficiente para a produção de quatorze derivados semissintéticos de LS, sendo dez destes compostos relatados pela primeira vez. Na investigação *in vitro* da atividade biológica as LS piptocarфина A, diacetilpiptocarfol e vernodalina apresentaram moderada a fraca atividade leishmanicida ($IC_{50}=18,83$ a $26,58 \mu M$) frente à *Leishmania amazonensis*, e moderada atividade tripanocida ($IC_{50}=10,62$ a $20,57 \mu M$) frente à *Trypanosoma cruzi*, enquanto que as LS glaucolídeo A e glaucolídeo B não foram ativas para ambos os parasitas na forma amastigota intracelular. Na avaliação da atividade citotóxica em método de MTT, a LS piptocarфина A apresentou promissora atividade frente às células leucêmicas Nalm-6 e K-562 ($CC_{50}=2,8 \mu M$ e $CC_{50}=3,0 \mu M$, respectivamente), enquanto que o glaucolídeo A mostrou moderada atividade frente às linhagens de células tumorais K-562, HL-60, REH, JURKAT, PC3, OVCAR, NCI-1299 e HOS ($CC_{50}=8,5$ a $27,2 \mu M$). As LS piptocarфина A, diacetilpiptocarfol e vernodalina ($CC_{50}=6,7 \mu M/IS=1,9$, $CC_{50}=3,8 \mu M/IS=3,3$, $CC_{50}=2,6 \mu M/IS=4,6$, respectivamente), bem como dois derivados semissintéticos análogos de hirsutinolídeos e um análogo diepoxigermacranolídeo ($CC_{50}=11,2 \mu M/IS=2,5$, $CC_{50}=5,0 \mu M/IS=3,0$ e $CC_{50}=3,1 \mu M/IS=3,0$, respectivamente) apresentaram ótima e seletiva atividade citotóxica frente à linhagem de células de melanoma humano (SK-MEL-28). Ainda, o glaucolídeo B apresentou promissora atividade anti-inflamatória nas doses de 1, 3 e 10 μM em células RAW 264.7 estimuladas por lipopolissacarídeos, cujo efeito inibitório sobre a produção de metabólitos NO_x e da secreção de interleucina 6 foi similar à dexametasona (7 μM).

Palavras-chave: Lactonas sesquiterpênicas. Vernonieae. Cromatografia de partição centrífuga. Semissíntese. Ciclização transanular. Anti-inflamatório. Citotóxico. Antiparasitário.

ABSTRACT

Sesquiterpene lactones from selected species of Vernoniae (Asteraceae): semisynthesis and evaluation of the biological potential (*in vitro*)

The sesquiterpene lactones (SL), widespread in the Asteraceae family, are endowed with anti-inflammatory, cytotoxic and antiparasitic properties. Semisynthetic SL derivatives have shown improved pharmacological properties relative to the starting product. Because of high demand in developing therapeutic alternatives for the treatment of neoplasms and antiparasitic disease, the objective of this work was to isolate SL from selected Vernoniae (Asteraceae) species for structural modification by semisynthesis in order to develop bioactive derivatives. The optimization of the extraction process by leaves washing in experimental design 4x4 from the *Vernonanthura tweedieana* species turned to be an ideal condition for SL extraction using acetone as extractive solvent during 10 minutes. A strategy of differentiation between hirsutinolide and glaucolide-type SL by ESI-MS and MS/MS was established based on the differences observed in their respective MS spectra and related to their ionization, adduct formation and fragmentation profiles, wherein it is the first time that the fragmentation mechanism for glaucolide-type SL is discussed in detail. The UPLC-MS dereplication analysis of *V. tweedieana* leaves washing crude extract (LWE) allowed the identification of 14 compounds (7 SL and 7 flavonoids). Glaucolide B and vernodalin were respectively isolated in large quantities from the LWE of *Lepidaploa chamissonis* and *Cyrtocymura scorpioides* and from *Vernonanthura condensata* by centrifugation partition chromatography (CPC). Leaves washing process was a selective method for the SL extraction, whereas the CPC technique was a simple and efficient tool for the isolation of these constituents with high yield. Whereas the acid-base conditions of the extractive/chromatographic medium have been related to structural conversion and the formation of different SL subtypes, the strategy based on transannular cyclization employing catalysts with varying acid-base properties, associated with other reaction conditions, proved to be an efficient approach to produce fourteen semisynthetic SL derivatives, ten of which are reported for the first time. In the *in vitro* biological investigation, piptocarphin A, diacetylpiptocarphol and vernodalin presented from moderate to weak leishmanicidal activity (IC_{50} =18.83 to 26.58 μ M) against *Leishmania amazonensis*, and moderate trypanocidal activity (IC_{50} =10.62 to 20.57 μ M) against *Trypanosoma cruzi*, whereas glaucolide A and glaucolide B were not active against the intracellular amastigote form of both parasites. In the cytotoxicity activity evaluation by MTT method, piptocarphin A presented promising activity against Nalm-6 and K-562 leukemic cell lines (CC_{50} =2.8 μ M and CC_{50} =3.0 μ M, respectively) whereas the glaucolide A showed moderate activity against the cell lines K-562, HL-60, REH, JURKAT, PC3, OVCAR, NCI-1299 and HOS (CC_{50} =8.5 to 27.2 μ M). Piptocarphin A, diacetylpiptocarphol and vernodalin (CC_{50} =6.7 μ M/SI=1.9, CC_{50} =3.8 μ M/SI=3.3, CC_{50} =2.6 μ M/SI=4.6, respectively) as well as two semisynthetic hirsutinolide analogues and one diepoxygermacranolide analogue (CC_{50} =11.2 μ M/SI =2.5, CC_{50} =5.0 μ M/SI=3.0 and CC_{50} =3.1 μ M/SI=3,0, respectively) showed promising and selective cytotoxic activity against the human melanoma cell line (SK-MEL-28). Furthermore, glaucolide B showed promising anti-inflammatory activity at 1, 3 and 10 μ M doses in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells, whose inhibitory effect on NO_x metabolite production and interleukin 6 secretion was similar to dexamethasone (7 μ M).

Keywords: Sesquiterpene lactones. Vernoniae. Centrifugal partition chromatography. Semisynthesis. Transannular cyclization. Anti-inflammatory. Cytotoxic. Antiparasitic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Exemplos de fármacos de origem natural	49
Figura 2 – Ilustração de espécimes de <i>Cyrtocymura scorpioides</i> (Lam.) H. Rob.....	52
Figura 3 – Constituintes químicos isolados de <i>Cyrtocymura scorpioides</i> (Lam.) H. Rob.	54
Figura 4 – Ilustração de espécimes de <i>Lepidaploa chamissonis</i> (Less.) H. Rob.....	55
Figura 5 – Ilustração de espécimes de <i>Vernonanthura condensata</i> (Baker) H. Rob.	58
Figura 6 – Constituintes químicos isolados de <i>Vernonanthura condensata</i> (Baker) H. Rob..	59
Figura 7 – Ilustração de espécimes de <i>Vernonanthura tweedieana</i> (Baker) H. Rob.	60
Figura 8 – Constituintes químicos isolados de <i>Vernonanthura tweedieana</i> (Baker) H. Rob..	61
Figura 9 – Principais núcleos carbocíclicos para as lactonas sesquiterpênicas.....	63
Figura 10 – Núcleos carbocíclicos das LS do tipo hirsutinolídeo e glaucolídeo.....	64
Figura 11 – Cromatoplaça da fração AcOEt da partição dos extrato bruto de lavagem foliar de <i>Lepidaploa chamissonis</i>	88
Figura 12 – Cromatoplaça da fração AcOEt da partição do extrato bruto de lavagem foliar de <i>Vernonanthura condensata</i>	91
Figura 13 – Análise microscópica das folhas das diferentes espécies de Vernonieae para pesquisa de tricomas glandulares.	118
Figura 14 – Análise comparativa do rendimento de extração entre os diferentes extratos de lavagem foliar de <i>V. tweedieana</i> , obtidos da otimização do processo extrativo	120
Figura 15 – Análise comparativa por CLUE-EM entre os extratos de lavagem foliar de <i>V. tweedieana</i> , obtidos da etapa de otimização do processo extrativo, preparados com diferentes líquidos extratores durante 10 minutos de extração.	122
Figura 16 – Curva de calibração para piptocarfina A (1) em função de Área vs Concentração.	123
Figura 17 – Análise comparativa da concentração de piptocarfina A (1) entre os diferentes extratos de lavagem foliar de <i>V. tweedieana</i> , obtidos da otimização do processo extrativo..	124
Figura 18 – Espectros de ESI-QToF EM por injeção direta dos padrões de lactonas sesquiterpênicas (1-4).....	126
Figura 19 – Espectros de ESI-QToF EM por injeção combinada dos padrões de lactonas sesquiterpênicas (1-4).....	128

Figura 20 – Representação esquemática das estruturas 2D para piptocarфина A (1) e glaucolídeo A (2) com oxigênios numerados, usado nas simulações de dinâmica molecular atomística..	131
Figura 21 – Representação ilustrativa das simulações de dinâmica molecular atomística na avaliação da interação entre o Na ⁺ e as LS piptocarфина A (1) e glaucolídeo A (2).	136
Figura 22 – Diferenças de energia entre os dois conformeros mais estáveis (1a e 1b) para a piptocarфина A e (2a e 2b) para o glaucolídeo A, obtidos com BP86/def2-TZVP.	140
Figura 23 – Mapas de potencial eletrostático molecular dos conformeros 1a e 2a (isovalor 0,05 a.u.) a partir da piptocarфина A e glaucolídeo A, respectivamente.....	140
Figura 24 – Estruturas otimizadas de complexos selecionados de sódio com piptocarфина A (1a1) e glaucolídeo A (2a3).....	141
Figura 25 – Cromatograma de pico base do extrato de lavagem foliar de <i>V. tweedieana</i> obtido por CLUE-EM (ESI positivo).....	144
Figura 26 – Perfil de CLUE-EM do extrato de lavagem foliar de <i>Lepidaploa chamissonis</i> . 152	
Figura 27 – Perfil de CLUE-EM das fases superior (A) e inferior (B) da fração AcOEt do ELF de <i>L. chamissonis</i> após teste de <i>shake flask</i> com o sistema de solvente HEMWat M, em comparação com o glaucolídeo B isolado (4, C).....	153
Figura 28 – Perfil de CLUE-EM do extrato de lavagem foliar de <i>Cyrtocymura scorpioides</i>	155
Figura 29 – Perfil de CLUE-EM do extrato de lavagem foliar de <i>Vernonanthura condensata</i>	157
Figura 30 – Perfil por CLUE-EM das subfrações VcC e VcJ oriundas do fracionamento da porção AcOEt de <i>V. condensata</i>	159
Figura 31 – Análise comparativa por CLUE-EM do extrato bruto de lavagem foliar de <i>L. chamissonis</i> sob condições reacionais mimetizando o processo usual de isolamento de LS. 163	
Figura 32 – Estrutura molecular da piptocarфина A (1) de <i>Vernonanthura tweedieana</i>	169
Figura 33 – Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃ , 283 K) para a piptocarфина A (1) de <i>Vernonanthura tweedieana</i>	171
Figura 34 – Mapa de correlação HSQC (400 MHz ¹ H e 100 MHz ¹³ C, CDCl ₃ , 283 K) para a piptocarфина A (1) de <i>Vernonanthura tweedieana</i>	172
Figura 35 – Mapa de correlação HMBC (400 MHz ¹ H e 100 MHz ¹³ C, CDCl ₃ , 283 K) para a piptocarфина A (1) de <i>Vernonanthura tweedieana</i>	172

Figura 36 – Espectro ESI-QToF EM <i>full scan</i> (100-1200 Da) para a piptocarфина A (1) de <i>Vernonanthura tweedieana</i>	174
Figura 37 – Estrutura molecular do glaucolídeo A (2) de <i>Vernonanthura tweedieana</i>	174
Figura 38 – Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃ , 263 K) para o glaucolídeo A (2) de <i>Vernonanthura tweedieana</i>	176
Figura 39 – Mapa de correlação HSQC (400 MHz ¹ H e 100 MHz ¹³ C, CDCl ₃ , 263 K) para o glaucolídeo A (2) de <i>Vernonanthura tweedieana</i>	177
Figura 40 – Mapa de correlação HMBC (400 MHz ¹ H e 100 MHz ¹³ C, CDCl ₃ , 263 K) para o glaucolídeo A (2) de <i>Vernonanthura tweedieana</i>	177
Figura 41 – Espectro ESI-QToF EM <i>full scan</i> (100-1200 Da) para o glaucolídeo A (2) de <i>Vernonanthura tweedieana</i>	178
Figura 42 – Estrutura molecular do diacetilpiptocarfol (3) de <i>Lepidaploa chamissonis</i>	179
Figura 43 – Espectro de RMN ¹ H (600 MHz, CDCl ₃ , 263 K) para o diacetilpiptocarfol (3) de <i>Lepidaploa chamissonis</i>	181
Figura 44 – Mapa de correlação HSQC (600 MHz ¹ H e 150 MHz ¹³ C, CDCl ₃ , 263 K) para o diacetilpiptocarfol (3) de <i>Lepidaploa chamissonis</i>	182
Figura 45 – Mapa de correlação HMBC (600 MHz ¹ H e 150 MHz ¹³ C, CDCl ₃ , 263 K) para o diacetilpiptocarfol (3) de <i>Lepidaploa chamissonis</i>	182
Figura 46 – Espectro ESI-QToF EM <i>full scan</i> (100-1200 Da) para o diacetilpiptocarfol (3) de <i>Lepidaploa chamissonis</i>	183
Figura 47 – Estrutura molecular do glaucolídeo B (4) de <i>Lepidaploa chamissonis</i>	183
Figura 48 – Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, acetona- <i>d</i> ₆ , 273 K) para o glaucolídeo B (4) de <i>Lepidaploa chamissonis</i>	185
Figura 49 – Mapa de correlação HSQC (400 MHz ¹ H e 100 MHz ¹³ C, acetona- <i>d</i> ₆ , 273 K) para o glaucolídeo B (4) de <i>Lepidaploa chamissonis</i>	186
Figura 50 – Mapa de correlação HMBC (400 MHz ¹ H e 100 MHz ¹³ C, acetona- <i>d</i> ₆ , 273 K) para o glaucolídeo B (4) de <i>Lepidaploa chamissonis</i>	186
Figura 51 – Espectro ESI-QToF EM <i>full scan</i> (100-1200 Da) para o glaucolídeo B (4) de <i>Lepidaploa chamissonis</i>	187
Figura 52 – Estrutura molecular da vernodalina (5) de <i>Vernonanthura condensata</i>	187

Figura 53 – Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , 273 K) para a vernodalina (5) de <i>Vernonanthura condensata</i>	189
Figura 54 – Mapa de correlação HSQC (400 MHz ^1H e 100 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 273 K) para a vernodalina (5) de <i>Vernonanthura condensata</i>	190
Figura 55 – Mapa de correlação HMBC (400 MHz ^1H e 100 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 273 K) para a vernodalina (5) de <i>Vernonanthura condensata</i>	190
Figura 56 – Espectro ESI-QToF EM <i>full scan</i> (100-1200 Da) para a vernodalina (5) de <i>Vernonanthura condensata</i>	191
Figura 57 – Estrutura molecular da 11,13,16,17-tetrahidrovernolida (6) de <i>Vernonanthura condensata</i>	192
Figura 58 – Espectro de RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3 , 263 K) para a 11,13,16,17-tetrahidrovernolida (6) de <i>Vernonanthura condensata</i>	194
Figura 59 – Mapa de correlação HSQC (600 MHz ^1H e 150 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 263 K) para a 11,13,16,17-tetrahidrovernolida (6) de <i>Vernonanthura condensata</i>	195
Figura 60 – Mapa de correlação HMBC (600 MHz ^1H e 150 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 263 K) para a 11,13,16,17-tetrahidrovernolida (6) de <i>Vernonanthura condensata</i>	195
Figura 61 – Espectro ESI-QToF EM <i>full scan</i> (100-1200 Da) para a 11,13,16,17-tetrahidrovernolida (6) de <i>Vernonanthura condensata</i>	196
Figura 62 – Estrutura molecular da 11,13-dihidrovernolida (7) de <i>Vernonanthura condensata</i>	197
Figura 63 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , 295 K) para a 11,13-dihidrovernolida (7) de <i>Vernonanthura condensata</i>	199
Figura 64 – Mapa de correlação HSQC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 295 K) para a 11,13-dihidrovernolida (7) de <i>Vernonanthura condensata</i>	200
Figura 65 – Mapa de correlação HMBC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 295 K) para a 11,13-dihidrovernolida (7) de <i>Vernonanthura condensata</i>	200
Figura 66 – Espectro ESI-QToF EM <i>full scan</i> (100-1200 Da) para a 11,13-dihidrovernolida (7) de <i>Vernonanthura condensata</i>	201
Figura 67 – Estrutura molecular da vernolida (8) de <i>Vernonanthura condensata</i>	201
Figura 68 – Espectro de RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3 , 273 K) para a vernolida (8) de <i>Vernonanthura condensata</i>	203

Figura 69 – Mapa de correlação HSQC (600 MHz ¹ H e 150 MHz ¹³ C, CDCl ₃ , 273 K) para a vernolida (8) de <i>Vernonanthura condensata</i>	204
Figura 70 – Mapa de correlação HMBC (600 MHz ¹ H e 150 MHz ¹³ C, CDCl ₃ , 273 K) para a vernolida (8) de <i>Vernonanthura condensata</i>	204
Figura 71 – Espectro ESI-QToF EM <i>full scan</i> (100-1200 Da) para a vernolida (8) de <i>Vernonanthura condensata</i>	205
Figura 72 – Estrutura molecular da 19-hidroxi-11,13-dihidrovermolida (9) de <i>Vernonanthura condensata</i>	206
Figura 73 – Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃ , 295 K) para a 19-hidroxi-11,13-dihidrovermolida (9) de <i>Vernonanthura condensata</i>	208
Figura 74 – Mapa de correlação HSQC (300 MHz ¹ H e 75 MHz ¹³ C, CDCl ₃ , 295 K) para a 19-hidroxi-11,13-dihidrovermolida (9) de <i>Vernonanthura condensata</i>	209
Figura 75 – Mapa de correlação HMBC (300 MHz ¹ H e 75 MHz ¹³ C, CDCl ₃ , 295 K) para a 19-hidroxi-11,13-dihidrovermolida (9) de <i>Vernonanthura condensata</i>	209
Figura 76 – Espectro ESI-QToF EM <i>full scan</i> (100-1200 Da) para a 19-hidroxi-11,13-dihidrovermolida (9) de <i>Vernonanthura condensata</i>	210
Figura 77 – Estrutura molecular da 19-hidroxivermolida (10) de <i>Vernonanthura condensata</i>	210
Figura 78 – Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃ , 295 K) para a 19-hidroxivermolida (10) de <i>Vernonanthura condensata</i>	212
Figura 79 – Mapa de correlação HSQC (300 MHz ¹ H e 75 MHz ¹³ C, CDCl ₃ , 295 K) para a 19-hidroxivermolida (10) de <i>Vernonanthura condensata</i>	213
Figura 80 – Mapa de correlação HMBC (300 MHz ¹ H e 75 MHz ¹³ C, CDCl ₃ , 295 K) para a 19-hidroxivermolida (10) de <i>Vernonanthura condensata</i>	213
Figura 81 – Espectro ESI-QToF EM <i>full scan</i> (100-1200 Da) para a 19-hidroxivermolida (10) de <i>Vernonanthura condensata</i>	214
Figura 82 – Estrutura molecular do derivado semissintético (11) do glaucolídeo B (4).....	214
Figura 83 – Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃ , 295 K) para o derivado semissintético (11) do glaucolídeo B (4).....	217
Figura 84 – Mapa de correlação HSQC (300 MHz ¹ H e 75 MHz ¹³ C, CDCl ₃ , 295 K) para o derivado semissintético (11) do glaucolídeo B (4).....	218

Figura 85 – Mapa de correlação HMBC (300 MHz ¹ H e 75 MHz ¹³ C, CDCl ₃ , 295 K) para o derivado semissintético (11) do glaucolídeo B (4).	218
Figura 86 – Espectro ESI-QToF EM <i>full scan</i> (100-1200 Da) para o derivado semissintético 11	219
Figura 87 – Estrutura molecular do derivado semissintético (12) do glaucolídeo B (4).	220
Figura 88 – Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃ , 295 K) para o derivado semissintético (12) do glaucolídeo B (4).	222
Figura 89 – Mapa de correlação HSQC (300 MHz ¹ H e 75 MHz ¹³ C, CDCl ₃ , 295 K) para o derivado semissintético (12) do glaucolídeo B (4).	223
Figura 90 – Mapa de correlação HMBC (300 MHz ¹ H e 75 MHz ¹³ C, CDCl ₃ , 295 K) para o derivado semissintético (12) do glaucolídeo B (4).	223
Figura 91 – Espectro ESI-QToF EM <i>full scan</i> (100-1200 Da) para o derivado semissintético 12	224
Figura 92 – Estrutura molecular do derivado semissintético (13) do glaucolídeo B (4).	224
Figura 93 – Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃ , 295 K) para o derivado semissintético (13) do glaucolídeo B (4).	228
Figura 94 – Mapa de correlação HSQC (300 MHz ¹ H e 75 MHz ¹³ C, CDCl ₃ , 295 K) para o derivado semissintético (13) do glaucolídeo B (4).	229
Figura 95 – Mapa de correlação HMBC (300 MHz ¹ H e 75 MHz ¹³ C, CDCl ₃ , 295 K) para o derivado semissintético (13) do glaucolídeo B (4).	229
Figura 96 – Espectro ESI-QToF EM <i>full scan</i> (100-1200 Da) para o derivado semissintético 13	230
Figura 97 – Estrutura molecular do derivado semissintético (14) do glaucolídeo B (4).	231
Figura 98 – Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃ , 295 K) para o derivado semissintético (14) do glaucolídeo B (4).	233
Figura 99 – Mapa de correlação HSQC (300 MHz ¹ H e 75 MHz ¹³ C, CDCl ₃ , 295 K) para o derivado semissintético (14) do glaucolídeo B (4).	234
Figura 100 – Mapa de correlação HMBC (300 MHz ¹ H e 75 MHz ¹³ C, CDCl ₃ , 295 K) para o derivado semissintético (14) do glaucolídeo B (4).	234
Figura 101 – Espectro ESI-QToF EM <i>full scan</i> (100-1200 Da) para o derivado semissintético 14.	235

Figura 102 – Estrutura molecular do derivado semissintético (15) do glaucolídeo B (4).....	235
Figura 103 – Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃ , 295 K) para o derivado semissintético (15) do glaucolídeo B (4).....	237
Figura 104 – Mapa de correlação HSQC (300 MHz ¹ H e 75 MHz ¹³ C, CDCl ₃ , 295 K) para o derivado semissintético (15) do glaucolídeo B (4).....	238
Figura 105 – Mapa de correlação HMBC (300 MHz ¹ H e 75 MHz ¹³ C, CDCl ₃ , 295 K) para o derivado semissintético (15) do glaucolídeo B (4).....	238
Figura 106 – Espectro ESI-QToF EM <i>full scan</i> (100-1200 Da) para o derivado semissintético 15.	239
Figura 107 – Estrutura molecular do derivado semissintético (16) do glaucolídeo B (4).....	240
Figura 108 – Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃ , 295 K) para o derivado semissintético (16) do glaucolídeo B (4).....	243
Figura 109 – Mapa de correlação HSQC (300 MHz ¹ H e 75 MHz ¹³ C, CDCl ₃ , 295 K) para o derivado semissintético (16) do glaucolídeo B (4).....	244
Figura 110 – Mapa de correlação HMBC (300 MHz ¹ H e 75 MHz ¹³ C, CDCl ₃ , 295 K) para o derivado semissintético (16) do glaucolídeo B (4).....	244
Figura 111 – Espectro ESI-QToF EM <i>full scan</i> (100-1200 Da) para o derivado semissintético 16.	245
Figura 112 – Estrutura molecular do derivado semissintético 17.	245
Figura 113 – Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃ , 295 K) para o derivado semissintético 17.	248
Figura 114 – Mapa de correlação HSQC (300 MHz ¹ H e 75 MHz ¹³ C, CDCl ₃ , 295 K) para o derivado semissintético 17.....	249
Figura 115 – Mapa de correlação HMBC (300 MHz ¹ H e 75 MHz ¹³ C, CDCl ₃ , 295 K) para o derivado semissintético 17.....	249
Figura 116 – Espectro ESI-QToF EM <i>full scan</i> (100-1200 Da) para o derivado semissintético 17.	250
Figura 117 – Estrutura molecular do derivado semissintético 18.	251
Figura 118 – Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃ , 295 K) para o derivado semissintético 18.	254

Figura 119 – Mapa de correlação HSQC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 295 K) para o derivado semissintético 18	255
Figura 120 – Mapa de correlação HMBC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 295 K) para o derivado semissintético 18	255
Figura 121 – Espectro ESI-QToF EM <i>full scan</i> (100-1200 Da) para o derivado semissintético 18	256
Figura 122 – Estrutura molecular do derivado semissintético 19	256
Figura 123 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , 278 K) para o derivado semissintético 19	259
Figura 124 – Mapa de correlação HSQC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 278 K) para o derivado semissintético 19	260
Figura 125 – Mapa de correlação HMBC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 278 K) para o derivado semissintético 19	260
Figura 126 – Espectro ESI-QToF EM <i>full scan</i> (100-1200 Da) para o derivado semissintético 19	261
Figura 127 – Estrutura molecular do derivado semissintético 20	262
Figura 128 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , 295 K) para o derivado semissintético 20	265
Figura 129 – Mapa de correlação HSQC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 295 K) para o derivado semissintético 20	266
Figura 130 – Mapa de correlação HMBC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 295 K) para o derivado semissintético 20	266
Figura 131 – Espectro ESI-QToF EM <i>full scan</i> (100-1200 Da) para o derivado semissintético 20	267
Figura 132 – Estrutura molecular do derivado semissintético 21	268
Figura 133 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , 308 K) para o derivado semissintético 21	270
Figura 134 – Mapa de correlação HSQC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 308 K) para o derivado semissintético 21	271
Figura 135 – Mapa de correlação HMBC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 308 K) para o derivado semissintético 21	271

Figura 136 – Espectro ESI-QToF EM <i>full scan</i> (100-1200 Da) para o derivado semissintético 21 .	272
Figura 137 – Estrutura molecular do derivado semissintético 22 .	273
Figura 138 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , 295 K) para o derivado semissintético 22 .	275
Figura 139 – Mapa de correlação HSQC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 295 K) para o derivado semissintético 22 .	276
Figura 140 – Mapa de correlação HMBC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 295 K) para o derivado semissintético 22 .	276
Figura 141 – Espectro ESI-QToF EM <i>full scan</i> (100-1200 Da) para o derivado semissintético 22 .	277
Figura 142 – Estrutura molecular do derivado semissintético 23 .	277
Figura 143 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , 295 K) para o derivado semissintético 23 .	279
Figura 144 – Mapa de correlação HSQC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 295 K) para o derivado semissintético 23 .	280
Figura 145 – Mapa de correlação HMBC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 295 K) para o derivado semissintético 23 .	280
Figura 146 – Espectro ESI-QToF EM <i>full scan</i> (100-1200 Da) para o derivado semissintético 23 .	281
Figura 147 – Estrutura molecular do derivado semissintético 24 .	282
Figura 148 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , 295 K) para o derivado semissintético 24 .	284
Figura 149 – Mapa de correlação HSQC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 295 K) para o derivado semissintético 24 .	285
Figura 150 – Mapa de correlação HMBC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 295 K) para o derivado semissintético 24 .	285
Figura 151 – Espectro ESI-QToF EM <i>full scan</i> (100-1200 Da) para o derivado semissintético 24 .	286
Figura 152 – Comparação estrutural entre as LS testadas frente à atividade antiparasitária.	289

Figura 153 – Comparação estrutural entre algumas das LS testadas frente à atividade citotóxica.	294
Figura 154 – Efeito do glaucolídeo B (4) sobre a citotoxicidade em macrófagos RAW 264.7.....	295
Figura 155 – Efeitos do glaucolídeo B (4) sobre os níveis de NO (A) e IL-6 (B) em macrófagos RAW 264.7 tratados com LPS.....	296

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1 – Obtenção dos padrões piptocarfina A (1) e glaucolídeo A (2) a partir do extrato bruto de lavagem foliar (ELF) de <i>Vernonanthura tweedieana</i>	78
Fluxograma 2 – Obtenção dos padrões diacetilpiptocarfol (3) e glaucolídeo B (4) a partir do extrato bruto macerado de <i>Lepidaploa chamissonis</i> (MLC).	79
Fluxograma 3 – Ilustração do procedimento extrativo pela técnica de lavagem foliar	84
Fluxograma 4 – Fracionamento cromatográfico do extrato de lavagem foliar (ELF) de <i>L. chamissonis</i>	154
Fluxograma 5 – Fracionamento cromatográfico do extrato de lavagem foliar (ELF) de <i>C. scorpioides</i>	156
Fluxograma 6 – Fracionamento cromatográfico do extrato de lavagem foliar (ELF) de <i>V. condensata</i>	158
Fluxograma 7 – Fracionamento cromatográfico complementar da fração de AcOEt de extrato de lavagem foliar (ELF) de <i>V. condensata</i>	161
Fluxograma 8 – Fracionamento cromatográfico para a purificação dos derivados semissintéticos (11-24) de lactonas sesquiterpênicas.....	168

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Ordem de preparação das 16 diferentes combinações de fatores do desenho experimental fatorial para otimização de extração por lavagem foliar	75
Quadro 2 – Composição dos sistemas HEMWat testados para o fracionamento da fração AcOEt de ELF de <i>L. chamissonis</i>	89
Quadro 3 – Composição dos sistemas HEMWat testados para o fracionamento da fração AcOEt de ELF de <i>V. condensata</i>	92
Quadro 4 – Composição dos sistemas HEMWat testados para o fracionamento da subfração VcC de CPC da fração AcOEt de ELF de <i>V. condensata</i>	93
Quadro 5 – Composição dos sistemas HEMWat testados para o fracionamento da subfração VcJ de CPC da fração AcOEt de ELF de <i>V. condensata</i>	95

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Esquema geral de reações de ciclização transanular a partir do glaucolídeo B (4)..	98
Esquema 2 – Esquema reacional de ciclização transanular do glaucolídeo B (4) em presença de N,N-dimetil-4-aminopiridina (DMAP): condição a(i) .	98
Esquema 3 – Esquema reacional de ciclização transanular do glaucolídeo B (4) em presença de N,N-dimetil-4-aminopiridina (DMAP): condição a(ii) .	99
Esquema 4 – Esquema reacional de ciclização transanular do glaucolídeo B (4) em presença de cloreto de bismuto III (BiCl ₃) em presença de anidrido acético (Ac ₂ O): condição b .	100
Esquema 5 – Esquema reacional de ciclização transanular do glaucolídeo B (4) em presença de cloreto de bismuto III (BiCl ₃) sem anidrido acético: condição c(i) .	101
Esquema 6 – Esquema reacional de ciclização transanular do glaucolídeo B (4) em presença de ácido trifluoroacético: condição c(ii) .	102
Esquema 7 – Esquema reacional de ciclização via rearranjo alílico do derivado semissintético 16 em presença de carbonato de potássio (K ₂ CO ₃): condição d .	103
Esquema 8 – Esquema reacional de ciclização transanular do derivado semissintético 16 em presença de cloreto de bismuto III (BiCl ₃): condição e .	103
Esquema 9 – Esquema geral de reações de modificação molecular a partir do derivado semissintético 16 .	104
Esquema 10 – Esquema reacional de oxidação do derivado semissintético 16 em presença de clorocromato de piridínio (PCC): condição f .	105
Esquema 11 – Esquema reacional de desidroalogenação do derivado semissintético 16 em presença de cloreto de tionila (SOCl ₂): condição g .	106
Esquema 12 – Esquema reacional de acetilação do derivado semissintético 16 em presença de N,N-dimetil-4-aminopiridina, trietilamina (Et ₃ N) e de anidrido acético: condição h .	106
Esquema 13 – Esquema reacional de acetilação do derivado semissintético 17 em presença de N,N-dimetil-4-aminopiridina, trietilamina (Et ₃ N) e de anidrido acético: condição h .	107
Esquema 14 – Esquema reacional de acetilação do derivado semissintético 18 em presença de N,N-dimetil-4-aminopiridina, trietilamina (Et ₃ N) e de anidrido acético: condição h .	108
Esquema 15 – Esquema reacional de eliminação do derivado semissintético 19 em presença de cloreto de bismuto III (BiCl ₃): condição e .	109

Esquema 16 – Mecanismo de fragmentação proposto para o íon adutado com sódio $[M+Na]^+$ da piptocarфина A (1).....	130
Esquema 17 – Mecanismo de fragmentação adicional proposto para a piptocarфина A (1) a partir do isômero mais estável (1.4g) para o fragmento m/z 277.....	133
Esquema 18 – Mecanismo de fragmentação complementar proposto para a piptocarфина A (1)..	134
Esquema 19 – Mecanismo de fragmentação proposto para os íons adutados com sódio m/z 487,15 $[M+Na]^+$ e com hidrogênio m/z 465,17 $[M+H]^+$ do glaucolídeo A (2)... ..	135
Esquema 20 – Mecanismo de fragmentação adicional proposto para o glaucolídeo A (2) a partir do fragmento m/z 277.....	137
Esquema 21 – Mecanismo de fragmentação complementar proposto para o glaucolídeo A (2).....	138
Esquema 22 – Mecanismos de fragmentação propostos em modo positivo para o composto luteolina-7-metileter (pico IV; m/z 301,0732).....	150
Esquema 23 – Esquema reacional geral de produção dos derivados semissintéticos (11-24) de lactonas sesquiterpênicas.	167
Esquema 24 – Mecanismo de reação proposto para produção dos derivados semissintéticos 11 e 12 com N,N-dimetil-4-aminopiridina (DMAP): condições a(i) e a(ii).....	215
Esquema 25 – Mecanismo de reação proposto para produção dos derivados semissintéticos 13, 14 e 15 com cloreto de bismuto III ($BiCl_3$): condição b.....	225
Esquema 26 – Mecanismo de reação proposto para produção do derivado semissintético 16 com cloreto de bismuto III ($BiCl_3$): condição c(i).....	240
Esquema 27 – Mecanismo de reação proposto para produção do derivado semissintético 17 com carbonato de potássio (K_2CO_3): condição d.. ..	246
Esquema 28 – Mecanismo de reação proposto para produção do derivado semissintético 18 com cloreto de bismuto III ($BiCl_3$): condição e.....	251
Esquema 29 – Mecanismo de reação proposto para produção do derivado semissintético 19 com clorocromato de piridínio (PCC): condição f.....	257
Esquema 30 – Mecanismo de reação proposto para produção do derivado semissintético 20 com cloreto de tionila ($SOCl_2$): condição g.....	262

Esquema 31 – Mecanismo de reação proposto para acetilação do derivado semissintético 21 com DMAP e trietilamina (Et ₃ N) em presença de anidrido acético: condição h	268
Esquema 32 – Mecanismo de reação proposto para acetilação do derivado semissintético 22 com DMAP e trietilamina (Et ₃ N) em presença de anidrido acético: condição h	273
Esquema 33 – Mecanismo de reação proposto para acetilação do derivado semissintético 23 com DMAP e trietilamina (Et ₃ N) em presença de anidrido acético: condição h	278
Esquema 34 – Mecanismo de reação proposto para produção do derivado semissintético 24 com cloreto de bismuto III (BiCl ₃): condição e	282

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros avaliados para folhas secas obtidas para as espécies de Vernonieae.....	117
Tabela 2 – Rendimento de extração das diferentes preparações derivadas da otimização do processo extrativo por lavagem foliar a partir da espécie <i>V. tweedieana</i>	120
Tabela 3 – Teor de piptocarфина A (1) nas diferentes preparações derivadas da otimização do processo extrativo por lavagem foliar a partir da espécie <i>V. tweedieana</i>	123
Tabela 4 – Dados de ESI-QToF EM por injeção direta e combinada dos padrões (1-4) de lactonas sesquiterpênicas.....	126
Tabela 5 – Dados de ESI(+)-QToF EM/EM para os padrões de lactonas sesquiterpênicas (1-4)..	129
Tabela 6 – Valores máximos médios de distribuição e de função de distribuição radial do Na ⁺ em relação aos átomos de oxigênio da piptocarфина A (1) e glaucolídeo A (2).	132
Tabela 7 – Dados de energia de interação para os complexos de sódio 1a1-1a4 a partir da piptocarфина A (1) e para os complexos 2a1-2a4 a partir do glaucolídeo A (2).....	142
Tabela 8 – Compostos identificados no extrato de lavagem foliar de <i>V. tweedieana</i> por CLUE-EM (ESI positivo).....	145
Tabela 9 – Valores de coeficiente de partição (K_D) obtidos para o glaucolídeo B (4) na fração AcOEt de <i>L. chamissonis</i> frente aos sistemas HEMWat M, N e P.	152
Tabela 10 – Valores de coeficiente de partição (K_D) obtidos para a vernodalina (5) na fração AcOEt de <i>V condensata</i> frente aos sistemas HEMWat J, K, L, M e N.....	157
Tabela 11 – Valores de coeficiente de partição (K_D) obtidos para os compostos 6, 7 e 8 na subfração VcC de <i>V condensata</i> frente aos sistemas HEMWat M, N, P, Q e R.	160
Tabela 12 – Valores de coeficiente de partição (K_D) obtidos para os compostos 9 e 10 na subfração VcJ de <i>V condensata</i> frente aos sistemas HEMWat G, H, J e K.	160
Tabela 13 – Compostos identificados na análise comparativa por CLUE-EM (ESI positivo) do extrato de lavagem foliar de <i>L. chamissonis</i> sob condições reacionais mimetizando o processo usual de isolamento de LS.	164
Tabela 14 – Dados de RMN ¹ H e RMN ¹³ C para a piptocarфина A (1) de <i>Vernonanthura tweedieana</i> e dados comparativos da literatura.	170

Tabela 15 – Dados de RMN ¹ H e RMN ¹³ C para o glaucolídeo A (2) de <i>Vernonanthura tweediana</i> e dados comparativos da literatura.	175
Tabela 16 – Dados de RMN ¹ H e RMN ¹³ C para o diacetilpiptocarfol (3) de <i>Lepidaploa chamissonis</i> e dados comparativos da literatura.	179
Tabela 17 – Dados de RMN ¹ H e RMN ¹³ C para o glaucolídeo B (4) de <i>Lepidaploa chamissonis</i> e dados comparativos da literatura.....	184
Tabela 18 – Dados de RMN ¹ H e RMN ¹³ C para a vernodalina (5) de <i>Vernonanthura condensata</i> e dados comparativos da literatura.	188
Tabela 19 – Dados de RMN ¹ H e RMN ¹³ C para a 11,13,16,17-tetrahidrovernalida (6) de <i>Vernonanthura condensata</i> e dados comparativos da literatura.	192
Tabela 20 – Dados de RMN ¹ H e RMN ¹³ C para a 11,13-dihidrovernalida (7) de <i>Vernonanthura condensata</i> e dados comparativos da literatura.	197
Tabela 21 – Dados de RMN ¹ H e RMN ¹³ C para a vernalida (8) de <i>Vernonanthura condensata</i> e dados comparativos da literatura.....	202
Tabela 22 – Dados de RMN ¹ H e RMN ¹³ C para a 19-hidroxi-11,13-dihidrovernalida (9) de <i>Vernonanthura condensata</i> e dados comparativos da literatura.	206
Tabela 23 – Dados de RMN ¹ H e RMN ¹³ C para a 19-hidroxivernolida (10) de <i>Vernonanthura condensata</i> e dados comparativos da literatura.	211
Tabela 24 – Dados de RMN ¹ H e RMN ¹³ C para o derivado semissintético (11) do glaucolídeo B (4) e dados comparativos da literatura	216
Tabela 25 – Dados de RMN ¹ H e RMN ¹³ C para o derivado semissintético (12) do glaucolídeo B (4) e dados comparativos da literatura.	221
Tabela 26 – Dados de RMN ¹ H e RMN ¹³ C para o derivado semissintético (13) do glaucolídeo B (4) e dados comparativos da literatura	227
Tabela 27 – Dados de RMN ¹ H e RMN ¹³ C para o derivado semissintético (14) do glaucolídeo B (4) e dados comparativos da literatura	232
Tabela 28 – Dados de RMN ¹ H e RMN ¹³ C para o derivado semissintético (15) do glaucolídeo B (4) e dados comparativos da literatura.	236
Tabela 29 – Dados de RMN ¹ H e RMN ¹³ C para o derivado semissintético (16) do glaucolídeo B (4) e dados comparativos da literatura.	241

Tabela 30 – Dados de RMN ¹ H e RMN ¹³ C para o derivado semissintético (17) e dados comparativos da literatura.	247
Tabela 31 – Dados de RMN ¹ H e RMN ¹³ C para o derivado semissintético (18) e dados comparativos da literatura.	253
Tabela 32 – Dados de RMN ¹ H e RMN ¹³ C para o derivado semissintético (19) e dados comparativos com material de partida (16).	258
Tabela 33 – Dados de RMN ¹ H e RMN ¹³ C para o derivado semissintético (20) e dados comparativos da literatura.	264
Tabela 34 – Dados de RMN ¹ H e RMN ¹³ C para o derivado semissintético (21) e dados comparativos com material de partida (16)..	269
Tabela 35 – Dados de RMN ¹ H e RMN ¹³ C para o derivado semissintético (22) e dados comparativos com material de partida (17).	274
Tabela 36 – Dados de RMN ¹ H e RMN ¹³ C para o derivado semissintético (23) e dados comparativos com material de partida (18).	278
Tabela 37 – Dados de RMN ¹ H e RMN ¹³ C para o derivado semissintético (24) e dados comparativos com material de partida (19).	283
Tabela 38 – Valores de IC ₅₀ e CC ₅₀ para as LS (1-5) purificas a partir das espécies Vernoniae avaliadas quanto à atividade leishmanicida frente à <i>Leishmania amazonensis</i>	288
Tabela 39 – Valores de IC ₅₀ e CC ₅₀ para as LS (1-5) purificas a partir das espécies Vernoniae avaliadas quanto à atividade tripanocida frente à <i>Trypanosoma cruzi</i>	288
Tabela 40 – Valores de CC ₅₀ para as LS 1 e 2 quanto à avaliação da atividade citotóxica...	290
Tabela 41 – Valores de viabilidade, CC ₅₀ e IS para as LS 1-10 de Vernoniae e derivados semissintéticos 11-24 quanto à avaliação da atividade citotóxica.....	292

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, FÓRMULAS E UNIDADES

Ac ₂ O	<i>Anidrido acético</i>
Acetona-d ₆	<i>Acetona deuterada</i>
AcOEt	<i>Acetato de etila</i>
ANOVA	<i>Análise de variância</i>
Ar	<i>Argônio</i>
ASC	<i>Ascendente</i>
atm	<i>Atmosfera</i>
BiCl ₃	<i>Cloreto de bismuto (III)</i>
CC	<i>Cromatografia em coluna clássica</i>
CC ₁₀	<i>Concentração que inibe 10% do crescimento celular</i>
CC ₅₀	<i>Concentração que inibe 50% do crescimento celular</i>
CCD	<i>Cromatografia em camada delgada</i>
CCDP	<i>Cromatografia em camada delgada preparativa</i>
CD ₃ OD	<i>Metanol deuterado</i>
CDCl ₃	<i>Clorofórmio deuterado</i>
CHCl ₃	<i>Clorofórmio</i>
CLAE-DAD	<i>Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à detector de arranjo de diodos</i>
CLUE	<i>Cromatografia líquida de ultra eficiência</i>
CLUE-EM	<i>Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas</i>
COX	<i>Ciclooxigenase</i>
CPC	<i>Cromatografia de partição centrífuga</i>
<i>d</i>	<i>Dupleto</i>
Da	<i>Dalton</i>
DCM	<i>Diclorometano</i>
<i>dd</i>	<i>Dupleto de dupleto</i>
<i>ddd</i>	<i>Duplo-dupleto de dupleto</i>
<i>dddd</i>	<i>Duplo-duplo-dupleto de dupleto</i>
<i>dl</i>	<i>Dupleto largo</i>
DMAP	<i>N,N-dimetil-4-aminopiridina</i>

DMEM	<i>Meio de Eagle modificado por Dulbecco (do inglês, Dulbecco's Modified Eagle Medium)</i>
DMSO	<i>Dimetilsulfóxido</i>
DPPH	<i>2,2-difenil,1-picrilidrazila</i>
DSC	<i>Descendente</i>
<i>dt</i>	<i>Dupleto de tripleto</i>
ELF	<i>Extrato de lavagem foliar</i>
EM	<i>Espectrometria de massas</i>
EM/EM	<i>Espectrometria de massas em tandem (do inglês, Tandem mass spectrometry, MS/MS)</i>
EMAR	<i>Espectrometria de massas de alta resolução</i>
ESI-QTof	<i>Ionização por eletronebulização com analisadores do tipo quadrupolo acoplado a tempo de voo (do inglês, Electrospray ionization-quadrupole-time of flight)</i>
Et ₃ N	<i>Trietilamina</i>
EtOH	<i>Etanol</i>
eV	<i>Elétron-volt</i>
FE	<i>Fase estacionária</i>
FI	<i>Fase inferior</i>
FID	<i>Decaimento de indução livre (do inglês, Free induction decay)</i>
FM	<i>Fase móvel</i>
FS	<i>Fase superior</i>
g	<i>Grama</i>
HEMWat	<i>Sistema de solventes formada pela mistura de n-hexano/acetato de etila/metanol/água (do inglês, n-hexane/ethyl acetate/methanol/water)</i>
HEPES	<i>Ácido N-(2-hidroxietil)-piperazina-N'-(2-etanosulfônico)</i>
HMBC	<i>Correlação heteronuclear de ligações múltiplas (do inglês, Heteronuclear multiple bond correlation)</i>
HSQC	<i>Correlação heteronuclear de quantum simples (do inglês, Heteronuclear single quantum correlation)</i>
IC ₅₀	<i>Concentração que inibe 50% dos parasitos (do inglês, Inhibitory concentration)</i>
IL	<i>Interleucina</i>
iNOS	<i>Óxido nítrico sintase induzível (do inglês, Inducible nitric oxide synthase)</i>

<i>J</i>	<i>Constante de acoplamento (expresso em Hertz, Hz)</i>
<i>K</i>	<i>Kelvin</i>
K_2CO_3	<i>Carbonato de potássio</i>
K_D	<i>Coefficiente de partição (também chamado coeficiente de distribuição)</i>
<i>kg</i>	<i>Quilograma</i>
<i>kV</i>	<i>Quilovolt</i>
<i>L</i>	<i>Litro</i>
<i>LPS</i>	<i>Lipopolissacarídeo</i>
<i>LS</i>	<i>Lactonas sesquiterpênicas</i>
<i>m</i>	<i>Multiplete</i>
<i>m/z</i>	<i>Razão massa X carga</i>
<i>MeOH</i>	<i>Metanol</i>
<i>mg</i>	<i>Miligrama</i>
<i>min</i>	<i>Minuto</i>
<i>mL</i>	<i>Mililitro</i>
<i>mm</i>	<i>Milímetro</i>
<i>mM</i>	<i>Milimolar</i>
<i>MTT</i>	<i>Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio</i>
Na_2SO_4	<i>Sulfato de sódio</i>
$NaHCO_3$	<i>Bicarbonato de sódio</i>
<i>NF-κB</i>	<i>Fator nuclear kappa B (do inglês, nuclear factor kappa B)</i>
<i>nm</i>	<i>Nanômetro</i>
<i>NO</i>	<i>Óxido nítrico</i>
<i>ns</i>	<i>Nano segundo (10^{-9} segundos)</i>
<i>PAINS</i>	<i>Compostos interferentes em ensaios gerais (do inglês, Pan assay interference compounds)</i>
<i>PCC</i>	<i>Clorocromato de piridínio (do inglês, Pyridinium chlorochromate)</i>
<i>PMA</i>	<i>Forbol-12-miristato-13-acetato</i>
<i>ps</i>	<i>Pico segundo (10^{-12} segundos)</i>
<i>Rf</i>	<i>Fator de retenção (do inglês, Retention factor)</i>
<i>RMN 1H</i>	<i>Ressonância magnética nuclear de hidrogênio</i>
<i>RMN</i>	<i>Ressonância magnética nuclear</i>
<i>rpm</i>	<i>Rotações por minuto</i>
<i>rt</i>	<i>Temperatura ambiente (do inglês, Room temperature)</i>

s	<i>Segundo</i>
s	<i>Simpleto</i>
SBF	<i>Soro bovino fetal</i>
SiO ₂	<i>Sílica (dióxido de silício)</i>
sl	<i>Simpleto largo</i>
SOCl ₂	<i>Cloreto de tionila</i>
SPE	<i>Extração em fase sólida (do inglês, Solid phase extraction)</i>
t	<i>Tripleto</i>
TFA	<i>Ácido trifluoroacético</i>
THF	<i>Tetrahidrofurano</i>
TMS	<i>Tetrametilsilano</i>
TNF- α	<i>Fator de necrose tumoral alfa (do inglês, tumor necrosis factor alpha)</i>
t _R	<i>Tempo de retenção</i>
UV	<i>Ultravioleta</i>
V	<i>Volt</i>
v	<i>Volume</i>
δ (delta)	<i>Deslocamento químico (expresso em partes por milhão – ppm, em relação ao padrão interno - TMS)</i>
°C	<i>Grau Celsius</i>
μ g	<i>Micrograma</i>
μ L	<i>Microlitro</i>
μ M	<i>Micromolar</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	47
2 REVISÃO DA LITERATURA	49
2.1 PLANTAS MEDICINAIS	49
2.2 FAMÍLIA ASTERACEAE	50
2.2.1 Tribo Vernonieae Cass.	50
2.2.1.1 Gênero <i>Cyrtocymura</i> H. Rob.	51
2.2.1.1.1 Considerações sobre a espécie <i>Cyrtocymura scorpioides</i> (Lam.) H. Rob.	52
2.2.1.2 Gênero <i>Lepidaploa</i> H. Rob.	54
2.2.1.2.1 Considerações sobre a espécie <i>Lepidaploa chamissonis</i> (Less.) H. Rob.	55
2.2.1.3 Gênero <i>Vernonanthura</i> H. Rob.	56
2.2.1.3.1 Considerações sobre a espécie <i>Vernonanthura condensata</i> (Baker) H. Rob.	57
2.2.1.3.2 Considerações sobre a espécie <i>Vernonanthura tweediana</i> (Baker) H. Rob.	59
2.3 LACTONAS SESQUITEPÊNICAS E SUAS PROPRIEDADES	62
2.3.1 Classificação	63
2.3.2 Propriedades biológicas	64
2.3.3 Caracterização e purificação	65
2.3.4 Semissíntese	66
2.4 CONSIDERAÇÕES SOBRE O CÂNCER	67
2.5 CONSIDERAÇÕES SOBRE AS DOENÇAS PARASITÁRIAS: leishmanioses e doença de Chagas	69
3 OBJETIVOS	71
3.1 OBJETIVO GERAL	71
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	71
4 MATERIAIS E MÉTODOS	73
4.1 MATERIAL VEGETAL	73
4.1.1 Coleta e identificação das espécies	73
4.1.2 Controle de qualidade farmacognóstico	73
4.1.2.1 Avaliação microscópica para pesquisa de tricomas glandulares	73
4.1.2.2 Determinação do teor de umidade	74
4.2 OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO EXTRATIVO A PARTIR DA ESPÉCIE <i>Vernonanthura tweediana</i>	74

4.2.1 Determinação do teor de lactonas sesquiterpênicas por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLUE-EM)	75
4.2.1.1 Desenvolvimento de método analítico por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLUE-EM)	75
4.2.1.2 Determinação do teor de piptocarфина A nas preparações obtidas na etapa de otimização do processo extrativo	76
4.2.2 Caracterização do extrato de lavagem foliar de <i>Vernonanthura tweediana</i> por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLUE-EM) e desreplicação	77
4.2.2.1 Caracterização espectrométrica e estudo computacional das lactonas sesquiterpênicas do tipo hirsutinolídeo e glaucolídeo	77
4.2.2.1.1 <i>Obtenção dos padrões de lactonas sesquiterpênicas do tipo hirsutinolídeo e glaucolídeo</i>	77
4.2.2.1.2 <i>Avaliação do perfil de lactonas sesquiterpênicas por espectrometria de massas de alta resolução (EMAR-ESI-QToF) e espectrometria de massas em tandem (EM/EM)</i>	80
4.2.2.1.3 <i>Estudo computacional do processo de ionização e formação de adutos das lactonas sesquiterpênicas do tipo hirsutinolídeo e glaucolídeo</i>	81
4.2.2.2 Análise de desreplicação do extrato de <i>Vernonanthura tweediana</i> por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLUE-EM).	83
4.3 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES EXTRATIVAS	84
4.3.1 Obtenção dos extratos brutos otimizados de lavagem foliar	84
4.4 TRATAMENTO PRELIMINAR E MONITORAMENTO CROMATOGRÁFICO	85
4.4.1 Particionamento dos extratos brutos	85
4.4.2 Monitoramento por cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLUE-EM)	85
4.5 PURIFICAÇÃO E ISOLAMENTO DE LACTONAS SESQUITERPÊNICAS DE ESPÉCIES DE VERNONIEAE	86
4.5.1 Método geral de cromatografia de partição centrífuga (CPC)	86
4.5.1.1 Seleção do sistema bifásico pela análise de coeficiente de partição (K_D)	86
4.5.2 Purificação de lactona sesquiterpênica de <i>Lepidaploa chamissonis</i>	88
4.5.2.1 Purificação da fração AcOEt de ELF de <i>L. chamissonis</i> por CPC: composto 4	88
4.5.2.1.1 <i>Seleção do sistema bifásico pela análise de coeficiente de partição (K_D)</i>	88
4.5.2.1.2 <i>Fracionamento da fração AcOEt de ELF por CPC: CPC de <i>L. chamissonis</i></i>	89
4.5.3 Purificação de lactona sesquiterpênica de <i>Cyrtocymura scorpioides</i>	90

4.5.3.1 Purificação da fração AcOEt de ELF de <i>C. scorpioides</i> por CPC: composto 4	90
4.5.3.1.1 <i>Fracionamento da fração AcOEt de ELF por CPC: CPC de C. scorpioides</i>	90
4.5.4 Purificação de lactonas sesquiterpênicas de <i>Vernonanthura condensata</i>	91
4.5.4.1 Purificação da fração AcOEt de ELF de <i>V. condensata</i> por CPC: composto 5	92
4.5.4.1.1 <i>Seleção do sistema bifásico pela análise de coeficiente de partição (K_D)</i>	92
4.5.4.1.2 <i>Fracionamento da fração AcOEt de ELF por CPC: 1° CPC de V. condensata</i>	92
4.5.4.2 Purificação da subfração VcC de ELF de <i>V. condensata</i> por CPC: compostos 6-8	93
4.5.4.2.1 <i>Seleção do sistema bifásico pela análise de coeficiente de partição (K_D)</i>	93
4.5.4.2.2 <i>Fracionamento da subfração VcC por CPC: 2° CPC de V. condensata</i>	94
4.5.4.3 Purificação da subfração VcJ de ELF de <i>V. condensata</i> por CPC: compostos 9-10	94
4.5.4.3.1 <i>Seleção do sistema bifásico pela análise de coeficiente de partição (K_D)</i>	94
4.5.4.3.2 <i>Fracionamento da subfração VcJ por CPC: 3° CPC de V. condensata</i>	95
4.6 OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS DE LACTONAS SESQUITERPÊNICAS	96
4.6.1 Avaliação do potencial de conversão de glaucolídeo B (4) em outros subtipos de LS sob condições usuais de purificação de LS	96
4.6.2 Métodos gerais para purificação dos derivados semissintéticos	97
4.6.2.1 Cromatografia em coluna clássica (CC)	97
4.6.2.2 Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP)	97
4.6.3 Obtenção dos derivados semissintéticos de lactonas sesquiterpênicas	97
4.6.3.1 Reações de ciclização transanular do glaucolídeo B (4) em presença de reagente catalítico básico (condição a)	98
4.6.3.1.1 <i>Reação de ciclização transanular do glaucolídeo B (4) em presença de N,N-dimetil-4-aminopiridina (DMAP): condição a(i)</i>	98
4.6.3.1.2 <i>Reação de ciclização transanular do glaucolídeo B (4) em presença de N,N-dimetil-4-aminopiridina (DMAP): condição a(ii)</i>	99
4.6.3.2 Reações de ciclização transanular do glaucolídeo B (4) em presença de reagente catalítico ácidos (condição b e c)	100
4.6.3.2.1 <i>Reação de ciclização transanular do glaucolídeo B (4) em presença de cloreto de bismuto III ($BiCl_3$) e de anidrido acético (Ac_2O): condição b</i>	100
4.6.3.2.2 <i>Reação de ciclização transanular do glaucolídeo B (4) em presença de cloreto de bismuto III ($BiCl_3$) sem anidrido acético: condição c(i)</i>	101
4.6.3.2.3 <i>Reação de ciclização transanular do glaucolídeo B (4) em presença de ácido trifluoroacético (TFA): condição c(ii)</i>	101

4.6.3.3 Reações de ciclização via rearranjo alílico do derivado semissintético 16 em presença de reagente catalítico básico (condição d)	102
<i>4.6.3.3.1 Reação de ciclização via rearranjo alílico do derivado semissintético 16 em presença de carbonato de potássio (K₂CO₃): condição d</i>	102
4.6.3.4 Reações de ciclização transanular do derivado semissintético 16 em presença de reagente catalítico ácido (condição e)	103
<i>4.6.3.4.1 Reação de ciclização transanular do glaucolídeo B (4) em presença de cloreto de bismuto III (BiCl₃): condição e</i>	103
4.6.3.5 Reações adicionais de modificação estrutural a partir do derivado semissintético 16	104
<i>4.6.3.5.1 Reação de oxidação do derivado semissintético 16 em presença de clorocromato de piridínio (PCC): condição f</i>	104
<i>4.6.3.5.2 Reação de desidroalogenação via cloração do derivado semissintético 16 em presença de cloreto de tionila: condição g</i>	105
<i>4.6.3.5.3 Reação de acetilação do derivado semissintético 16 em presença de N,N-dimetil-4-aminopiridina, trietilamina (Et₃N) e de anidrido acético: condição h</i>	106
4.6.3.6 Reação de acetilação dos derivados semissintéticos 17 e 18	107
<i>4.6.3.6.1 Reação de acetilação do derivado semissintético 17 em presença de N,N-dimetil-4-aminopiridina, trietilamina e de anidrido acético: condição h</i>	107
<i>4.6.3.6.2 Reação de acetilação do derivado semissintético 18 em presença de N,N-dimetil-4-aminopiridina, trietilamina e de anidrido acético: condição h</i>	108
4.6.3.7 Reações de eliminação via rearranjo e ataque nucleofílico do derivado semissintético 19 em presença de reagente catalítico ácido (condição e)	108
<i>4.6.3.7.1 Reação de eliminação via rearranjo e ataque nucleofílico do derivado semissintético 19 em presença de cloreto de bismuto III (BiCl₃): condição e</i>	108
4.7 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL	109
4.7.1 Ressonância magnética nuclear (RMN)	110
4.7.2 Espectrometria de massas (EM)	110
4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA <i>in vitro</i>	110
4.8.1 Análise de pureza dos compostos por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à detector de arranjo de fotiodos e espectrometria de massas (CLUE-PDA-EM)	110
4.8.2 Avaliação das atividades leishmanicida e tripanocida	111
4.8.3 Avaliação da atividade citotóxica	112

4.8.4 Avaliação da atividade anti-inflamatória	114
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	117
5.1 OBTENÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE DO MATERIAL VEGETAL	117
5.1.1 Coleta, processamento e determinação do teor de umidade	117
5.1.2 Análise microscópica	117
5.2 OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO EXTRATIVO A PARTIR DA ESPÉCIE <i>Vernonanthura tweedieana</i>	119
5.3 CARACTERIZAÇÃO DE LACTONAS SESQUITERPÊNICAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO E ANÁLISE DE RESPRELICAÇÃO DO EXTRATO OTIMIZADO DE <i>Vernonanthura tweedieana</i>	125
5.3.1 Caracterização das lactonas sesquiterpênicas do tipo hirsutinolídeo e glaucolídeo por espectrometria de massa de alta resolução (EMAR)	125
5.3.2 Análise de desreplicação do extrato de lavagem foliar (ELF) otimizado de <i>Vernonanthura tweedieana</i> por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLUE-EM)	144
5.4 PREPARAÇÃO E FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS DE LAVAGEM FOLIAR (ELF) DAS ESPÉCIES DE VERNONIEAE	151
5.4.1 Obtenção e fracionamento do ELF de <i>Lepidaploa chamissonis</i>	151
5.4.2 Obtenção e fracionamento do ELF de <i>Cyrtocymura scorpioides</i>	155
5.4.3 Obtenção e fracionamento do ELF de <i>Vernonanthura condensata</i>	156
5.5 PREPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS DE LACTONAS SESQUITERPÊNICAS	162
5.6 CARACTERIZAÇÃO E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DAS LACTONAS SESQUITERPÊNICAS ISOLADAS E DOS DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS	169
5.6.1 Lactonas sesquiterpênicas isoladas a partir de espécies selecionadas de Vernonieae: compostos 1-10	169
5.6.1.1 Composto (1): piptocarфина A	169
5.6.1.2 Composto (2): glaucolídeo A	174
5.6.1.3 Composto (3): diacetilpiptocarfol	179
5.6.1.4 Composto (4): glaucolídeo B	183
5.6.1.5 Composto (5): vernodalina	187
5.6.1.6 Composto (6): 11,13,16,17-tetrahidrovernolida	192
5.6.1.7 Composto (7): 11,13-dihidrovernolida	197
5.6.1.8 Composto (8): vernolida	201

5.6.1.9 Composto (9): 19-hidroxi-11,13-dihidroveranolida	205
5.6.1.10 Composto (10): 19-hidroxivernolida	210
5.6.2 Derivados semissintéticos de lactonas sesquiterpênicas: compostos 11-24	214
5.6.2.1 Derivado (11): 1,4-dihidroxi-5,8,10-triacetoxi-13-metoxicadin-7(11)-en-6(12)-olídeo	214
5.6.2.2 Derivado (12): 1,4-dihidroxi-5,8,10,13-tetraacetoxicadin-7(11)-en-6(12)-olídeo	220
5.6.2.3 Derivado (13): 1(10)-acetonida-5,8-diacetoxi-2-epi-vernomargolídeo-1(4)-ciclohemiacetal	224
5.6.2.4 Derivado (14): 5,8,10-triacetoxi-2-epi-vernomargolídeo-1(4)-ciclohemiacetal	231
5.6.2.5 Derivado (15): 5,8-diacetoxi-2-epi-vernomargolídeo-1(4)-ciclohemiacetal	235
5.6.2.6 Derivado (16): 8,10,13-triacetoxi-1(4)-epoxi-1,5-dihidroxigermacr-7(11)-en-6(12)-olídeo	240
5.6.2.7 Derivado (17): 1,8-diacetoxi-1(4),7(10)-diepoxi-5-hidroxigermacr-11(13)-en-6(12)-olídeo	245
5.6.2.8 Derivado (18): 8-acetoxi-vernomargolídeo	251
5.6.2.9 Derivado (19): 8,10,13-triacetoxi-1(4)-epoxi-6-hidroxi-5-ceto-germacr-7(11)-en-6(12)-olídeo	256
5.6.2.10 Derivado (20): 8,10,13-triacetoxi-1(4)-epoxi-germacra-1(2),5(6),7(11)-trien-6(12)-olídeo	261
5.6.2.11 Derivado (21): 5,8,10,13-tetraacetoxi-1(4)-epoxi-1-hidroxigermacr-7(11)-en-6(12)-olídeo	267
5.6.2.12 Derivado (22): 1,5,8-triacetoxi-1(4),7(10)-diepoxi-germacr-11(13)-en-6(12)-olídeo	272
5.6.2.13 Derivado (23): 5,8-diacetoxi-vernomargolídeo	277
5.6.2.14 Derivado (24): 8,10-diacetoxi-4(7)-epoxi-6-hidroxi-1,5-diceto-germacr-11(13)-en-6(12)-olídeo	281
5.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA <i>in vitro</i>	287
5.7.1 Avaliação das atividades leishmanicida e tripanocida	287
5.7.2 Avaliação da atividade citotóxica	290
5.7. Avaliação da atividade anti-inflamatória	295
6 CONCLUSÕES	299
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	303
REFERÊNCIAS	305

1 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais vêm contribuindo substancialmente ao longo dos anos para a descoberta de novos agentes terapeuticamente ativos, tendo as plantas medicinais e os seus derivados uma importância preponderante neste processo (CRAGG; NEWMAN, 2013; JANTAN et al., 2015; NEWMAN; CRAGG, 2016b).

Pertencente à família Asteraceae, a tribo Vernoniae é distribuída principalmente nas Américas e África (LOEUILLE, 2011; NAKAJIMA et al., 2015), sendo considerada um dos grupos mais complexos taxonomicamente (MENDONÇA et al., 2009; SOARES, 2012). Nesta tribo, os gêneros *Vernonanthura*, *Cyrtocymura* e *Lepidaploa* destacam-se pela produção de lactonas sesquiterpênicas (LS) (KOTOWICZ et al., 1998; BORKOSKY et al., 2003; MARTUCCI et al., 2014; GALLON; JAIYESIMI; GOBBO-NETO, 2018).

Consideradas como características na família Asteraceae, as LS são metabólitos secundários formados por uma cadeia de 15 carbonos, organizada em três unidades isoprênicas, contendo um anel lactônico fundido, sendo altamente promissoras principalmente devido às suas propriedades citotóxica, antiproliferativa e antitumoral (GHANTOUS et al., 2010; TOYANG et al., 2013; ITO et al., 2016; FRONZA et al., 2017), anti-inflamatória (CHADWICK et al., 2013; HOHMANN et al., 2016; WU et al., 2017) e antiprotozoária (NI LOO et al., 2017; ULLOA et al., 2017).

Nesse âmbito, a técnica de lavagem foliar tem se mostrado um método bastante seletivo para a obtenção das LS a partir da extração do conteúdo dos tricomas glandulares das folhas (IGUAL et al., 2013; LUSA; DA COSTA; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, 2016). Ainda assim, a fim de se acelerar o isolamento de uma classe de substâncias, tal qual as LS, estratégias de otimização tecnológica do processo extrativo podem ser aplicadas, podendo ser empregadas técnicas de planejamento experimental e análise estatística a partir de delineamentos fatoriais (MIGLIATO et al., 2011; BARBOSA et al., 2014).

Diversos análogos sintéticos e semissintéticos de produtos naturais vêm sendo desenvolvidos e avaliados nos últimos 50 anos para o tratamento de diferentes tipos câncer (alguns em fase clínica) (NEWMAN; CRAGG, 2014; JANTAN et al., 2015; NEWMAN; CRAGG, 2016a), sendo grande parte desses compostos derivados de LS, muito devido à sua seletividade por células tumorais (CHATURVEDI; DWIVEDI; MISHRA, 2015; REN; YU; KINGHORN, 2016; JANA et al., 2017).

Da mesma forma, as LS também possuem uma proeminente propriedade antiprotozoária, como as atividades leishmanicida e tripanocida (SAEIDNIA; GOHARI;

HADDADI, 2013; BRANQUINHO et al., 2014; JIMENEZ et al., 2014; KIMANI et al., 2018). Igualmente, diferentes derivados semissintéticos de LS vem demonstrando melhoradas propriedades leishmanicida e tripanocida quando comparadas ao produto de partida (FUCHINO et al., 2001; ZIMMERMANN et al., 2014).

No que tange o desenvolvimento de novos fármacos ou protótipos, a abordagem semissintética a partir de produtos naturais mostra-se uma estratégia bastante válida podendo promover a produção de derivados análogos com propriedades farmacológicas melhoradas em relação aos compostos precursores (LANG et al., 2012; RAHIER et al., 2015). Estudos recentes apresentam diferentes estratégias de modificação molecular de LS para produção e avaliação da atividade biológica de seus derivados semissintéticos (TURCONI et al., 2014; DOAN et al., 2015; VILLAGOMEZ et al., 2015; CHEN et al., 2017; ZAKI; AKSSIRA; BERTEINARABOIN, 2017; TANG et al., 2018).

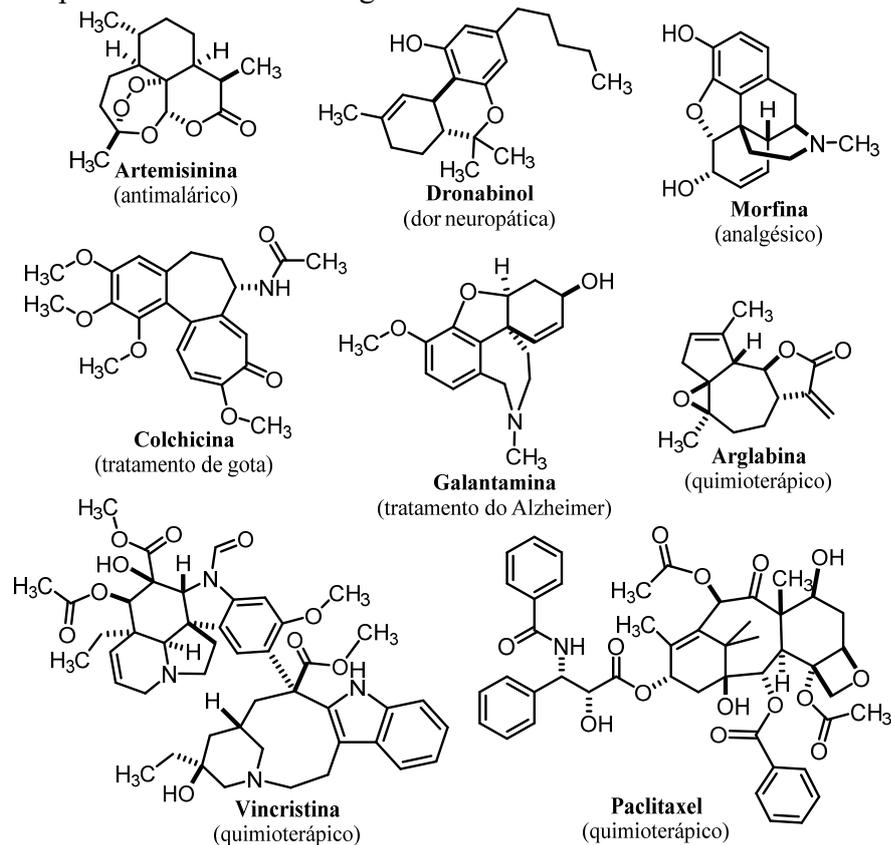
Neste contexto, a produção de derivados semissintéticos de LS, visando o desenvolvimento de novos compostos com promissoras atividades citotóxica, anti-inflamatória e antiparasitária, permitirá um progresso relevante no futuro dos produtos naturais e fornecerá mais subsídios para o potencial desenvolvimento de um agente terapêutico e/ou protótipo para o tratamento destas doenças.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 PLANTAS MEDICINAIS

A natureza auxilia a humanidade em suas necessidades básicas e fornece matéria-prima para o desenvolvimento de medicamentos para um amplo espectro de doenças. Os produtos naturais de origem vegetal e seus derivados têm contribuído, e continuarão fundamentais para o processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos, servindo como fonte de padrões moleculares inovadores (NEWMAN; CRAGG, 2014; JANTAN et al., 2015). Diversos são os compostos de origem natural ou baseados nestes que resultaram em medicamentos utilizados na clínica, sendo alguns exemplos ilustrados na Figura 1.

Figura 1 – Exemplos de fármacos de origem natural.



Fonte: adaptado de Kingston (2011), Atanasov e colaboradores (2015) e Katz e Baltz (2016).

Acredita-se que cerca de 30% dos medicamentos disponíveis são derivados de fontes naturais, principalmente de plantas e microrganismos, sendo muitos desses princípios ativos isolados de plantas brasileiras. Embora o Brasil seja o maior detentor de biodiversidade vegetal mundial, com mais de 45 mil espécies de plantas superiores representando de 20-22% do total

existente no planeta, o mercado de produtos derivados de plantas no Brasil é muito pequeno, correspondendo a menos de 5% de todos os medicamentos comercializados (HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015; DUTRA et al., 2016).

Entretanto, apesar da escassez de informações relacionadas à vegetação nativa brasileira e às propriedades medicinais dessas plantas, essa ampla diversidade da flora nacional torna as plantas medicinais brasileiras altamente promissoras. O Brasil, neste contexto, pode deixar de ser um fornecedor de matéria-prima passando a fornecer substâncias e produtos de valor tecnológico agregado ao mercado farmacêutico (CALIXTO; SIQUEIRA JUNIOR, 2008; DUTRA et al., 2016).

2.2 FAMÍLIA ASTERACEAE

A família Asteraceae é uma das mais importantes fontes de espécies vegetais com valor medicinal (BESSADA; BARREIRA; OLIVEIRA, 2015). Compreende 12 subfamílias, 43 tribos, cerca de 1.500 gêneros e aproximadamente 25.000 espécies, distribuídas por quase todo o planeta (com exceção da Antártida), mas principalmente encontrada na região das Américas (GURIB-FAKIM, 2006; HEINRICH et al., 2012).

No Brasil, as asteráceas compreendem 28 tribos, 290 gêneros e cerca de 2.100 espécies, especialmente encontradas no cerrado, em campos rupestres, campos de altitude e restinga (OGASAWARA; ROQUE, 2015; REFLORA, 2019a). Os metabolitos secundários na família Asteraceae são bastante diversificados, sendo mais de 5.000 espécies quimicamente estudadas, com cerca de 7.000 compostos já isolados (ALVARENGA et al., 2001).

As asteráceas são caracterizadas principalmente pela presença de lactonas sesquiterpênicas (LS) que, quando presentes, são responsáveis em grande parte pela atividade biológica observada para a espécie em questão (GURIB-FAKIM, 2006; PADILLA-GONZALEZ; DOS SANTOS; DA COSTA, 2016). Todavia, a família também se destaca pela presença de flavonoides, ácidos fenólicos, terpenoides, cumarinas e poliacetilenos (WAKSMUNDZKA-HAJNOS; SHERMA; KOWALSKA, 2008; ACHIKA et al., 2014; KONOVALOV, 2014).

2.2.1 Tribo Vernoniae Cass.

A tribo Vernoniae é considerada taxonomicamente um dos grupos mais complexos da família Asteraceae, sendo atualmente subdividida em 21 subtribos, com aproximadamente 100

gêneros e cerca de 1.500 espécies. A tribo é amplamente distribuída pelo Paraguai, Uruguai, Bolívia, Argentina e Brasil, sendo neste último representada por 15 subtribos, cerca de 52 gêneros e aproximadamente 458 espécies, com maior incidência no sudeste brasileiro (MARINHO, 2014; NAKAJIMA et al., 2015; REFLORA, 2019g).

Devido à complexidade taxonômica, diversos estudos genéticos recentes vem sendo desenvolvidos para a melhor compreensão e classificação dos membros da tribo (LOEUILLE; KEELEY; PIRANI, 2015; MARINHO et al., 2016; VEGA; DEMATTEIS, 2016). Os membros da tribo são anuais ou perenes, de hábitos variando desde ervas, arbustos, lianas e, raramente, árvores de grande porte. Entre os compostos já obtidos para tribo, destacam-se as LS, flavonoides, poliacetilenos e fenilpropanoides (MENDONÇA; ESTEVES; GONÇALVES-ESTEVES, 2007; OGASAWARA; ROQUE, 2015; LUSA et al., 2016; GALLON et al., 2018).

Entre as diferentes subtribos de Vernoniaceae destacam-se a subtribo Vernoniinae, representada principalmente pelos gêneros *Cyrtocymura* H. Rob. e *Vernonanthura* H. Rob.; e a subtribo Lepidaploinae, com ênfase nos gêneros *Lepidaploa* H. Rob., *Chrysolea* H. Rob., *Echinocoryne* H. Rob., *Lessingianthus* H. Rob. e *Stenocephalum* Sch. Bip. (KEELEY; ROBINSON, 2009).

2.2.1.1 Gênero *Cyrtocymura* H. Rob.

O gênero *Cyrtocymura* H. Rob. foi estabelecido por Robinson (1987), sendo reclassificado a partir do grupo *Vernonia*, e compreende seis espécies distribuídas pelo México, Índias Ocidentais e Américas Central e do Sul (ROBINSON, 1987; KEELEY; ROBINSON, 2009). No Brasil, o gênero é representado por quatro espécies (*C. harleyi*, *C. lanuginosa*, *C. mattos-silvae* e *C. scorpioides*) com destaque para a espécie *C. scorpioides* como a mais incidente (ROBINSON, 1987; OGASAWARA; ROQUE, 2015; REFLORA, 2019b).

Entre os constituintes químicos já reportados para o gênero destacam-se as LS, em especial os subtipos glaucolídeo e hirsutinolídeo, além de mono e sesquiterpenos, flavonoides e ácidos fenólicos (BORKOSKY et al., 1996; BORKOSKY et al., 2009; GALLON; JAIYESIMI; GOBBO-NETO, 2018).

Valdés e colaboradores (2001) demonstraram o efeito alelopático de frações oriundas do extrato hexânico das raízes de *C. cincta* sobre monocotiledôneas. Além disso, os efeitos antiproliferativo, antitumoral e antibacteriano foram descritos para a espécie *C. scorpioides*,

mas sob a denominação da sinonímia *Vernonia scorpioides* (PAGNO et al., 2006; ZANDONAI et al., 2010; SOBRINHO; DE SOUZA; DOS SANTOS FONTENELLE, 2015).

2.2.1.1.1 Considerações sobre a espécie *Cyrtocymura scorpioides* (Lam.) H. Rob.

A espécie *Cyrtocymura scorpioides* (Figura 2) (denominação botânica mais atualizada adotada neste estudo), reclassificada por Robinson (1987), tem como basionímo *Conyza scorpioides* Lam. (TROPICOS.ORG, 2019a) – apesar de ser frequentemente reconhecida pela sinonímia botânica *Vernonia scorpioides* (Lam.) Pers.

Figura 2 – Ilustração de espécimes de *Cyrtocymura scorpioides* (Lam.) H. Rob.



Fonte: autor.

Distribuída pelas Américas Central e do Sul e considerada uma espécie endêmica do Brasil, a *C. scorpioides* é conhecida popularmente como “erva-São-Simão”, "enxuga" e "ervapreá" e encontrada em todas as regiões do país, com significativa dispersão no estado de Santa Catarina, sendo usada na medicina popular para o tratamento de hemorroidas e disenteria (CABRERA; KLEIN, 1980b; HATTORI; NAKAJIMA, 2008; REFLORA, 2019c).

Em termos botânicos, a espécie *C. scorpioides* apresenta-se na forma de arbusto, com talos ramosos, lanuginoso, foliosos até o ápice, com face adaxial setosa e face abaxial estrigosa. As folhas são alternadas, pecioladas, ovadas, medindo de seis a dez centímetros de comprimento e dois a quatro de largura, sendo agudas no ápice e atenuadas na base, remotamente serrado-dentadas nos bordos. Ainda, possui capítulos florais numerosos, sésseis, dispostos em cincínios curtos e densos, dispostos no extremo dos ramos, formando uma pseudopanicula contraída. As flores, cerca de 20 a 30, apresentam coloração de lilás à roxa,

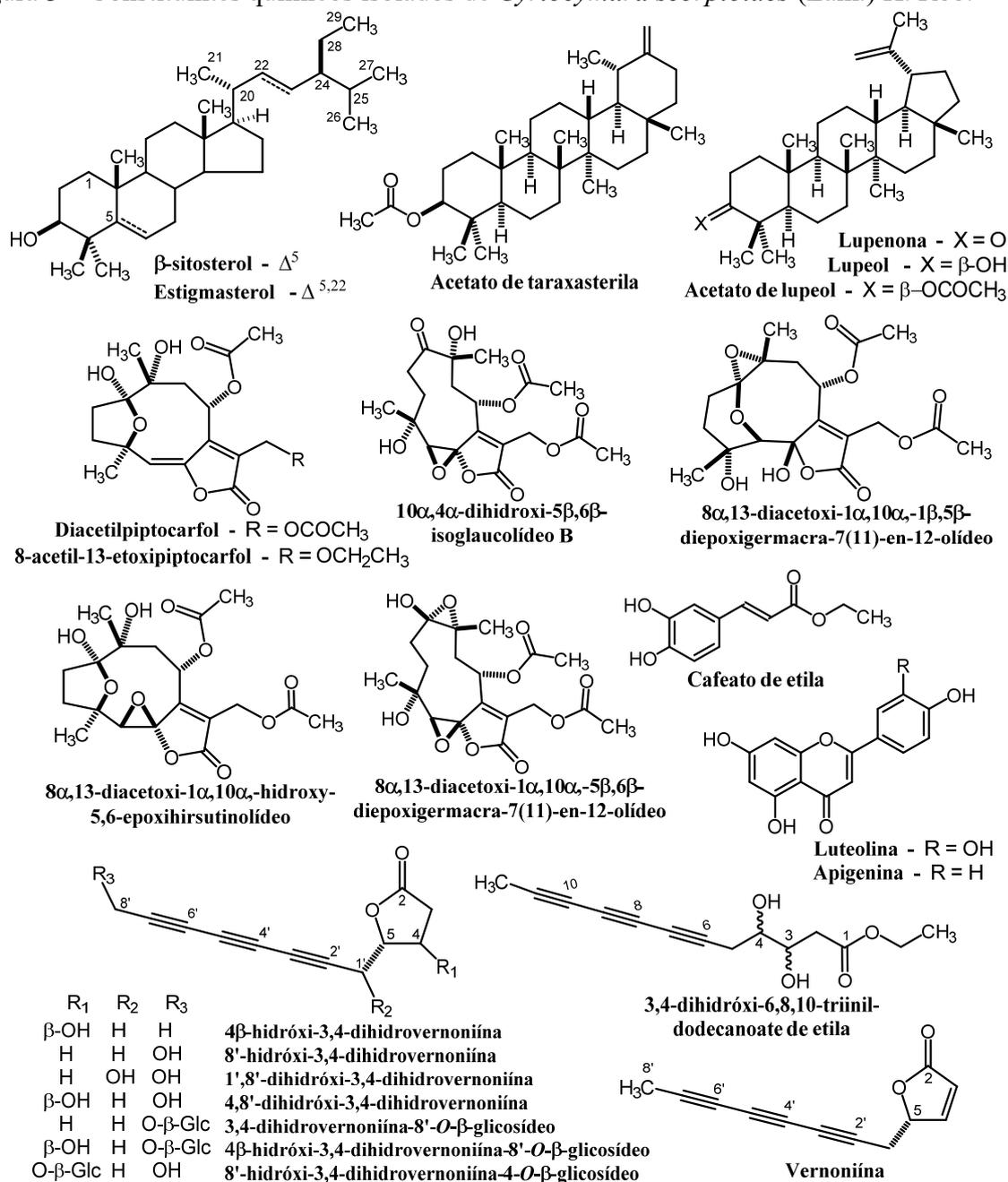
cujo período de florescência acontecendo durante o inverno e primavera entre os meses de julho a dezembro/janeiro. Os aquênios são veludosos e de papus branco (CABRERA; KLEIN, 1980b; OGASAWARA; ROQUE, 2015).

No que diz respeito às atividades biológicas reportadas para preparações a partir de *C. scorpioides* já foram demonstrados os efeitos citotóxico, observado para o extrato etanólico das folhas após aplicação tópica em camundongos (DALAZEN et al., 2005), e antitumoral, observado para a fração diclorometano em camundongos portadores do tumor de Ehrlich (PAGNO et al., 2006) e para uma subfração de porção diclorometano em camundongos portadores do tumor ascítico Sarcoma 180 (KREUGER et al., 2009). Além disso, do extrato etanólico de *C. scorpioides* também apresentou os efeitos antiedematogênico (PEREIRA; COGO; ZAMUNER, 2012) e anti-inflamatório (RAUH et al., 2011b). Ainda, Kreuger e colaboradores (2012a) demonstraram a atividade antibacteriana *in vitro* da fração acetato de etila obtida do extrato etanólico de *C. scorpioides*.

Em relação à composição química de *C. scorpioides*, a partir da análise de desreplicação por cromatografia líquida de ultra performance em hifenização à espectrometria de massas (CLUE-EM) do extrato 70% metanólico da espécie foram identificados flavonoides aglicônicos (apigenina, luteolina, crisoeriol, kaempferol e genkwanina) e glicosilados (acacetina-7-*O*-rutinosídeo, quercetina-3-*O*-rutinosídeo, quercetina-3-*O*-glicosídeo, luteolina-7-*O*-glicuronídeo, kaempferol-3-*O*-rutinosídeo, crisoeriol-7-*O*-neohesperidosídeo), bem como diferentes ácidos fenólicos (isômeros 3- e 5- do ácido cafeoilquínico, ácido 5-*p*-coumaroilquínico, e os isômeros 3,4-, 3,5- e 4,5- do ácido dicafeoilquínico) (GALLON; JAIYESIMI; GOBBO-NETO, 2018; GALLON et al., 2018).

Já a análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas permitiu identificar 45 sesquiterpenos no óleo essencial de *C. scorpioides*, cujos componentes majoritários foram o β -cariofileno (37,0%), óxido de cariofileno (12,5%), (*E*)-nerolidol (10,4%), α -humuleno (6,0%), e espatulenol (4,7%) (PINTO et al., 2016).

Ainda no contexto da investigação fitoquímica para *C. scorpioides*, entre os compostos já isolados a partir da espécie (Figura 3) estão LS do tipo glaucolídeo e hirsutinolídeo (BUSKUHLE et al., 2010), triterpenos e esteroides (MACHADO et al., 2013), poliacetilenos (POLLO et al., 2013), flavonoides (luteolina e apigenina), além de um derivado do ácido cafeico, o cafeato de etila (KREUGER et al., 2012a).

Figura 3 – Constituintes químicos isolados de *Cyrtocymura scorpioides* (Lam.) H. Rob.

Fonte: adaptado de Buskuhl e colaboradores (2010), Kreuger e colaboradores (2012a), Machado e colaboradores (2013) e Pollo e colaboradores (2013).

2.2.1.2 Gênero *Lepidaploa* H. Rob.

Reiterado por Robinson (1990) o gênero *Lepidaploa* H. Rob. compreende cerca de 140 espécies, distribuídas nos Andes, Índias Ocidentais e América Central e do Sul (TELES; SOBRAL; NAKAJIMA, 2010). No Brasil são encontradas aproximadamente 52 espécies, predominantemente nas regiões nordeste e sudeste (REFLORA, 2019d).

Diferentes LS foram encontradas nas flores e folhas de *L. remotiflora* (VALDÉS et al., 1998) e de *L. myriocephala* (BORKOSKY et al., 2003). Dos Santos e colaboradores (2012) identificaram duas novas ceramidas, além dos conhecidos germanicol, β -sitosterol, estigmasterol, 3 β -*O*- β -D-glicopiranosil-sitosterol, lupeol, acetato de lupeol e tilirosida a partir das partes aéreas de *L. cotoneaster*. Já Morales-Escobar e colaboradores (2007) isolaram quatro flavonoides glicosilados e dois benzofuranos glicosilados das partes aéreas de *L. mapirensi*.

Maia e colaboradores (2010) descreveram a atividade antibacteriana moderada para o óleo essencial (rico em *E*-cariofileno e biciclogermacreno) da espécie *L. remotiflora* frente à *P. aeruginosa* (ATCC25619), *E. aerogenes* (ATCC12472), *S. choleraesuis* (ATCC10708), *K. pneumoniae* (ATCC10031), *S. aureus* (ATCC25923) e *B. subtilis* (ATCC6633).

2.2.1.2.1 Considerações sobre a espécie *Lepidaploa chamissonis* (Less.) H. Rob.

A espécie *Lepidaploa chamissonis* (Figura 4), cujo basiônimo *Vernonia chamissonis* Less. (TROPICOS.ORG, 2019b), é conhecida popularmente no Brasil como “cambarazinho” e é encontrada nas regiões sul e sudeste (CABRERA; KLEIN, 1980a; REFLORA, 2019e).

Figura 4 – Ilustração de espécimes de *Lepidaploa chamissonis* (Less.) H. Rob.



Fonte: autor

Quanto aos aspectos botânicos, a espécie apresenta-se como um arbusto pequeno de aproximadamente um metro de altura, ramoso, com ramos foleosos até o ápice. Suas folhas são

alternas, pecioladas, herbáceas, acuminadas no ápice e arredondadas na base com nervuras altamente marcadas, podendo medir de cinco a dez centímetros de comprimento e dois a quatro centímetros de largura. Os capítulos florais costumam ser numerosos e dispostos em panículas de longos cincínios, com coloração violácea, cujo período florescente acontece entre os meses de dezembro a abril. Os aquênios são veludosos e de pappus branco (CABRERA; KLEIN, 1980a).

Em estudos recentes avaliando a composição química de diferentes espécies brasileiras de Vernoniae (GALLON; JAIYESIMI; GOBBO-NETO, 2018; GALLON et al., 2018) foram descritos para a espécie *L. chamissonis*, a partir da análise de desreplicação por CLUE-EM do extrato 70% metanólico, a presença de flavonoides aglicônicos (vicenina-2 e quercetina) e glicosilados (quercetina-3-*O*-rutinosídeo, quercetina-3-*O*-glicosídeo, quercetina-3-*O*-[6-cafeoil]-glicosídeo, luteolina-7-*O*-glicuronídeo, kaempferol-3-*O*-rutinosídeo), de diferentes ácidos fenólicos (isômeros 3-, 4- e 5- do ácido cafeoilquínico, ácido 5-*p*-coumaroilquínico, ácido 5-*O*-ferruloilquínico, e os isômeros 3,4-, 3,5- e 4,5- do ácido dicafeoilquínico), além da LS 8-metacrilóil-hirsutinolídeo (análogo desidratado em C-1 da piptocarфина A). Apesar disso, não foram encontrados trabalhos descrevendo o isolamento de compostos a partir da espécie

Ainda, embora existam estudos envolvendo o gênero *Lepidaploa*, não foram encontradas informações na literatura referente à investigação da atividade biológica para a espécie *L. chamissonis*.

2.2.1.3 Gênero *Vernonanthura* H. Rob.

O gênero *Vernonanthura* H. Rob., instituído por Robinson (1992) para designar um grupo de espécies antes pertencentes anteriormente ao gênero *Vernonia* Schreb, compreende cerca de 70 espécies, distribuídas no México, Índias Ocidentais e América Central e do Sul.

No Brasil, existem aproximadamente 42 espécies, predominantemente encontradas nas regiões sul e sudeste (MENDONÇA et al., 2009; VEGA; DEMATTEIS, 2011; REFLORA, 2019f). Entretanto, a nomenclatura para esse novo gênero ainda não é totalmente consolidada na literatura, sendo empregado muitas vezes o basônimo *Vernonia* das espécies em estudo.

As espécies de *Vernonanthura* representam as chamadas "assapeixes", que no Brasil são utilizadas popularmente na preparação de xaropes para o tratamento de gripes e resfriados. Apresentam-se como arbustos ou árvores pequenas, sendo comumente encontrados nas vegetações que cercam as cidades, facilitando assim sua coleta (LEITÃO et al., 2014).

Entre as atividades descritas para preparações e/ou substâncias obtidas a partir do gênero estão as atividades antifúngica (SANTANA et al., 2012), antiprotozoária (SANTANA et al., 2014), antibacteriana (ROCHA-GRACIA et al., 2013), fago-inibidora (DEL CORRAL et al., 2014) e antiulcerogênica (OLIVEIRA et al., 2011).

Das classes de compostos que já foram identificadas para o gênero estão ácidos graxos, ácidos fenólicos e flavonoides (IGUAL et al., 2013), terpenoides (MANZANO et al., 2014), e principalmente LS (SANTANA et al., 2013; MARTUCCI et al., 2014).

Se considerada a busca na literatura pelo basionímico (*Vernonia*) das respectivas espécies de *Vernonanthura*, mais estudos são descritos quanto à identificação de metabólitos secundários, entre os quais poliacetilenos, além de outros ácidos fenólicos, terpenoides, flavonoides e lactonas sesquiterpênicas (MABRY et al., 1975a; BOHLMANN et al., 1983; ABEGAZ et al., 1994; CARVALHO; COSTA; SANTOS ABREU, 1999; PÉREZ-AMADOR et al., 2008; MAIA et al., 2010; TOYANG; VERPOORTE, 2013). Em relação à investigação biológica, são apresentadas ainda as atividades anti-inflamatória, antibacteriana, analgésica, reguladora de pressão arterial, citotóxica, antifúngica, leishmanicida, antiulcerogênica e antinociceptiva (VALVERDE et al., 2001; SILVEIRA; FOGGIO; GONTIJO, 2003; BARBASTEFANO et al., 2007; BRAGA et al., 2007; RISSO; SCARMINIO; MOREIRA, 2010; SANTOS JÚNIOR et al., 2010; TOYANG; VERPOORTE, 2013; SOBRINHO; DE SOUZA; DOS SANTOS FONTENELLE, 2015).

2.2.1.3.1 Considerações sobre a espécie *Vernonanthura condensata* (Baker) H. Rob.

A *Vernonanthura condensata* (Baker) H. Rob. (Figura 5) – basionímico *Vernonia condensata* Baker (TROPICOS.ORG, 2019c), é encontrada principalmente no Brasil e Nigéria.

A espécie, chamada de “boldo” e “alumã”, tem sido empregada popularmente no Brasil para o tratamento de problemas digestivos, intestinais, hepáticos e como analgésico para dores de cabeça e musculares (TOYANG; VERPOORTE, 2013; LEITÃO et al., 2014).

Em relação aos aspectos botânicos, a espécie é encontrada na forma de arbusto de altura variável entre dois a cinco metros. As folhas são alternas, pecioladas, pilosas (principalmente na face dorsal), com ápice agudo e base atenuada, podendo medir onze centímetros de comprimento e quatro centímetros de largura, sendo caracterizadas por bordas serrilhadas de textura fina. Os capítulos florais estão dispostos nos ápices dos ramos, formados por flores tubulosas, iguais e com papilos formados por pequenas cerdas (FIGUEIREDO; FRUTUOSO, 2005).

Figura 5 – Ilustração de espécimes de *Vernonanthura condensata* (Baker) H. Rob.

Fonte: autor

Entre as atividades biológicas já verificadas para a espécie estão as atividades antinociceptiva e anti-inflamatória, demonstrada para extratos etanólicos das folhas (DA SILVA et al., 2011). As atividades anti-inflamatória e analgésica foram também demonstradas *in vivo* para o esteroide vernoniosídeo B2 (VALVERDE et al., 2001).

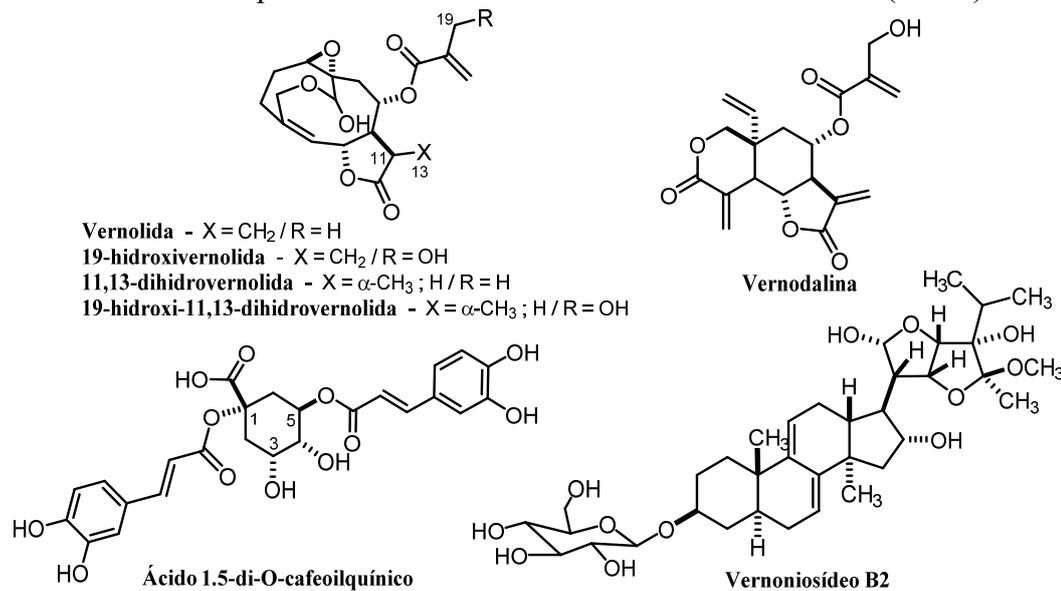
Da Silva e colaboradores (2013) demonstraram efeito antioxidante do extrato etanol e das frações hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol, obtidas a partir de folhas de *V. condensata*. Assim como Boeing e colaboradores (2016) identificaram as propriedades gastroprotetivas para extrato etanólico da folhas de *V. condensata*. Os efeito antinociceptivo (ED_{50} entre 2,7 e 281,8 mg/kg) e toxicidade aguda (LD_{50} entre 300 e >2000 mg/kg) foram demonstrados para diferentes extratos preparados a partir das folhas da espécie (RISSO; SCARMINIO; MOREIRA, 2010).

Monteiro e colaboradores (2001) não encontraram riscos teratogênicos ou mutagênicos (sem efeito em dose de 5000 μ g/mL), em modelos *in vivo* em camundongos, mas observaram baixa toxicidade oral aguda do extrato aquoso de folhas da espécie (observado letargia dos animais em doses superiores a 2000 mg/kg/dia). Por outro lado, Thomas e colaboradores (2016) demonstraram as atividades citotóxicas (frente às linhagens celulares tumorais REH, Nalm6, K-562 Molt4, MCF7 e HEK293T, com IC_{50} variando entre 9,0 e 26,0 mg/mL) e antitumoral

contra carcinoma de pulmão em ratos para o sobrenadante de centrifugação do extrato aquoso de *V. condensata*.

Quanto aos constituintes químicos já isolados para *V. condensata* (Figura 6) estão LS do tipo elemanolídeo e vernolídeo (JAKUPOVIC et al., 1987), o esteroide glicosilado vernoniosídeo B2 (VALVERDE et al., 2001) e o ácido fenólico ácido 1,5-di-*O*-cafeoilquínico (DA SILVA et al., 2017).

Figura 6 – Constituintes químicos isolados de *Vernonanthura condensata* (Baker) H. Rob.



Fonte: adaptado de Jakupovic e colaboradores (1987), Valverde e colaboradores (2001) e Da Silva e colaboradores (2017).

A partir da avaliação por CLAE-DAD do extrato alcoólico de *V. condensata* foi possível detectar a presença do ácido clorogênico e dos flavonoides luteolina, apigenina (DA SILVA et al., 2017) rutina e quercetina-3β-D-glicosídeo (RODRIGUES et al., 2019); e pela análise por CLUE-EM a presença dos esteroides vernoniosídeos A2, A3, B1, B2, D e E (AFONSO et al., 2015).

2.2.1.3.2 Considerações sobre a espécie *Vernonanthura tweedieana* (Baker) H. Rob.

A espécie *Vernonanthura tweedieana* (Baker) H. Rob. (Figura 7), cujo basionímo *Vernonia tweedieana* Baker (TROPICOS.ORG, 2019d), tem ocorrência no Brasil, Argentina e Paraguai. No Brasil é conhecida popularmente como “assapeixe” e “mata-pasto”, encontrada principalmente na região sul, ocorrendo também nos estados de São Paulo, Mato Grosso do Sul e Minas Gerais. No estado de Santa Catarina é predominante na região do meio oeste e vale do

Itajaí, e constitui uma das principais plantas invasoras de pastagens (CABRERA; KLEIN, 1980c; GASPER et al., 2013).

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



Fonte: adaptado de Da Silva (2015).

A espécie *V. tweedieana* compreende subarbustos eretos com aproximadamente 2 metros de altura com caule ramificado. As folhas são alternadas, levemente pecioladas (com pecíolo de 0,7 a 1,3 cm de contorno plano-convexo), com bordos serrados, sendo agudas no ápice e atenuadas na base, medindo de 5 a 12 centímetros de comprimento e de 1,3 a 2,5 centímetros de largura. Apresenta nervura central mais pronunciada na face abaxial. Possui capítulos numerosos, pedicelados, em número de 2 a 3. Os aquênios são pubescentes de 2 milímetros de comprimento e com pappus alvo. As flores são brancas ou roxas, de corola lilás, florescendo no verão entre os meses de fevereiro e abril, predominantemente em março (CABRERA; KLEIN, 1980c; SOARES, 2012; DUARTE; CHELLA, 2014).

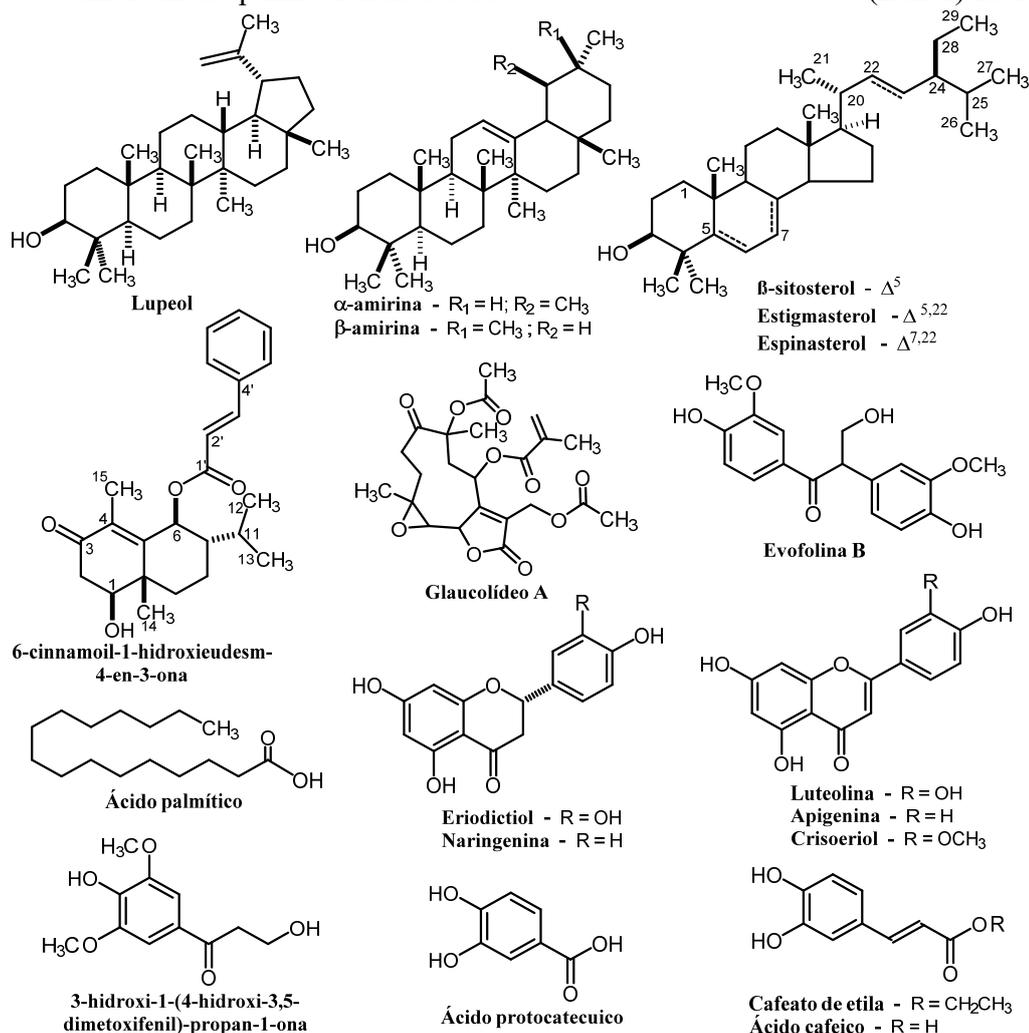
Na medicina popular, a espécie *V. tweedieana* é utilizada para o tratamento de doenças respiratórias, como alternativa terapêutica para gripes, bronquites e tosses (ZANON, 2006).

Ensaio realizados com extratos da espécie demonstraram atividade antibacteriana contra *Bacillus cereus*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* (DÍAZ et al., 2008). Petri e colaboradores (2008) demonstraram atividade imunomoduladora em camundongos para o extrato hidroetanólico da espécie, o qual também apresentou atividade antioxidante em modelo de DPPH (ZANON, 2006). Trevisan e colaboradores (2012) confirmaram atividade

antinociceptiva e anti-edematogênica do esteroide α -espinasterol obtido da espécie. O sesquiterpeno 6-cinamoil-1-hidroxiudesm-4-en-3-ona, purificado a partir de raízes da espécie apresentou atividade antifúngica contra *Candida albicans* (ATCC10231), *Cryptococcus neoformans* (CECT1075), *Microsporium gypseum* (CECT2908), *Saccharomyces cerevisiae* (CECT1324) e principalmente *Trichophyton mentagrophytes* (CECT2795) (PORTILLO et al., 2005). Os óleos essenciais das flores e folhas de *V. tweedieana* não apresentaram atividade antimicrobiana frente a *Enterococcus faecalis* (ATCC29212) e *S. aureus* (ATCC 25923) (LOQUETE et al., 2008), enquanto que os extratos aquoso e hidroetanólico da espécie também não foram ativos contra cepas virais HSV-1 (MONTANHA et al., 2004).

Entre os constituintes químicos já obtidos da espécie *V. tweedieana* estão, triterpenos (ZANON et al., 2008; TREVISAN et al., 2012), flavonoides, ácidos fenólicos, e a LS glaucolídeo A (PORTILLO et al., 2005; DA SILVA, 2015), conforme descrito na Figura 8.

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



Fonte: adaptado de Portillo e colaboradores (2005), Díaz e colaboradores (2008), Zanon e colaboradores (2008), Trevisan e colaboradores (2012), Da Silva (2015) e Da Silva e colaboradores (2015).

Adicionalmente, a análise de desreplicação por CLUE-EM do extrato 70% metanólico de *V. tweediana*, além de confirmar a presença dos constituintes luteolina, crisoeriol, apigenina e glaucolídeo A – isolados a partir da espécie, também possibilitou identificar a presença de flavonoides aglicônicos (vicenina-2, genkwanina e 3',4'-dimetoxiluteolina) e glicosilados (quercetina-3-*O*-glicosídeo, luteolina-7-*O*-glicuronídeo, apigenina-7-*O*-glicuronídeo, kaempferol-3-*O*-rutinosídeo e 7,3',5'-trihidroxi-4'-metoxi-3-*O*-glicosídeo), de diferentes ácidos fenólicos (ácido 5-cafeoilquínico e os isômeros 3,5- e 4,5- do ácido dicafeoilquínico), além da LS 8-tigloiloxiglaucolídeo A (GALLON; JAIYESIMI; GOBBO-NETO, 2018; GALLON et al., 2018).

2.3 LACTONAS SESQUITERPÊNICAS E SUAS PROPRIEDADES

Reconhecidas como um classe química característica da família Asteraceae, uma vez que cerca de 90% do total desses metabólitos secundários são obtidos de espécies da família, as LS pertencem ao subgrupo dos sesquiterpenos, ou seja, hidrocarbonetos formados por cadeias de 15 carbonos organizadas por 3 unidades isoprênicas, que se destacam pela presença de um anel lactônico fundido à esta cadeia carbônica (KREUGER et al., 2012b; PADILLA-GONZALEZ; DOS SANTOS; DA COSTA, 2016).

As LS são substâncias relativamente estáveis e de caráter lipofílico. São sintetizadas a partir do *trans,trans*-farnesilpirofosfato (formado pela condensação de três moléculas de difosfato de isopentenila, oriundo da condensação de unidades de acetil-CoA pela via do ácido mevalônico), que passa por uma ciclização inicial para obtenção do cátion germacrano. Por meio de subsequentes modificações oxidativas, este cátion serve de precursor para formação dos diferentes esqueletos das LS. A oxidação da cadeia lateral isopropila do esqueleto sesquiterpênico, seguida da adição de oxigênio em C-6 ou C-8 possibilita o fechamento do anel lactônico (RODRIGUEZ; TOWERS; MITCHELL, 1976; EMERENCIANO, 1983; SCHMIDT, 2006; CHADWICK et al., 2013).

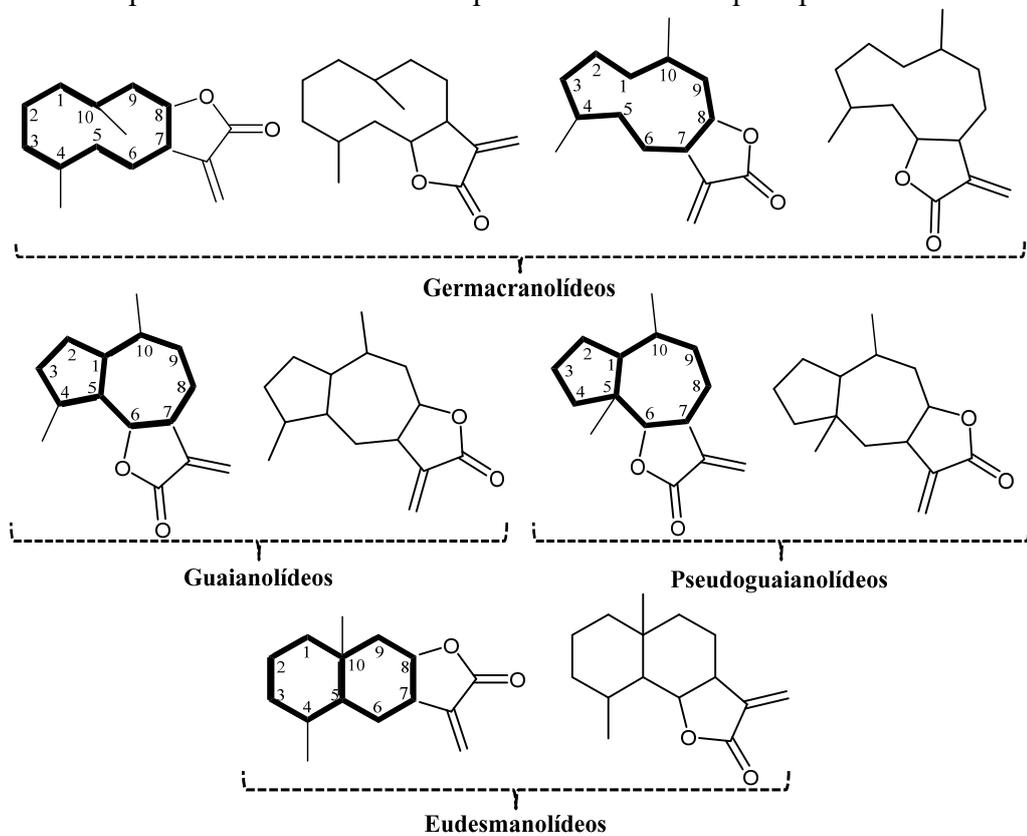
As LS assumem importante papel de proteção, atuando como fitoalexinas, sendo responsáveis pela defesa do vegetal contra ataques microbianos, contra herbivoria, como repelente de insetos e alérgenos à animais predadores, como aleloquímicos e na proteção UV (CHADWICK et al., 2013; PADILLA-GONZALEZ; DOS SANTOS; DA COSTA, 2016).

Esses metabólitos, caracterizados pelo “princípio amargo”, ocorrem principalmente em tricomas glandulares nas folhas, flores ou de sementes, podendo variar quantitativamente entre as espécies entre 0,001% a 8% de peso seco (STRAPASSON, 2010; CHATURVEDI, 2011b).

2.3.1 Classificação

Estipula-se a existência de cerca de 30 tipos de núcleos carbocíclicos diferentes para as LS, resultando em mais de 4.000 estruturas para essa subclasse já descritas para as Asteraceae (CHADWICK et al., 2013; PADILLA-GONZALEZ; DOS SANTOS; DA COSTA, 2016), sendo divididas em quatro grupos principais: germacranolídeos, guaianolídeos, pseudoguaianolídeos e eudesmanolídeos (Figura 9) (CHATURVEDI; DWIVEDI; MISHRA, 2015).

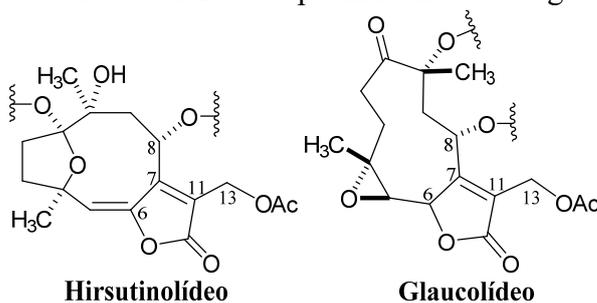
Figura 9 – Principais núcleos carbocíclicos para as lactonas sesquiterpênicas.



Fonte: adaptado de e Chaturvedi e colaboradores (2015).

Determinados subtipos de LS tendem a ser exclusivas em certos grupos de plantas, como observado para os hirsutinolídeos e glaucolídeos (Figura 10) que presumivelmente são restritas à tribo Vernonieae (Asteraceae). Estes subtipos de LS são derivados dos germacranolídeos e correspondem à estruturas altamente oxigenadas, sendo caracterizadas pela presença de uma insaturação endocíclica entre C-7 e C-11, um grupamento acetoxi em C-13 e uma função éster em C-8 (DA COSTA; TERFLOTH; GASTEIGER, 2005; BORKOSKY et al., 2009).

Figura 10 – Núcleos carbocíclicos das LS do tipo hirsutinolídeo e glaucolídeo.



Fonte: adaptado de Da Costa e colaboradores (2005) e Padilla-Gonzalez e colaboradores (2016).

As LS do tipo glaucolídeo têm sido associadas à formação de diferentes subtipos de LS, como exemplos os hirsutinolídeos e cadinanolídeos, considerados artefatos oriundos do processo de extração e/ou purificação de extratos brutos em condições que envolvem usualmente a utilização de adsorventes sólidos com caráter ácido (como sílica gel, terra bentonita) e solventes próticos (i.e. metanol, etanol) (BARDÓN et al., 1993; JIMENEZ et al., 1995; BAZON et al., 1997; BORKOSKY et al., 1997). Por outro lado, alguns autores propõem a presença desses subtipos de LS em extratos brutos que não foram expostos às condições acima mencionadas, seja durante a extração ou na purificação, sugerindo que estes sejam de fato metabólitos secundários produzidos pelo vegetal (PILLAY et al., 2007; APPEZZATO-DA-GLORIA et al., 2012).

2.3.2 Propriedades biológicas

Acredita-se que a bioatividade das LS seja principalmente relacionada à habilidade de alquilação de nucleófilos pelas α,β - ou α,β,γ -insaturações, presentes nas porções ciclopentenonas α,β -insaturadas ou α -metileno- γ -lactonas, que atuam como um aceptores de Michael, reagindo com nucleófilos, como grupos de sulfidril (R-SH) em enzimas e outras proteínas levando à interrupção das funções macromoleculares (SCHMIDT, 2006; CHATURVEDI, 2011b; AMORIM et al., 2013; QUINTANA; ESTÉVEZ, 2018). A atividade das LS pode também ser exercida por outros elementos estruturais aceptores eletrofilicos, como grupos epóxi, aldeídos, peróxidos e radicais ésteres, tais como acetato, metacrilato e tiglato (SCHMIDT, 2006; CHATURVEDI, 2011b; AMORIM et al., 2013; QUINTANA; ESTÉVEZ, 2018).

Além do potencial como digestivos amargos, as LS apresentam diversas propriedades biológicas, como antibacteriana, antimalárica, antiviral, antifúngicas, antiplasmódica, anti-inflamatórias, moluscicida, leishmanicida, tripanocida, gastroprotetora, analgésica, genotóxica, citotóxicas, alergênica e antitumoral (MATEJIĆ; ŠARAC; RANĐELOVIĆ, 2010;

STRAPASSON, 2010; ODONNE et al., 2011; AMORIM et al., 2013; JIMENEZ et al., 2014; FORMISANO et al., 2017; WULSTEN et al., 2017).

2.3.3 Caracterização e purificação

Apesar do aprimoramento dos espectrômetros, as análises de confirmação estrutural por ressonância magnética nuclear de algumas LS, como aquelas do tipo hirsutinolídeo e glaucolídeo, podem exigir condições peculiares de experimentação, tais como o uso de temperatura aumentada ou reduzida (COSTA et al., 2000; BUSKUHL et al., 2010), acarretando em dificuldades operacionais no processo. Entretanto, diversos métodos analíticos podem ser empregados para a caracterização das LS, e as técnicas hífenadas assumem um papel relevante para este propósito, combinando abordagens de separação e elucidação estrutural (MERFORT, 2002; DIAS; DE MELO; CROTTI, 2012).

Nesse contexto, a cromatografia líquida de ultra performance em hífenização à espectrometria de massas (CLUE-EM), amplamente utilizada na triagem de extratos de produtos naturais (LE; MCCOOEYE; WINDUST, 2014; ZHANG; SUN; WANG, 2016), mostra-se uma excelente opção no processo de caracterização das LS. Devido à alta sensibilidade, proporcionando uma detecção rápida de compostos em nível de traço, a espectrometria de massas em tandem de alta resolução com ionização por eletronebulização (EMAR-EM/EM) oferece uma caracterização estrutural facilitada por meio da medição precisa de massa (DE VIJLDER et al., 2017; HUBERT; NUZILLARD; RENAULT, 2017).

Diferentes métodos cromatográficos preparativos podem ser empregados para o isolamento de LS, com destaque para a cromatografia de partição centrífuga (CPC), utilizada na purificação desses compostos em larga escala em uma ou poucas etapas, com redução do consumo de solventes orgânicos (tecnologia verde), conciliando economia de tempo e recursos (MERFORT, 2002; OLLIVIER et al., 2013; SKALICKA-WOŹNIAK; GARRARD, 2014).

A cromatografia de partição centrífuga é um tipo de cromatografia em contracorrente, a qual se baseia na separação por partição de uma amostra entre duas fases não miscíveis, utilizando um equipamento com um eixo de rotação e assim, tendo equilíbrio hidrostático das duas fases (BECERRA et al., 2015; BOJCZUK; ŻYŻELEWICZ; HODUREK, 2017).

Quando comparada à outros sistemas líquidos preparativos, a CPC oferece muitas vantagens, tais como não usar fase sólida como suporte e, conseqüentemente, nenhuma perda de amostra devido à adsorção irreversível, uma quantidade acessível alta de fase estacionária e uma alta capacidade de preenchimento de amostra. Além disso, usando baixo consumo de

solventes e um curto tempo de separação, sugerindo um caráter de química verde, as análises de CPC proporcionam alta seletividade e pureza de compostos isolados, bem como alta recuperação de amostras via etapa de extrusão (MICHEL; DESTANDAU; ELFAKIR, 2014; BOJCZUK; ŻYŻELEWICZ; HODUREK, 2017; ISSAADI et al., 2017).

Recentemente, tem se mostrado cada vez mais crescente o uso bem sucedido da técnica de CPC para a purificação de LS em larga escala (PINEL et al., 2007; OLLIVIER et al., 2013; ADEKENOVA et al., 2016). Nesse âmbito, Skalicka-Woźniak e Garrard (2014) compilaram 150 sistemas de solventes empregados na separação de terpenoides, entre os quais a LS, de modo a favorecer a aplicação dessa técnica.

2.3.4 Semissíntese

A busca por novos candidatos a fármacos pode ser baseada na modificação semissintética de um composto natural (NEWMAN, 2016). Nesse contexto, o uso dos conhecimentos relativos à química medicinal na abordagem semissintética no desenvolvimento de compostos ou protótipos de produtos naturais pode gerar análogos a partir da modificação de grupos funcionais existentes que forneçam propriedades melhoradas em relação aos compostos de partida, como o aumento da atividade e/ou seletividade e a redução dos efeitos secundários ou toxicidade (VIEGAS JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006; CHEN et al., 2015; RAHIER et al., 2015).

Pesquisas recentes têm sido desenvolvidas com a modificação molecular de LS, aplicando-se diferentes estratégias semissintéticas, tais como i) reações de funcionalização envolvendo a substituição, adição, oxidação, arilação e/ou esterificação, e ii) reações de transformação, por meio de rearranjos estruturais e da ciclização transanular (DOAN et al., 2015; SANTANA; MOLINILLO; MACIAS, 2015; VILLAGOMEZ et al., 2015; CANO-FLORES; DELGADO, 2017; ARHA et al., 2018). A utilização de variados catalisadores e condições experimentais diversas em reações de transformação de LS têm permitido a exploração da sua diversidade estrutural, obtendo-se análogos com diferenciados esqueletos carbocíclicos (NEUKIRCH; GUERRIERO; D'AMBROSIO, 2003; DE MIERI et al., 2017b; ÁLVAREZ-CALERO et al., 2018; WANG et al., 2019).

Neste âmbito, Nakagawa-Goto e colaboradores (2016) demonstraram diferentes estratégias de modificação de um análogo dilactonizado da LS deoxielefantopina, sendo produzidos 58 derivados esterificados, dos quais a maioria apresentou atividade citotóxica superior ao composto de partida (análogo dilactonizado) contra células de câncer de mama

MDA-MB-231. Similarmente, Vadaparathi e colaboradores (2015) obtiveram 12 aril-derivados semissintéticos da LS costunolida, a maioria dos quais apresentando atividade citotóxica aumentada quando comparadas ao composto de partida (costunolida) frente à cinco linhagens de células tumorais (B-16; DU-145; Hela; A549; MCF-7). Além disso, Miklossy e colaboradores (2015) demonstraram estratégias para a obtenção de 12 análogos éster de três LS do tipo hirsutinolídeo, sendo dez destes análogos com atividade inibitória do fator de transcrição STAT3 *in vitro*.

Ni Loo e colaboradores (2017) revisaram as propriedades antiprotozoárias da LS artemisinina e seus derivados contra o gênero *Leishmania* e *Trypanosoma*, mostrando em muitos casos uma atividade melhorada dos derivados semissintéticos em relação ao composto de partida. O mesmo foi observado por De Mieri e colaboradores (2015) para derivados de ciclização transanular da nobilina, em que alguns derivados foram mais ativos que o seu precursor contra *T. brucei rhodesiense*, cujos valores de IC₅₀ estão entre 0,46-50,53 µM.

Considerando o exposto, a produção de derivados semissintéticos de LS visa à melhoria das atividades citotóxica e antiprotozoárias, leishmanicida e tripanocida, fornecendo protótipos potenciais para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para doenças neoplásicas e aquelas causadas por protozoários.

2.4 CONSIDERAÇÕES SOBRE O CÂNCER

O câncer é uma das principais causa de morte no mundo. A estimativa mundial de câncer passou de 12,7 milhões de novos casos em 2008, para 22,2 milhões em 2030. O aumento previsto de casos de câncer se deve ao aumento e envelhecimento da população, somada incidência, prevalência e distribuição de fatores de risco - tais como tabaco, obesidade, estilo de vida, agentes infecciosos. Em 2012, estima-se ter havido 14,1 milhões de novos casos e 8,2 milhões de mortes por câncer no mundo. Nos países em desenvolvimento, o câncer de pulmão e o câncer de mama foram os mais frequentemente diagnosticados e as principais causas de morte por câncer em homens e mulheres, respectivamente (SIEGEL et al., 2014; VINEIS; WILD, 2014; TORRE et al., 2015).

Segundo dados divulgados pelo Instituto Nacional do Câncer (2017) a estimativa para o Brasil no biênio 2018-2019 apontam a ocorrência de cerca de 600 mil casos novos de câncer. Com exceção dos casos de câncer de pele não melanoma, os tipos mais frequentes em homens são próstata (31,7%), pulmão (8,7%), intestino (8,1%), estômago (6,3%) e cavidade oral (5,2%). Nas mulheres, os cânceres de mama (29,5%), intestino (9,4%), colo do útero (8,1%),

pulmão (6,2%) e tireoide (4,0%) figuram entre os principais. No que se refere ao estado de Santa Catarina, estimativas para 2018 apontaram 15.970 novos casos de neoplasias em homens e 11.380 para as mulheres, sendo o câncer de próstata o tipo com maior número de casos (2.600) para os homens, e o câncer de mama aquele com maior número (2.190) para as mulheres (BRASIL, 2017).

Neste contexto, diante da problemática que essa enfermidade traz para a população, novas alternativas terapêutica podem ser extremamente favoráveis para o tratamentos dessa doenças. As LS mostram-se promissoras principalmente, devido às suas atividades citotóxicas frente a diferentes linhagens de células tumorais, como demonstrado por Toyang e colaboradores (2013) para as LS vernopicrina e vernomelitsina que exibiram atividade contra 10 linhagens celulares (MDA-MB-231, MCF-7, HCT-116, HL-60, A549, A375, OVCAR3, Mia-paca, PC-3, DU-145) com valores de IC₅₀ variando entre 0,35-2,04 µM e entre 0,13-1,56 µM, respectivamente.

Testes *in vivo* também demonstram atividade antitumoral das LS (BURIM et al., 2001; ZHANGABYLOV et al., 2004). Já em fase de estudo clínico, destacam-se as LS artemisinina (e seus derivados, artesunato e artemeter), dimetilamino-partenolideo e tapsigargina (sendo as duas últimas em estudo clínico de fase I) apresentando promissora atividade anticancerígena sobre diferentes tipos de câncer (GHANTOUS et al., 2010; LOURENCO; FERREIRA; BRANCO, 2012; CHADWICK et al., 2013; REN; YU; KINGHORN, 2016).

É conhecido o conceito de que inflamação é um componente crítico na progressão de um tumor e que alguns tumores apresentam grande quantidade de células do sistema imune que geram um processo inflamatório no ambiente tumoral. Nessa perspectiva, ainda que sejam necessários estudos mais aprofundados, uma abordagem terapêutica anti-inflamatória vem sendo cada vez mais considerada para o tratamento do câncer (COUSSENS; WERB, 2002; CRUSZ; BALKWILL, 2015; TODORIC; ANTONUCCI; KARIN, 2016; RITTER; GRETEN, 2019).

Neste contexto, as LS vêm sendo consideradas em muitos estudos como promissores agentes anti-inflamatórios (CHATURVEDI, 2011a; MERFORT, 2011; QUINTANA; ESTÉVEZ, 2018). Diferentes análogos isolados e semissintéticos de LS são descritos na literatura com atividades anti-inflamatórias com efeito inibitório sobre a secreção de mediadores pró-inflamatórios como óxido nítrico (NO), interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) em macrófagos RAW 264.7 murinos estimulados por lipopolissacarídeos (LPS) (CHEN et al., 2017; WU et al., 2017; CHOODEJ; PUDHOM; MITSUNAGA, 2018; WANG et al., 2018). Assim, LS do tipo hirsutinolideo contendo anel γ-lactônico com uma

função α,β -insaturada endocíclica apresentaram o mesmo efeito inibitório na produção de NO e contra a atividade do fator nuclear kappa B (NF- κ B) induzida por TNF- α em células RAW 264.7 estimulada por LPS (YOUN et al., 2012; KUO et al., 2018).

2.5 CONSIDERAÇÕES SOBRE AS DOENÇAS PARASITÁRIAS: leishmanioses e doença de Chagas

As doenças tropicais que são consideradas negligenciadas pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2015) consistem em um grupo de 17 doenças virais, fúngicas, bacterianas, protozoárias e parasitárias com efeitos crônicos, debilitantes, incapacitantes e desfigurantes, sendo endêmica em 149 países e atingindo cerca de 1,4 bilhão de pessoas, principalmente em países de baixa renda (FEASEY et al., 2010; GYAPONG et al., 2010; WHO, 2015).

Com status de negligenciadas as leishmanioses são doenças parasitárias causadas por protozoários intracelulares obrigatórios do gênero *Leishmania*, podendo apresentar uma variedade de sintomas clínicos, sendo divididas em cutâneas, mucocutâneas e viscerais (HOTEZ et al., 2007; WHO, 2007; AGUIAR; RODRIGUES, 2017). O ciclo do parasita é heteroxênico, com uma fase de multiplicação intracelular no hospedeiro vertebrado (homem e mamíferos) – (forma amastigota, sendo alvo em estudos de novos fármacos); e outra extracelular no inseto vetor (flebotomíneos fêmeas do gênero *Lutzomyia*) – (forma promastigotas) (GENARO; REIS, 2005; MICHALICK; GENARO, 2005). O tratamento é complexo, realizado com antimoniais e antibióticos, como antimoniato de N-metil glucamina e anfotericina B (FEASEY et al., 2010; PELISSARI et al., 2011).

A tripanossomíase americana ou doença de Chagas é também uma doença parasitária negligenciada causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, cujas manifestações clínicas podem ser agudas ou crônicas. No ciclo heteroxênico do *T. cruzi*, no hospedeiro vertebrado são encontradas as formas tripomastigotas e amastigotas intracelulares e no inseto vetor (triatomíneos, barbeiro), são encontradas as formas esferomastigotas, epimastigotas e tripomastigotas (LANA; TAFURI, 2005; FEASEY et al., 2010). O tratamento pode incluir uso de nifurtimox e benznidazol, ambos eficazes apenas na fase aguda da doença (BARRETT et al., 2003; HOTEZ et al., 2007).

Desta forma, há a necessidade da pesquisa e desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para o tratamento dessas enfermidades e diferentes produtos naturais têm apresentado atividade leishmanicida e tripanocida *in vitro* (ROCHA et al., 2005; GONZÁLEZ-COLOMA et al., 2012; BECERRA et al., 2015) com ênfase às LS (ODONNE et al., 2011;

BRANQUINHO et al., 2014; JIMENEZ et al., 2014; ULLOA et al., 2017; HERRERA-ACEVEDO; SCOTTI; SCOTTI, 2018).

Nesse contexto, De Toledo e colaboradores (2014) demonstraram a atividade *in vitro* de oito LS diferentes contra formas promastigotas de *Leishmania braziliensis* com valores de DL₅₀ entre 9,2 a > 50 µM. Além disso, Sosa e colaboradores (2016) mostraram atividade *in vitro* de 17 LS contra formas promastigotas de *L. braziliensis* e *L. amazonensis*, com valores de DL₅₀ entre 1,3-31,8 µM e entre 1,6-47,8 µM, respectivamente. Adicionalmente, Schmidt e colaboradores (2014) demonstraram atividade tripanocida de diferentes LS contra *Trypanosoma brucei rhodesiense* e *T. cruzi*, cujos valores de DL₅₀ estavam entre 0,015-234,5 µM e 1,08-254,7 µM, respectivamente. Kimani e colaboradores (2017) demonstraram a atividade tripanocida de seis LS elemanolídeo frente à *T. brucei rhodesiense*, cujos valores de IC₅₀ variando entre 0,051 a 0,779 µg/mL, e índices de seletividade entre 4,5 e 14,5.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Isolar lactonas sesquiterpênicas a partir de espécies selecionadas de Vernoniae (Asteraceae) para a modificação estrutural por semissíntese visando o desenvolvimento de compostos derivados biologicamente ativos (*in vitro*).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Otimizar o processo extrativo de lavagem foliar monitorado pela composição química em função do perfil semiquantitativo de LS;

Purificar as LS de extratos específicos otimizados de lavagem foliar preparados a partir das quatro espécies selecionadas de Vernoniae, *Cyrtocymura scorpioides*, *Lepidaploa chamissonis*, *Vernonanthura condensata* e *Vernonanthura tweedieana*.

Caracterizar as LS purificadas por meio de técnicas espectroscópicas como Ressonância Magnética Nuclear e Espectrometria de Massas;

Preparar, purificar e caracterizar derivados semissintéticos a partir das LS previamente obtidas das espécies de Vernoniae;

Avaliar, em modelos biológicos *in vitro* (em parceria), as LS e seus derivados semissintéticos frente às atividades antiparasitárias (leishmanicida e tripanocida), citotóxica e anti-inflamatória;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAL VEGETAL

4.1.1 Coleta e identificação das espécies

O material vegetal foi coletado no município de Florianópolis, estado de Santa Catarina, Brasil, sendo as espécies *Vernonanthura tweedieana* e *Lepidaploa chamissonis* coletadas na região da Costa da Lagoa da Conceição (27°34'50"S, 48°27'47"W) em 02/03/2016, a espécie *Vernonanthura condensata* coletada no Horto Didático Medicinal da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC (27°35'49"S, 48°31'00"W) em 24/11/2016, e a espécie *Cyrtozymura scorpioides* coletada em 20/10/2017 no entorno do Centro de Ciências da Saúde da UFSC – Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima, Trindade (27°35'59"S, 48°30'56"W).

A identidade botânica foi confirmada por meio da comparação com exsiccatas representativas de cada espécie com o auxílio dos professores Dr. Ademir Reis, Dr. Marcos Sobral e César P. Simionato, respectivamente na confirmação das espécies *V. tweedieana* (RB 612274), *L. chamissonis* (RB 650076) e espécies *V. condensata* (RB 650083) e *C. scorpioides* (RB 537994), cujo material herborizado foi depositado no Herbário RB do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, município do Rio de Janeiro/RJ.

Para este estudo foram coletadas somente as folhas de cada espécie, as quais foram manuseadas de modo a evitar rasuras, sendo secadas à temperatura ambiente e ao abrigo de luz solar, revolvendo-se cuidadosamente duas vezes ao dia, durante cerca de 10 dias.

4.1.2 Controle de qualidade farmacognóstico

4.1.2.1. Avaliação microscópica para pesquisa de tricomas glandulares

Uma alíquota das folhas ainda frescas de cada espécie foi submetida a avaliação microscópica, em microscópio óptico Studar Lab[®], para investigar a presença de tricomas glandulares.

Para tanto, as folhas foram seccionadas transversalmente a mão-livre, clarificadas em hipoclorito de sódio a 2% e observadas em microscópio com aumento de 100 e 400 vezes.

4.1.2.2 Determinação do teor de umidade

O material vegetal seco teve seu teor de umidade estabelecido, em triplicata (exatamente cerca de 0,5 g por réplica), com o auxílio de analisador de umidade por infravermelho Ohaus[®] modelo *MB45*, cujos parâmetros incluíram a temperatura de determinação de 105 °C e peso constante identificado com a variação de peso menor que 1 mg durante 60 s.

4.2 OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO EXTRATIVO A PARTIR DA ESPÉCIE *Vernonanthura tweedieana*

A técnica de extração por lavagem foliar vem sendo reportada sob diferentes condições extrativas, principalmente no que tange o líquido extrator e tempo de extração empregados (ARAKAWA et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2013a; FALEIRO, 2014). Entretanto, considerando a falta de padronização desse processo extrativo, e com o intuito de se avaliar a influência desses dois fatores sobre a extração por lavagem foliar de LS de Vernoniaceae (aqui analisado a partir da espécie *V. tweedieana*), diferentes preparações foram comparadas por análise de variância (ANOVA) de duas vias e post teste de Holm-Sidak (teste com grande poder indicado para múltiplas comparações) com auxílio do *software GraphPad Prism 6.01* (Inc[®]).

Para isso, selecionou-se como fatores o líquido extrator (A) e tempo de extração (B), investigados em quatro níveis cada, nomeadamente diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt), acetona e etanol (EtOH) para o fator A; e 1 (um), 5 (cinco), 10 (dez) e 20 (vinte) minutos para o fator B.

Empregando-se os dois fatores em quatro níveis, compreendendo um plano de experimentação fatorial 4² (4x4), obtiveram-se 16 combinações extrativas diferentes entre si, que foram casualizadas e preparadas em triplicata. Para a preparação dos diferentes extratos de lavagem foliar (ELF), foram empregados exatamente cerca de 5,0 g de folhas secas íntegras de *V. tweedieana*, extraídas em sistema rotativo adaptado de evaporador rotatório (para maiores detalhes vide *item 4.3.1*) na proporção 1:30, sob as diferentes combinações de líquido extrator e tempo de extração conforme descrito no Quadro 1.

As 16 preparações extrativas obtidas foram então avaliadas perante duas respostas, o rendimento de extração (expresso % de massa de extrato bruto referente a massa inicial corrigida de folhas secas empregadas) e o teor de lactonas sesquiterpênicas (LS), expresso em função de piptocarfina A (em µg/g de folha seca corrigida pelo de teor de umidade), cuja

determinação se deu por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLUE-EM).

Quadro 1 – Ordem de preparação das 16 diferentes combinações de fatores do desenho experimental fatorial para otimização de extração por lavagem foliar.

Ordem de preparação	Fator A: Líquido extrator	Fator B: Tempo de extração (min)
1	EtOH	1
2	AcOEt	20
3	DCM	1
4	Acetona	5
5	AcOEt	1
6	AcOEt	5
7	Acetona	10
8	EtOH	20
9	EtOH	10
10	DCM	20
11	DCM	5
12	AcOEt	10
13	DCM	10
14	Acetona	20
15	Acetona	1
16	EtOH	5

AcOEt, acetato de etila; **DCM**, diclorometano; **EtOH**, etanol.

4.2.1 Determinação do teor de lactonas sesquiterpênicas por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLUE-EM)

4.2.1.1 Desenvolvimento de método analítico por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLUE-EM)

O método analítico empregado na avaliação comparativa das diferentes preparações obtidas na etapa de otimização extrativa a partir da espécie *V. tweediana* foi desenvolvido em cromatógrafo Waters® modelo *Acquity H-Class UPLC* equipado com sistema quaternário de distribuição de solventes, amostrador automático e forno de coluna, acoplado a um espectrômetro de massas híbrido *Xevo® G2-S QToF* equipado com fonte de ionização por eletronebulização (ESI) *Zpray™* e analisadores do tipo quadrupolo acoplado a tempo de voo (QToF). As preparações extrativas a serem investigadas foram levadas à secura em evaporador rotatório, posteriormente, ressuspensas em acetonitrila (grau HPLC) na concentração de 1,5 mg/g de solvente e filtradas com filtro de seringa (0,22 µm) antes da análise. A separação dos constituintes dos extratos foi realizada em coluna Waters® *Acquity UPLC BEH C₁₈* (100 mm x

2.1 mm i.d, 1.7 μm) a 40 °C, cujo volume de injeção de amostra foi de 2 μL . A fase móvel consistiu um sistema gradiente de 13 min combinando água acidificada com ácido fórmico 0,1% (pH: 3,0) (A) e acetonitrila (B), mantida a um fluxo constante de 0,5 mL/min, nas seguintes condições: 0-0,5 min, 80-60% de A (curva 9); 0,5-5,5 min, 60% de A (curva 6); 5,5-6,0 min, 60-0% de A (curva 8); 6,0-7,5 min, 0% de A (curva 6); 7,5-8,0 min, 0-80% de A (curva 4); 8,0-13,0 min, mantido a 80% de A para reequilíbrio da coluna na condição inicial. A acetonitrila (grau HPLC) e a água ultrapura (obtida por osmose reversa em sistema Milli-Q) empregados foram filtrados por membrana de porosidade de 0,22 μm antes de sua utilização.

A ionização por ESI, aplicada em modo positivo, teve as condições instrumentais configuradas com a voltagem do capilar de 0,3 kV, voltagem do cone de 40 V, voltagem offset da fonte de 80 V, temperatura da fonte de 150 °C, temperatura de dessolvatação de 400 °C, fluxo de gás do cone de 200 L/h e fluxo do gás de dessolvatação de 900 L/h. O nitrogênio foi usado como gás nebulizador e argônio como gás de colisão. Os dados de EM foram adquiridos em modo contínuo e corrigidos pela amostra de referência *Leucine Enkephalin* em LocksprayTM, com *lock-mass* de m/z 556,2771. As análises foram desenvolvidas em *full-scan* na faixa entre 100 e 1200 Da, com tempo de varredura de 1,0 s. A aquisição e tratamento dos dados foram realizados com auxílio do *software MassLynx 4.1* (Waters[®]).

4.2.1.2 Determinação do teor de piptocarfina A nas preparações obtidas na etapa de otimização do processo extrativo

Para a determinação do teor de LS nas preparações obtidas na etapa de otimização extrativa, a piptocarfina A foi empregada como marcador, cuja quantificação foi realizada a partir de curva de calibração com padrão (para maiores detalhes da obtenção do padrão de piptocarfina A vide *item 4.2.2.1.1* a seguir).

Para a construção da curva de calibração, preparou-se uma solução-mãe do marcador piptocarfina A na concentração de 2.000 $\mu\text{g/g}$ de acetonitrila (p/p), a partir da qual foram realizadas sucessivas diluições para obtenção de soluções de padrão em nove níveis de concentração, sendo 30, 75, 150, 300, 750, 1.500, 3.000, 7.500 e 15.000 ng/g. As soluções foram avaliadas por CLUE-EM segundo método descrito no *item 4.2.1.1*, e partir dos valores de área sob a curva obtidos nos cromatogramas para o pico correspondente ao marcador, foi possível estabelecer a equação da reta e coeficiente de correlação (r) e de determinação (R^2) da curva analítica com auxílio do *software Microsoft Excel 2010* (Windows[®]).

Os cromatogramas obtidos das análises das diferentes soluções extrativas foram extraídos em função do valor de m/z relativo ao íon adutado de sódio para a piptocarфина A (m/z 445.1469 $[M+Na]^+$), e a área sob a curva do pico correspondente foi utilizada na determinação da concentração de piptocarфина por meio da equação de reta.

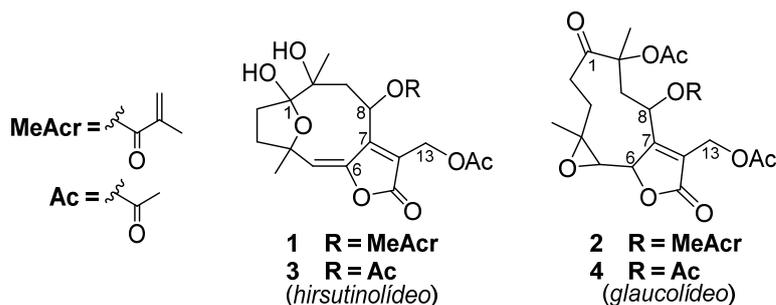
4.2.2 Caracterização do extrato de lavagem foliar de *Vernonanthura tweedieana* por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLUE-EM) e desreplicação

A fim de se caracterizar o perfil fitoquímico do ELF de *V. tweedieana* preparado sob as condições otimizadas de extração, a análise de desreplicação foi realizada em associação aos experimentos de CLUE-EM. Porém, devido à escassez de informações relativas às LS do tipo hirsutinolídeo e glaucolídeo (membros característicos da tribo Vernonieae – vide revisão da literatura), fez-se necessário a investigação prévia do perfil por espectrometria de alta resolução (EMAR) desses dois subtipos de LS, tendo concomitantemente o suporte de ensaios complementares de simulação computacional.

4.2.2.1 Caracterização espectrométrica e estudo computacional das lactonas sesquiterpênicas do tipo hirsutinolídeo e glaucolídeo

4.2.2.1.1 Obtenção dos padrões de lactonas sesquiterpênicas do tipo hirsutinolídeo e glaucolídeo

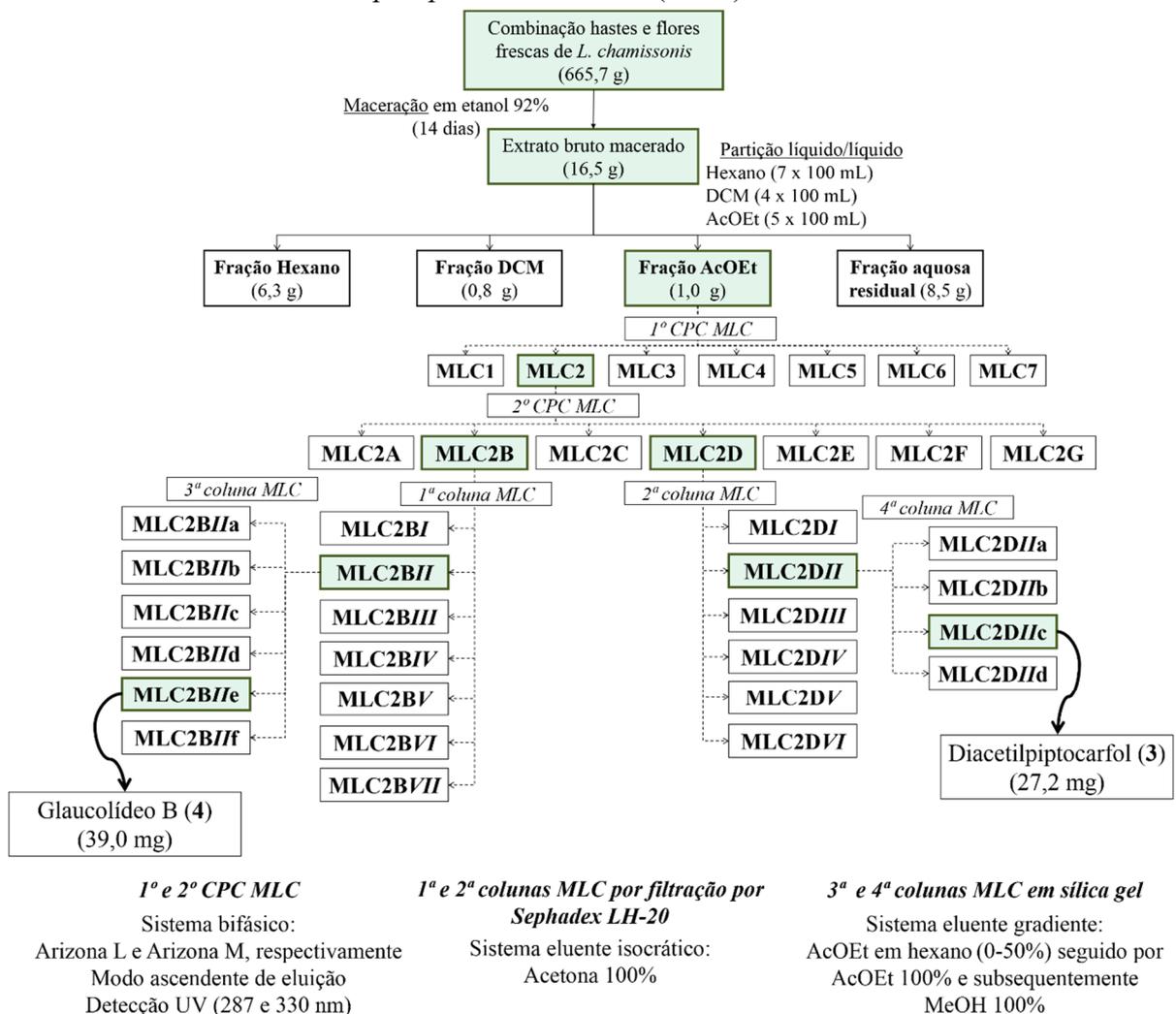
As LS utilizadas como padrões nas análises de EMAR foram previamente isoladas a esta etapa, sendo a piptocarфина A (**1**) e o glaucolídeo A (**2**) obtidos a partir de ELF em acetona de *V. tweedieana*, enquanto que o diacetilpiptocarfol (**3**) e o glaucolídeo B (**4**) foram obtidos a partir de extrato de maceração com etanol de hastes e flores de *Lepidaploa chamissonis*.



A partir de amostras remanescentes do processo de fracionamento cromatográfico do ELF em acetona de *V. tweedieana*, desenvolvido durante a etapa de mestrado (DA SILVA,

desenvolvida em modo ascendente (ASC), usando o sistema de solventes bifásico Arizona L (*n*-hexano/AcOEt/MeOH/água, 2/3/2/3, v/v/v/v). A fase inferior (FI) hidrofílica foi preenchida na coluna de CPC de 250 mL a uma taxa de fluxo de 30 mL/min, a 500 rpm, durante 10 min. A fase superior (FS) móvel lipofílica foi bombeada através da fase estacionária durante 12 min, a uma taxa de fluxo de 8 mL/min, a 1600 rpm (condições analíticas de CPC), até o equilíbrio. A fração AcOEt foi dissolvida em 10 mL de mistura FS/ FI (1/1, v/v) e injetada no sistema. A fase móvel foi bombeada nas condições analíticas de CPC durante 40 minutos, com uma coleta de 10 mL/fração. Posteriormente, a FI foi bombeada a uma taxa de fluxo de 30 mL/min, a 1600 rpm, durante 17 min, para a etapa de extrusão, com uma coleta de 10 mL/fração. As frações eluídas de CPC foram monitorizadas a 287 e 330 nm, produzindo sete subfrações (MLC1-MLC7) (Fluxograma 2).

Fluxograma 2 – Obtenção dos padrões diacetilpiptocarfol (3) e glaucolídeo B (4) a partir do extrato bruto macerado de *Lepidaploa chamissonis* (MLC).



DCM, diclorometano; AcOEt, acetato de etila; MeOH, metanol; CPC, cromatografia de partição centrífuga.

A subfração MLC2 (177,4 mg) também foi submetida a uma separação de CPC, utilizando o sistema de solvente bifásico Arizona M (*n*-hexano/AcOEt/metanol/água, 5/6/5/6, v/v/v/v) em modo de eluição ASC. As condições de preenchimento, equilíbrio e de análise foram as mesmas às mencionadas na etapa anterior, sendo essa última mantida durante 60 minutos e com uma coleta de 7 mL/fração. Posteriormente, o FI foi bombeado a uma taxa de fluxo de 30 mL/min, a 1600 rpm, agora durante 15 min, para a extrusão, com uma coleta de 10 mL/fração. As frações eluídas de CPC foram também monitorizadas a 287 e 330 nm, produzindo outras sete subfrações (MLC2A-MLC2G). As subfrações MLC2B (42,5 mg) e MLC2D (60,8 mg) foram filtradas, separadamente, através de Sephadex-LH20 (Sigma-Aldrich®) com acetona como eluente, produzindo sete (MLC2BI-MLC2BVII) e seis subfrações (MLC2DI-MLC2DVI), respectivamente. As subfrações MLC2BII (40,2 mg) e MLC2DII (52,4 mg) foram separadamente submetidas à cromatografia em coluna de sílica e eluídas com um sistema de gradiente consistindo em concentrações crescentes de AcOEt em hexano (0-50%) seguido por AcOEt (100%) e depois por MeOH (100%), produzindo seis (MLC2BIIa-MLC2BIIe) e quatro subfrações (MLC2DIIa-MLC2DIIe), respectivamente. A subfração MLC2DIIc foi caracterizada como o hirsutinolídeo diacetilpiptocarfol (**3**, 27,2 mg), enquanto a subfração MLC2BIIe foi identificada como glaucolídeo B (**4**, 39,0 mg).

Todas as estruturas foram caracterizadas por ressonância magnética nuclear (RMN) de 1D e 2D desenvolvida em Bruker® modelo *Avance* (400 MHz) em temperatura reduzida (263 a 273 K) e por EMAR desenvolvida em Waters® *Xevo G2-S QToF*, cujos resultados foram comparados com dados disponíveis na literatura (para maiores detalhes quanto à elucidação estrutural dos padrões de LS vide *item 5.6*).

A pureza dos padrões de LS (**1-4**) foram superiores a 90%, estabelecida com base na análise por CLUE-PDA (de acordo com método descrito no *item 4.2.1.1*) dos mesmo, considerando-se a porcentagem de área de pico de cada LS em relação à somatória de todas as áreas dos picos no cromatograma.

4.2.2.1.2 Avaliação do perfil de lactonas sesquiterpênicas por espectrometria de massas de alta resolução (EMAR-ESI-QToF) e espectrometria de massas em tandem (EM/EM)

Soluções dos padrões de LS (**1-4**) foram preparadas em acetonitrila na concentração de 6 µg/mL, filtradas (0,22 µm) e submetidas à análises de EMAR-ESI-QToF, realizadas em espectrômetro de massas híbrido *Xevo® G2-S QToF* equipado com fonte de ionização ESI Zpray™ e analisadores do tipo quadrupolo acoplado a tempo de voo (QToF).

A análises de ESI-QToF EM e EM/EM das LS (1-4) se deu por injeção direta em modos simples e em combinação com sistema de CLUE (Waters® modelo *Acquity H-Class UPLC*). A análise de injeção combinada foi desenvolvida empregando uma eluição isocrática por CLUE de uma mistura de solução aquosa de ácido fórmico a 0,1% e acetonitrila (95/5, v/v) a um fluxo de 0,4 mL/min, simultaneamente a coinjeção por infusão direta de 20 µL/min da solução de cada LS. A acetonitrila (grau HPLC) e a água ultrapura (por osmose reversa em sistema Milli-Q) empregados foram filtrados por membrana de porosidade de 0,22 µm antes de sua utilização.

Os dados de EM foram obtidos com a sonda de ESI operando em modo positivo, com aquisição de massas na faixa entre 100 e 1200 Da, com tempo de varredura de 1,0 s. As condições instrumentais foram configuradas com a voltagem do capilar de 3,0 kV, voltagem do cone de 40 V, voltagem offset da fonte de 80 V, temperatura da fonte de 150 °C, temperatura de dessolvatação de 400 °C, fluxo de gás do cone de 200 L/h e fluxo do gás de dessolvatação de 900 L/h. O nitrogênio foi usado como gás nebulizador e argônio como gás de colisão. Os dados de EM foram adquiridos em modo contínuo e corrigidos pela amostra de referência *Leucine Enkephalin* em Lockspray™, com *lock-mass* de m/z 556,2771. Os íons precursores selecionados para cada LS a partir da varredura geral do espectro EM foram submetidos aos experimentos de EM/EM, adquiridos também em modo contínuo, empregando-se as energias de colisão de 30 eV (para os íons de LS adutados com sódio, Na⁺) e 18 eV (para os íons de LS adutados com hidrogênio, H⁺). Os dados de EM/EM foram utilizados para estabelecer o perfil de fragmentação das LS do tipo hirsutinolídeo e glaucolídeo estudadas. A aquisição e tratamento dos dados foram realizados com auxílio do *software MassLynx 4.1* (Waters®).

4.2.2.1.3 *Estudo computacional do processo de ionização e formação de adutos das lactonas sesquiterpênicas do tipo hirsutinolídeo e glaucolídeo*

Estudos computacionais complementares foram realizados em colaboração com o Grupo de Estrutura Eletrônica Molecular, sob supervisão professor Dr. Giovanni Finoto Caramori, vinculado ao Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina –UFSC, no intuito de se avaliar o nível de interação e afinidade do cátion Na⁺ com as LS do tipo hirsutinolídeo e glaucolídeo, para melhor compreensão dos perfis de ionização e interação molecular na formação de adutos. Ainda, tais estudos auxiliaram para sustentar a proposta de mecanismo de fragmentação estabelecida para ambos os subtipos de LS.

Para tanto, a piptocarfina A (1, modelo de hirsutinolídeo) e glaucolídeo A (2, modelo

de glaucolídeo) foram otimizadas por meio da teoria do funcional da densidade através da troca de Becke (BECKE, 1988) e da correlação funcional de Perdew (PERDEW, 1986), BP86, com o conjunto de base gaussiana Ahlrichs de tripla qualidade ζ (zeta), def2-TZVP (AHLRICHS; MAY, 2000; WEIGEND; AHLRICHS, 2005). As estruturas foram verificadas como mínimos por ausência de autovalores negativos na matriz de Hessian. As otimizações da geometria, as frequências vibratórias e as energias de ponto único foram realizadas no programa *ORCA* (NEESE, 2012), usando o mesmo nível de teoria, BP86/def2-TZVP. A pesquisa conformacional foi realizada no programa *Avogadro* (HANWELL et al., 2012) usando mecânica molecular (campo de força MMFF94) e protocolo sistemático de pesquisa de rotor.

Adicionalmente, simulações de dinâmica molecular atômica foram realizadas considerando uma caixa de simulação contendo uma molécula única de **1**, 121 de acetonitrila, 1012 moléculas de água (H₂O), 10 íons de sódio (Na⁺) e 10 íons cloreto (Cl⁻). De forma semelhante, uma segunda caixa de simulação foi considerada contendo uma molécula única de **2**, 128 moléculas de acetonitrila, 1068 de H₂O, 10 íons Na⁺ e 10 íons Cl⁻. As proporções de H₂O e acetonitrila obedecem a proporções experimentais em EMAR-ESI-QToF. Ambos os sistemas foram simulados a 298 K e 473 K e 1 atm de pressão.

Todas as simulações foram realizadas utilizando o pacote *GROMACS 5.1.2* (ABRAHAM et al., 2015). Foram aplicadas configurações iniciais e condições de fronteira periódicas aleatórias. Os arquivos de topologia foram obtidos no servidor ATB (*Automated Topology Builder*) (MALDE et al., 2011), empregando o campo de força GROMOS 54A7 (SCHMID et al., 2011) e o modelo SPC (*Simple Point Charge*) para a água (BERENDSEN; GRIGERA; STRAATSMA, 1987). Os sistemas foram minimizados energeticamente e equilibrados em conjuntos (*ensembles*) NVT (Número de partículas, Volume e Temperatura constantes) e NPT (Número de partículas, Pressão e Temperatura constantes) por 200 ps. O termostato e o barostato de Berendsen foram empregados com uma constante de acoplamento de 1,0 ps. As condições de temperatura e pressão usadas nas etapas de equilíbrio foram mantidas para uma simulação dinâmica molecular de 100 ns (com o passo de integração de 1,0 ps). Uma faixa curta de corte de 1,0 nm foi utilizada para calcular as interações de van der Waals, e o método SHIFT de 1,6 nm foi utilizado para interações eletrostáticas. Todos os comprimentos de ligação foram restringidos por meio do algoritmo LINCS (*Linear Constraint Solver*) (HESS et al., 1997).

O pacote VMD (*Visual Molecular Dynamics*) (HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996) foi utilizado para visualização e para a ferramenta de traçado Grace.

4.2.2.2 Análise de desreplicação do extrato de *Vernonanthura tweedieana* por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLUE-EM)

A caracterização do perfil fitoquímico do ELF de *V. tweedieana*, preparado sob as condições otimizadas de extração (5,0 g de folhas secas extraídas com acetona [1:30, p/v] durante dez minutos, conforme descrito no *item 4.2*), foi estabelecido pela análise de desreplicação a partir dos resultados de experimentos de CLUE-EM/EM realizados em cromatógrafo Waters® modelo *Acquity H-Class UPLC* acoplado a espectrômetro de massas híbrido *Xevo® G2-S QToF*. O ELF foi ressuspendido em acetonitrila (grau HPLC) na concentração de 500 µg/mL, e filtradas (0,22 µm) antes da análise.

Por motivos alheios a este estudo, tornou-se impossibilitada a utilização da coluna Waters® *Acquity UPLC BEH C₁₈* (100 mm x 2.1 mm i.d, 1.7 µm), empregada no desenvolvimento do método de quantificação de piptocarfina A (**1**) por CLUE-EM (*item 4.2.1.1*), sendo necessária a substituição da coluna cromatográfica bem como os devidos ajustes nas condições analíticas.

Sendo assim, a separação dos constituintes do extrato foi realizada em coluna Waters® *Acquity UPLC BEH C₁₈* (50 mm x 2.1 mm i.d, 1.7 µm) mantida a 40 °C, com volume de injeção de amostra de 3,0 µL. A fase móvel consistiu um sistema gradiente de 11 min combinando água acidificada com ácido fórmico 0,1% (pH: 3,0) (A) e acetonitrila (B), mantida a um fluxo constante de 0,5 mL/min, nas seguintes condições: 0-0,5 min, 80-65% de A (curva 9); 0,5-5,5 min, 65% de A (curva 6); 5,5-6,0 min, 65-2% de A (curva 8); 6,0-7,5 min, 2% de A (curva 6); 7,5-8,0 min, 2-80% de A (curva 4); 8,0-11,0 min, mantido a 80% de A para reequilíbrio da coluna na condição inicial. A acetonitrila (grau HPLC) e a água ultrapura (por osmose reversa em sistema Milli-Q) empregados foram filtrados por membrana de porosidade de 0,22 µm antes de sua utilização.

A ionização por ESI foi aplicada em modo positivo e as condições instrumentais configuradas para a voltagem do capilar de 3,0 kV, voltagem do cone de 40 V, voltagem offset da fonte de 80 V, temperatura da fonte de 80 °C, temperatura de dessolvatação de 200 °C, fluxo de gás do cone de 200 L/h e fluxo do gás de dessolvatação de 900 L/h. O nitrogênio foi usado como gás nebulizador e argônio como gás de colisão. Os dados de AREM e EM/EM foram adquiridos em modo contínuo e corrigidos pela amostra de referência *Leucine Enkephalin* em Lockspray™, com *lock-mass* de *m/z* 556,2771. As análises foram desenvolvidas em *full-scan* na faixa entre 50 e 1200 *m/z*, com tempo de varredura de 1,0 s. Para a fragmentação dos íons

precursores selecionados empregou-se as energias de colisão de 30 e 18 eV. A aquisição e tratamento dos dados foram realizados com auxílio do *software MassLynx 4.1* (Waters®).

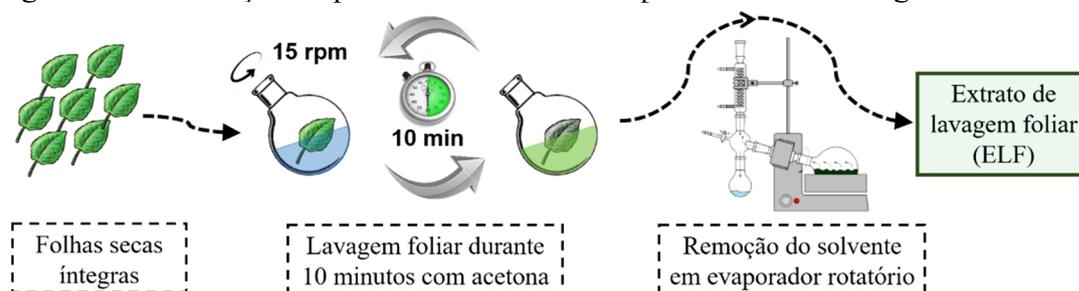
A identificação dos principais picos no cromatograma ESI em modo positivo foi estabelecida pela comparação dos dados de m/z obtidos nas análises de EMAR e EM/EM com a fórmula molecular proposta para a massa teórica exata correspondente, e pelo perfil de fragmentação em tandem observado para cada composto, sempre em comparação com os dados reportados na literatura.

4.3 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES EXTRATIVAS

4.3.1 Obtenção dos extratos brutos otimizados de lavagem foliar

Para a preparação dos extratos de lavagem foliar foram empregadas as folhas secas e íntegras de cada espécie sob as condições extrativas otimizadas usando acetona (1:50 m/v) durante 10 minutos. Para tanto, as folhas e o solvente foram transferidos para um balão de fundo redondo de 2 L (ocupando cerca de dois terços do volume interno), sendo submetido à um sistema rotativo adaptado girando a 15 rpm durante 10 min, conforme ilustrado no Fluxograma 3. O sistema de rotação utilizado foi adequadamente adaptado de um evaporador rotatório (Heidolph Instruments, Schwabach, Alemanha), sem banho-maria, permitindo que todo o processo de lavagem fosse realizado em temperatura ambiente durante o tempo estabelecido. Esse processo foi repetido até extração de todo o material vegetal.

Fluxograma 3 – Ilustração do procedimento extrativo pela técnica de lavagem foliar.



Fonte: autor.

Os extratos da lavagem foliar de cada espécie foram filtrados por papel filtro e o solvente removido em evaporador rotatório sob pressão reduzida, resultando nos extratos brutos de lavagem foliar (ELF), o qual foi levado à secura e armazenado em temperatura reduzida (8 °C) para posteriores análise e fracionamento cromatográfico.

4.4 TRATAMENTO PRELIMINAR E MONITORAMENTO CROMATOGRÁFICO

A fim de se facilitar o isolamento de LS a partir dos ELF previamente obtidos para diferentes espécies, uma etapa preliminar de desengorduramento foi realizada por meio do particionamento dos extratos brutos.

4.4.1 Particionamento dos extratos brutos

A etapa de particionamento dos ELF foi realizado, separadamente para cada espécie, em funil de separação e utilizando solventes de ordem crescente de polaridade. Portanto, os ELF obtidos e anteriormente levados à secura foram ressuspensos em água destilada e submetidos a uma partição líquido/líquido, sob agitação manual, de forma exaustiva e sucessiva, utilizando hexano e AcOEt, respectivamente.

As frações orgânicas tiveram o solvente removido em evaporador rotatório e sob pressão reduzida para a obtenção das frações hexano e AcOEt, respectivamente. A fração aquosa residual resultante teve seu volume reduzido também em evaporador rotatório, sendo posteriormente liofilizada e armazenada em temperatura reduzida (8 °C).

As frações orgânicas foram então monitoradas por CCD e CLUE-EM, juntamente com o ELF inicial para a pesquisa de LS.

4.4.2 Monitoramento por cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLUE-EM)

Para monitorar a presença das substâncias de interesse nas frações obtidas da etapa de partição, bem como da própria extração empregou-se análises de CCD, utilizando-se cromatofolhas de sílica gel 60 com indicador de fluorescência (F₂₅₄) em suporte de alumínio (SiliCycle®). Para frações mais polares foram utilizadas cromatofolhas de sílica de fase reversa (C₁₈), com indicador de fluorescência (F₂₅₄), também em suporte de alumínio (Macherey-Nagel®).

Foram selecionados o solvente ou a mistura de solventes para compor o eluente levando-se em consideração o perfil em CCD das amostras analisadas, para obtenção de sistema cromatográfico que proporcionasse a melhor separação dos constituintes. O perfil cromatográfico das frações e/ou amostras foi estabelecido após análise sob luz visível, luz UV,

nos comprimentos de onda de 254 (extinção) e 366 nm (fluorescência), antes e após revelação com solução de anisaldeído sulfúrico 10% e aquecimento (WAGNER; BLADT, 2001).

Para auxiliar na caracterização do perfil fitoquímico das frações/extratos, as amostras foram, a partir do perfil em CCD, avaliadas também por CLUE-EM.

4.5 PURIFICAÇÃO E ISOLAMENTO DE LACTONAS SESQUITERPÊNICAS DE ESPÉCIES DE VERNONIEAE

4.5.1 Método geral de cromatografia de partição centrífuga (CPC)

Visando a obtenção e isolamento de grandes quantidades de LS no menor número possível de etapas, as frações oriundas do particionamento preliminar contendo os prováveis constituintes de interesse foram submetidas ao fracionamento por cromatografia de partição centrífuga (CPC).

As análises de CPC foram desenvolvidas em instrumento Armen[®] modelo *SCPC-250-L* equipado com rotor de 250 mL de capacidade acoplado a um sistema *Spot Prep II* (equipado com uma bomba quaternária, detector de arranjo de diodos e um coletor automático). Os dados foram processados em *software Armen Glider CPC v.5.0* (Armen[®]).

As condições analíticas empregadas (fluxo, frequência de rotação da coluna, sistema eluente bifásico e modo de eluição – ascendente ou descendente) foram estabelecidas com o desenvolvimento analítico do método para cada amostra. Para acompanhar e monitorar o fracionamento cromatográfico e purificação de LS foram empregadas análises por CCD e CLUE-EM, em condições definidas conforme cada amostra.

4.5.1.1 Seleção do sistema bifásico pela análise de coeficiente de partição (K_D)

Diferentes combinações de solventes podem ser usadas para compor o sistema bifásico mais apropriado para a purificação de compostos por CPC. Nesse sentido, Skalicka-Woźniak e Garrard (2014) compilaram 150 sistemas de solventes aplicados na separação de terpenoides. O sistema ARIZONA (ou sua variante HEMWat), consistindo da mistura em diferentes proporções (denominada A-Z) de heptano (ou *n*-hexano), acetato de etila, metanol e água (HOPMANN; ARLT; MINCEVA, 2011; BOJCZUK; ŻYŻELEWICZ; HODUREK, 2017), é o sistema mais amplamente usado em CPC para a purificação de sesquiterpenos, incluindo os lactonizados (SKALICKA-WOŹNIAK; GARRARD, 2014). Diante disso, diferentes

combinações do sistema HEMWat foram utilizadas no isolamento das LS das espécies de Vernoniae, cuja proporção dos solventes mais apropriada foi determinada com base no perfil de cada amostra.

A escolha do sistema HEMWat ideal foi baseada no valor do coeficiente de partição (K_D) dos constituintes de interesse, o qual foi determinado de forma preliminar por meio do método de *shake-flask* (BERTHOD; CARDA-BROCH, 2004).

Para tanto, uma alíquota da amostra (cerca de 1 mg) foi particionada em tudo de ensaio entre as duas fases líquidas (1 mL de cada fase) da mistura de solventes do sistema eluente a ser testado. Após o equilíbrio, as fases foram separadas e o perfil cromatográfico de cada uma foi avaliado preliminarmente por CCD. Posteriormente, para a determinação da concentração relativa do composto de interesse em cada uma das fase, estas foram separadamente levadas a secura em concentrador de frações a vácuo *speedvac* (SPD1010 e SPD2010 Integrated SpeedVac Systems, Thermo Scientific®), retomadas em 1 mL de acetonitrila (grau HPLC), filtradas (0,22 μm) para vials individuais e analisadas por CLUE-EM (cujas condições analíticas foram definidas e descritas respectivamente para cada amostra).

O valor de K_D foi estabelecido em função da razão entre a área de pico do composto no cromatograma da fase estacionária (FE) e a área na fase móvel (FM) (Equação 1) (BERTHOD, 2017) – para o modo de eluição ascendente a fase inferior corresponde à FE enquanto que a fase superior representa a FM; já no modo descendente, essa determinação foi inversa.

$$K_D = \text{área do pico}_{\text{fase estacionária}} / \text{área do pico}_{\text{fase móvel}} \quad (\text{Eq. 1})$$

Além destes, outros parâmetros foram estabelecidos afim de se identificar um sistema de solventes ideal para a purificação dos constituintes de interesse. Entre eles, a porcentagem de retenção de fase estacionária (S_f) foi calculada de acordo com Berthod (2017), usando a Equação 2 definida pela razão entre o volume retido da fase estacionária (V_S) na coluna após o equilíbrio sobre o volume da coluna (V_C):

$$S_f = V_S / V_C \quad (\text{Eq. 2})$$

De modo a prever um provável tempo de eluição do constituinte de interesse durante análise de CPC para a consequente definição do início da etapa de extrusão, o volume de retenção teórico (V_r) e tempo de retenção (t_R) para esses compostos foram calculados com base no seu respectivo valor de K_D e na taxa de fluxo de fase móvel (F) nas condições analíticas

correspondentes, conforme as Equações 3 e 4 (DE FOLTER; SUTHERLAND, 2009; BERTHOD, 2017):

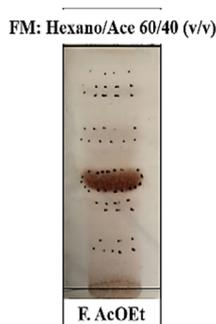
$$V_r = V_C + (K_D - 1)V_S \quad (\text{Eq. 3})$$

$$t_{R} = V_r / F \quad (\text{Eq. 4})$$

4.5.2 Purificação de lactona sesquiterpênica de *Lepidaploa chamissonis*

Ao apresentar um perfil cromatográfico em CCD indicativo da presença de LS (Figura 11), com manchas de coloração marrom a castanho após revelação com anisaldeído sulfúrico (KOCH; BASAR; RICHTER, 2008), a fração AcOEt do ELF de *L. chamissonis* foi selecionada para a purificação dos compostos de interesse da espécie.

Figura 11 – Cromatoplaça da fração AcOEt da partição dos extrato bruto de lavagem foliar de *Lepidaploa chamissonis*.



Cromatogramas revelados com anisaldeído sulfúrico e aquecimento. **FM**, fase móvel; **Ace**, acetona; **F. AcOEt**: fração acetato de etila.

4.5.2.1 Purificação da fração AcOEt de ELF de *L. chamissonis* por CPC: composto 4

4.5.2.1.1 Seleção do sistema bifásico pela análise de coeficiente de partição (K_D)

A fração AcOEt de ELF de *L. chamissonis* foi testada frente aos sistemas HEMWat M, N e P, preparados a partir de diferentes proporções da mistura de *n*-hexano/AcOEt/MeOH/água, conforme descrito no Quadro 2.

As diferentes combinações foram submetidas ao método de *shake-flask* (conforme descrito item 4.5.1.1) e avaliadas por CCD e CLUE-EM para a determinação do K_D (tanto para modo ascendente quanto descendente) do composto 4.

Quadro 2 – Composição dos sistemas HEMWat testados para o fracionamento da fração AcOEt de ELF de *L. chamissonis*.

HEMWat	Proporção v/v/v/v			
	<i>n</i> -hexano	Acetato de etila	Metanol	Água
M	5	6	5	6
N	1	1	1	1
P	6	5	6	5

v, volume. Adaptado de Berthod e colaboradores (2005).

As análises CLUE-EM foram desenvolvidas em um sistema Waters® *Acquity H-Class UPLC* equipado com um gerenciador de solvente quaternário, um amostrador automático e forno de coluna acoplado a um espectrômetro de massas Xevo® *G2-S QToF* equipado com uma fonte de ionização por eletronebulização Zpray™ e um analisador do tipo quadrupolo-tempo de voo (QToF) (Waters Co., Manchester). As separações foram realizadas em uma coluna C₁₈ da Thermo Scientific® *Hypersil GOLD* (100 × 3 mm, 1,9 μm) mantida a 40 °C enquanto o volume de injeção foi de 2,0 μL. A fase móvel consistiu em um tempo de análise de 9 min de um sistema gradiente combinando solução aquosa de ácido fórmico a 0,1% (A) e acetonitrila (B), mantido a uma taxa de fluxo de 0,5 mL/min, como segue: 0-0.5 min, 80-52% de A (curva 9); 0.5-6.0 min, 52% de A (curva 6); 6.0-6.5 min, 52-1% de A (curva 8); 6.5-8.5 min, 1% de A (curva 6); 8.5-9.0 min, 1-80% de A (curva 4); e mais 5 minutos a 80% de A para condicionamento da coluna. Os dados de massa foram medidos com uma fonte ESI operando no modo positivo de ionização (ESI+), com intervalo de massas de aquisição entre 50-1200 Da e um tempo de varredura de 1,0 s. A configuração do instrumento incluiu a voltagem do capilar de 3,5 kV, voltagem do cone 40 V, voltagem offset da fonte de 80 V, temperatura da fonte de 80 °C, temperatura de dessolvatação de 300 °C, fluxo de gás do cone de 200 L/h e fluxo de gás de dessolvatação de 900 L/h O nitrogênio foi usado como gás nebulizador e argônio como gás de colisão. A *Leucine Enkephalin* foi usada como amostra de referência em Lockspray™ (*Lockmass m/z 556,2771*) para a medição precisa de massas. Os dados foram processados com o software *MassLynx v. 4.1* (Waters®).

4.5.2.1.2 Fracionamento da fração AcOEt de ELF por CPC: CPC de *L. chamissonis*

A partir da análise de K_D para o composto **4** de interesse, o sistema HEMWat M foi selecionado como sistema eluente a para a separação da LS da espécie *L. chamissonis*.

Para tanto, a fração AcOEt enriquecida em LS (2,00 g) foi purificada por CPC, desenvolvido em modo de eluição DSC usando o sistema de solvente bifásico HEMWat M (*n*-

hexano/AcOEt/MeOH/água 5/6/5/6, v/v/v/v) – preparado previamente em funil de separação para obtenção das fases superior (FS) e inferior (FI). A FS (lipofílica), utilizada como fase estacionária, foi preenchida na coluna de CPC de 250 mL a uma taxa de fluxo de 30 mL/min, com velocidade de rotação de 500 rpm, durante 10 min. A FI (hidrófila), utilizada como fase móvel, foi bombeada através da fase estacionária durante 10 min, com fluxo de 8 mL/min, na rotação de 1600 rpm (condições analíticas), até o equilíbrio do sistema com 83% da retenção da fase estacionária e 32 bar de pressão. Em seguida, a amostra foi dissolvida em 10 mL de mistura de FS/FI (1/1, v/v) e injetada no sistema. A fase móvel foi bombeada nas condições analíticas durante 70 min, com a coleta de 7 mL/fração. Posteriormente, a FS foi bombeada a uma taxa de fluxo de 30 mL/min, a 1600 rpm, durante 15 minutos, para o passo de extrusão, com a coleta de 10 mL/fração, totalizando 85 min de análise.

As frações eluídas do CPC foram monitorizadas em 287 e 330 nm, sendo avaliadas e reunidas de acordo com o perfil cromatográfico por CPC-UV e CCD, produzindo nove subfrações, nomeadas LcA-I.

A subfração LcG proporcionou 1,04 g do composto **4**, o qual correspondeu a 25% do ELF de *L. chamissonis* (ou 50% da fração AcOEt).

4.5.3 Purificação de lactona sesquiterpênica de *Cyrtocymura scorpioides*

A investigação do perfil cromatográfico por CLUE-EM do ELF de *C. scorpioides* revelou um extrato enriquecido também na LS glaucolídeo B (**4**) (para maiores detalhes vide item 5.4.2), assim como observado para o ELF de *L. chamissonis*.

Dessa forma, foram empregadas as mesmas condições analíticas do fracionamento da espécie *L. chamissonis* por CPC para a purificação da LS **4** a partir fração enriquecida em LS AcOEt de *C. scorpioides*, sem que fosse necessário a repetição do teste de K_D .

4.5.3.1 Purificação da fração AcOEt de ELF de *C. scorpioides* por CPC: composto **4**

4.5.3.1.1 Fracionamento da fração AcOEt de ELF por CPC: CPC de *C. scorpioides*

A fração AcOEt (2,55 g) de *C. scorpioides* enriquecida em LS foi purificada por CPC, também empregando o sistema de solvente bifásico HEMWat M (*n*-hexano/AcOEt/MeOH/água 5/6/5/6, v/v/v/v) – preparado previamente em funil de separação para obtenção das fases superior (FS) e inferior (FI). A FS foi preenchida na a coluna de CPC

de 250 mL em modo eluição DSC, a uma taxa de fluxo de 30 mL/min, com velocidade de rotação de 500 rpm, durante 10 min. A FI foi bombeada através da fase estacionária durante 8 min, a um de fluxo de 8 mL/min, na rotação de 1600 rpm (condições analíticas), até o equilíbrio do sistema com 74% da retenção da fase estacionária e 32 bar de pressão. A amostra foi dissolvida em 10 mL de mistura de FS/FI (1/1, v/v) e injetada no sistema. A fase móvel foi bombeada nas condições analíticas durante 100 min, coletando 7 mL/fração. Posteriormente, para o passo de extrusão, a FS foi bombeada a uma taxa de fluxo de 30 mL/min, a 1600 rpm, durante 12 minutos, com a coleta 9 mL/fração.

As frações eluídas de CPC também foram monitorizadas em 287 e 330 nm e reunidas conforme com o seu perfil cromatográfico por CPC-UV e CCD, resultando em nove subfrações, nomeadas CsA-I.

A subfração CsE proporcionou 0,98 g do composto **4**, correspondendo a 19% do ELF de *C. scorpioides* de partida (ou 38% da fração AcOEt).

4.5.4 Purificação de lactonas sesquiterpênicas de *Vernonanthura condensata*

Da mesma forma como observado anteriormente para a espécie *L. chamissonis* e *C. scorpioides*, a fração AcOEt oriunda do tratamento preliminar do ELF de *V. condensata* foi selecionada para a purificação dos compostos de interesse da espécie, por apresentar um perfil cromatográfico em CCD característico de LS (Figura 12), apresentando três conjuntos de manchas de coloração marrom a castanho após a revelação com anisaldeído sulfúrico

Figura 12 – Cromatoplaça da fração AcOEt da partição do extrato bruto de lavagem foliar de *Vernonanthura condensata*.



Cromatogramas revelados com anisaldeído sulfúrico e aquecimento. FM, fase móvel; CHCl₃, clorofórmio; Ace, acetona; F. AcOEt: fração acetato de etila.

4.5.4.1 Purificação da fração AcOEt de ELF de *V. condensata* por CPC: composto 5

4.5.4.1.1 Seleção do sistema bifásico pela análise de coeficiente de partição (K_D)

O Quadro 3 descreve as proporções referentes aos sistemas HEMWat J, K, L, M e N, preparados a partir da mistura de *n*-hexano/AcOEt/MeOH/água, os quais foram testados avaliados para serem utilizados na separação dos constituintes de interesse a partir da fração AcOEt de ELF de *V. condensata*

Quadro 3 – Composição dos sistemas HEMWat testados para o fracionamento da fração AcOEt de ELF de *V. condensata*.

HEMWat	Proporção v/v/v/v			
	<i>n</i> -hexano	Acetato de etila	Metanol	Água
J	2	5	2	5
K	1	2	1	2
L	2	3	2	3
M	5	6	5	6
N	1	1	1	1

v, volume. Adaptado de Berthod e colaboradores (2005).

O valor de K_D (tanto para modo ascendente quanto descendente) para o composto 5 de interesse foi determinado nos diferentes sistemas pelo método de *shake-flask* (conforme descrito item 4.5.1.1) a partir das análises por CCD e CLUE-EM (para detalhes vide item 4.5.2.1.1).

4.5.4.1.2 Fracionamento da fração AcOEt de ELF por CPC: 1º CPC de *V. condensata*

Uma alíquota de 1.60 g da fração AcOEt de ELF de *V. condensata* foi submetida à purificação por CPC, desenvolvida em modo de eluição ASC, usando o sistema de solventes bifásico HEMWat L (*n*-hexano/AcOEt/MeOH/água, 2/3/2/3, v/v/v/v) – preparado previamente em funil de separação para obtenção das fases superior (FS) e inferior (FI). A FI foi preenchida na coluna de CPC de 250 mL a uma taxa de fluxo de 30 mL/min, com velocidade de rotação de 500 rpm, durante 10 min. A FS móvel foi bombeada através da fase estacionária durante 12 min, a uma taxa de fluxo de 5 mL/min, a 1600 rpm (condições analíticas de CPC), até o equilíbrio do sistema com 83% da retenção da fase estacionária e 32 bar de pressão. A amostra foi dissolvida em 10 mL de mistura FS/ FI (1/1, v/v) e injetada no sistema. A fase móvel foi

bombeada nas condições analíticas de CPC durante 90 min, coletando-se 5 mL/fração. Posteriormente, o FI foi bombeada a uma taxa de fluxo de 5 mL/min, a 1600 rpm, durante 60 min, para a etapa de extrusão, com a coleta de 5 mL/fração.

As frações eluídas de CPC foram monitorizadas em 215, 287 e 330 nm, avaliadas e reunidas conforme o perfil cromatográfico por CPC-UV e CCD, produzindo dez subfrações, denominadas VcA-J. A subfração VcE proporcionou 639,0 mg do composto **5**, correspondendo a 43% da fração AcOEt de partida (1,60 g) de ELF de *C. scorpioides*.

Além desta, as subfrações VcC (152,8 mg) e VcJ (323,3 mg) também apresentaram perfil por CLUE-EM (para detalhes vide *item 5.4.3*) sugestivo de LS, ainda que em mistura, sendo encaminhadas para etapa de purificação adicional por CPC.

4.5.4.2 Purificação da subfração VcC de ELF de *V. condensata* por CPC: compostos **6-8**

Apresentando um perfil em CLUE-EM indicativo da presença de LS de interesse (para maiores detalhes vide *item 5.4.3*) a subfração VcC proveniente da primeira etapa de fracionamento por CPC da porção AcOEt do ELF de *V. condensata* foi também selecionada para a purificação de LS a partir da espécie.

4.5.4.2.1 Seleção do sistema bifásico pela análise de coeficiente de partição (K_D)

Os sistemas HEMWat M, N, P, Q e R foram preparados a partir da mistura de *n*-hexano/AcOEt/MeOH/água nas proporções descritas no Quadro 4 e testados para a purificação de LS de interesse a partir da subfração VcC proveniente da etapa e purificação da fração AcOEt de ELF de *V. condensata*

Quadro 4 – Composição dos sistemas HEMWat testados para o fracionamento da subfração VcC de CPC da fração AcOEt de ELF de *V. condensata*.

HEMWat	Proporção v/v/v/v			
	<i>n</i> -hexano	Acetato de etila	Metanol	Água
M	5	6	5	6
N	1	1	1	1
P	6	5	6	5
Q	3	2	3	2
R	2	1	2	1

v, volume. Adaptado de Berthod e colaboradores (2005).

Os valores de K_D (tanto para modo ascendente quanto descendente) para os compostos **6-8** de interesse também foram estabelecidos utilizando o método de *shake-flask* (conforme descrito *item 4.5.1.1*), em função das análises por CCD e CLUE-EM (para detalhes vide *item 4.5.2.1.1*) para os diferentes sistemas de solventes testados.

4.5.4.2.2 Fracionamento da subfração VcC por CPC: 2º CPC de *V. condensata*

A subfração VcC (152,8 mg) foi também sujeita ao fracionamento por CPC usando o sistema de solventes bifásico HEMWat N (*n*-hexano/AcOEt/MeOH/água, 1/1/1/1, v/v/v/v) – preparado previamente em funil de separação para obtenção das fases superior (FS) e inferior (FI). A FI foi preenchida na coluna de CPC de 250 mL em modo de eluição ASC a uma taxa de fluxo de 30 mL/min, com velocidade de rotação de 500 rpm, durante 10 min. A FS móvel foi bombeada através da fase estacionária durante 7 min, a uma taxa de fluxo de 10 mL/min, a 1600 rpm (condições analíticas de CPC), até o equilíbrio do sistema com 74% da retenção da fase estacionária e 36 bar de pressão. A amostra foi dissolvida em 10 mL de mistura FS/ FI (1/1, v/v) e injetada no sistema. A fase móvel foi bombeada nas condições analíticas de CPC durante 70 min, coletando 6 mL/fração. Posteriormente, para a etapa de extrusão o FI foi bombeado a uma taxa de fluxo de 30 mL/min, a 1600 rpm, durante 10 min, com a coleta de 10 mL/fração.

As frações eluídas de CPC foram monitorizadas em 215, 287 e 330 nm, avaliadas e reunidas conforme o perfil cromatográfico por CPC-UV e CCD, produzindo oito subfrações, denominadas VcCa-h. As subfrações VcCb, VcCd e VcCf corresponderam respectivamente aos compostos **6** (15,7 mg), **7** (17,9 mg) e **8** (18,8 mg).

4.5.4.3 Purificação da subfração VcJ de ELF de *V. condensata* por CPC: compostos **9-10**

Assim como observado na subfração VcC, a subfração VcJ (oriunda do fracionamento por CPC da porção AcOEt do ELF de *V. condensata*) também indicou a presença de LS de interesse a partir da análise do perfil em CLUE-EM (para maiores detalhes vide *item 5.4.3*), sendo igualmente escolhida para a purificação de LS a partir da espécie.

4.5.4.3.1 Seleção do sistema bifásico pela análise de coeficiente de partição (K_D)

Para o isolamento das LS de interesse a partir a subfração VcJ, também proveniente da etapa e purificação por CPC da fração AcOEt de ELF de *V. condensata* foram testados os sistemas HEMWat G, H, J e K, conforme descrito no Quadro 5.

Quadro 5 – Composição dos sistemas HEMWat testados para o fracionamento da subfração VcJ de CPC da fração AcOEt de ELF de *V. condensata*.

HEMWat	Proporção v/v/v/v			
	<i>n</i> -hexano	Acetato de etila	Metanol	Água
G	1	4	1	4
H	1	3	1	3
J	2	5	2	5
K	1	2	1	2

v, volume. Adaptado de Berthod e colaboradores (2005).

Os valores de K_D (tanto para modo ascendente quanto descendente) para os compostos **9** e **10** de interesse também foram definidos em função das análises por CCD e CLUE-EM (para detalhes vide *item 4.5.2.1.1*) a partir do método de *shake-flask* (conforme descrito *item 4.5.1.1*).

4.5.4.3.2 Fracionamento da subfração VcJ por CPC: 3° CPC de *V. condensata*

Uma alíquota de 212,5 mg da subfração VcJ também foi sujeita ao fracionamento por CPC empregando o sistema de solventes bifásico HEMWat J (*n*-hexano/AcOEt/MeOH/água, 2/5/2/5, v/v/v/v) – preparado previamente em funil de separação para obtenção das fases superior (FS) e inferior (FI). A FI foi preenchida na coluna de CPC de 250 mL em modo de eluição ASC a uma taxa de fluxo de 30 mL/min, com velocidade de rotação de 500 rpm, durante 10 min. A FS móvel foi bombeada através da fase estacionária durante 8 min, a uma taxa de fluxo de 10 mL/min, a 1600 rpm (condições analíticas de CPC), até o equilíbrio do sistema com 74% da retenção da fase estacionária e 28 bar de pressão. A amostra foi dissolvida em 10 mL de mistura FS/ FI (1/1, v/v) e injetada no sistema. A fase móvel foi bombeada nas condições analíticas de CPC durante 65 min, com a coleta de 6 mL/fração. Posteriormente, para a etapa de extrusão o FI foi bombeado a uma taxa de fluxo de 30 mL/min, a 1600 rpm, durante 10 min, com a coleta de 10 mL/fração.

As frações eluídas de CPC foram monitorizadas em 215, 287 e 330 nm, avaliadas e reunidas conforme o perfil cromatográfico por CPC-UV e CCD, produzindo cinco subfrações, denominadas VcJa-e. As subfrações VcJb e VcCd corresponderam respectivamente aos compostos **9** (21,4 mg) e **10** (26,5 mg).

4.6 OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS DE LACTONAS SESQUITERPÊNICAS

A fim de se investigar a influência das modificações estruturais de LS, obtida de espécies de Vernoniaeae, sobre seu potencial biológico e seletividade, diferentes condições reacionais foram consideradas para a obtenção de um conjunto diversificado de derivados semissintéticos. Para tal, empregou-se como material de partida a LS glaucolídeo B (**4**), obtida em grande quantidade a partir da prospecção fitoquímica por CPC dos ELF das espécies *C. scorpioides* e *L. chamissonis* (vide itens 4.5.2 e 4.5.3).

4.6.1 Avaliação do potencial de conversão de glaucolídeo B (**4**) em outros subtipos de LS sob condições usuais de purificação de LS

Frente à divergência de informações relacionadas à origem de algumas subclasses de LS, tais como hirsutinolídeos e cadinanolídeos, ora consideradas como produtos do metabolismo vegetal, ora como artefatos oriundos de purificação de extratos brutos vegetais contendo esqueletos glaucolídeos (BAZON et al., 1997; BORKOSKY et al., 1997; PILLAY et al., 2007; APPEZZATO-DA-GLORIA et al., 2012), um experimento teste foi desenvolvido em duas etapas para melhor compreender as possibilidades de modificação do glaucolídeo B (**4**). Assim, o ELF de *L. chamissonis* (rico em glaucolídeo B, **4** – vide item 5.4.1) foi submetido à condições que mimetizam o processo mais frequentemente empregado na purificação de LS, ou seja, em presença de sílica gel e solvente prótico (EtOH) (MARTÍNEZ-VÁZQUEZ et al., 1992).

Para a primeira etapa, 20 mg de ELF de *L. chamissonis* foram retomados em 2 mL de EtOH, em balão de 15 mL, seguido da adição de 300 mg de sílica gel 60 (230-400 mesh; 0,04-0,063 mm) (na proporção de 1:30, p/p). Essa mistura foi mantida sob agitação magnética, em temperatura ambiente de 25 °C, durante 24 h. Após este período, a mistura foi levada à secura em evaporador rotatório, transferida para cartucho de SPE e eluído com acetona. Uma alíquota da fração obtida foi avaliada por CLUE-EM conforme método descrito no item 4.5.2.1.1.

A fim de se reproduzir condições mais extremas de temperatura em que a purificação de um extrato bruto vegetal pode estar sujeita, uma segunda fase foi desenvolvida em que a mistura remanescente da etapa inicial foi novamente submetida às mesmas condições (2 mL de EtOH e 300 mg de sílica gel), entretanto, mantendo-se sob agitação magnética e em refluxo à 35 °C, durante mais 24 h. A reação foi finalizada da mesma maneira como na primeira etapa, e

a nova fração obtida foi também avaliada por CLUE-EM (vide *item 4.5.2.1.1* para maiores detalhes das condições analíticas).

4.6.2 Métodos gerais para purificação dos derivados semissintéticos

4.6.2.1 Cromatografia em coluna clássica (CC)

As frações contendo os derivados semissintéticos de LS foram submetidas à cromatografia em coluna clássica (CC) para a purificação dos compostos de interesse, utilizando como fase estacionária sílica gel 60 (240-400 *mesh*; 0,04-0,063 mm) (SiliCycle[®]).

Como fase móvel foram empregados sistemas isocrático ou gradiente, constituídos por misturas de solventes, cuja composição dos eluentes foi definida com baseada no perfil em CCD das amostras analisadas, de forma a obter um sistema cromatográfico que proporcionasse a melhor separação dos constituintes. Entre os solventes utilizados estão hexano, diclorometano (DCM), clorofórmio (CHCl₃) e acetona.

4.6.2.2 Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP)

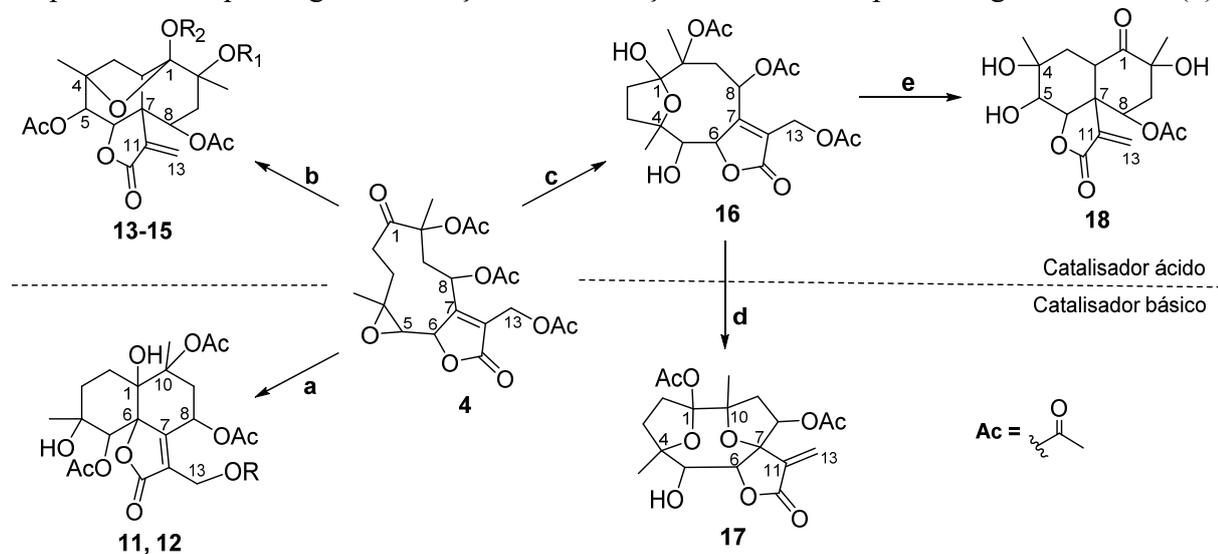
As frações indicativas da presença dos derivados semissintéticos de interesse foram, quando pertinente, purificados por cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP). Nesses casos, as amostras foram aplicadas com capilar de vidro em placas de sílica gel 60 com indicador de fluorescência (F₂₅₄) em suporte de alumínio (SiliCycle[®]), sendo a CCD desenvolvida em sistema eluente composto por misturas de hexano e acetona (em proporções definidas conforme o perfil de cada fração).

A mancha correspondente ao composto de interesse foi raspada com auxílio de espátula, solubilizada em acetona e filtrada por funil com placa de vidro sinterizado de granulometria G3, sob vácuo.

4.6.3 Obtenção dos derivados semissintéticos de lactonas sesquiterpênicas

Visando à produção da maior diversidade estrutural possível de derivados semissintéticos de LS, definiu-se como estratégia principal o desenvolvimento de diferentes condições de reação de ciclização transanular a partir do glaucolídeo B (**4**), conforme ilustrado no Esquema 1, por meio da utilização de agentes catalíticos com características variadas.

Esquema 1 – Esquema geral de reações de ciclização transanular a partir do glaucolídeo B (4).



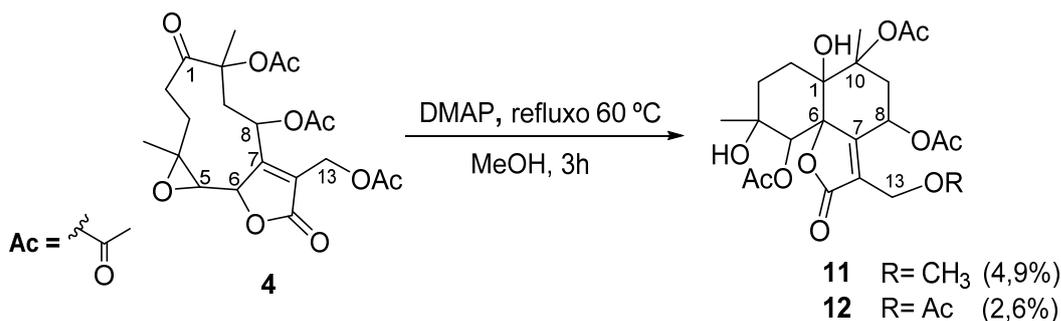
Condições reacionais: **(a)** (i) DMAP, MeOH, refluxo a 60 °C, 3 h ou (ii) DMAP, DCM, rt, 0,5 h; **(b)** BiCl₃, Ac₂O, DCM, Ar, rt, 2 h; **(c)** (i) BiCl₃, DCM, Ar, rt, 3 h ou (ii) TFA-H₂O, DCM, -2 °C-rt, 24 h; **(d)** K₂CO₃ (aq.), THF, refluxo a 45 °C, 2 h; **(e)** BiCl₃, DCM, refluxo a 50 °C, 15 h.

4.6.3.1 Reações de ciclização transanular do glaucolídeo B (4) em presença de reagente catalítico básico (condição a)

4.6.3.1.1 Reação de ciclização transanular do glaucolídeo B (4) em presença de *N,N*-dimetil-4-aminopiridina (DMAP): condição a(i)

Em balão de 10 mL foram retomados 30,1 mg de glaucolídeo B (4; 0,07 mmol) em 1 mL de MeOH. Em seguida, foram adicionados 1,5 mg de DMAP (0,01 mmol; 0,2 eq), e a mistura mantida sob refluxo a 60 °C com agitação magnética, durante 3 h (Esquema 2).

Esquema 2 – Esquema reacional de ciclização transanular do glaucolídeo B (4) em presença de *N,N*-dimetil-4-aminopiridina (DMAP): condição a(i).



Fundamentado em Miklossy e colaboradores (2015).

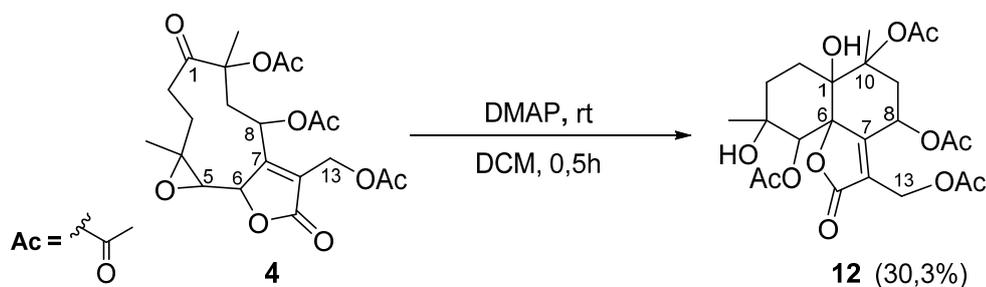
A reação, monitorada por CCD, foi finalizada levando-se a mistura à secura sob pressão reduzida em evaporador rotatório. O resíduo obtido (32,2 mg) foi submetido à CC de sílica gel utilizando eluente gradiente composto por acetona em hexano (20-50%), obtendo-se 19 frações (DS1a-s) (para maiores detalhes vide *item 5.5 – Fluxograma 8*).

Embora a mistura tenha se mostrado bastante complexa, foi possível o isolamento em baixo rendimento dos derivados semissintéticos **11** (1,6 mg; 4,9%) e **12** (1,1 mg; 2,6%), respectivamente correspondendo às frações DS1l e DS1o.

4.6.3.1.2 Reação de ciclização transanular do glaucolídeo B (**4**) em presença de *N,N*-dimetil-4-aminopiridina (DMAP): condição **a(ii)**

Na tentativa de se otimizar as condições reacionais para a reação com DMAP, uma segunda condição foi ensaiada, sendo retomados 30,3 mg de glaucolídeo B (**4**; 0,07 mmol) em 1 mL de DCM seco e mantendo-se sob agitação magnética em temperatura ambiente (rt) até completa solubilização. Posteriormente, adicionou-se à mistura 1,8 mg de DMAP (0,01 mmol; 0,2 eq), sendo mantido sob agitação magnética em rt durante 30 min (Esquema 3).

Esquema 3 – Esquema reacional de ciclização transanular do glaucolídeo B (**4**) em presença de *N,N*-dimetil-4-aminopiridina (DMAP): condição **a(ii)**.



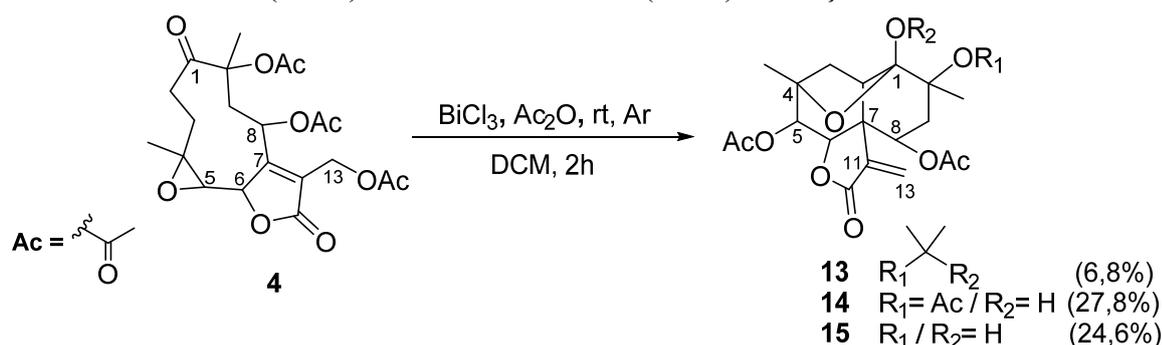
A reação, também monitorada por CCD, foi finalizada levando-se a mistura à secura sob pressão reduzida em evaporador rotatório. O resíduo obtido (33,8 mg) foi submetido à CC de sílica gel utilizando eluente gradiente constituído de acetona em hexano (20-100%), obtendo-se 11 frações (DS2a-k) (para maiores detalhes vide *item 5.5 – Fluxograma 8*). Destas, a fração DS2g correspondeu ao derivado semissintético **12** (10,5 mg; 30,3%), isolado em maior rendimento.

4.6.3.2 Reações de ciclização transanular do glaucolídeo B (**4**) em presença de reagentes catalíticos ácidos (condições **b** e **c**)

4.6.3.2.1 Reação de ciclização transanular do glaucolídeo B (**4**) em presença de cloreto de bismuto III (BiCl_3) e de anidrido acético (Ac_2O): condição **b**

Em balão de 10 mL foram retomados 50,0 mg de glaucolídeo B (**4**; 0,11 mmol) em 1 mL de DCM seco, sendo mantido sob agitação magnética em rt e em atmosfera de argônio (Ar) até completa solubilização. Posteriormente, adicionou-se à mistura 108 μL de Ac_2O (1,14 mmol; 10,0 eq) e 161,8 mg de BiCl_3 (0,51 mmol; 4,5 eq). A mistura foi mantida sob as mesmas condições durante 2 h (Esquema 4).

Esquema 4 – Esquema reacional de ciclização transanular do glaucolídeo B (**4**) em presença de cloreto de bismuto III (BiCl_3) e de anidrido acético (Ac_2O): condição **b**.



Fundamentado em Rodríguez-Hahn e colaboradores (1988).

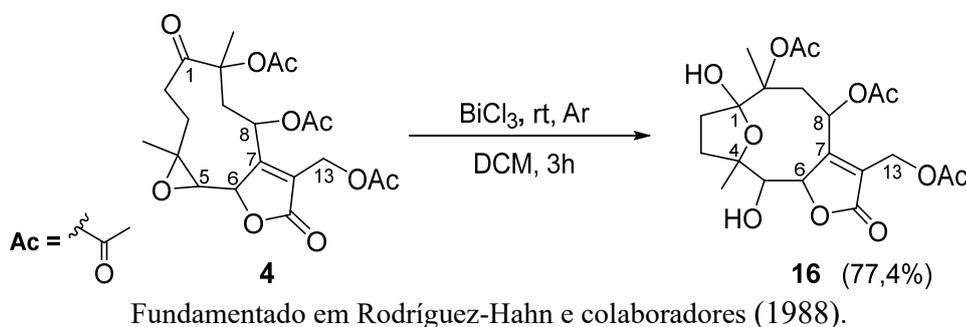
A reação foi monitorada por CCD e finalizada sendo mistura transferida para funil de separação (tendo o balão sido consecutivamente lavado com DCM e água destilada) e extraída por partição líquido-líquido com DCM (3x 15 mL). A fração orgânica obtida foi seca com sulfato de sódio (Na_2SO_4) anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida em evaporador rotatório.

O resíduo obtido (48,7 mg) foi submetido à CC de sílica gel utilizando eluente gradiente constituído de acetona em CHCl_3 (10-30%), obtendo-se 13 frações (DS3a-m) (para maiores detalhes vide *item 5.5 – Fluxograma 8*). As frações DS3d, DS3j e DS3l corresponderam aos derivados semissintéticos **13** (3,4 mg; 6,8%), **14** (13,9 mg; 27,8%) e **15** (11,1 mg; 24,6%), respectivamente.

4.6.3.2.2 *Reação de ciclização transanular do glaucolídeo B (4) em presença de cloreto de bismuto III (BiCl₃) sem anidrido acético: condição c(i)*

Em balão de 10 mL, 100,1 mg de glaucolídeo B (**4**; 0,23 mmol) foram retomados em 1 mL de DCM seco, sendo a mistura mantida sob agitação magnética em rt e em atmosfera de argônio (Ar) até completa solubilização. Após, adicionou-se à mistura 323,5 mg de BiCl₃ (10,3 mmol; 4,5 eq), mantendo as mesmas condições durante 3 h (Esquema 5).

Esquema 5 – Esquema reacional de ciclização transanular do glaucolídeo B (**4**) em presença de cloreto de bismuto III (BiCl₃) sem anidrido acético: condição c(i).



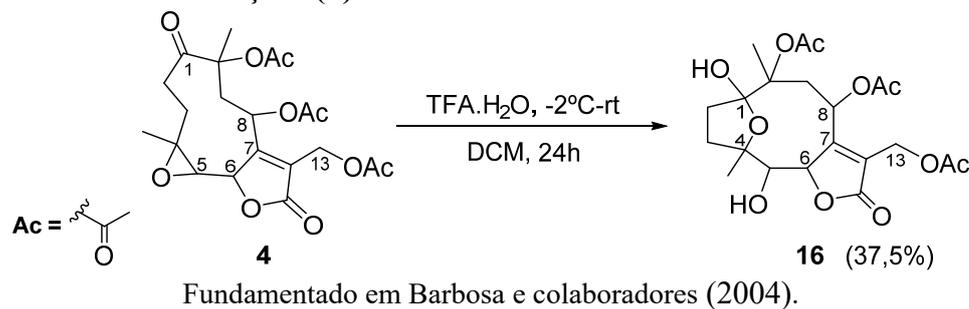
A partir do monitoramento por CCD, a reação foi finalizada sendo mistura transferida para funil de separação (sendo o balão consecutivamente lavado com DCM e água destilada) e extraída por partição líquido-líquido com DCM (3x 15 mL). A fração orgânica obtida foi seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida em evaporador rotatório, correspondendo ao derivado semissintético **16** (80,5 mg; 77,4%).

4.6.3.2.3 *Reação de ciclização transanular do glaucolídeo B (4) em presença de ácido trifluoroacético (TFA): condição c(ii)*

À uma solução de glaucolídeo B (**4**) (39,7 mg; 0,09 mmol) em 1 mL de DCM seco, mantida sob agitação magnética e em temperatura reduzida (-2 °C) de banho de gelo e sal, adicionou 10 µL de ácido trifluoroacético (TFA) contendo traços de água (0,13 mmol; 1,4 eq). A mistura foi mantida sob agitação durante 24 h, cuja temperatura inicial de -2 °C passou à temperatura ambiente (rt) (Esquema 6).

A reação, monitorada por CCD, foi finalizada sendo diluída em 5 mL de solução aquosa saturada de bicarbonato de sódio (NaHCO₃) e funil de separação, sendo extraída por partição líquido-líquido com CHCl₃ (6x 5 mL).

Esquema 6 – Esquema reacional de ciclização transanular do glaucolídeo B (**4**) em presença de ácido trifluoroacético: condição **c(ii)**.



A fração orgânica obtida foi seca com Na_2SO_4 anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida em evaporador rotatório. O resíduo obtido (37,6 mg) foi purificado por CC de sílica gel utilizando eluente isocrático hexano/acetona (70/30, v/v), obtendo-se quatro frações (DS4a-d) (para maiores detalhes vide *item 5.5 – Fluxograma 8*). A fração DS4b correspondeu novamente ao derivado semissintético **16** (15,5 mg; 37,5%), porém em menor rendimento.

Considerando o bom rendimento reacional observado na produção do derivado semissintético **16**, este também foi submetido à reações de ciclização transanular de modo a explorá-lo como fonte na obtenção de diferentes esqueletos carbocíclicos de LS.

4.6.3.3 Reações de ciclização via rearranjo alílico do derivado semissintético **16** em presença de reagente catalítico básico (condição **d**)

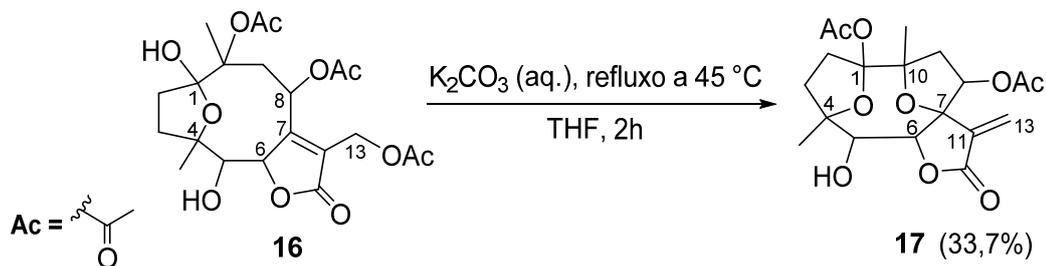
4.6.3.3.1 Reação de ciclização via rearranjo alílico do derivado semissintético **16** em presença de carbonato de potássio (K_2CO_3): condição **d**

Em balão de 10 mL foram retomados 30,0 mg do derivado semissintético **16** (0,07 mmol) em 1,5 mL de tetrahidrofurano (THF) seco. Após, adicionou-se 725 μL de solução aquosa 1 N de K_2CO_3 ; (0,36 mmol; 5,5 eq). A mistura foi então mantida sob agitação magnética e refluxo a 45 °C durante 2 h (Esquema 7).

A reação, monitorada por CCD, foi finalizada a partir da adição de 10 mL de DCM, sendo a mistura transferida para funil de separação e extraída por partição líquido-líquido com DCM (3x 15 mL).

A fração orgânica obtida foi seca com Na_2SO_4 anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida em evaporador rotatório, correspondendo ao derivado semissintético **17** (8,8 mg; 33,7%).

Esquema 7 – Esquema reacional de ciclização via rearranjo alílico do derivado semissintético **16** em presença de carbonato de potássio (K_2CO_3): condição **d**.

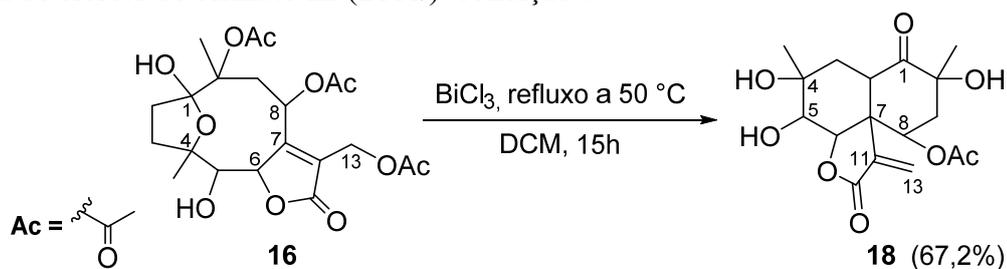


4.6.3.4 Reações de ciclização transanular do derivado semissintético **16** em presença de reagente catalítico ácido (condição **e**)

4.6.3.4.1 Reação de ciclização transanular do derivado semissintético **16** em presença de cloreto de bismuto III ($BiCl_3$): condição **e**

À uma solução do derivado semissintético **16** (28,0 mg; 0,06 mmol) em 2 mL de DCM seco foram adicionados 106,1 mg de $BiCl_3$ (0,34 mmol; 5,5 eq). A mistura foi então mantida sob agitação magnética e refluxo a 50 °C durante 15 h (Esquema 8).

Esquema 8 – Esquema reacional de ciclização transanular do derivado semissintético **16** em presença de cloreto de bismuto III ($BiCl_3$): condição **e**.



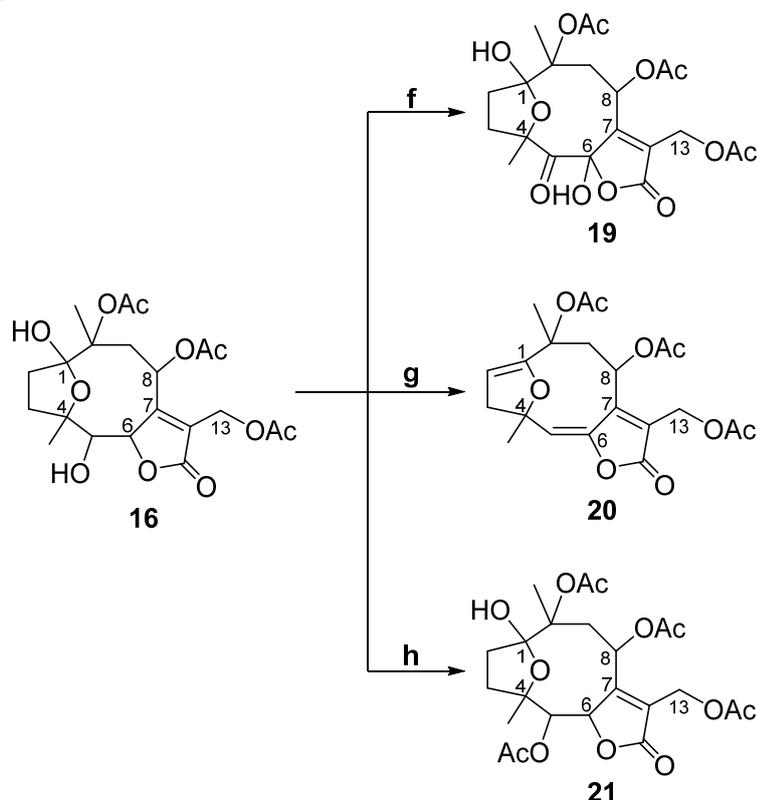
Após término da reação, monitorada por CCD, esta foi finalizada sendo mistura transferida para funil de separação (com o balão de reação lavado consecutivamente com DCM e água destilada) e extraída por partição líquido-líquido com DCM (3x 15 mL).

A fração orgânica obtida foi seca com Na_2SO_4 anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida em evaporador rotatório, correspondendo ao derivado semissintético **18** (14,6 mg; 67,2%).

4.6.3.5 Reações adicionais de modificação estrutural a partir do derivado semissintético **16**.

O derivado semissintético **16** foi submetido também à condições reacionais complementares de modificação molecular, conforme Esquema 9, com o intuito de produzir análogos estruturais para permitissem investigar a influência da mudança em seus diferentes substituintes frente às suas propriedades biológicas.

Esquema 9 – Esquema geral de reações de modificação molecular a partir do derivado semissintético **16**.



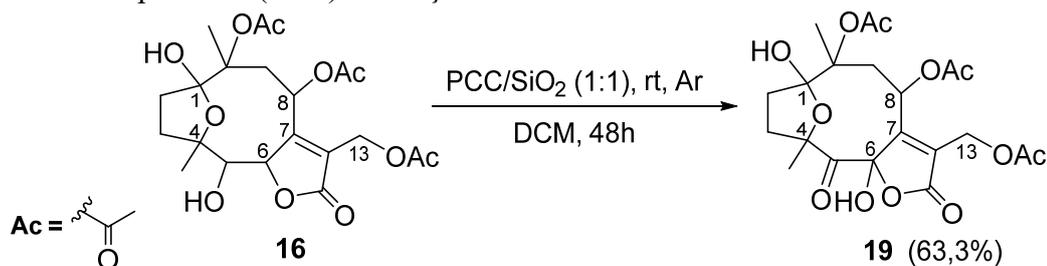
Condições reacionais: **(f)** PCC/SiO₂ (1:1), DCM, Ar, rt, 48 h; **(g)** SOCl₂, piridina, Ar, DCM, -10 °C (0,5 h) seguido por refluxo a 60 °C (3,5 h); **(h)** **1**) DMAP, Et₃N, Ac₂O, DCM, -10 °C, 0,5 h, **2)** derivado **16**, DCM, rt, 0,5 h.

Para tanto, uma nova quantidade de 234,7 mg do derivado semissintético **16** foi produzida a partir de 320 mg de glaucolídeo B (**4**; 0,73 mmol) em reação de ciclização transanular conforme já descrito na condição **c(i)** (vide *item 4.6.3.2.2*), a ser utilizada nas etapas reacionais subseqüentes (detalhadas a seguir).

4.6.3.5.1 Reação de oxidação do derivado semissintético **16** em presença de clorocromato de piridínio (PCC): condição **f**

Em balão de 10 mL foram retomados 30,0 mg do derivado semissintético **16** (0,07 mmol) em 2 mL de DCM seco. Posteriormente, foram adicionados 226,6 mg de uma mistura equivalente (1:1, m/m) de PCC (0,52 mmol, 8 eq) e sílica gel 60. A mistura foi então mantida sob agitação magnética, em atmosfera de argônio e em rt, durante 48 h (Esquema 10).

Esquema 10 – Esquema reacional de oxidação do derivado semissintético **16** em presença de clorocromato de piridínio (PCC): condição **f**.



Sendo monitorada por CCD, a reação foi finalizada levando-se a mistura à secura sob pressão reduzida em evaporador rotatório. O resíduo obtido foi submetido à CC de sílica gel utilizando eluente isocrático constituído pela mistura de DCM/acetona (80:20, v/v), obtendo-se 3 frações (DS5a-c) (para maiores detalhes vide *item 5.5 – Fluxograma 8*). A fração DS5b correspondeu ao derivado semissintético **19** (20,1 mg; 63,3%).

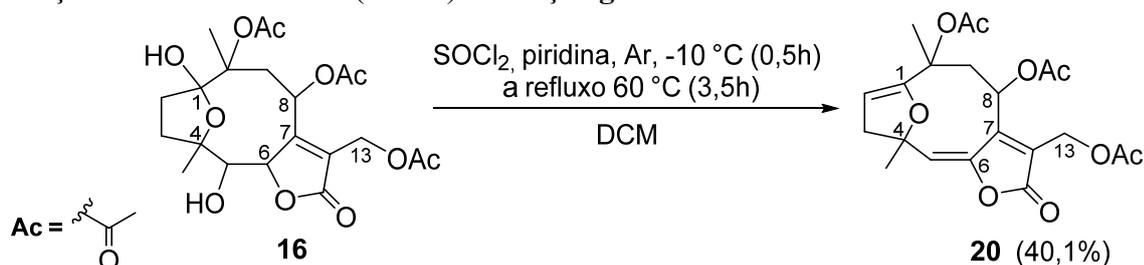
4.6.3.5.2 Reação de desidroalogenação via cloração do derivado semissintético **16** em presença de cloreto de tionila: condição **g**

Em balão de 10 mL, 30,2 mg do derivado semissintético **16** (0,07 mmol) foram retomados em 1,5 mL de DCM seco. A solução foi mantida sob agitação magnética e atmosfera de argônio, em temperatura reduzida (-10 °C) de banho de gelo e sal.

Em seguida, foram adicionados 8 µL de piridina (0,10 mmol, 1,5 eq). Após, adicionou-se por gotejamento 300 µL de uma solução de 35 µL de SOCl₂ (0,48 mmol; 7,3 eq) e DCM. A mistura foi mantida nas mesmas condições durante 30 min, sendo monitorada por CCD.

Após esse período, não se observando mudanças no perfil cromatográfico da mistura reacional, esta foi então submetida à refluxo a 60 °C, em atmosfera de argônio, durante 3,5 h (Esquema 11).

Esquema 11 – Esquema reacional de desidroalogenação do derivado semissintético **16** em presença de cloreto de tionila (SOCl₂): condição **g**.

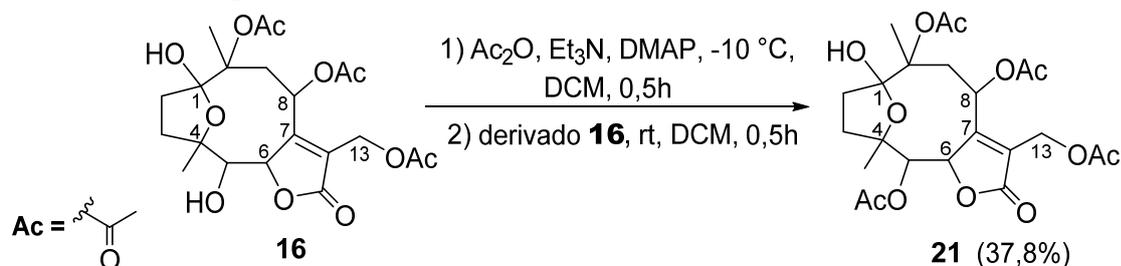


A reação foi finalizada levando-se a mistura à secura sob pressão reduzida em evaporador rotatório. O resíduo obtido foi filtrado por cartucho de SPE contendo sílica gel, utilizando DCM como eluente (para maiores detalhes vide *item 5.5 – Fluxograma 8*). A fração obtida correspondeu ao derivado semissintético **20** (11,1 mg; 40,1%).

4.6.3.5.3 Reação de acetilação do derivado semissintético **16** em presença de *N,N*-dimetil-4-aminopiridina, trietilamina (Et₃N) e de anidrido acético: condição **h**

A reação de acetilação do derivado **16** foi do tipo *one-pot* em duas etapas, conforme Esquema 12. Para o primeiro passo reacional, foram adicionados 0,4 mg de DMAP (0,003 mmol, 0,05 eq) à um balão de 10 mL contendo uma suspensão de Ac₂O (6 μL, 0,07 mmol, 1 eq) e Et₃N (14 μL, 0,10 mmol, 1,5 eq) em 1 mL de DCM seco. A mistura foi mantida sob agitação magnética e em temperatura reduzida (-10 °C) de banho de gelo e sal, durante 30 min. Após esse período, para a segunda etapa de reação foram adicionados 30,0 mg do derivado **16** (0,07 mmol) à mistura, sendo mantida sob agitação magnética por mais 30 min, agora em rt.

Esquema 12 – Esquema reacional de acetilação do derivado semissintético **16** em presença de *N,N*-dimetil-4-aminopiridina, trietilamina (Et₃N) e de anidrido acético: condição **h**.



A reação foi finalizada diluindo-se a mistura em 3 mL de água destilada, mantido sob agitação magnética durante 30 min, sendo posteriormente transferida para funil de separação e

extraída por partição líquido-líquido com DCM (3x 15 mL). A fração orgânica obtida foi seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida em evaporador rotatório.

O resíduo obtido (24,0 mg) foi submetido à CC de sílica gel utilizando eluente gradiente constituído de acetona em hexano (30-50%), obtendo-se 4 frações (DS6a-d) (para maiores detalhes vide *item 5.5 – Fluxograma 8*). A fração DS6c correspondeu ao derivado semissintético **21** (12,4 mg; 37,8%).

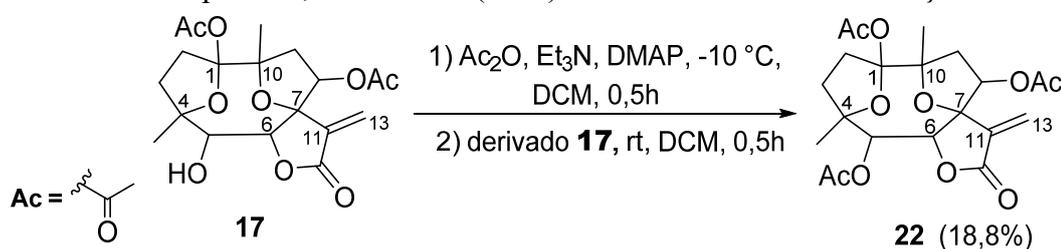
4.6.3.6 Reação de acetilação dos derivados semissintéticos **17** e **18**.

Assim como para o derivado **16**, os derivados **17** e **18** também foram submetidos à reação de acetilação conforme condição **h** (vide *item 4.6.3.5.3*), a fim de se avaliar a influência da modificação de grupos funcionais em ambas estrutura perante suas propriedades biológicas.

4.6.3.6.1 Reação de acetilação do derivado semissintético **17** em presença de *N,N*-dimetil-4-aminopiridina, trietilamina e de anidrido acético: condição **h**

Para a primeira etapa da reação de acetilação do derivado semissintético **17** (Esquema 13) foram utilizados 2 µL de Ac₂O (0,02 mmol, 1 eq), 4 µL de Et₃N (0,03 mmol, 1,5 eq) e 0,1 mg de DMAP (0,001 mmol, 0,05 eq), retomados em 1 mL de DCM seco em balão de 10 mL. Para a segunda etapa, foram adicionados 7,7 mg do derivado **17** (0,02 mmol) à mistura,

Esquema 13 – Esquema reacional de acetilação do derivado semissintético **17** em presença de *N,N*-dimetil-4-aminopiridina, trietilamina (Et₃N) e de anidrido acético: condição **h**.

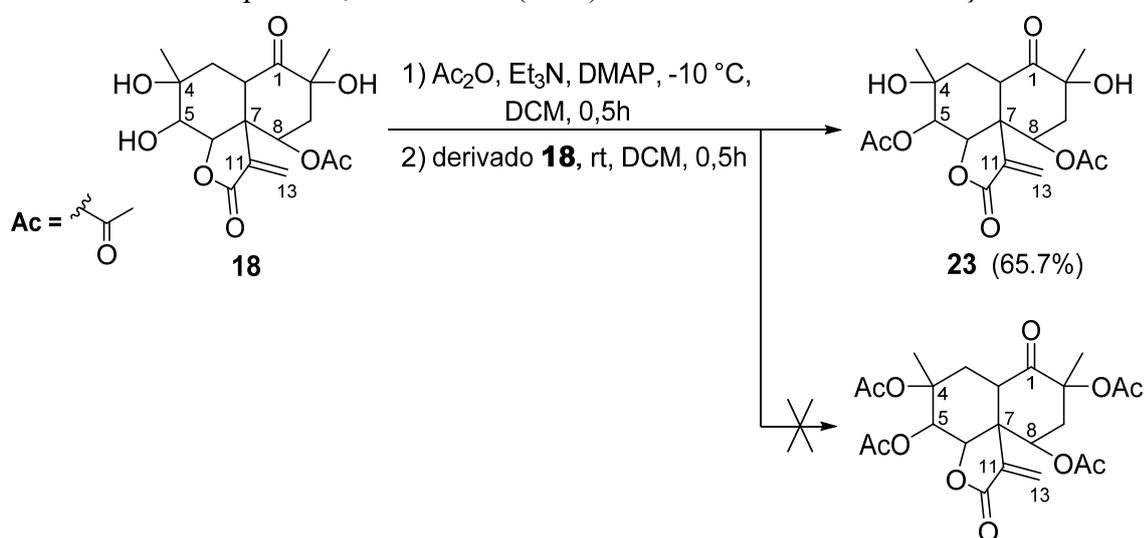


O resíduo obtido (5,1 mg) foi purificado por CCDP utilizando como eluente a mistura de hexano/acetona (70:30, v/v), com a coleta da mancha de $R_f \cong 0,40$, levando ao isolamento do derivado semissintético **22** (1,6 mg; 18,8%).

4.6.3.6.2 Reação de acetilação do derivado semissintético **18** em presença de *N,N*-dimetil-4-aminopiridina, trietilamina e de anidrido acético: condição **h**

Por sua vez, na reação de acetilação do derivado semissintético **18** (Esquema 14) foram utilizados 10 μ L de Ac₂O (0,10 mmol, 3 eq), 16 μ L de Et₃N (0,12 mmol, 3,5 eq) e 0,2 mg de DMAP (0,002 mmol, 0,05 eq), retomados em 1 mL de DCM seco em balão de 10 mL. Para a segunda etapa, foram adicionados 12,0 mg do derivado **18** (0,03 mmol) à mistura, cuja reação foi desenvolvida conforme descrito no *item 4.6.3.5.3*.

Esquema 14 – Esquema reacional de acetilação do derivado semissintético **18** em presença de *N,N*-dimetil-4-aminopiridina, trietilamina (Et₃N) e de anidrido acético: condição **h**.



Fundamentado em Chen e colaboradores (2017).

Após a finalização da reação e extração por partição líquido-líquido com DCM (detalhes vide *item 4.6.3.5.3*), a fração orgânica obtida correspondeu ao derivado semissintético **23** (8,8 mg; 65,7%).

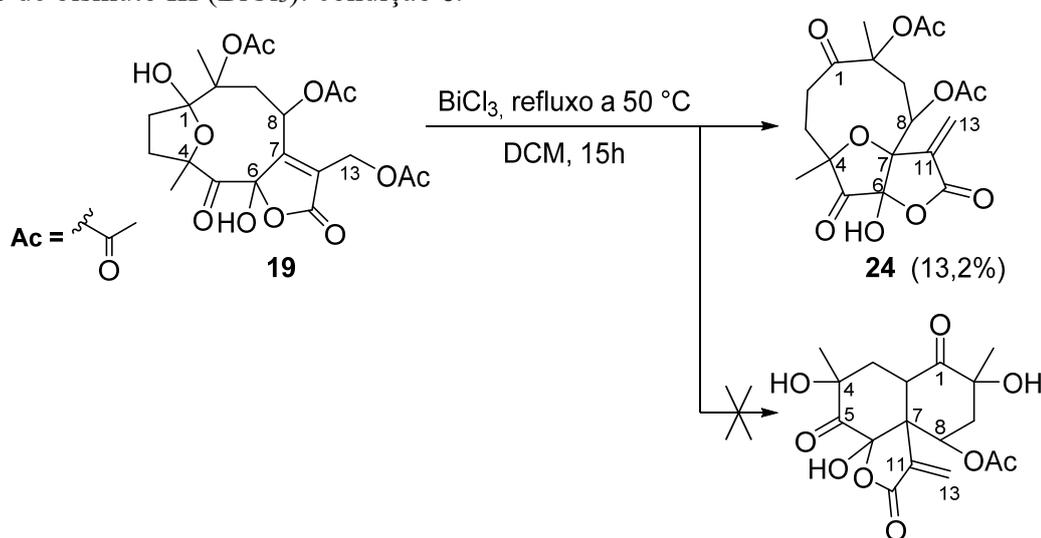
4.6.3.7 Reações de eliminação via rearranjo e ataque nucleofílico do derivado semissintético **19** em presença de reagente catalítico ácido (condição **e**)

4.6.3.7.1 Reação de eliminação via rearranjo e ataque nucleofílico do derivado semissintético **19** em presença de cloreto de bismuto III (BiCl₃): condição **e**

De forma complementar, o derivado semissintético **19** foi também submetido à reação de eliminação conforme descrito na condição **e** (vide *item 4.6.3.4.1*). Para tanto, em um balão

de 10 mL foram retomados 20,0 mg do derivado semissintético **19** (0,04 mmol) em 2 mL de DCM seco. Posteriormente, foram adicionados 76,3 mg de BiCl_3 (0,24 mmol; 5,5 eq) à mistura, que foi mantida sob agitação magnética e em refluxo a 50 °C durante 15 h (Esquema 15).

Esquema 15 – Esquema reacional de eliminação do derivado semissintético **19** em presença de cloreto de bismuto III (BiCl_3): condição e.



Fundamentado em Rodríguez-Hahn e colaboradores (1988).

A reação foi finalizada sendo mistura transferida para funil de separação (com o balão de reação lavado consecutivamente com DCM e água destilada) e extraída por partição líquido-líquido com DCM (3x 15 mL). A fração orgânica obtida foi seca com Na_2SO_4 anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida em evaporador rotatório.

O resíduo obtido (10,9 mg) foi purificado por CCDP utilizando como eluente a mistura de hexano/acetona (60:40, v/v), sendo coletada a mancha de $R_f \cong 0,46$, o que levou ao isolamento do derivado semissintético **24** (2,3 mg; 13,2%).

4.7 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL

As amostras derivadas do fracionamento cromatográfico para isolamento das LS e seus derivados, ao apresentar apenas uma mancha em CCD e/ou cristalização espontânea, foram submetidas à análises espectroscópicas de ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas para a elucidação estrutural e caracterização das substâncias.

4.7.1 Ressonância magnética nuclear (RMN)

As substâncias isoladas foram submetidas a análises de RMN de hidrogênio (RMN ^1H) e experimentos bidimensionais (HSQC, HMBC). Os deslocamentos químicos referentes aos carbonos (^{13}C) foram atribuídos em função de análises de RMN de carbono-13 e/ou a partir dos experimentos bidimensionais de HSQC e HMBC.

Os experimentos foram desenvolvidos em equipamento Bruker[®] modelo *Fourier 300* (^1H a 300 MHz, ^{13}C a 75 MHz). Para amostras que necessitaram análises de RMN em baixa temperatura, os experimentos foram desenvolvidos em espectrômetros Bruker[®] modelo *Avance 400* (^1H a 400 MHz, ^{13}C a 100 MHz) e Bruker[®] modelo *AVANCE III 600* (^1H a 600 MHz, ^{13}C a 150 MHz), respectivamente vinculados ao Departamento de Química e Departamento de Bioquímica da UFPR, Curitiba/PR.

Os dados adquiridos (FID) foram processados em *software TopSpin 3.2* (Bruker[®]), e os resultados comparados com dados disponíveis na literatura.

4.7.2 Espectrometria de massas (EM)

As substâncias isoladas foram também caracterizadas por EM, cujos experimentos foram desenvolvidos em espectrômetro de massas híbrido Waters[®] modelo *Xevo G2-S QTof* equipado com fonte de ionização por eletronebulização (ESI) *Zpray*[™] e analisadores do tipo quadrupolo acoplado a tempo de voo (QTof).

Os dados adquiridos foram processados em *software MassLynx 4.1* (Waters[®]).

4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA *in vitro*

4.8.1 Análise de pureza dos compostos por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à detector de arranjo de fotodiodos e espectrometria de massas (CLUE-PDA-EM)

As substâncias purificadas a serem ensaiadas biologicamente foram submetidas à análise de pureza por CLUE-PDA. Os experimentos foram realizados em cromatógrafo Waters[®] modelo *Acquity H-Class UPLC* acoplado a espectrômetro de massas híbrido *Xevo*[®] *G2-S QTof*.

Na avaliação de pureza da substância, esta foi estabelecida em função da porcentagem de área de pico de cada substância em relação à somatória de todas as áreas dos picos no cromatograma.

4.8.2 Avaliação das atividades leishmanicida e tripanocida

A investigação *in vitro* das atividades leishmanicida e tripanocida para algumas das LS isoladas das espécies de *Vernoniae* foi realizada em parceria com o Laboratório de Protozoologia, sob supervisão do professor Dr. Mário Steindel, vinculado ao Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

Para tanto, empregou-se a linhagem celular THP-1 (ATCC TIB202) de monócitos humanos que foi cultivada em meio RPMI-1640 sem vermelho de fenol, suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino inativo (SBF), tampão HEPES (ácido N-[2-hidroxietil]-piperazina-N'-2-etanosulfônico) a 12,5 mM, penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL) e Glutamax[®] (2 mM), em incubação a 37 °C em atmosfera umidificada com 5% de CO₂. As formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/77/LTB0016) utilizadas, expressando β-galactosidase, foram cultivadas a 26 °C em meio *Schneider's insect medium* (Sigma-Aldrich Co, St. Louis) suplementado com 5% (v/v) de SBF inativado por calor e 2% (v/v) de urina humana.

Para a triagem leishmanicida contra formas amastigotas intracelulares as células THP-1 ($4,0 \times 10^4$ células/poço) foram cultivadas em placas de 96 poços em meio RPMI-1640 e tratadas com 100 ng/mL de forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) durante 72 horas a 37 °C em 5% de CO₂, para permitir a diferenciação das células THP-1 em macrófagos que não se dividem (SCHWENDE et al., 1996). Após quatro dias de cultivo a cultura de promastigotas ajustada para $4,0 \times 10^6$ parasitos/mL foi lavada com solução salina tamponada com fosfato, pH 7,4 (PBS) e incubada em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro humano AB⁺ inativado por calor durante uma hora a 34 °C para a opsonização do parasito. As células THP-1 aderentes foram incubadas com a solução de promastigotas opsonizadas na proporção parasitos: célula de 10:1, durante quatro horas a 34 °C e 5% de CO₂. Após este período os parasitos não aderentes foram removidos por lavagem com PBS. As células infectadas foram incubadas com 180 µL de meio RPMI-1640 completo nas mesmas condições de opsonização durante 24 horas, para permitir a transformação de promastigotas em amastigotas intracelulares.

Para triagem tripanocida, as cepas de *Trypanosoma cruzi* β-galactosidase positivas (Tulahuen) foram fornecidas pelo Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular, Centro de

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

As LS a serem ensaiadas (1-5) foram solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO) e diluídas em série (de 50 µM a 1,56 µM). As células infectadas foram tratadas com 20 µL de cada amostra, em triplicata, seguida de incubação durante 48 horas a 34 °C ou 37 °C e 5% de CO₂. Após o tratamento, as células foram cuidadosamente lavadas com PBS e incubadas durante 16 horas a 37 °C com 250 µL de clorofenol-vermelho-β-D-galactopiranosídeo a 100 µM e Nonidet P-40 a 0,1%. A densidade óptica foi determinada a 570 e 630 nm em espectrofotômetro Tecan® modelo *Infinite M200*. A anfotericina B e o benznidazol foram utilizados como controle positivo para as atividades leishmanicida e tripanocida, respectivamente. DMSO 1% foi empregado como controle negativo.

A concentração (µM) de cada amostra que reduziu a viabilidade do parasito em 50% quando comparado ao controle não tratado (IC₅₀) foi calculada por regressão não linear das curvas de concentração-resposta.

Para os ensaios de toxicidade celular, as células THP-1 foram semeadas ($6,0 \times 10^4$ por poço) em microplacas de 96 poços e diferenciadas com 100 ng/mL de PMA durante 72 horas a 37 °C e 5% de CO₂. Para os ensaios de toxicidade celular, as amostras em concentrações variando entre 15,6 a 500 µM ou 1% de DMSO (controle negativo) foram adicionados e as células foram e cultivadas a 37 °C e 5% de CO₂ durante 72 horas. A viabilidade celular foi determinada pelo método colorimétrico de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio), e a densidade óptica foi determinada a 540 nm em leitor de microplacas TECAN® modelo *Infinite M200*.

A concentração (µM) de cada amostra que reduziu o crescimento celular em 50% comparada ao controle (CC₅₀) foi calculada plotando-se as curvas concentração-resposta em um modelo de regressão não linear. A partir dos dados de CC₅₀ foram determinados os índices de seletividade (IS).

4.8.3 Avaliação da atividade citotóxica

A avaliação da atividade citotóxica foi realizada em dois momentos diferentes e com grupos parceiros distintos, sendo a primeira etapa correspondente à investigação preliminar

apenas para os compostos **1** (piptocarфина A) e **2** (glaucolídeo a) afim de se conhecer melhor o efeito desses compostos e de modo a direcionar a pesquisa perante a atividade citotóxica. Já a segunda etapa, esta foi desenvolvida envolvendo não somente as LS isoladas de Vernoniaceae (**1-10**), mas os produtos de semissíntese (**11-24**).

Desse modo, a investigação inicial *in vitro* da atividade citotóxica foi realizada em parceria com o Laboratório de Imunologia Celular, sob supervisão do Dr. Gilberto Carlos Franchi Junior, vinculado ao Centro Integrado de Pesquisas Oncohematológicas da Infância (CIPOI) da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP.

Para tanto, as LS **1** e **2** foram avaliadas em um triagem quanto à sua atividade citotóxica frente às linhagens celulares de leucemias mieloide aguda (K-562) e linfoide B (Nalm-6) (para a LS **1**), leucemias pró-mielocítica (HL-60), linfocítica aguda (REH) e linfoide T (JURKAT), além das linhagens de células tumorais de adenocarcinoma de próstata (PC3), carcinoma de ovário (OVCAR), carcinoma de pulmão (NCI-H1299) e osteosarcoma (HOS) (para a LS **2**).

As células, cultivadas em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SBF, 1% de penicilina (10.000 UI/mL) e estreptomicina (10 mg/mL) (SOUZA et al., 2017), foram distribuídas em microplacas de cultura de 96 poços (1×10^4 células/poço) e incubadas com as amostras em concentrações variando entre 0,1 e 100 μ M em DMSO (0,1%), sendo mantidas a 37 °C em 95% de atmosfera umidificada, contendo 5% de CO₂. Após 24 h de exposição a 37 °C, a viabilidade celular foi determinada pelo método colorimétrico de MTT (MOSMANN, 1983), sendo a absorbância medida a 570 nm em espectrofotômetro *PowerWave XS* (Bio-Tek®). A doxorubicina e vincristina foram usados como controle positivo e o DMSO (0,1%) como controle negativo.

Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos em CC₅₀ (μ M), calculado como a concentração da amostra que diminuiu 50% das células viáveis em relação ao controle negativo.

A segunda etapa da investigação *in vitro* da atividade citotóxica das LS envolveu também a avaliação dos produtos de semissíntese. Para essa etapa, os experimentos foram realizados em parceria junto ao Grupo de Estudos de Interações entre Micro e Macromoléculas (GEIMM), sob supervisão da professora Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa, vinculado ao Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFSC.

Para tanto, os compostos (**1-24**) foram quanto à sua atividade citotóxica frente às linhagens de células tumorais humanas de carcinoma de pulmão (NCI-H460) glioblastoma (SF295) e melanoma (SK-MEL-28), e comparados com a linhagem não tumoral HUVEC (células endoteliais da veia umbilical humana).

As células foram cultivadas em meio RPMI-1640 ou meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), contendo 1,5 g/L de bicarbonato de sódio, 10 mM de HEPES, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e suplementado com 10% de SBF, em estufa a 37 °C em atmosfera umidificada com 5% de CO₂ (ASSUNÇÃO et al., 2019). O número de células viáveis foi determinado pelo método de exclusão com corante azul de trypan (FRESHNEY, 1987), com as contagens realizadas em uma câmara de Neubauer. Em seguida, para a triagem dos compostos **1-24**, as células foram plaqueadas em microplacas de cultura de 96 poços (1 x 10⁴ células/poço) e incubadas com as amostras na concentração de 50 µM em DMSO (0,1%) e mantidas a 37 °C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂, durante 24 h de exposição, sendo a viabilidade celular determinada pelo método colorimétrico de MTT (MOSMANN, 1983). Após período de incubação o meio foi substituído por uma solução de MTT (0,25µg/µL) por 2 horas a 37°C., sendo posteriormente substituída por DMSO para solubilização dos cristais de formazan com a absorbância medida em 570 nm. Os compostos mais promissores (**1-3**, **5**, **20-22**) foram selecionados para a determinação de CC₅₀ frente às linhagens celulares SK-MEL-28 e HUVEC, sendo estas expostas às amostras em concentrações variando entre 1 e 75 µM em DMSO (0,1%) e mantidas durante 24 h a 37 °C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂. A viabilidade celular foi novamente determinada pelo método colorimétrico de MTT com a densidade óptica determinada a 540 nm. A densidade óptica obtida no grupo controle (células sem tratamento) foi considerada como equivalente a 100% de células viáveis e a viabilidade celular nos demais tratamentos foi calculada por regressão linear.

Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos em porcentagem da viabilidade celular e em CC₅₀ (µM) – para os compostos mais ativos, calculado por meio da curva de concentração-resposta de Hill usando o software *GraphPad Prism 6.0* (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA). Os valores do IS para os compostos foram definidos pela razão entre o CC₅₀ das linhagens não-tumoral e tumoral, para cada composto.

4.8.4 Avaliação da atividade anti-inflamatória

Afim de se conhecer as propriedades anti-inflamatórias da LS do tipo glaucolídeo, a avaliação *in vitro* da atividade anti-inflamatória para o glaucolídeo B (**4**), tomado como material de partida nas reações de semissíntese, foi realizada em com o Laboratório de Pesquisa em Imunofarmacologia – LAPI, sob supervisão do professor Dr. Eduardo Monguilhott Dalmarco, vinculado ao Departamento de Análises Clínicas da UFSC.

Para tanto, o glaucolídeo B (**4**) foi avaliado quanto à sua citotoxicidade em células RAW 264.7 e a viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT (MOSMANN, 1983). As células foram cultivadas em frascos plásticos apropriados com o meio DMEM, suplementado com 10% de SBF, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, em incubadora umidificada a 37 °C com 5% de emissões de CO₂. Antes dos experimentos, o número de células viáveis foi determinado pelo método de exclusão com corante azul de trypan, com as contagens realizadas em uma câmara de Neubauer. As células foram distribuídas em microplacas de cultura de 96 poços (1 x 10⁴ células/poço) e incubadas com o composto **4** em diferentes concentrações (1, 3, 10, 30, 100, 300 e 1000 µM), que foram adicionadas aos poços em triplicata. O DMSO foi usado para a solubilização da substância testada em uma concentração máxima de 1% do poço/tratamento – concentração na qual não há citotoxicidade para as células. Após o período de tratamento (24 h), o meio foi removido e 100 µL de uma solução de MTT foram adicionados a 500 µg/mL em meio de cultura e incubados durante 2 h. Após este período, o meio foi removido, o precipitado de formazano foi dissolvido em 100 µL de DMSO/poço e a absorbância foi medida a 540 nm. A densidade óptica obtida no grupo controle – células não tratadas (incubadas apenas com meio de crescimento) – foi considerada como 100% de células viáveis. A concentração citotóxica (CC₁₀), que significa a concentração necessária para manter a viabilidade celular acima de 90%, foi calculada por meio de uma curva de concentração-resposta de Hill usando o software *GraphPad Prism 6.0*.

Em relação ao ensaio de inflamação celular, para induzir os macrófagos RAW 264.7 a uma condição inflamatória, as células foram cultivadas em uma microplaca de 96 poços (2 x 10⁵ células/poço) por 48 h para completar a aderência e confluência de macrófagos (a 37 °C em atmosfera umidificada com 5% de CO₂). Quando a aderência foi adequada, as células foram então designadas para diferentes grupos (n=3/grupo) consistindo de **a**) controle branco (BLK, células não inflamadas) – células pré-tratadas com veículo; **b**) controle negativo (LPS, células inflamadas) – também células pré-tratadas com veículo; **c**) controle positivo (DEX, tratamento padrão) – células pré-tratadas com dexametasona (7 µM); e **d**) grupos experimentais (tratamento com composto **4**) – células pré-tratadas com glaucolídeo B (1, 3 e 10 µM). Após 1 h, as células foram estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS, 1 µg/mL) por 24 h, então os sobrenadantes foram coletados para investigações adicionais referentes à produção de metabólitos nitrito/nitrato (NO_x) e a secreção de citocina pró-inflamatória (IL-6).

Para a determinação da produção de espécies de NO_x, o acúmulo de nitrito nos sobrenadantes das culturas foi medido como um indicador da produção de óxido nítrico (NO) com base na reação de Griess (GREEN et al., 1982). Resumidamente, 100 µL do meio de

cultura celular foram coletados 24 h após a estimulação por LPS (1 $\mu\text{g/mL}$), misturados com um volume igual de reagente Griess, e incubados à temperatura ambiente por 10 min. A absorbância a 540 nm foi medida com interpolação de curva padrão de nitrito (0-100 μM), e a produção de nitrito foi determinada, sendo os resultados expressos em μM .

Ainda, os níveis de IL-6 nos sobrenadantes das culturas foram quantificados a partir dos macrófagos RAW 264.7. Após a estimulação com LPS (1 $\mu\text{g/mL}$), o sobrenadante foi removido e submetido à determinação da concentração da citocina pró-inflamatória IL-6 (PeproTech, Rocky Hill, New Jersey, EUA) utilizando o kit de ensaio de imunoabsorção enzimático comercialmente disponível, de acordo com as instruções do fabricante. Os níveis de citocinas no sobrenadante da cultura celular foram estimados a partir da interpolação da curva padrão de IL-6, sendo os resultados expressos em pg/mL .

Os dados obtidos nos experimentos *in vitro* foram descritos como a média \pm erro padrão da média, e as comparações de parâmetros entre os grupos foram realizadas por análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida do pós teste de Dunnett. Estas análises foram realizadas utilizando o software *GraphPad Prism 6.0*.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OBTENÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE DO MATERIAL VEGETAL

5.1.1 Coleta, processamento e determinação do teor de umidade

Após coleta e secagem, as folhas secas de cada espécie foram pesadas e avaliadas quanto ao teor de umidade, cujos dados estão descrito na Tabela 1.

Tabela 1 – Parâmetros avaliados para folhas secas obtidas para as espécies de Vernonieae.

Espécie	Parâmetros	
	Quantidade (peso)	Teor de umidade
<i>Cyrtocymura scorpioides</i>	541,0 g	11,2 ± 0,5%
<i>Lepidaploa chamissonis</i>	278,4 g	12,3 ± 0,4 %
<i>Vernonanthura condensata</i>	770,0 g	8,9 ± 0,2 %
<i>Vernonanthura tweedieana</i>	276,1 g	13,9 ± 0,1 %

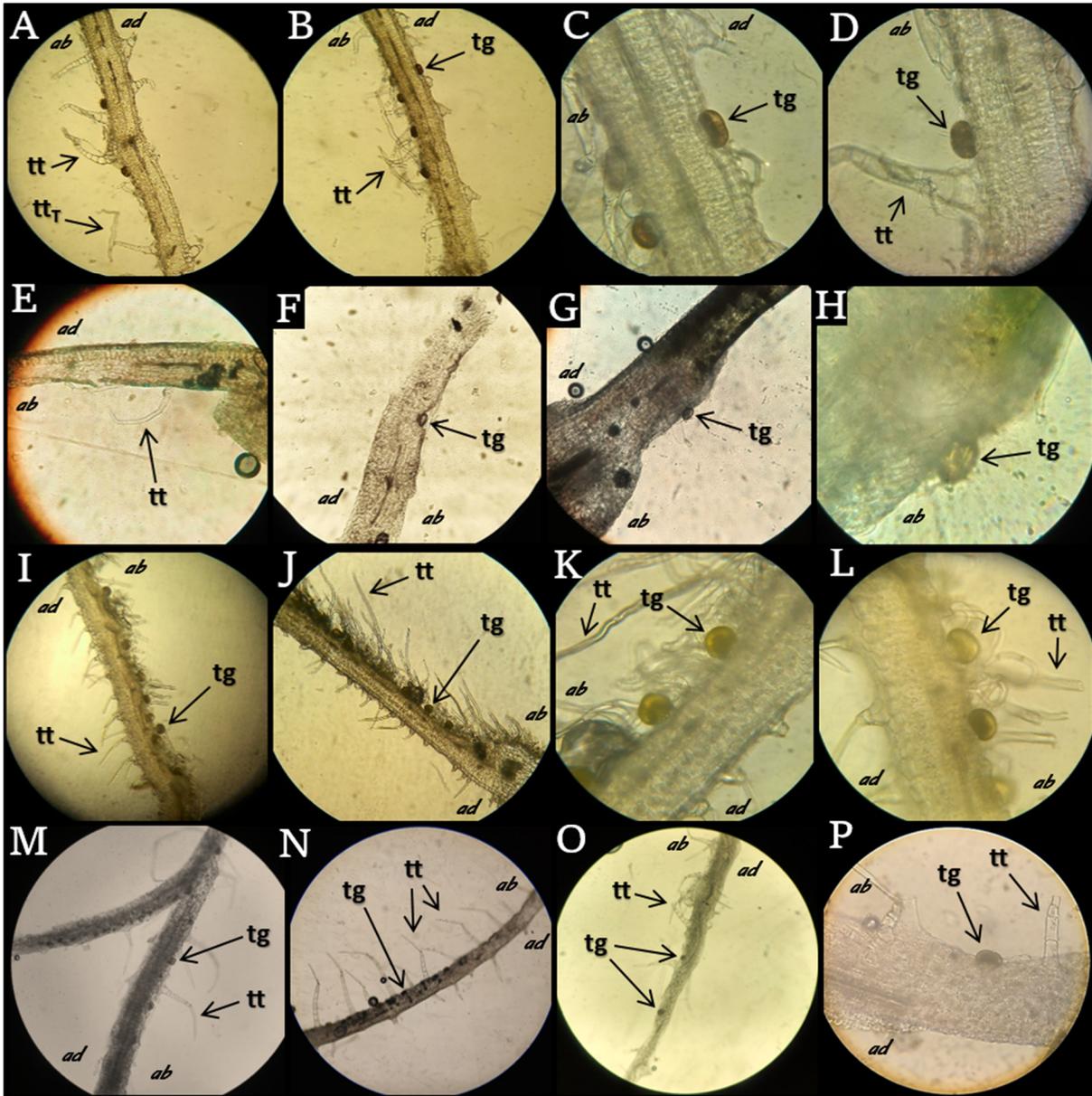
É importante ressaltar que mesmo não existindo valores de referência estabelecidos para o teor de umidade nestas espécies estudadas, os valores encontrados estão de acordo com os limites (8-14%) usualmente indicados para drogas vegetais processadas (FARIAS, 2007; BRASIL, 2010).

5.1.2 Análise microscópica

A análise microscópica realizada a partir da secção transversal das folhas frescas das diferentes espécies de Vernonieae para a pesquisa de tricomas revelou a presença de ambos os tipos, tanto tricomas glandulares quanto tectores (Figura 13).

Para a espécie *V. tweedieana* foram observados anexos epidérmicos representativos de tricomas glandulares (Figura 13B-D) da espécie, além de tricomas tectores característicos em formato de “T” (Figura 13A). Duarte e Chella (2014) descrevem para a espécie *V. tweedieana* a presença de tricomas glandulares capitados, com cabeça bicelular e pedicelo curto, inseridos em pequena depressão na epiderme, além de tricomas tectores pluricelulares, unisseriados, exibindo uma célula apical alongada e perpendicularmente inclinada em formato em “T” – estes também reportados em outras espécies do gênero (REDONDA-MARTÍNEZ; VILLASEÑOR; TERRAZAS, 2012; DE MORAIS et al., 2015).

Figura 13 – Análise microscópica das folhas das diferentes espécies de Vernoniae para pesquisa de tricomas glandulares.



Secções transversais de folhas de *V. tweediana* (A-D), *V. condensata* (E-H), *L. chamissonis* (I-L) e de *C. scorpioides* (M-P) observadas com aumento de 100 (A,B,E,F,G,I,J,M,N,O) e 400 (C,D,H,K,L,P) vezes; **tt**, tricoma tector; **tt_T**, tricoma tector em formato de “T”; **tg**, tricoma glandular; **ad**, face adaxial; **ab**, face abaxial.

Nas secções transversais das folhas de *V. condensata* foram identificados tricomas glandulares com pedúnculo curto e cabeça arredonda (Figura 13F-H), além de tricomas tectores simples pluricelulares (Figura 13E). Em estudos morfo-anatômicos realizados a partir das folhas de *V. condensata* foram indicados dois tipos diferentes de tricomas glandulares para a espécie, apresentando-se i) com pedúnculo uni ou bisseriado (pequenas células), com aparência sésil, e com cabeça arredondada glandular bicelular, ou ii) unisseriado com um número variado de células pedunculares e célula terminal em formato de semiesférico a alongado, sendo mais

usualmente observado na face adaxial (LOLIS; MILANEZE-GUTIERRE, 2003; MILAN; HAYASHI; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, 2006).

Na investigação das folhas de *L. chamissonis*, além de tricomas unicelulares simples em ambas as faces adaxial e abaxial (Figura 13I-K), foram observado tricomas glandulares lobulares de pedicelo curto (Figura 13I-L), similares aos observados nas demais espécies desse estudo, inseridos na epiderme abaxial. Embora não tenham sido encontrados relatos morfo-anatômicos das folhas de *L. chamissonis* na literatura, estudos realizados com outras espécies de gênero indicam a presença de tricomas tectores simples além de tricomas glandulares bilobulados sésseis (inseridos diretamente na epiderme), encontrados em ambas as faces da folha, sendo os glandulares ligeiramente mais observados na face abaxial (TELES; SOBRAL; NAKAJIMA, 2010; REDONDA-MARTÍNEZ; VILLASEÑOR, 2011; PRUSKI, 2017).

Já as folhas de *C. scorpioides* apresentaram tricomas tectores pluricelulares unisseriados predominantemente dispostos na face abaxial, geralmente com uma célula basal e terminados por uma célula longa (Figura 13M-O). Ainda, foram observados tricomas glandulares restritos a face abaxial (Figura 13M-O), inseridos na epiderme, apresentando pedúnculo curto e cabeça arredonda. Estes achados mostraram-se de acordo com o descrito para a espécie que relata a presença nas folhas de tricomas tectores pluricelulares unisseriados formados por 4 a 20 células e célula flagilifonne terminal, bem como tricomas glandulares inseridos em depressões na epiderme (TOIGO et al., 2004).

Diferentes autores têm demonstrado a presença de LS como constituinte preponderante do conteúdo de tricomas glandulares em espécies de Vernonieae (FAVI et al., 2008; APPEZZATO-DA-GLORIA et al., 2012; IGUAL et al., 2013), e a presença destes anexos epidérmicos nas folhas das espécies investigadas nesse estudo corrobora a possibilidade do isolamento desses constituintes de interesse.

5.2 OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO EXTRATIVO A PARTIR DA ESPÉCIE *Vernonanthura tweedieana*

O estudo de otimização do processo extrativo por lavagem foliar foi desenvolvido a partir das folhas secas da espécie *V. tweedieana*. A escolha da espécie em questão como ponto de partida para o aprimoramento do processo de extração se deu em função dos dados preliminares obtido durante a realização da etapa de mestrado (DA SILVA, 2015).

Foram preparadas, em triplicata, 16 combinações extrativas diferentes (conforme item 4.2) pelo método de lavagem foliar (para mais detalhes vide item 4.3.1), variando-se o líquido

extrator e o tempo de extração. Os extratos de lavagem foliar (ELF) obtidos foram concentrados e os rendimentos de extração (expressos em porcentagem referente a massa de folhas secas) calculados, cujos valores estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Rendimento de extração das diferentes preparações derivadas da otimização do processo extrativo por lavagem foliar a partir da espécie *V. tweedieana*.

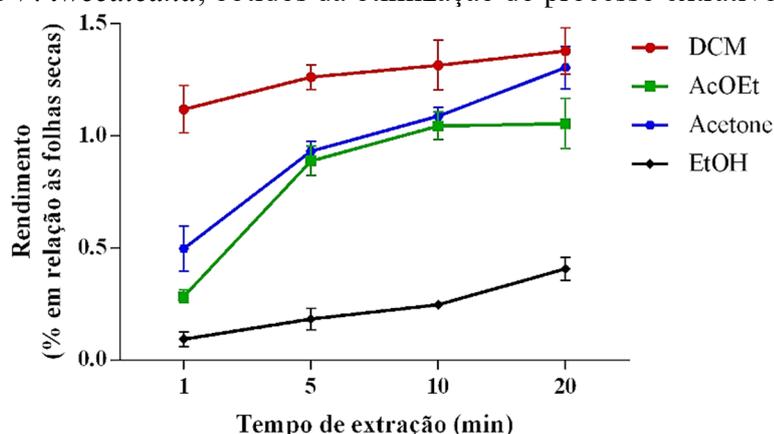
Tempo de extração (min)	Líquido extrator			
	DCM	AcOEt	Acetona	EtOH
1	1,12 ± 0,09%	0,28 ± 0,01%	0,50 ± 0,08%	0,09 ± 0,02%
5	1,26 ± 0,05%	0,89 ± 0,05%	0,93 ± 0,04%	0,19 ± 0,04%
10	1,31 ± 0,09%	1,04 ± 0,05%	1,09 ± 0,03%	0,25 ± 0,01%
20	1,38 ± 0,09%	1,05 ± 0,09%	1,30 ± 0,08%	0,41 ± 0,04%

Os valores foram expressos como a média ± desvio padrão (n=3) da porcentagem de extrato bruto (ELF) referente a massa inicial corrigida pelo teor de umidade de folhas secas empregadas. **DCM**, diclorometano; **AcOEt**, acetato de etila; **EtOH**, etanol.

A análise de variância (ANOVA) de duas vias para os valores de rendimento de extração, com intervalo de confiança de 95%, indicou que tanto o líquido extrator ($F_{\text{calculado}(3;8)}=286,90$ [$p<0,0001$] maior que $F_{\text{crítico}}=4,07$) como o tempo de extração ($F_{\text{calculado}(3;24)}=137,80$ [$p<0,0001$] maior que $F_{\text{crítico}}=3,01$), influenciam o rendimento extrativo, cujas contribuições para a variância total foram de 71,58% e 20,45%, respectivamente.

A partir dos dados de rendimento extrativo (Figura 14) é possível observar que quanto maior o tempo de extração, maiores são os rendimentos obtidos. Esse perfil se reproduziu para todos os líquidos extratores avaliados, sendo os maiores valores brutos de rendimento foram obtidos com o líquido extrator DCM.

Figura 14 – Análise comparativa do rendimento de extração entre os diferentes extratos de lavagem foliar de *V. tweedieana*, obtidos da otimização do processo extrativo.



Os valores foram expressos como a média ± desvio padrão (n=3) da porcentagem de extrato bruto (ELF) referente a massa inicial corrigida pelo teor de umidade de folhas secas empregadas. **DCM**, diclorometano; **AcOEt**, acetato de etila; **EtOH**, etanol.

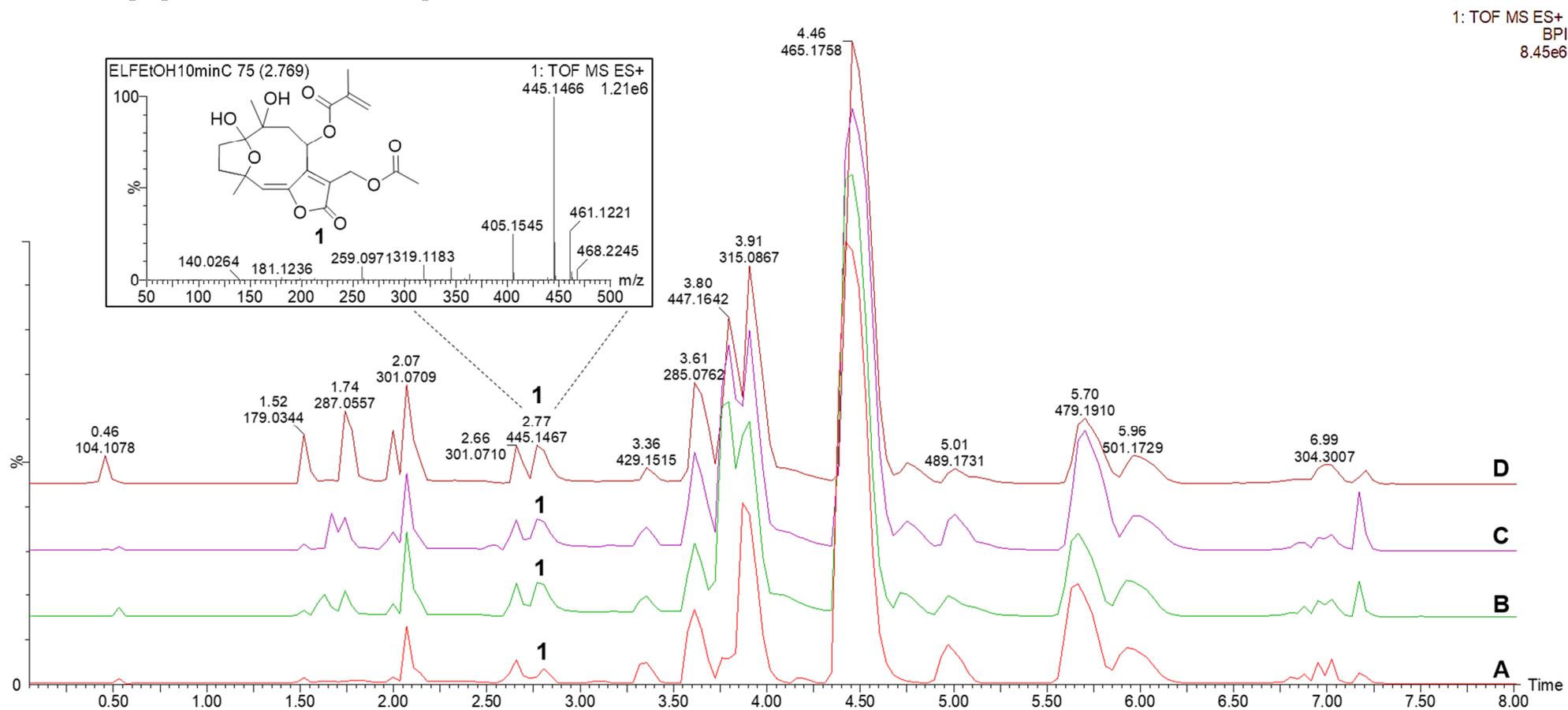
A partir da análise de ANOVA de duas vias com post teste de Holm-Sidak foi possível observar que houve diferença significativa no rendimento de extração em praticamente todas as comparações pareada entre os diferentes líquidos extratores, para todos os tempos de extração. A exceção se deu na comparação entre os extratos de AcOEt e acetona nos tempos de 5 minutos ($p=0,4778$) e 10 minutos ($p=0,4778$), e na comparação entre os ELF de DCM e acetona no tempo de 20 minutos ($p=0,2331$), em que não existiu diferença significativa.

Quando a diferença no rendimento de extração foi avaliada em função do tempo de extração, identificou-se que as diferenças nas comparações pareadas foram variadas para cada líquido extrator. Para os ELF preparados por DCM, houveram diferenças somente na comparação entre os tempos de 1 e 10 minutos ($p=0,0086$) e os tempos 1 e 20 minutos ($p=0,0006$). Por outro lado, para os extratos de AcOEt, só não foi observada diferença significativa para a comparação entre os tempos de 10 e 20 minutos ($p=0,8592$). De forma similar, os extratos de acetona foram significativamente diferentes em todas as comparações pareadas entre os diferentes tempos (valores de significância entre $p=0,0097$ e $p<0,0001$). Já nos ELF preparados com EtOH, não houve diferença significativa para as comparações entre os tempos de 1 e 5 minutos ($p=0,2250$) e entre os tempos 5 e 10 minutos ($p=0,2674$).

Os perfis cromatográficos das 16 diferentes preparações foram avaliados por CLUE-EM (conforme descrito no *item 4.2.1.1*). A identificação inicial do padrão de piptocarfina A (**1**) (padrão de referência a ser utilizado na determinação do teor de LS) nos ELF foi realizada a partir da estratégia de coinjeção do padrão isolado, com a comparação do tempo de retenção e perfil em espectro EM. A Figura 15 apresenta, de forma representativa as análises dos ELF por CLUE-EM, os cromatogramas obtidos a partir dos extratos preparados com tempo de extração de 10 minutos, utilizando os quatro líquidos extratores testados (DCM, AcOEt, acetona e EtOH). Conforme demonstrado nos cromatogramas, o perfil cromatográfico dos extratos é muito similar para todos os líquidos extratores, havendo, no entanto, variação quanto a intensidade de cada pico quando da comparação entre os cromatogramas. Além disso, é possível perceber que o método de separação desenvolvido proporcionou uma boa resolução entre a maioria dos picos. Neste contexto, a piptocarfina A (**1**) foi identificada com tempo de retenção (t_R) de 2,77 min, cujo espectro de EM (em ampliação na Figura 15) mostra um íon molecular m/z 445,1466 [$C_{21}H_{26}O_9+Na$]⁺ (calc. m/z 445,1475) (a caracterização completa do perfil cromatográfico do ELF de *V. tweediana* está descrita no *item 5.3.2*).

A análise quantitativa para a determinação do teor de piptocarfina A (**1**) nas diferentes preparações foi realizada a partir de curva analítica construída em nove níveis de concentração, entre 30 e 15.000 ng/g de solução, sob mesmo método descrito no *item 4.2.1.1*.

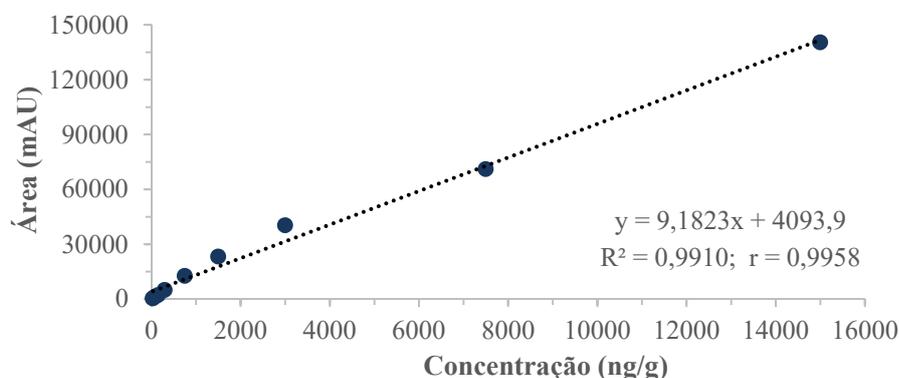
Figura 15 – Análise comparativa por CLUE-EM entre os extratos de lavagem foliar de *V. tweedieana*, obtidos da etapa de otimização do processo extrativo, preparados com diferentes líquidos extratores durante 10 minutos de extração.



Cromatogramas de pico base obtidos por CLUE-EM (em modo positivo de ionização – condições cromatográficas vide *item 4.2.1.1*) dos diferentes extratos de lavagem foliar de *V. tweedieana* extraídos durante 10 minutos empregando como líquido extrator (A) diclorometano, (B) acetato de etila, (C) acetona, e (D) etanol. (1) piptocarfina A (t_R : 2,77 min; m/z 445,1466 [$C_{21}H_{26}O_9+Na$] $^+$), cujo espectro de massas *full scan* em ampliação.

A curva de calibração obtida para a piptocarфина A (**1**) (Figura 16) é representada pela equação $y=9,1823x+4093,9$, em que o coeficiente de correlação (r) de 0,9958 e coeficiente de determinação (R^2) de 0,9910 confirma a linearidade dentro da faixa de 30–15.000 ng/g.

Figura 16 – Curva de calibração para piptocarфина A (**1**) em função de Área vs Concentração.



A partir da equação de reta foi possível calcular o teor de piptocarфина A (**1**) (expresso em $\mu\text{g/g}$ de folha seca) nas diferentes preparações, cujos valores são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Teor de piptocarфина A (**1**) nas diferentes preparações derivadas da otimização do processo extrativo por lavagem foliar a partir da espécie *V. tweediana*.

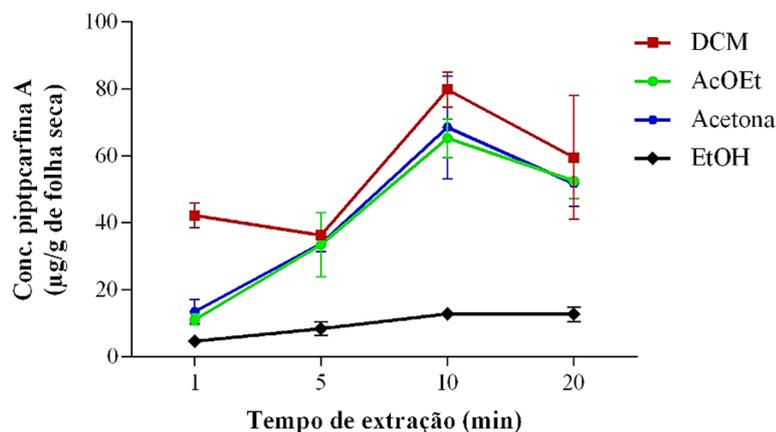
Tempo de extração (min)	Líquido extrator			
	DCM	AcOEt	Acetona	EtOH
1	42,17 ± 2,77	11,08 ± 1,26	13,42 ± 2,74	4,65 ± 0,43
5	36,29 ± 0,87	33,41 ± 6,65	33,81 ± 1,96	8,34 ± 1,45
10	79,75 ± 3,74	65,28 ± 4,42	68,51 ± 10,82	12,77 ± 0,72
20	59,50 ± 23,67	52,56 ± 3,86	51,69 ± 5,16	12,68 ± 1,61

Os valores foram expressos como a média \pm desvio padrão ($n=3$) de μg de piptocarфина A/g de folhas secas (corrigida pelo teor de umidade). **DCM**, diclorometano; **AcOEt**, acetato de etila; **EtOH**, etanol.

A partir da análise de variância (ANOVA) de duas vias dos valores de teor de piptocarфина A (**1**), empregando intervalo de confiança de 95%, foi possível observar que o líquido extrator ($F_{\text{calculado}(3;8)}=87,23$ [$p<0,0001$] maior que $F_{\text{crítico}}=4,07$) bem como o tempo de extração ($F_{\text{calculado}(3;24)}=64,18$ [$p<0,0001$] maior que $F_{\text{crítico}}=3,01$), ambos tiveram influência sobre a concentração de piptocarфина A (**1**), cujas contribuições para a variância total foram de 45,98% e 37,23%, respectivamente.

Conforme demonstrado na Figura 17, os maiores valores absolutos de concentração de LS são observados para o tempo de 10 minutos de extração. Este perfil que se reproduz em todos os líquidos extratores testados, sendo as extrações com DCM, AcOEt e acetona aquelas que apresentaram os maiores teores de piptocarфина A (**1**).

Figura 17 – Análise comparativa da concentração de piptocarфина A (1) entre os diferentes extratos de lavagem foliar de *V. tweedieana*, obtidos da otimização do processo extrativo.



Os valores foram expressos como a média \pm desvio padrão ($n=3$) de μg de piptocarфина A/g de folhas secas (corrigida pelo teor de umidade). **DCM**, diclorometano; **AcOEt**, acetato de etila; **EtOH**, etanol.

A análise de ANOVA de duas vias com post teste de Holm-Sidak mostrou que houve diferença significativa na concentração de piptocarфина A (1) entre os quatro tempos de extração diferentes para os líquidos extratores DCM, AcOEt e acetona. Ou seja, para os extratos preparados com DCM, apenas a comparação entre os tempos de extração de 1 e 5 minutos não mostrou diferença estatística ($p=0,3412$), sendo que as demais comparações pareadas entre os outros tempos de extração variaram entre si (valores entre $p=0,0171$ a $p>0,0001$). Para os ELF preparados com AcOEt e acetona, houveram diferenças significativas em todas as comparações pareadas entre os diferentes tempos de extração, cujos valores de significância variaram entre $p=0,0463$ e $p<0,0001$ para os extratos de AcOEt, e entre $p=0,0138$ e $p<0,0001$ para os extratos de acetona. Por outro lado, não foram observadas diferenças significativas (valores de p entre 0,9883 e 0,7230) no teor de piptocarфина A (1) entre os tempos de extração quando o EtOH foi empregado como líquido extrator.

Em relação a comparação entre os diferentes líquidos extratores utilizados para cada tempo de extração, com exceção do tempo de 1 minuto, para os demais tempos de extração (5, 10 e 20 minutos) houveram diferenças significativas apenas nas comparações pareada entre o EtOH com os outros líquidos extratores ($p<0,001$). Considerando, por exemplo, somente os dados de concentração de piptocarфина A (1) para o tempo de extração de 10 minutos, por serem os maiores valores observados, a ANOVA de duas vias com post teste de Holm-Sidak mostrou não haver diferença significativa na comparação pareada entre os extratos preparados com DCM, AcOEt e acetona (valores de significância entre $p=0,5932$ e $p=0,0629$).

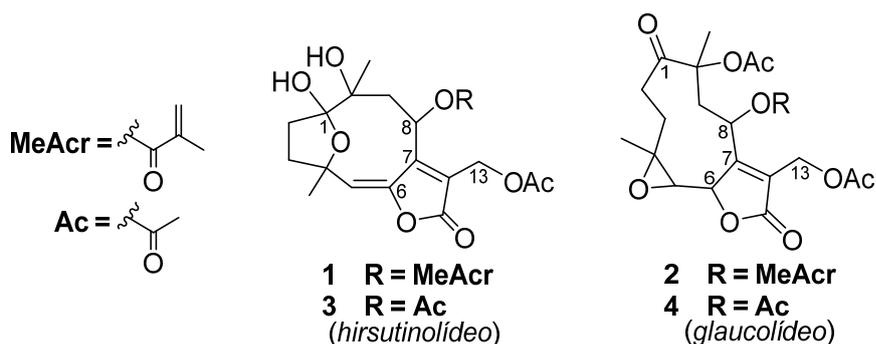
Embora os maiores rendimentos tenham sido observados para o maior tempo de extração (20 minutos), o aumento no rendimento de extração observado para o tempo 20

minutos em comparação ao tempo 10 minutos, sem o correspondente aumento na concentração da LS marcador, pode representar uma redução na seletividade de extração dos constituintes de interesse. Nesse caso, com o tempo de extração de 20 minutos e maior exposição/contato com o solvente deve estar favorecendo a solvatação de metabólitos contidos nos tecidos vegetais mais internos das folhas (OLIVEIRA et al., 2016) ou ainda uma extração mais ampla de outros metabólitos presentes na superfície foliar, tais como triterpenos, flavonoides, compostos fenólicos e ceras epicuticulares (LUSA; DA COSTA; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, 2016).

Portanto, considerando-se a avaliação combinada dos dados de rendimento de extração e de concentração de LS em função da piptocarфина A (**1**), somado ao fato da acetona apresentar uma menor toxicidade como solvente em relação à DCM e AcOEt (TEAF, 2000; VELLASCO JUNIOR, 2011; CHAZIN, 2012), selecionou-se como condições ótimas para a extração de LS pela técnica de lavagem foliar o uso da acetona como líquido extrato durante um tempo de extração de 10 (dez) minutos.

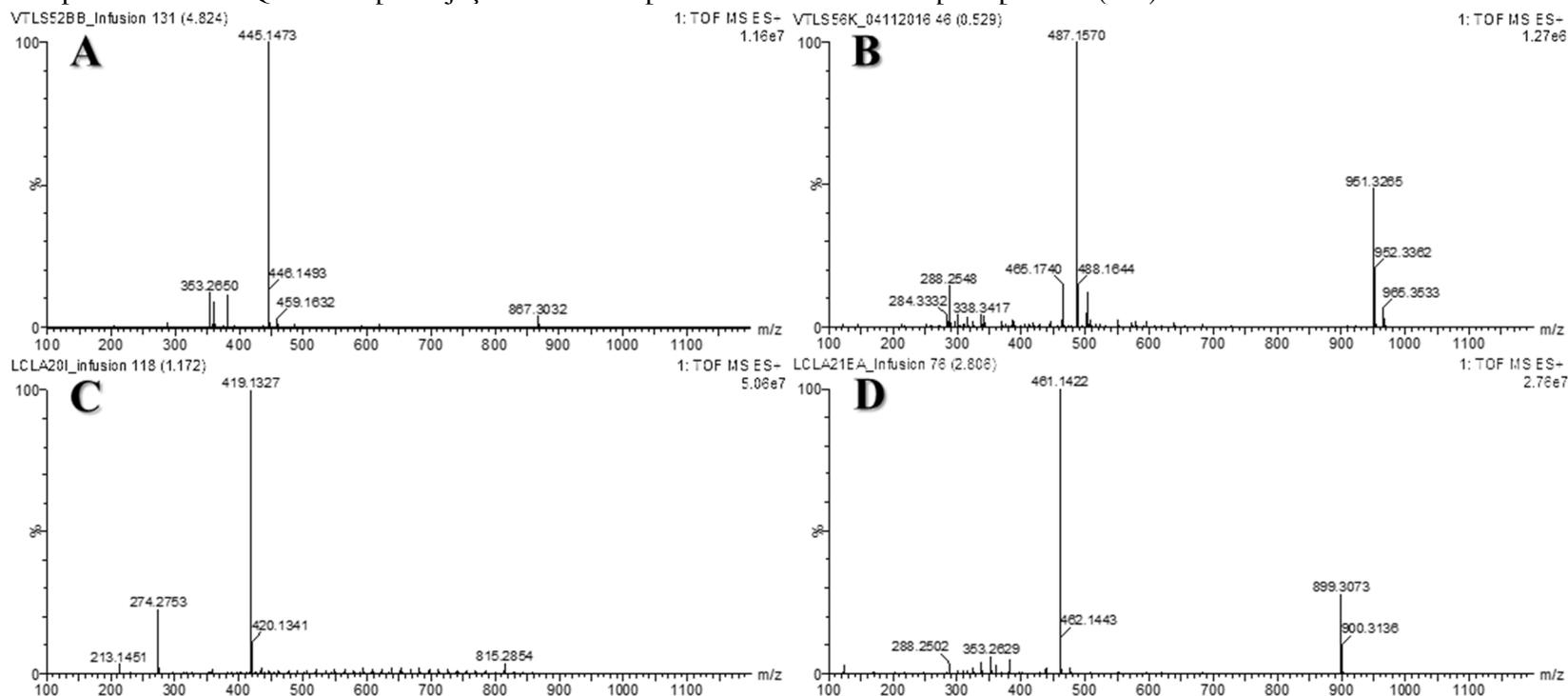
5.3 CARACTERIZAÇÃO DE LACTONAS SESQUITERPÊNICAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO E ANÁLISE DE RESPREPLICAÇÃO DO EXTRATO OTIMIZADO DE *Vernonanthura tweediana*

5.3.1 Caracterização das lactonas sesquiterpênicas do tipo hirsutinolídeo e glaucolídeo por espectrometria de massa de alta resolução (EMAR)



Assim como observado na Figura 18 e descrito na Tabela 4, as análises de injeção direta por ESI-QToF EM indicaram que as LS **1-4** forneceram os íons de pico base nos espectros EM com m/z 445,1473 (**1**), m/z 487,1570 (**2**), m/z 419,1327 (**3**) e m/z 461,1422 (**4**), correspondendo ao $[M+Na]^+$ e sugeriram uma forte afinidade com Na^+ . Além disso, os íons protonados $[M+H]^+$ não foram detectados para LS do tipo hirsutinolídeo (compostos **1** e **3**), enquanto que os íons $[M+H]^+$ foram observados com uma abundância extremamente baixa para os glaucolídeo **2** (m/z 465,1740; 15%) e **4** (m/z 439,1620; 2%).

Figura 18 – Espectros de ESI-QToF EM por injeção direta dos padrões de lactonas sesquiterpênicas (1-4).



Espectros ESI-EM de A, piptocarfin A (1); B, glaucolídeo A (2); C, diacetilpiptocarfol (3); D, glaucolídeo B (4). Condições analíticas vide item 4.2.2.1.2

Tabela 4 – Dados de ESI-QToF EM por injeção direta e combinada dos padrões (1-4) de lactonas sesquiterpênicas.

Padrão	Fórmula molecular	Modo de injeção	Aduto [M+H] ⁺		Aduto [M+Na] ⁺		Íons <i>m/z</i> relevantes observados no espectro EM (abundância relativa, %)
			<i>m/z</i> experimental (abundância relativa, %)	Erro (ppm)	<i>m/z</i> experimental (abundância relativa, %)	Erro (ppm)	
Piptocarfin A (1) ^a	C ₂₁ H ₂₆ O ₉	Direto	n.d.	-	445.1473 (pb)	-0.4	461.1249 (1) [M+K] ⁺
		Combinado	423.1667 (4)	2.8	445.1462 (52)	-2.9	405.1560 (pb) [M+H-H ₂ O] ⁺ ; 461.1275 (60) [M+K] ⁺
Glaucolídeo A (2) ^b	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₀	Direto	465.1740 (15)	-4.5	487.1570 (pb)	-2.1	503.1338 (12) [M+K] ⁺
		Combinado	465.1740 (pb)	-4.5	487.1570 (39)	-2.1	503.1292 (29) [M+K] ⁺
Diacetilpiptocarfol (3) ^a	C ₁₉ H ₂₄ O ₉	Direto	n.d.	-	419.1327 (pb)	2.1	435.1076 (2) [M+K] ⁺
		Combinado	397.1498 (1)	-0.3	419.1327 (65)	2.1	379.1410 (pb) [M+H-H ₂ O] ⁺ ; 435.1033 (13) [M+K] ⁺
Glaucolídeo B (4) ^b	C ₂₁ H ₂₆ O ₁₀	Direto	439.1620 (2)	3.6	461.1422 (pb)	-0.4	477.1181 (2) [M+K] ⁺
		Combinado	439.1620 (pb)	3.6	461.1422 (17)	-0.4	477.1181 (6) [M+K] ⁺

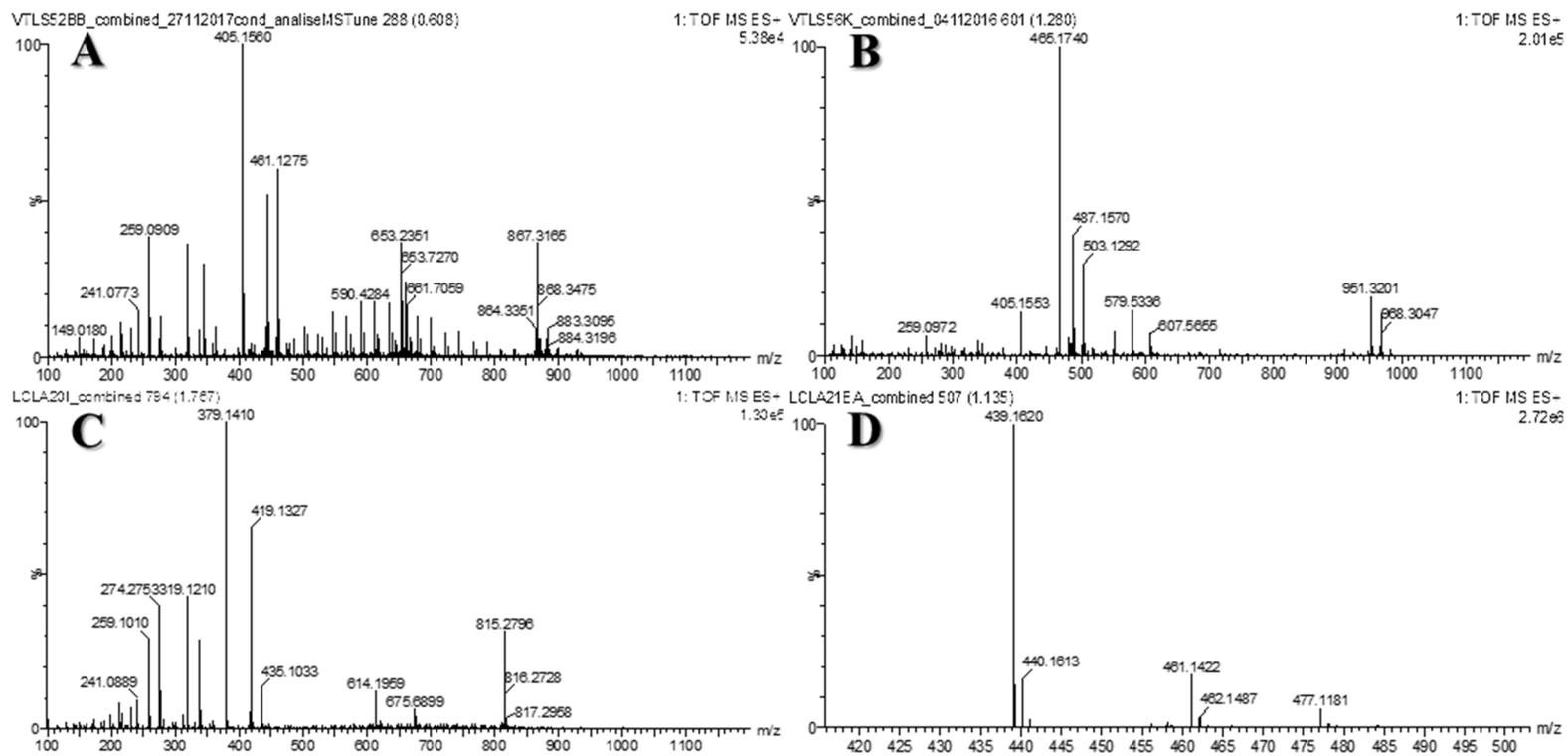
^a, LS do tipo hirsutinolídeo; ^b, LS do tipo glaucolídeo; **n.d.**, não detectado; **pb**, pico base (abundância relativa de 100%).

Os adutos cationizados de sódio $[M+Na]^+$ geralmente se formam em análises ESI-EM devido à presença do sódio na fase móvel (na ordem de 0,01-0,1 mM) como impurezas nos solventes da fase móvel (mesmo em HPLC grau) (CECH; ENKE, 2001; KOSTIAINEN; KAUPPILA, 2009; DIAS; DE MELO; CROTTI, 2012). A formação destes cátions usualmente sugere uma alta afinidade à grupos hidrofóbicos e à compostos ricos em átomos com pares não ligantes de elétrons (como Oxigênio e Nitrogênio) (KRUBE; KAUPMEES, 2017; YAMAGAKI; MAKINO, 2017). Os adutos de sódio pode levar à alguns inconvenientes durante as análises de EM devido à sua variação de intensidade nos espectros e a um perfil fragmentação pobre (mesmo com um energia de colisão maior de 40 eV) (KRUBE et al., 2013; HEILING et al., 2016; PAUK et al., 2017; YANG et al., 2017). De fato, usando apenas o modo de injeção direta, a tentativa de fragmentação dos íons $[M+Na]^+$ das LS **1-4** foi falha, fornecendo um número restrito de íons fragmento em seus espectros de EM/EM.

Devido a esta limitação na análise de fragmentação EM/EM para os padrões LS, a ausência do íon protonado dos hirsutinolídeos **1** e **3**, e a baixa intensidade do íon $[M+H]^+$ para os glaucolídeos **2** e **4**, uma abordagem diferente foi necessária. Assim, a fim de se reduzir a formação de adutos de sódio e promover uma melhor ionização com hidrogênio nas análises de EM/EM de **1-4**, a estratégia de injeções combinadas foi utilizada, cujo procedimento consistiu na injeção simultânea da solução de LS (20 μ L/min) e uma mistura isocrática (0,4 mL/min) de solução aquosa de ácido fórmico a 0,1% e acetonitrila (95/5, v/v) a partir do sistema CLUE. O uso de uma fase móvel aquosa ou tamponada (cuja concentração dos modificantes abaixo de 10 mM) pode minimizar a formação de adutos de sódio e contribuir para a melhora na fragmentação, sendo os aditivos mais utilizados em ionizadores do tipo ESI os ácidos fórmico, acético e oxálico, bem como hidróxido, acetato e formiato de amônio (KOSTIAINEN; KAUPPILA, 2009; YANG et al., 2013; KRUBE; KAUPMEES, 2017).

Os dados da análise de ESI-QToF EM realizada por infusão combinada (Tabela 4, Figura 19) revelaram uma diminuição da abundância relativa do íon $[M+Na]^+$ para os glaucolídeos **2** (m/z 487,1570, 39%) e **4** (m/z 461,1422, 17 %) e um aumento do seus íons $[M+H]^+$ (100%) (m/z 465,1740 e m/z 439,1620, respectivamente para **2** e **4**). Por outro lado, ambos os hirsutinolídeos **1** (m/z 445,1473, 52%) e **3** (m/z 419,1327, 65%) mantiveram permanentemente o íon $[M+Na]^+$ mais intenso que a entidade protonada $[M+H]^+$ para **1** (m/z 423,1667, 4%) e para **3** (m/z 397,1498, 1%) (Tabela 4). Além disso, para melhor compreender a origem dos íons de pico de base em m/z 405,1560 para **1** e m/z 379,1410 para **3**, diferentes condições experimentais foram testadas. Os parâmetros incluindo a tensão capilar de 2 kv, temperatura de dessolvatação de 120 °C e temperatura do cone de 70 °C, levaram a uma detecção fraca de íons $[\text{hirsutinolídeos}+H]^+$.

Figura 19 – Espectros de ESI-QToF EM por injeção combinada dos padrões de lactonas sesquiterpênicas (1-4).



Espectros ESI-EM de **A**, piptocarфина A (1); **B**, glaucolídeo A (2); **C**, diacetilpiptocarfol (3); **D**, glaucolídeo B (4). Condições analíticas vide *item 4.2.2.1.2*.

Estes achados sugerem que os íons produtos m/z 405,1560 (a partir de **1**) e m/z 379,1410 (a partir de **3**) foram produzidos a partir da perda de H₂O (18 Da) do aduto protonado [hirsutinolídeos+H-H₂O]⁺ e são mais estáveis que seus íons precursores. Esta característica de massa em tandem é comumente encontrada e representa um dos íons fragmento mais abundantes em experimentos de ESI-EM, o qual gerado a partir da perda de água por fragmentação na fonte de ionização [M+H-H₂O]⁺ (VARGHESE et al., 2012; XU; LU; RABINOWITZ, 2015; GIRARDI et al., 2016; KIND et al., 2017).

Diante dessas observações, afim de se conhecer melhor o perfil de massas de ambos os subtipos hirsutinolídeo e glaucolídeo, as LS isoladas (**1-4**) foram submetidas à análise ESI-QToF EM/EM (Tabela 5) e o comportamento de massa em tandem foi utilizado para propor o padrão de fragmentação de ambos os esqueletos, o qual pode ser empregado como *fingerprint* para a caracterização por EMⁿ de hirsutinolídeos e glaucolídeos.

Tabela 5 – Dados de ESI(+)-QToF EM/EM para os padrões de lactonas sesquiterpênicas (**1-4**).

Padrão	Íon precursor m/z	Fragmentos m/z de EM/EM (abundância relativa, %)
1	445,14 [C ₂₁ H ₂₆ O ₉ +Na] ⁺ ^a	359,1028 (pb); 317,0971 (20); 299,0870 (48); 277,1104 (9); 259,0880 (20); 241,0866 (32); 231,1097 (32); 217,0970 (41); 213,1005 (48); 199,0902 (35); 189,0984 (20); 185,1107 (39); 173,0716 (23); 171,0937 (28); 161,1073 (16); 143,1027 (12)
2	465,17 [C ₂₃ H ₂₈ O ₁₀ +H] ⁺	405,1563 (6); 379,1387(6); 363,1421 (5); 345,1337 (8); 337,1233 (3); 319,1185 (3); 277,1104 (15); 259,0945 (pb); 241,0866 (14); 231,1035 (30); 217,0850 (7); 213,0945 (18); 203,1083 (7); 199,0787 (4); 189,0590 (39); 185,0968 (8); 173,0635 (7); 171,0830 (3); 161,0605 (4); 155,0704 (3)
	487,15 [C ₂₃ H ₂₈ O ₁₀ +Na] ⁺	427,1398 (14); 401,1144 (8); 359,1067 (27); 341,1016 (20); 299,0834 (21); 277,1138 (51); 259,0945 (67); 241,0898 (24); 231,1035 (pb); 217,0880 (69); 213,0945 (74); 203,0995 (54); 199,0845 (29); 189,0956 (68); 185,0968 (61); 173,0662 (78); 171,0857 (24); 161,0995 (34); 143,0904 (12)
3	419,13 [C ₁₉ H ₂₄ O ₉ +Na] ⁺ ^a	359,0999 (pb); 317,0962 (17); 299,0920 (44); 277,1113 (15); 259,0977 (27); 241,0952 (29); 231,1040 (41); 217,0963 (59); 213,1003 (56); 199,0832 (38); 189,1097 (31); 185,1114 (39); 173,0738 (31); 171,1015 (34); 161,1110 (23); 143,1085 (17)
4	439,16 [C ₂₁ H ₂₆ O ₁₀ +H] ⁺	397,1253 (5); 379,1091 (7); 337,1234 (21); 319,1137 (7); 309,1260 (12); 277,1079 (27); 259,1010 (pb); 241,0920 (13); 231,1071 (22); 217,1023 (6); 213,1033 (17); 203,1211 (6); 199,0919 (5); 189,0704 (43); 185,1114 (7); 173,0792 (8); 171,0988 (4); 161,0798 (5); 155,0876 (5)
	461,14 [C ₂₁ H ₂₆ O ₁₀ +Na] ⁺	401,1220 (19); 359,1270 (18); 341,1125 (18); 299,1097 (23); 277,1283 (42); 259,1373 (49); 241,1175 (23); 231,1226 (pb); 217,1144 (53); 213,1272 (67); 203,1415 (67); 199,1034 (25); 189,1322 (61); 185,1336 (62); 173,0899 (74); 171,1122 (25); 161,1317 (37); 143,1232 (24)

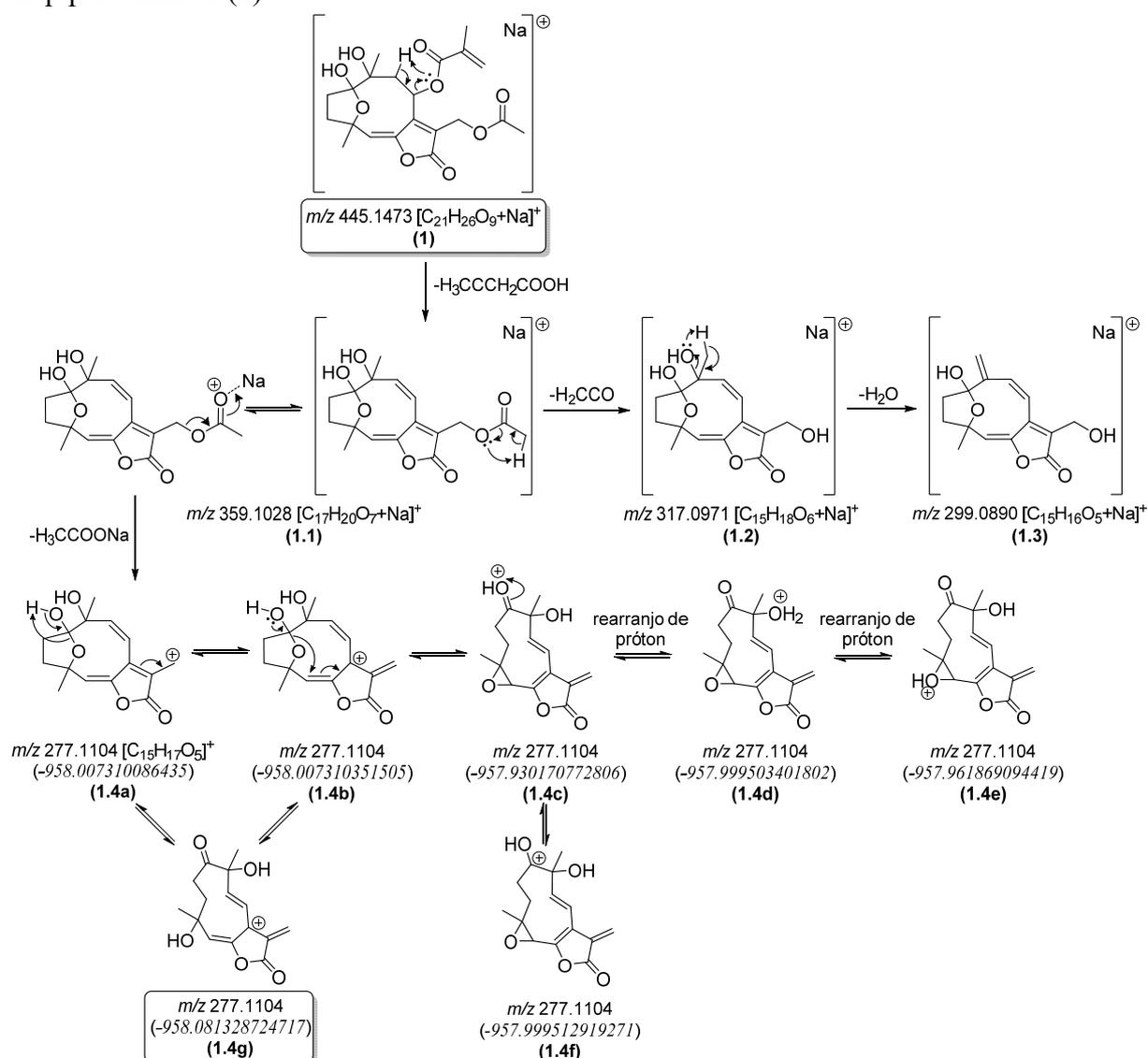
^a, Apenas o aduto de Na⁺ foi selecionado para a fragmentação EM/EM uma vez que respectivo aduto de H⁺ apresentou uma intensidade muito baixa; **pb**, pico base (abundância relativa de 100%).

Assim, a piptocarфина A (**1**, hirsutinolídeo) e o glaucolídeo A (**2**, glaucolídeo) foram selecionados como modelos para propor o perfil de fragmentação dos dois subtipos de LS,

enquanto que os dados de EM/EM do diacetilpiptocarfol (**3**, hirsutinolídeo) e do glaucolídeo B (**4**, glaucolídeo) foram usados posteriormente para sustentar a proposta do perfil já mencionado.

A via de fragmentação proposta para a piptocarфина A (**1**, m/z 445,14 $[M+Na]^+$) a partir está proposta no Esquema 16. Baseado na fragmentação com retenção da carga, os fragmentos m/z 359,1028 $[C_{17}H_{20}O_7+Na]^+$, m/z 317,0971 $[C_{15}H_{18}O_6+Na]^+$ e m/z 299,0890 $[C_{15}H_{16}O_5+Na]^+$ foram respectivamente gerados a partir da perda de ácido metacrílico (MeacrOH, 86 Da), seguido pela sucessiva eliminação da ceteno (42 Da) e H_2O (18 Da). Sob as condições analíticas, o fragmento m/z 359 foi identificado como sendo o pico base.

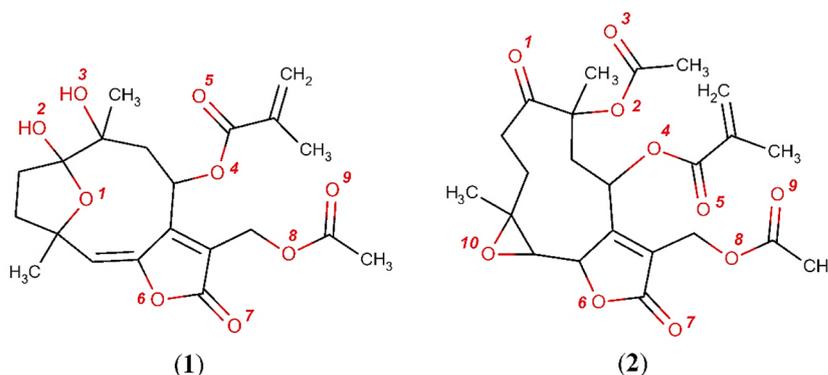
Esquema 16 – Mecanismo de fragmentação proposto para o íon adutado com sódio $[M+Na]^+$ da piptocarфина A (**1**).



Valores de energia eletrônica (expressa em hartree) para as espécies isoméricas do fragmento m/z 277 (itálico).

A fim de definir a possível localização da interação Na^+ com a piptocarфина A (**1**), realizou-se uma simulação de dinâmica molecular atomística. As funções de distribuição radial (FDR) do Na^+ em relação aos átomos de oxigênio em **1** (Figura 20) foram calculadas.

Figura 20 – Representação esquemática das estruturas 2D para piptocarфина A (**1**) e glaucolídeo A (**2**) com oxigênios numerados, usado nas simulações de dinâmica molecular atomística



As funções de distribuição radial (FDR), representadas como $g(r)$, descrevem a probabilidade de encontrar uma dada partícula, nesse caso o Na^+ , a uma determinada distância de uma partícula de referência, aqui medidos em relação ao átomos de oxigênio das LS. Os perfis FDR de obtidos de Na^+ em relação aos diferentes átomos de oxigênio da piptocarфина A (**1**), avaliados em duas temperaturas diferentes 298 K e 473 K e a pressão de 1 atm, mostraram apenas um pico amplo com máximos de distribuição (r) localizado em torno de 1,53 a 1,82 nm (r) e os correspondentes valores de $g(r)$ variaram em torno de 1,20-1,30.

Ao aumentar a temperatura de 298 K para 473 K, esse pico foi ligeiramente desviado para a direita com os valores máximos de desvio, revelando o efeito direto da temperatura na distribuição de Na^+ em torno dos átomos de oxigênio de **1**. As médias dos valores mais altos de $g(r)$ e máximos (r) correspondentes para o composto **1** são apresentados na Tabela 6.

Vale ressaltar que foi observado um pico acentuado muito alto para a $g(r)$ de Na^+ em relação ao O-9 do composto **1**, que estava ocupando um grupo muito flexível na molécula que provavelmente se aproximou do Na^+ durante a simulação, embora essa interação não tenha durado muito. O pico acentuado localizado a 1,20 nm forneceu um grande valor de $g(r)$ 1,14 e correspondeu $g(r)$ da relação entre Na^+ e O-9.

O valor do raio entre Na^+ e O-9 indica que este oxigênio que está mais próximo do Na^+ em relação aos outros oxigênios presentes no composto **1**.

Tabela 6 – Valores máximos médios de distribuição e de função de distribuição radial do Na⁺ em relação aos átomos de oxigênio da piptocarфина A (1) e glaucolídeo A (2).

Nº	Piptocarфина A (1)				Glaucolídeo A (2)			
	Em 298 K		Em 473 K		Em 298 K		Em 473 K	
	r (nm)	g(r)	r (nm)	g(r)	r (nm)	g(r)	r (nm)	g(r)
O-1	1,65±0,06	1,22±0,01	1,68±0,11	1,27±0,02	1,49±0,19	1,33±0,02	1,61±0,17	1,33±0,01
O-2	1,55±0,09	1,20±0,01	1,72±0,08	1,26±0,01	1,54±0,18	1,33±0,03	1,59±0,24	1,32±0,01
O-3	1,53±0,11	1,26±0,01	1,82±0,04	1,24±0,02	1,52±0,13	1,31±0,01	1,64±0,25	1,38±0,03
O-4	1,69±0,05	1,26±0,01	1,61±0,11	1,26±0,01	1,59±0,05	1,40±0,04	1,69±0,02	1,34±0,01
O-5	1,65±0,12	1,28±0,03	1,57±0,18	1,22±0,01	1,75±0,02	1,34±0,02	1,52±0,13	1,41±0,03
O-6	1,55±0,04	1,25±0,02	1,62±0,10	1,25±0,04	1,45±0,04	1,41±0,07	1,66±0,16	1,30±0,01
O-7	1,65±0,04	1,30±0,02	1,69±0,14	1,27±0,01	1,62±0,10	1,32±0,02	1,42±0,24	1,36±0,05
O-8	1,65±0,02	1,25±0,01	1,74±0,06	1,23±0,01	1,58±0,15	1,36±0,02	1,81±0,05	1,37±0,03
O-9	1,20±0,68	1,14±0,16	1,26±0,71	1,18±0,10	0,25±0,01	2,20±0,17	0,25±0,01	1,76±0,37
O-10	-	-	-	-	1,60±0,03	1,35±0,04	1,46±0,16	1,37±0,04

Os valores foram expressos pela média ± desvio padrão (n=3) para os máximos de distribuição (r) em nanômetros, e para função distribuição radial g(r).

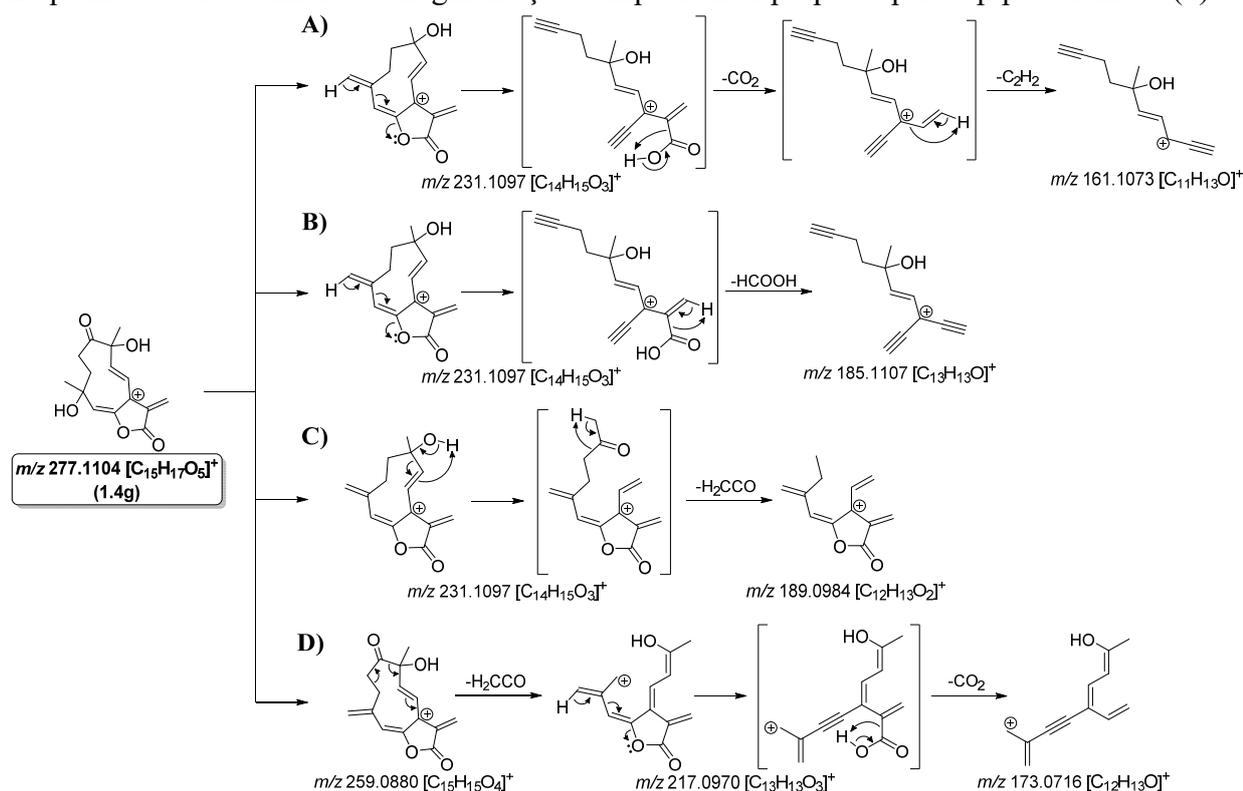
Guiado pelos dados computacionais da simulação de dinâmica molecular que permitiram assumir a localização do íon de sódio no grupo acetoxi C-13 e com base em uma fragmentação de migração de carga, uma perda neutra de acetato de sódio (82 Da, H₃CCOONa) por simples clivagem indutiva do fragmento *m/z* 359 foi observada, produzindo o íon *m/z* 277,1104 [C₁₅H₁₇O₅]⁺. Embora incomum, a perda neutra de moléculas de sódio na fragmentação de íons [M+Na]⁺ já foi recentemente demonstrada em ESI-EM (CHAI et al., 2017). Essa perda de H₃CCOONa também corroborou as simulações de dinâmica molecular, que mostraram uma forte proximidade entre Na⁺ e O-9.

Diferentes isômeros foram propostos para o fragmento *m/z* 277 (formado a partir de uma perda neutra de acetato de sódio), os quais foram investigados quanto a sua estabilidade em termos de energia eletrônica (Esquema 16). Todos os isômeros propostos foram obtidos pela migração de carga com consequentemente deslocamento da ligação π, e por vezes também pelo deslocamento-1,3 de hidrogênio (a partir da hidroxila em C-1), com rearranjo de ligação σ para a abertura do anel de tetrahidrofurano.

A distribuição da energia eletrônica de Boltzmann foi definida para os isômeros **1.4a-1.4g** do fragmento *m/z* 277, apresentados no Esquema 16, nas diferentes temperaturas de 25, 50, 400 e 800 °C. Uma vez que todos são isômeros, fica claro que a espécie **1.4g** tem a menor energia eletrônica (-958.081328724717 hartree), sendo predominante em todas as temperaturas.

Posteriormente, a partir do isômero mais estável (**1.4g**) do íon *m/z* 277 foi proposto um padrão de fragmentação adicional de piptocarфина A (1) (Esquema 17).

Esquema 18 – Mecanismo de fragmentação complementar proposto para a piptocarфина A (1).



A partir de m/z 231, (A) perda de CO_2 e abertura de anel seguida de perda de C_2H_2 por rearranjo-1,3 de hidrogênio; (B) perda de ácido fórmico $[HCOOH]$ seguida de rearranjo-1,3 de hidrogênio e abertura de anel; (C) perda de ceteno $[H_2CCO]$ por dois rearranjos-1,3 de hidrogênio sucessivos com abertura de anel; e a partir de m/z 259, (D) perda de ceteno por reação de deslocamento com migração de carga e abertura de anel, seguida por rearranjo-1,3 de hidrogênio com perda de CO_2 .

O Esquema 19 mostrou o mecanismo de fragmentação proposto para o glaucolídeo A (2) a partir dos íons precursores m/z 487,15 $[M+Na]^+$ e m/z 465,17 $[M+H]^+$.

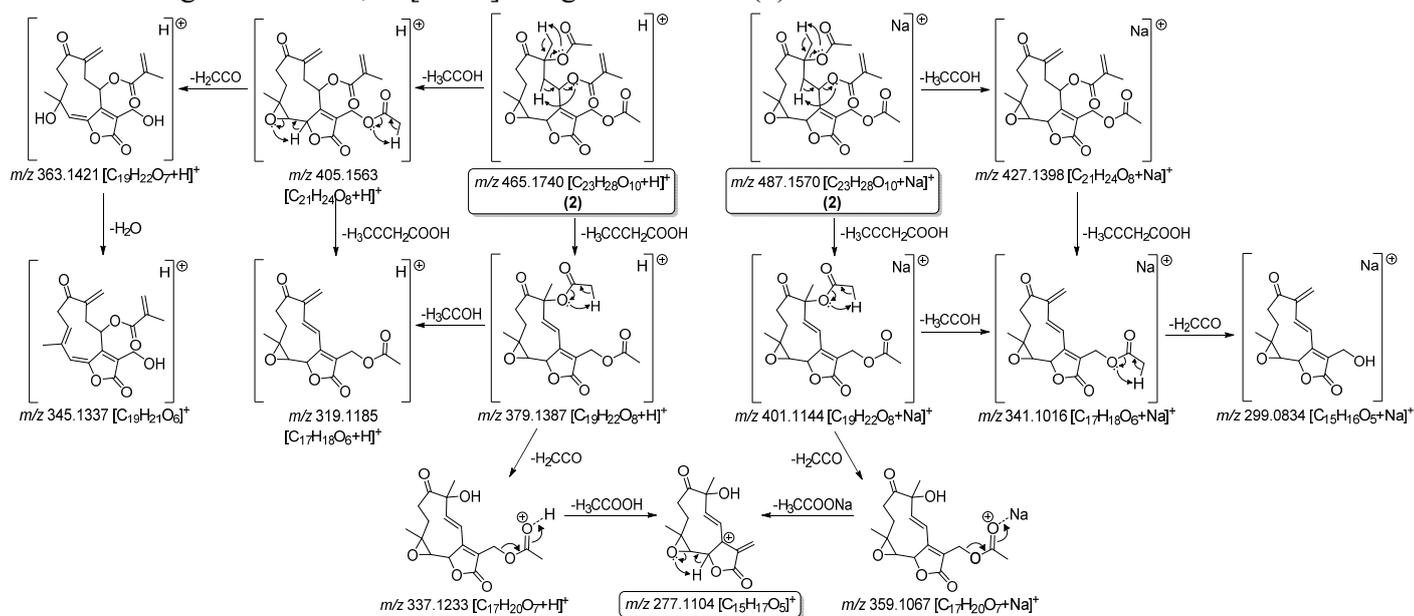
Assim, o íon m/z 487,15 $[M+Na]^+$ forneceu, a partir de rearranjos de hidrogênio na fragmentação com retenção da carga, os fragmentos m/z 427,1398 $[C_{21}H_{24}O_8+Na]^+$, m/z 401,1144 $[C_{19}H_{22}O_8+Na]^+$, m/z 359,1067 $[C_{17}H_{20}O_7+Na]^+$, m/z 341,1016 $[C_{17}H_{18}O_6+Na]^+$ e m/z 299,0834 $[C_{15}H_{16}O_5+Na]^+$. Esses íons fragmentos foram formados respectivamente, pela perda de AcOH (60 Da), MeacrOH (86 Da), MeacrOH (86 Da) mais ceteno (42 Da), AcOH (60 Da) mais MeacrOH (86 Da) e AcOH (60 Da) mais MeacrOH (86 Da) e AcOH (60 Da) mais MeacrOH (86 Da) mais ceteno (42 Da).

Como ocorreu com a LS do tipo hirsutinolídeo, a perda neutra de acetato de sódio (82 Da) a partir do fragmento m/z 359 foi observada por meio da clivagem indutiva simples na fragmentação com migração da carga, produzindo o fragmento m/z 277,1104 $[C_{15}H_{17}O_5]^+$.

Assim como para o composto 1, as interações entre glaucolídeo A (2) e o Na^+ foram estudadas por simulações de dinâmica molecular atomística e também revelaram um pico agudo muito alto relacionado à forte proximidade de Na^+ e o O-9, com o valor do raio de 0,25 nm em

ambas as temperaturas de 298 K e 473 K, conforme ilustrado na Figura 21 e Tabela 6. Logo, para ambas as estruturas (**1** e **2**), o O-9 mostrou a interação mais forte com Na⁺, suportando a perda de acetato de sódio localizado em C-13 do anel lactônico.

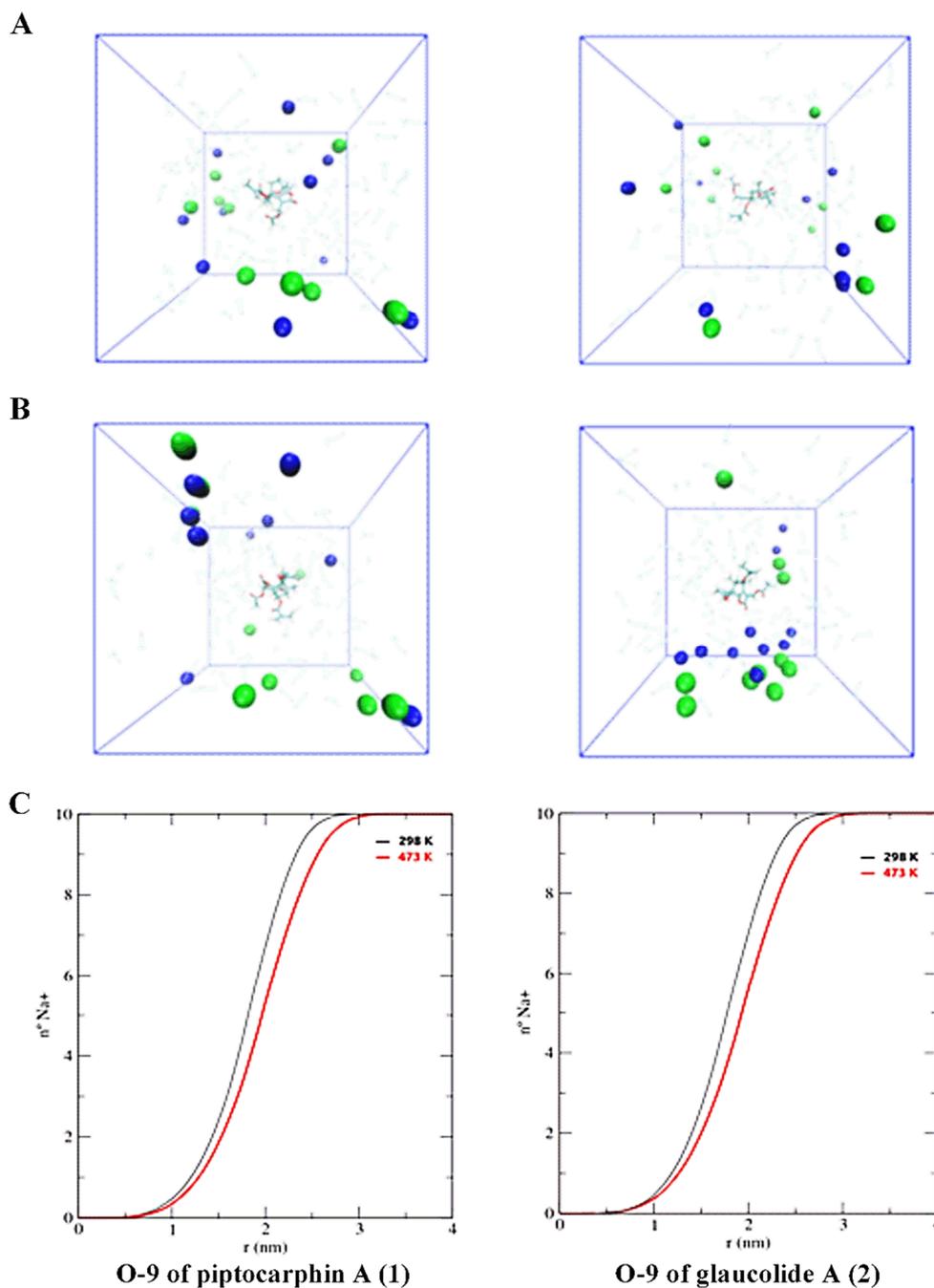
Esquema 19 – Mecanismo de fragmentação proposto para os íons adutados com sódio m/z 487,15 [M+Na]⁺ e com hidrogênio m/z 465,17 [M+H]⁺ do glaucolídeo A (**2**).



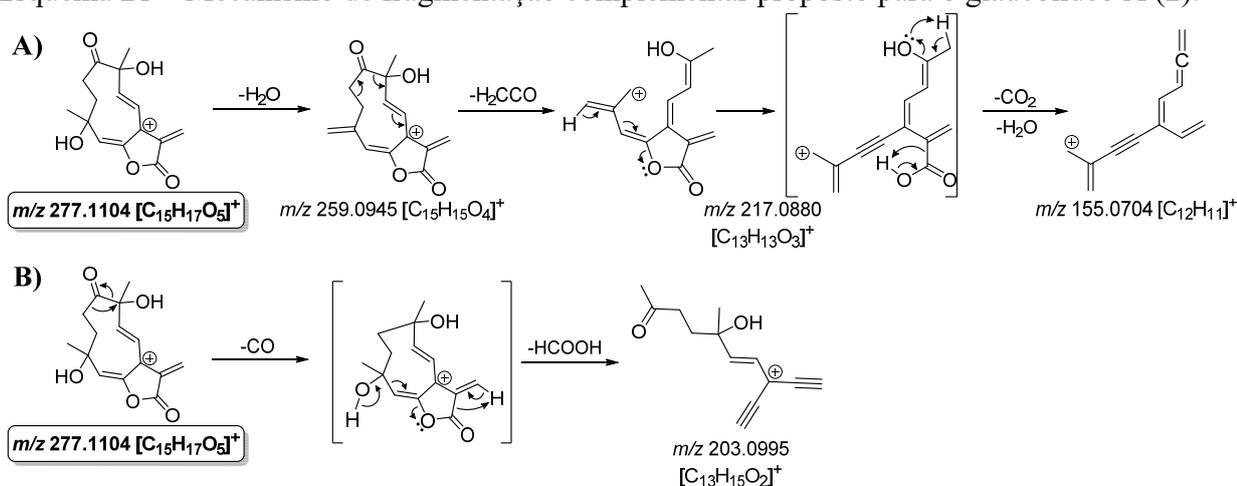
A partir do íon m/z 465,17 [M+H]⁺ do composto **2**, as mesmas perdas de AcOH (60 Da), MeacrOH (86 Da), MeacrOH (86 Da) mais ceteno (42 Da) e AcOH (60 Da) mais MeacrOH (86 Da) foram observadas, gerando m/z 405,1563 [C₂₁H₂₄O₈+H]⁺, m/z 379,1387 [C₁₉H₂₂O₈+H]⁺, m/z 337,1233 [C₁₇H₂₀O₇+H]⁺ e m/z 319,1185 [C₁₇H₁₈O₆+H]⁺, respectivamente. Além disso, a partir de m/z 405 os fragmentos m/z 363,1421 [C₁₉H₂₂O₇+H]⁺ e m/z 345,1337 [C₁₉H₂₁O₆]⁺ foram produzidos, respectivamente, pela eliminação de ceteno (42 Da) e por ceteno (42 Da) mais H₂O (18Da) por rearranjo de hidrogênio com a abertura do anel epóxido. Adicionalmente, m/z 337 eliminou AcOH (60 Da) por meio da clivagem indutiva simples na fragmentação com migração da carga, resultando no fragmento m/z 277,1104 [C₁₅H₁₇O₅]⁺.

É importante mencionar que a estrutura do fragmento m/z 277,1104 observada para o glaucolídeo A (**2**) é praticamente a mesma identificada para a LS do tipo hirsutinolídeo, cuja única diferença é a presença de um anel epóxido em C-4/C-5. Este anel oxirano pode ser facilmente aberto pelo rearranjo de hidrogênio em C-6 com consequente formação da função hidroxila em C-4 e de uma ligação π em C-5/C-6 para gerar o mesmo fragmento **1.4g** de m/z 277 (Esquema 19). Assim, sugere-se a estrutura m/z 277 como um fragmento comum no processo de fragmentação tanto das LS do tipo hirsutinolídeo quanto do tipo glaucolídeo.

Figura 21 – Representação ilustrativa das simulações de dinâmica molecular atomística na avaliação da interação entre o Na^+ e as LS piptocarфина A (1) e glaucolídeo A (2).



(A) Registro instantâneo da simulação em 100 ns com a piptocarфина A (1) a 298K (esquerda) e 473 K (direita), ambos em 1 atm de pressão; (B) Registro instantâneo da simulação em 100 ns com o glaucolídeo A (2) a 298 K (esquerda) e 473K (direita), ambos em 1 atm de pressão. Os íons Na^+ e Cl^- são representados por esferas azuis e verdes, respectivamente; (C) Integral das funções de distribuição radial para O-9- Na^+ na piptocarфина A (1) (esquerda) e O-9- Na^+ no glaucolídeo A (2) (direita)

Esquema 21 – Mecanismo de fragmentação complementar proposto para o glaucolídeo A (**2**).

A partir de m/z 217, (**A**) perda de CO_2 seguida de perda de H_2O ; e a partir de m/z 277, (**B**) perda de CO seguida de perda de ácido fórmico $[HCOOH]$ e abertura de anel por rearranjo-1,3 de hidrogênio.

O glaucolídeo B (**4**, glaucolídeo) apresentou quase o mesmo comportamento de massas em tandem ao observado para ambas as espécies iônicas $[M+H]^+$ e $[M+Na]^+$ a partir do glaucolídeo A (**2**) (Tabela 5). As diferenças se deram pela presença em C-8 de um grupo acetoxi em **4** em vez de um grupo metacrilóiloxi em **2**. Além dos íons fragmentos já mencionados para **2**, o espectro de EM/EM do composto **4** indicou que m/z 439,16 $[M+H]^+$ proporcionou m/z 397,1253 $[C_{19}H_{24}O_9+H]^+$ pela perda de ceteno (42 Da), e o fragmento m/z 309,1260 $[C_{16}H_{20}O_6+H]^+$ pela perda de $AcOH$ (60 Da) mais ceteno (42 Da) mais CO (28 Da). Ainda, o íon m/z 461,14 $[M+H]^+$ eliminou $AcOH$ (60 Da) para gerar o fragmento m/z 401,1220 $[C_{19}H_{22}O_8+Na]^+$.

Sob as condições analíticas, o fragmento m/z 259 foi identificado como pico base na fragmentação de massas em tandem do íon protonado $[M+H]^+$ dos glaucolídeos **2** e **4**, enquanto que para o íon adutado de sódio $[M+Na]^+$ dos mesmos compostos forneceu o fragmento m/z 231 como pico base.

O conjunto dos fragmentos m/z 277, m/z 259, m/z 241 e m/z 231 foi detectado no padrões de fragmentação de ambos os subtipos de LS, hirsutinolídeo e glaucolídeo, independentemente do íon precursor ($[M+H]^+$ ou $[M+Na]^+$). Resultados semelhantes foram relatados anteriormente (APPEZZATO-DA-GLORIA et al., 2012; MARTUCCI et al., 2014; GIRARDI et al., 2016), sugerindo estes como íons diagnósticos para a caracterização desses subtipos LS. De fato, estes achados corroboraram parcialmente com os resultados de Girardi e colaboradores (2016) que propuseram os íons m/z 299 e m/z 259 como íons diagnósticos ao núcleo de hirsutinolídeo, baseado em uma via de fragmentação diferente da proposta no presente estudo.

Apesar das semelhanças entre o padrão de fragmentação de hirsutinolídeos e glaucolídeos, a intensidade de seus íons no espectro de EM/EM (Tabela 5) pode ser usada como base para sua diferenciação. Diferenças foram observadas entre estes dois subtipos de LS em relação à abundância relativa dos fragmentos formados com a mesma energia de colisão a partir do íon precursor $[M+Na]^+$ de ambos os esqueletos. Assim, o hirsutinolídeos apresentaram maiores valores de abundância relativa para os íons com maiores valores de m/z (por exemplo, m/z 359 foi o pico base para **1** e **3**). Por outro lado, os glaucolídeos produziram íons com maiores valores de abundância relativa para aqueles com valores mais baixos de m/z (por exemplo, m/z 231 foi pico base para **2** e **4**). Vale ressaltar que a abundância relativa dos íons pode depender não apenas das complexas energias de interação, mas também da concentração de cátions na solução e do comportamento de fragmentação dos adutos na fonte de ionização (KRUIVE et al., 2013; SUGIMURA et al., 2017)

Embora as diferenças acima mencionadas tenham sido observadas nos espectros de EM/EM entre os núcleos hirsutinolídeo e glaucolídeo, uma estratégia de diferenciação destes esqueletos é necessária, especialmente considerando uma desrepliação por CLUE-EM de seus isômeros.

Modelos computacionais vêm sendo utilizados para investigar as interações físico-químicas do Na^+ com compostos orgânicos, bem como sua influência na caracterização e fragmentação dos compostos (RABUS et al., 2017; SUGIMURA et al., 2017; YANG et al., 2017). Nesse sentido, para melhor compreender as interações e afinidades do Na^+ com as LS do tipo hirsutinolídeo e o glaucolídeo, foi realizado um estudo adicional de cálculos computacionais empregando a piptocarфина A (**1**, hirsutinolídeo) e glaucolídeo A (**2**, glaucolídeo), os quais foram otimizados para sua geometria com o nível de teoria descrito no item 4.2.2.1.3. Depois de obtidas as estruturas mínimas, foram realizadas buscas conformacionais para cada composto de referência, sendo selecionados os confôrmeros (**1a**), (**1b**), (**2a**) e (**2b**) (Figura 22).

Os confôrmeros mais estáveis **1a** e **2a** foram empregados como estruturas modelo para avaliar a magnitude das interações Molécula- Na^+ . As geometrias de Guess para os complexos [piptocarфина A (**1**)- Na^+] e [glaucolídeo A (**2**)- Na^+] foram configuradas com base em mapas de potenciais eletrostáticos moleculares, conforme apresentado na Figura 23.

O mapa de potencial eletrostático de uma molécula representa as regiões onde a distribuição de cargas elétricas é intensa. Esta topografia de potencial eletrostático é particularmente usada para indicar a parte de uma molécula onde espécies eletrofílicas podem ser inicialmente atraídas.

Figure 22 – Diferenças de energia entre os dois confôrmeros mais estáveis (**1a** e **1b**) para a piptocarфина A e (**2a** e **2b**) para o glaucolídeo A, obtidos com BP86/def2-TZVP.

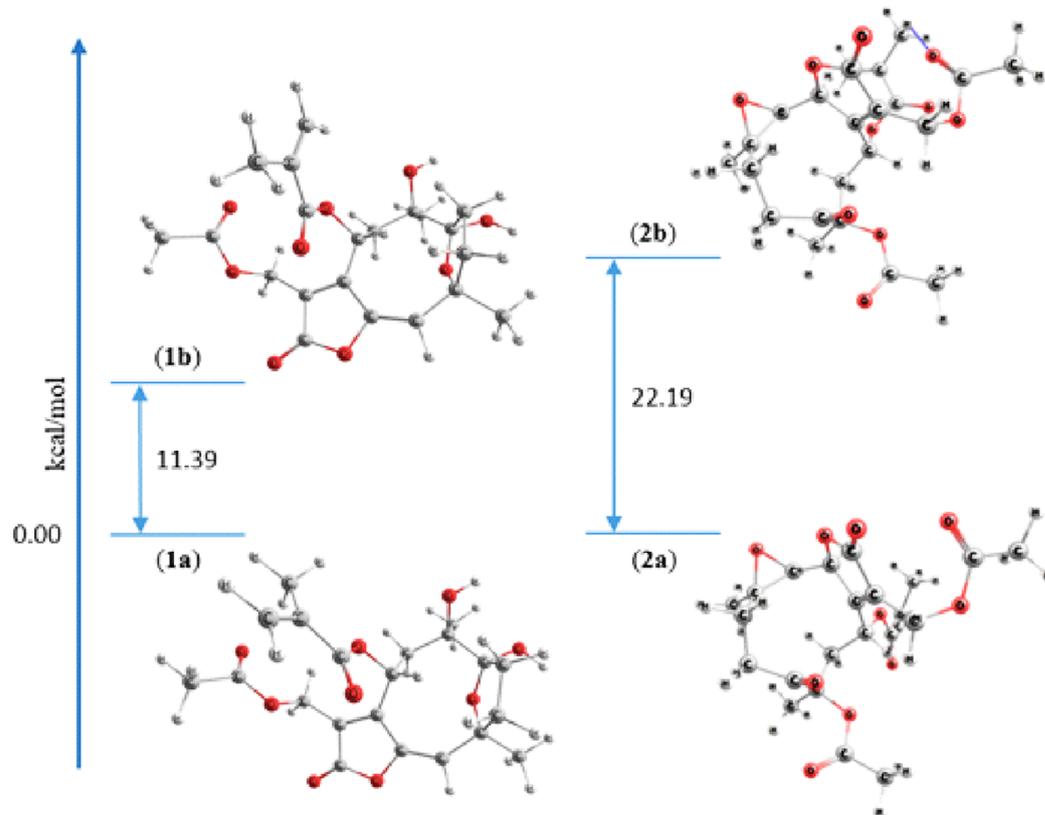
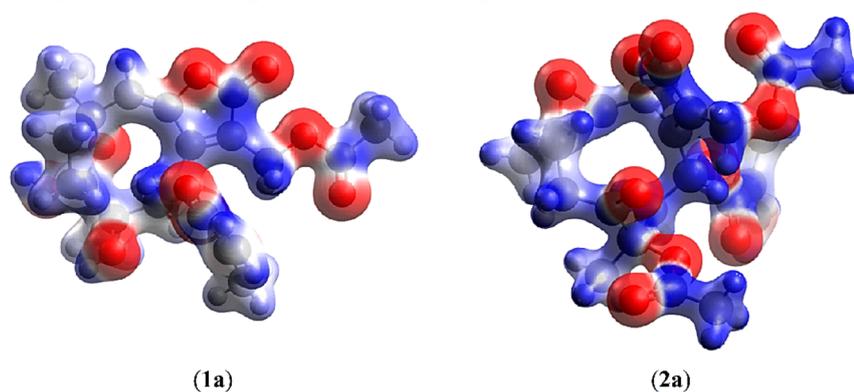


Figura 23 – Mapas de potencial eletrostático molecular dos confôrmeros **1a** e **2a** (isovalor 0,05 a.u.) a partir da piptocarфина A e glaucolídeo A, respectivamente

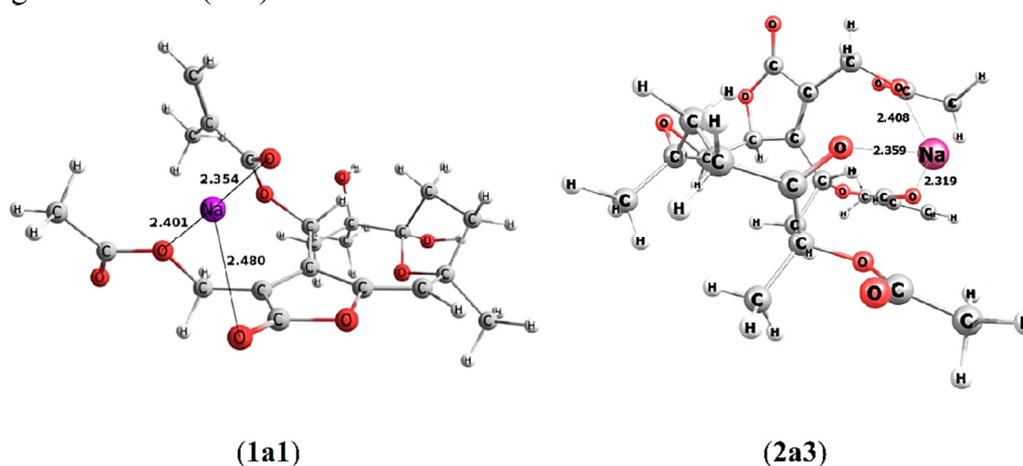


Faixa de dados da escala de cores, azul = +0,05 a.u., vermelho = -0,05 a.u.

Em ambas os confôrmeros (**1a** e **2a**, respectivamente para hirsutinolídeo e glaucolídeo), o Na^+ foi colocado próximo aos átomos de oxigênio, particularmente perto de grupos com os valores de potencial eletrostático mais negativos (grupos éster e γ -butirolactona). As geometrias dos complexos foram otimizadas sem restrições de simetria. Esta etapa forneceu um conjunto de complexos (**1a1-1a4**) e (**2a1-2a4**), respectivamente, para o tipo hirsutinolídeo e glaucolídeo. As estruturas otimizadas de dois desses complexos (um para cada subtipo de LS) são

apresentadas de forma ilustrativa na Figura 24, indicando em que as distâncias entre oxigênio e o sódio são ligeiramente mais curtas para o complexo glaucolídeo A–Na⁺ (**2a3**) do que para o complexo de piptocarfina A–Na⁺ (**1a1**).

Figura 24 – Estruturas otimizadas de complexos selecionados de sódio com piptocarfina A (**1a1**) e glaucolídeo A (**2a3**).



As distâncias selecionadas são relatadas em Å.

As interações nos complexos de sódio para os dois compostos avaliados (**1a1-2a4**) ocorreram principalmente com o grupamento acetoxi em C-13 e/ou com o oxigênio da carbonila no anel γ -butirolactona (como observado anteriormente nas simulações de dinâmica molecular atomística), como demonstrado na Figura 24, mostrando mais uma vez que é a região da estrutura com maior quelação de oxigênio. Uma das propriedades mais significativas na eficiência de ionização de bases de oxigênio para a formação de adutos de Na⁺ está relacionada à capacidade de quelação dessas bases, o que indica uma interação eletrostática no íon adutado de sódio (KRUVE et al., 2013; SUGIMURA et al., 2017).

A magnitude da interação metal-ligante nos complexos **1a1-2a4** (Tabela 7) foi estabelecida por meio da interação instantânea (ΔE^{int}) entre o Na⁺ e os ligantes, bem como considerando a energia de preparação (ΔE^{prep}) – que é uma energia necessária para distorcer os ligantes isolados de sua geometria do estado fundamental para a geometria que eles adquirem para formar os complexos.

A energia de interação total (ΔE^{tot}) foi então calculada, estando diretamente relacionada com o negativo da energia de ligação-dissociação (Equação 5).

$$\Delta E^{tot}(= -D_e) = \Delta E^{prep} + \Delta E^{int} \quad (\text{Eq. 5})$$

Tabela 7 – Dados de energia de interação para os complexos de sódio **1a1-1a4** a partir da piptocarфина A (**1**) e para os complexos **2a1-2a4** a partir do glaucolídeo A (**2**).

Complexo	ΔE^{prep}	ΔE^{int}	ΔE^{tot}
1a1	11,38	-53,05	-41,67
1a2	5,68	-60,67	-54,99
1a3	6,60	-41,87	-35,27
1a4	3,80	-53,46	-49,66
2a1	19,06	-63,78	-44,72
2a2	7,65	-62,01	-54,36
2a3	12,43	-50,95	-38,52
2a4	7,26	-51,40	-44,14

Todas as energias são expressas em kcal.mol⁻¹.

O cálculo da estrutura eletrônica revelou que ambos os compostos **1** e **2** foram capazes de interagir com o Na⁺, sendo a magnitude da interação dependente do local e da deformação na estrutura do ligante, que foi traduzida pelos valores de energia de preparação (ΔE^{prep}) (Tabela 7).

Os resultados revelaram ainda que os valores de ΔE^{prep} para **2** foram muito mais notáveis, variando de 7,26 a 19,06 kcal.mol⁻¹, enquanto que para **1** os valores de ΔE^{prep} variaram de 3,80 a 11,38 kcal.mol⁻¹. Esses achados sugerem que a atração entre **1** e Na⁺ ocorre com uma baixa energia, enquanto que esta energia é cerca de 1,9 vezes maior para a atração **2**-Na⁺. Portanto, a aproximação de **1** e Na⁺ ocorre por meio de um processo dependente de baixa energia quando comparado ao de **2**-Na⁺. Em contraste, os valores de energia de interação instantânea (ΔE^{int}) de **1** com o Na⁺ foram ligeiramente maiores quando comparados aos valores de ΔE^{int} para **2**, cujos valores variaram de -41,87 e -60,67 kcal.mol⁻¹ e de -50,95 a -63,78 kcal.mol⁻¹, respectivamente. Considerando o comportamento observado nos complexos, a energia de interação total (ΔE^{tot}) mostrou-se similar para ambos (**1** e **2**) LS (Tabela 7), sugerindo o porquê ambos os complexos **1**-Na⁺ e **2**-Na⁺ podem ser formados e detectados como picos base durante a injeção direta nas análises de ESI-EM.

A partir dos dados acima, as energias de preparação definiram os resultados obtidos a partir da injeção combinada da amostra e fase móvel aquosa. Como os complexos são formados via interação cátion-dipolo, que é uma interação não-covalente reversível, a baixa energia de preparação obtida (3,8 kcal.mol⁻¹) para atração de **1**-Na⁺ pode impedir a formação do complexo (**1**-H⁺) durante a injeção combinada de amostra de fase aquosa. Por outro lado, por causa da

alta energia de preparação para 2-Na^+ , a presença de H_2O também poderia fornecer o aduto (2-H^+), embora (2-Na^+) fosse o complexo mais estável (-63,78 a -50,95 kcal.mol⁻¹).

Sob as condições experimentais usadas para a análise de injeção combinada de **1-4**, foram observadas fortes diferenças no perfil de ionização de EM e formação de adutos entre os subtipos de LS hirsutinolídeo e glaucolídeo. De fato, um íon protonado $[\text{M}+\text{H}]^+$ foi detectado como pico base para o glaucolídeo enquanto o íon com a perda de água na fonte $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$ foi obtido para o hirsutinolídeo.

Embora as estruturas dos glaucolídeos estudados (**2 e 4**) não contenham grupos hidroxila livres como os hirsutinolídeos (**1 e 3**) capazes de eliminar a H_2O por fragmentação na fonte, uma análise anterior por ESI(+)-EMAR do análogo de glaucolídeo, $10\alpha,4\alpha$ -dihidroxi- $5\beta,6\beta$ -isoglaucolídeo B, contendo grupos hidroxila livres deram íons sem perda de água pela fragmentação na fonte (BUSKUHL et al., 2010). A característica EM do $10\alpha,4\alpha$ -dihidroxi- $5\beta,6\beta$ -isoglaucolídeo B revelou padrões semelhantes aos observados para os glaucolídeos **2 e 4** (i.e. $[\text{M}+\text{H}]^+$ como pico de base), sugerindo que o íon com a perda de água na fonte $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$ parece não se formar com glaucolídeos, mesmo contendo grupos hidroxilo livres.

Nesse contexto, tais diferenças (que podem estar relacionadas às propriedades intrínsecas do esqueleto de cada subtipo de LS) (SARTORI et al., 2014) poderiam ser usadas para a distinções desses dois subtipo de LS em mistura complexa.

Além das análises EM/EM, a abordagem de fragmentação na fonte pode ser empregada no estudo de analitos alvo, fornecendo informações da correlação entre os íons produto e íons de interesse. a fragmentação na fonte parece ocorrer exclusivamente com os íons protonados $[\text{M}+\text{H}]^+$, uma vez que os complexos de moléculas de sódio $[\text{M}+\text{Na}]^+$ não são facilmente dissociáveis e tendem a não ser profundamente afetados com o aumento da voltagem do capilar (ABRANKÓ; GARCÍA-REYES; MOLINA-DÍAZ, 2011; HEILING et al., 2016).

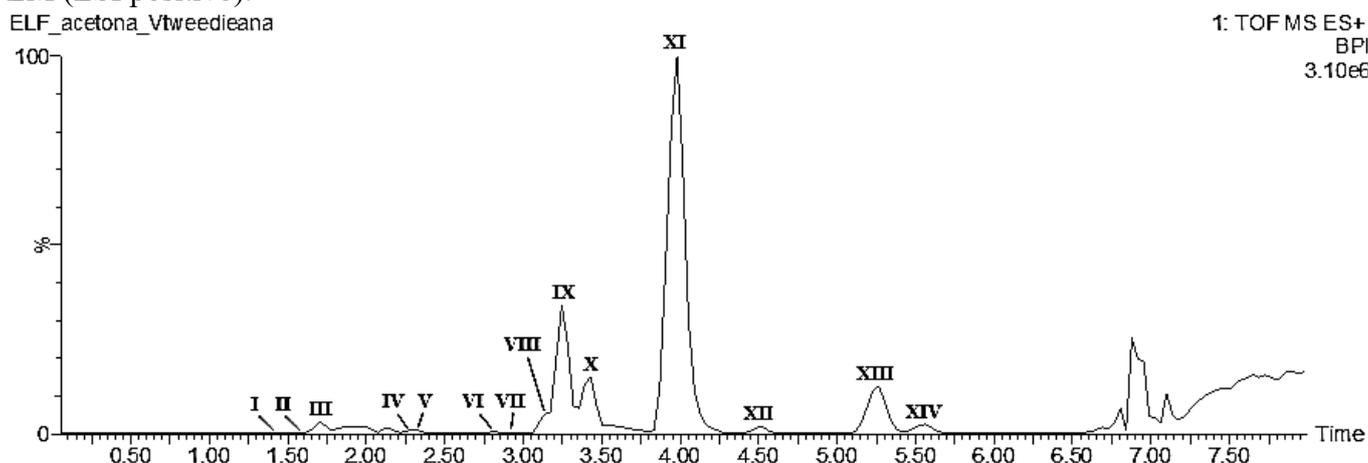
Os achados nos experimentos de ESI-EM com as LS **1-4** sugeriram uma possível estratégia de diferenciação rápida entre as LS do tipo hirsutinolídeo e glaucolídeo em análises de ESI-QToF EM de matrizes complexas, considerando suas diferenças no perfil de ionização e formação de adutos observados nos espectros completos de EM.

5.3.2 Análise de desreplicação do extrato de lavagem foliar (ELF) otimizado de *Vernonanthura tweedieana* por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLUE-EM)

De modo a aplicar a estratégia de diferenciação das LS do tipo hirsutinolídeo e glaucolídeo em uma mistura complexa enriquecida com LS, a análise qualitativa de ESI-QToF EM e EM/EM foi realizada com o extrato enriquecido em LS obtido a partir da lavagem de folhas de acetona de *V. tweedieana* nas condições otimizadas de extração.

A identificação dos principais picos no cromatograma de pico de base de ESI em modo positivo (Figura 25) para o ELF de *V. tweedieana* foi estabelecida pela comparação dos dados de EMAR e EM/EM obtidos com a massa teórica da fórmula elementar proposta, com suporte bibliográfico.

Figura 25 – Cromatograma de pico base do extrato de lavagem foliar de *V. tweedieana* obtido por CLUE-EM (ESI positivo).



Cromatograma de pico base obtido por CLUE-EM em modo positivo de ionização (condições cromatográficas vide item 4.2.2.2) de extrato de lavagem foliar de *V. tweedieana* extraído com acetona durante 10 minutos.

A Tabela 8 traz os dados compilados dos compostos caracterizados no extrato de *V. tweedieana*, incluindo o tempo de retenção (t_R), a fórmula molecular, a relação massa-carga experimental (m/z) e os principais fragmentos de EM/EM.

Oito dos 14 picos identificados no cromatograma de *V. tweedieana* (Figura 25) corresponderam a LS cuja caracterização foi baseada no diagnóstico de íons relevantes. Os picos V (t_R : 2,29 min, m/z 445,1448 [$C_{21}H_{26}O_9+Na$] $^+$) e XI (t_R : 3,98 min, m/z 465,1723 [$C_{23}H_{28}O_{10}+H$] $^+$) correspondem aos padrões LS piptocarфина A (1) e glaucolídeo A (2), cujo padrão de fragmentação correspondeu ao descrito previamente (Esquemas 16-21).

Tabela 8 – Compostos identificados no extrato de lavagem foliar de *V. tweedieana* por CLUE-EM (ESI positivo). (continua)

Nº do pico	Proposta de identificação	Tempo de retenção (min)	Fórmula molecular	<i>m/z</i> experimental (abundância relativa, %)	Erro (ppm)	Fragmentos EM/EM (<i>m/z</i>)	Íons <i>m/z</i> relevantes observados no espectro EM (abundância relativa, %)
I	Luteolina <i>e</i>	1,41	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	287,0541 (pb) [M+H] ⁺	-5,2	269,0486; 241,0512; 153,0181; 135,0471; 117,0363; 89,0428	-
	Eriodictiol		C ₁₅ H ₁₂ O ₆	289,0707 (61) [M+H] ⁺	-1,7	163,0400; 153,0206; 145,0303; 135,0471; 117,0397; 89,0389	-
II	Apigenina	1,63	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	271,0616 (pb) [M+H] ⁺	3,7	243,0652; 225,0572; 187,0402; 163,0400; 153,0206; 145,0328; 119,0493; 91,0551	-
III	Crisoeriol	1,70	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	301,0696 (pb) [M+H] ⁺	-5,3	286,0468; 258,0539; 229,0537; 153,0206; 149,0623	-
IV	Luteolina-7-metileter	2,26	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	301,0732 (pb) [M+H] ⁺	6,6	286,0503; 258,0539; 241,0512; 213,0546; 184,0569; 167,0357; 135,0448	-
V	Piptocarfina A	2,29	C ₂₁ H ₂₆ O ₉	445,1482 (37) [M+Na] ⁺ ^a	1,6	359,1142; 317,1101; 299,0894; 277,1046; 259,0898; 241,0925; 231,1010; 213,0964; 199,0747; 185,1015; 173,0568	405,1528 (pb) [M+H-H ₂ O] ⁺ ; 423,1635 (4) [M+H] ⁺ ; 461,1235 (25) [M+K] ⁺
VI	Estilpnomentolideo-8- <i>O</i> -metilacrilato	2,81	C ₂₁ H ₂₆ O ₈	407,1681 (pb) [M+H] ⁺	-6,1	365,1577; 347,1519; 321,1322; 279,1304; 261,1114; 243,1066; 233,1229; 215,1102; 187,1157; 175,0776	429,1538 (23) [M+Na] ⁺ ; 445,1310 (12) [M+K] ⁺
VII	Lactona sesquiterpênica não identificada	2,92	C ₁₉ H ₂₂ O ₇	363,1441 (pb) [M+H] ⁺	-0,8	321,1212; 303,1026; 277,1115; 259,0993; 241,0893; 231,1010; 213,0964; 199,0776; 171,0825	385,1302 (21) [M+Na] ⁺ ; 401,1003 (11) [M+K] ⁺
VIII	Genkwanina	3,14	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	285,0757 (pb) [M+H] ⁺	-2,1	270,0525; 242,0587; 197,0601; 167,0357; 124,0177; 119,0515	-
IX	10-acetoxi-8-metacriloiloxi-hirsutinolideo-13- <i>O</i> -acetato	3,25	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₀	487,1568 (10) [M+Na] ⁺ ^a	-2,5	427,1439; 401,1208; 359,1103; 341,1012; 299,0858; 277,1115; 259,1029; 241,0925; 231,1041; 217,0912; 213,0905; 199,0747; 185,0987; 173,0649; 171,0825; 161,0589	447,1654 (pb) [M+H-H ₂ O] ⁺ ; 465,1767 (2) [M+H] ⁺ ; 503,1282 (6) [M+K] ⁺
X	Velutina	3,40	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	315,0851 (pb) [M+H] ⁺	-5,7	300,0627; 272,0692; 257,0464; 167,0357	-

Tabela 8 – Compostos identificados no extrato de lavagem foliar de *V. tweedieana* por CLUE-EM (ESI positivo). (conclusão)

Nº do pico	Proposta de identificação	Tempo de retenção (min)	Fórmula molecular	<i>m/z</i> experimental (abundância relativa, %)	Erro (ppm)	Fragmentos EM/EM (<i>m/z</i>)	Íons <i>m/z</i> relevantes observados no espectro EM (abundância relativa, %)
XI	Glaucolídeo A	3,98	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₀	465,1723 (pb) [M+H] ⁺	-8,2	379,1380; 345,1354; 277,1080; 259,0963; 241,0861; 231,1010; 217,0882; 213,0934; 203,1084; 189,0564; 173,0622	487,1568 (2) [M+Na] ⁺ ; 503,1328 (1) [M+K] ⁺
XII	Glaucolídeo J	4,49	C ₂₃ H ₃₀ O ₁₀	467,1901 (pb) [M+H] ⁺	-3,4	407,1723; 379,1420; 365,1616; 337,1358; 319,1125; 295,1204; 277,1115; 259,0996; 241,0893; 231,1041; 213,0934; 189,0564; 173,0649	489,1719 (13) [M+Na] ⁺ ; 505,1484 (7) [M+K] ⁺
XIII	10,13-acetoxi-8-tigiloxi-glaucolídeo	5,26	C ₂₄ H ₃₀ O ₁₀	479,1916 (pb) [M+H] ⁺	-0,2	419,1724; 379,1420; 359,1530; 337,1321; 319,1198; 295,1204; 277,1080; 259,0996; 241,0893; 231,1041; 213,0934; 189,0564; 173,0622	501,1714 (11) [M+Na] ⁺ ; 517,1505 (5) [M+K] ⁺
XIV	Glaucolídeo G	5,56	C ₂₄ H ₃₀ O ₁₀	479,1916 (pb) [M+H] ⁺	-0,2	419,1724; 379,1420; 359,1491; 337,1283; 319,1198; 295,1239; 277,1115; 259,0996; 241,0893; 231,1072; 213,0934; 189,0564; 173,0622	501,1714 (20) [M+Na] ⁺ ; 517,1459 (10) [M+K] ⁺

^a, O aduto de Na⁺ foi selecionado para a fragmentação EM/EM uma vez que o respectivo aduto de H⁺ apresentou uma intensidade muito baixa; **pb**, pico base (abundância relativa de 100%)

O pico **IX** (RT: 3,25 min, m/z 487,1568 $[C_{23}H_{28}O_{10}+Na]^+$, calculado para m/z 487,1580) apresentou a mesma composição elementar ($C_{23}H_{28}O_{10}$) que o glaucolídeo **A** (**2**), embora com um valor de t_R diferente. Além do complexo molécula- Na^+ , o íon m/z 447,1654 $[M+H-H_2O]^+$ foi ainda observado como o pico de base no espectro EM completo, adicionalmente ao íon m/z 465,1767 $[M+H]^+$ que apresentou uma intensidade muito baixa. Essa característica é semelhante às características de EM já mencionados para os hirsutinolídeos a piptocarфина **A** (**1**) e diacetilpiptocarfol (**3**), sugerindo ao pico **IX** um núcleo de hirsutinolídeo.

O espectro de massas em tandem deste composto (Tabela 8) mostrou a mesma via de fragmentação estudada para as LS (Esquemas 16-21), com os mesmos íons produtos observados para **2**, indicando se tratar de um isômero estrutural. O íon precursor m/z 487 gerou m/z 427,1439, m/z 401,1208, m/z 359,1103, m/z 341,1012 e m/z 299,0858, depois de perder AcOH (60 Da), MeacrOH (86 Da), MeacrOH (86 Da) mais ceteno (42 Da), AcOH (60 Da) mais MeacrOH (86 Da) e AcOH (60 Da) mais MeacrOH (86 Da) mais ceteno (42 Da), respectivamente. Além disso, o conjunto proposto de íons diagnóstico para as LS também foi obtido em m/z 277,1115, m/z 259,1029, m/z 241,0925 e m/z 231,1041.

A partir desses dados, o pico **IX** foi identificado como 10-acetoxi-8-metacrilóiloxi-hirsutinolídeo-13-*O*-acetato. Esta dedução foi apoiada pela consideração quimiotaxonômica da tribo Vernonieae, uma vez que um derivado 1-metoxi deste metabólito foi previamente obtido a partir da espécie *Vernonia polyanthes* (BOHLMANN et al., 1983). No entanto, a estrutura proposta parece corresponder a um novo composto e o isolamento e a elucidação estrutural usando RMN são necessários para confirmar essa proposta. Mesmo assim, esses achados revelam a viabilidade do uso da estratégia sugerida de diferenciação das LS do tipo hirsutinolídeo e glaucolídeo em misturas complexas.

O pico **XII** (t_R : 4,49 min, m/z 467,1901 $[C_{23}H_{30}O_{10}+H]^+$) difere do pico **XI** (glaucolídeo **A**) apenas pela presença de duas unidades de massas. Seu espectro EM apresentou o íon $[M+H]^+$ como pico base, indicando um derivado sesquiterpênico glaucolídeo, quando considerados os perfis de formação de adutos e ionização em EM. O espectro EM/EM de m/z 467 gerou m/z 407,1723, m/z 379,1420, m/z 365,1616, m/z 337,1358, m/z 319,1125, m/z 295,1204 e m/z 277,1115, após a eliminação de AcOH (60 Da), ácido isobutírico (iBuOH, 88 Da), AcOH (60 Da) mais ceteno (42 Da), iBuOH (88 Da) mais ceteno (42 Da), AcOH (60 Da) mais iBuOH (88 Da), iBuOH (88 Da) mais dois cetenos (84 Da) e AcOH (60 Da) mais iBuOH (88 Da) mais ceteno (42 Da). Os íons diagnósticos de LS em m/z 277,1115, m/z 259,0996, m/z 241,0893 e m/z 231,1041 também foram detectados, conjuntamente com íons m/z 213,0934, m/z 189,0564

e m/z 173,0649, todos obtidos pelo padrão de fragmentação já mencionado para as LS (Esquemas 16-21).

Considerando que o padrão de fragmentação estabelecido é semelhante à LS do tipo glaucolídeo, um grupamento isobutiroiloxi em C-8 foi proposto para o pico **XII** em vez de um grupo metacrilóiloxi presente no glaucolídeo A (**2**, pico **XI**). Adicionalmente, e levando-se em conta a quimiotaxonomia da tribo Vernoniaceae, o pico **XII** foi identificado como glaucólido J, composto anteriormente obtido a partir de *Vernonanthura squamulosa* (KOTOWICZ et al., 1998) e caracterizado em diferentes espécies do gênero *Vernonanthura* (GALLON; JAIYESIMI; GOBBO-NETO, 2018).

Do mesmo modo, os picos **XIII** (t_R : 5,26 min, m/z 479,1916 $[C_{24}H_{30}O_{10}+H]^+$) e **XIV** (t_R : 5,56 min, m/z 479,1916 $[C_{24}H_{30}O_{10}+H]^+$) mostraram a mesma composição elementar e consequentemente os mesmos fragmentos em espectros de EM/EM (Tabela 8). A estrutura destes dois compostos sugeriu um esqueleto de glaucolídeo, uma vez que os seus precursores eram íons protonados. As perdas observadas de AcOH (60 Da), ácido tigílico (TigLOH, 100 Da), AcOH (60 Da) mais ceteno (42 Da) mais H₂O (18 Da), TigLOH (100 Da) mais ceteno (42 Da), TigLOH (100 Da) mais AcOH (60 Da), TigLOH (100 Da) mais duas moléculas de ceteno (84 Da) e TigLOH (100 Da) mais AcOH (60 Da) mais ceteno (42 Da) resultaram nos fragmentos m/z 419,1724, m/z 379,1420, m/z 359,1530, m/z 337,1321, m/z 319,1198, m/z 295,1204 e m/z 277,1080 para o pico **XIII**. As mesmas perdas foram identificadas no padrão de fragmentação do pico **XIV**. Para ambos (**XIII** e **XIV**), os íons diagnósticos das LS também foram obtidos em m/z 277, m/z 259, m/z 241 e m/z 231, além dos fragmentos m/z 213,0934, m/z 189,0564 e m/z 173,0622.

De acordo com a fragmentação de EM/EM, os picos **XIII** e **XIV** diferenciam-se do pico **XI** (glaucolídeo A, **2**) também em função do substituinte em C-8. Neste caso, o grupo metacrilóiloxi é substituído por uma porção tigloiloxi em **XIII** e um grupo angeloiloxi em **XIV**. Previamente, identificados em espécies de *Vernonanthura* (JAKUPOVIC et al., 1987; KOTOWICZ et al., 1998), os picos **XIII** e **XIV** foram caracterizados como 8-tigloiloxi-glaucolídeo e glaucolídeo G, respectivamente. Além disso, o 8-tigloiloxi-glaucolídeo A já foi caracterizado na espécie de *V. tweedieana* (GALLON; JAIYESIMI; GOBBO-NETO, 2018). A ordem de eluição proposta, em que o 8-tigloiloxi-glaucolídeo (**XIII**) tem um t_R menor em relação ao glaucolídeo G (**XIV**), foi baseada na literatura (DE MIERI et al., 2017a), que indica, em separação por CLUE, um t_R maior para o isômero de angelato em relação ao de tiglatato.

Além disso, o pico **VI** (t_R : 2,81min) forneceu em seu espectro de EM um íon precursor em m/z 407,1681 $[C_{21}H_{26}O_8+H]^+$ sugerindo um esqueleto glaucolídeo. A fragmentação de

EM/EM do íon m/z 407 proporcionou m/z 365,1577, m/z 347,1519, m/z 321,1322 e m/z 279,1304 após a perda de ceteno (42 Da), ceteno (42 Da) mais H₂O (18 Da), MeacrOH (86 Da) e MeacrOH (86 Da) mais ceteno (42 Da). Além disso, os fragmentos m/z 261,1114, m/z 243,1066, m/z 233,1229 e m/z 215,1102, foram estabelecidos após considerar a perda de H₂O (18 Da), duas H₂O (36 Da), H₂O (18 Da) mais CO (28 Da) e duas H₂O (36 Da) mais CO (28 Da), respectivamente, a partir do íon m/z 279. O íon m/z 233 foi utilizado para determinar a estrutura de m/z 187,1157 pela perda de um ácido fórmico (46 Da) com abertura do anel.

Os íons diagnósticos das LS não foram detectados nos valores de m/z previamente mencionados (ou seja, m/z 277, m/z 259, m/z 241 e m/z 231). No entanto, aplicando a mesma via de fragmentação da LS estudadas (**1-4**) os íons foram observados em m/z 279, m/z 261, m/z 243 e m/z 233. Estes achados sugerem a ausência do grupo éster C-10 na estrutura do pico **VI**. Assim, o pico **VI** foi caracterizado como estilnotomentolídeo-8-*O*-metilacrilato (derivado glaucolídeo), levando-se em consideração os dados de massa em tandem e a quimiotaxonomia da tribo, uma vez que este metabólito foi anteriormente obtido de *Vernonanthura chamaedrys* (CATALÁN et al., 1988).

O pico **VII** foi observado em t_R : 2,92 min com o íon precursor em m/z 363,1441 [C₁₉H₂₂O₇+H]⁺, sugerindo um esqueleto glaucolídeo com base nos resultados já descritos do glaucolídeos **2** e **4**. Além disso, o precursor do pico **VII** mostrou a presença dos íons de diagnóstico em m/z 277,1115, m/z 259,0993, m/z 241,0893 e m/z 231,1010. Ainda, outros três íons comumente encontrados no estudo de fragmentação das LS também foram detectados em m/z 213,0964, m/z 199,0776 e m/z 171,0825. Dois íons produtos interessantes foram observados em m/z 321,1212 e m/z 303,1026, correspondendo respectivamente à perda de ceteno (42 Da) e AcOH (60 Da). Esta observação posterior sugeriu a presença de um grupamento acetoxi ligado à molécula. No entanto, a composição elementar associada ao perfil de massas em tandem obtido para o pico **VII** não corresponde a nenhum composto previamente relatado na literatura. Essa descoberta pode se referir a uma nova LS. Assim, o isolamento e a elucidação da estrutura adequada por técnicas de espectroscopia e espectrometria são obrigatórios para permitir a identificação desse composto.

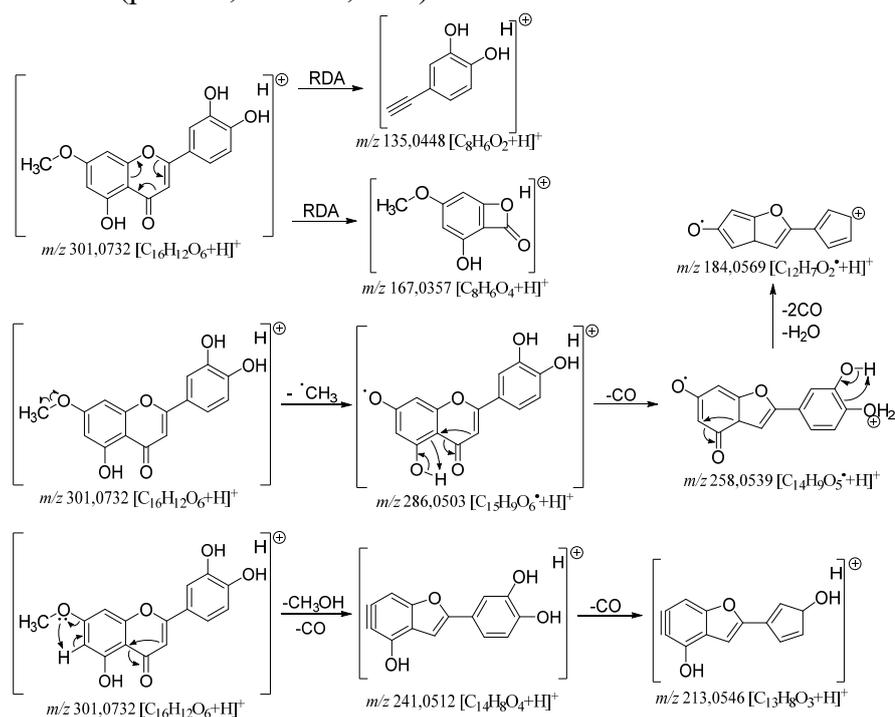
Adicionalmente, três flavonoides também foram atribuídos à picos no cromatograma do extrato de *V. tweediana*. O pico **I** (t_R : 1,41 min) corresponderam a uma mistura de luteolina (m/z 287,0541 [C₁₅H₁₀O₆+H]⁺) e eriodictiol (m/z 289,0707 [C₁₅H₁₂O₆+H]⁺), enquanto que o pico **II** (t_R : 1,63 min, m/z 271,0616 [C₁₅H₁₀O₅+H]⁺) e pico **III** (t_R : 1.70 min, m/z 301,0696 [C₁₆H₁₂O₆+H]⁺) foram identificados como apigenina e crisoeriol, respectivamente. Os dados de massas em tandem para esses picos (Tabela 8) estão de acordo com a literatura

(WOJAKOWSKA et al., 2013; BARANOWSKA; HEJNIAK; MAGIERA, 2017). Todos esses quatro compostos foram previamente caracterizados para a espécie *V. tweediana* (DA SILVA et al., 2015), o que corrobora com a identificação dos mesmo.

Além disso, outras três flavonas metoxiladas também foram identificadas, nomeadamente luteolina-7-metileter (**IV**, t_R : 2,26 min, m/z 301,0732 [$C_{16}H_{12}O_6+H$]⁺), genkwanina (**VIII**, t_R : 3,14 min, m/z 285,0757 [$C_{16}H_{12}O_5+H$]⁺) e velutina (**X**, t_R : 3,40 min, m/z 315,0851 [$C_{17}H_{14}O_6+H$]⁺), cujos dados de EM/EM e padrão de fragmentação estão de acordo com a literatura (STEVENS et al., 1999; PELLATI et al., 2011; WEI et al., 2016). A genkwanina já foi previamente caracterizada na espécie *V. tweediana* (GALLON; JAIYESIMI; GOBBO-NETO, 2018), além destes três compostos serem bem descritos para outras espécies do gênero *Vernonanthura* (MABRY et al., 1975b; BOHM; STUESSY, 2001), fato que ajudou a estabelecer a posição proposta dos grupos metil éter.

A partir do pico **IV** m/z 301,0732, por exemplo, a massa em tandem gerou íons que foram detectados em m/z 286,0503, m/z 258,0539, m/z 241,0512, m/z 213,0546 e m/z 184,0569, correspondentes às perdas de um radical metil (15 Da), um radical metil (15 Da) mais CO (28 Da), uma molécula de metanol (32 Da) mais CO (28 Da), um metanol (32 Da) mais dois CO (56 Da) e um radical metil (15 Da) mais três CO (84 Da) mais H₂O (18 Da) conforme ilustrado no Esquema 22.

Esquema 22 – Mecanismos de fragmentação propostos em modo positivo para o composto luteolina-7-metileter (pico **IV**; m/z 301,0732).



RDA, reação de retro Diels-Alder.

Adicionalmente, os íons produtos m/z 167,0357 e m/z 135,0448 também foram obtidos de **IV** a partir da reação de abertura do anel C por retro Diels-Alder (RDA). Mesmo comportamento de fragmentação observado nos espectros EM/EM para os picos **VIII** e **X**.

A composição fitoquímica observada para o ELF de *V. tweedieana*, constituído principalmente por LS e flavonoides, está em acordo com os resultados do estudo histoquímico com diferentes espécies de Vernonieae realizado por Lusa e colaboradores (2016), que reporta as LS como o principal componente do conteúdo dos tricomas glandulares das folhas, além da presença de flavonoides e outros fenólicos na epiderme foliar.

5.4 PREPARAÇÃO E FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS DE LAVAGEM FOLIAR (ELF) DAS ESPÉCIES DE VERNONIEAE

A utilização da técnica de lavagem foliar é um método que favorece a extração do conteúdo armazenado nos tricomas glandulares, constituído principalmente de LS (IGUAL et al., 2013; DE TOLEDO et al., 2014; LUSA; DA COSTA; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, 2016).

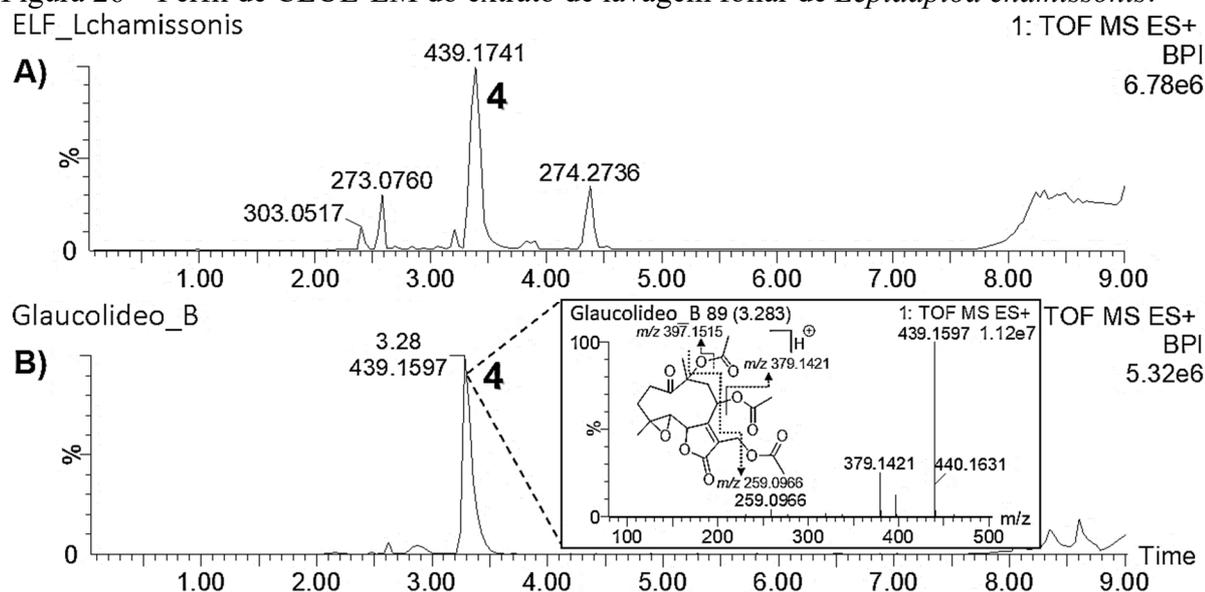
Outras condições, incluindo diferentes tempos de extração e solvente, foram previamente empregadas para o mesmo procedimento de extração, com a particularidade de que a operação foi realizada manualmente em folha individual (SCHORR et al., 2002; AMBRÓSIO et al., 2008; CHAGAS-PAULA et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2013b; PASSONI et al., 2013; DE ALMEIDA et al., 2016). A utilização da acetona como solvente e um período de extração de 10 minutos, em uma estratégia semi-automatizada realizada em balão de fundo redondo e mecanicamente auxiliada por um sistema de rotação operando com giro de 15 rpm, permitiu melhorar o processo de extração em termos de tempo, solvente e quantidade de matéria-prima por extração na purificação mais seletiva e das LS a partir das espécies de Vernonieae estudadas. Na técnica utilizada, a baixa rotação empregada (15 rpm) favoreceu para que as folhas se mantivessem relativamente estáticas dentro do balão, e pelo efeito da própria rotação, fossem emergidas alternadamente no líquido extrator durante o período de extração. Dessa forma, com a lavagem das folhas foi possível a extração direcionada do conteúdo superficial das folhas, objetivando nesse caso, o conteúdo dos tricomas glandulares.

5.4.1 Obtenção e fracionamento do ELF de *Lepidaploa chamissonis*

A extração por lavagem das folhas secas íntegras de *L. chamissonis* (278,4 g) permitiu a obtenção de 4,11 g do extrato bruto (ELF) enriquecido em glaucolídeo B (**4**), conforme

ilustrado na Figura 26. O processo de desengorduramento do ELF de *L. chamissonis* realizado por meio da partição líquido-líquido produziu as frações *n*-hexano (0,98 g), AcOEt (2,15 g) e aquosa (1,08 g) residual.

Figura 26 – Perfil de CLUE-EM do extrato de lavagem foliar de *Lepidaploa chamissonis*.



Cromatogramas de pico base (BPI) obtidos por CLUE-EM em modo positivo de ionização (condições cromatográficas vide *item 4.5.2.1.1*) do (A) extrato de lavagem foliar de *Lepidaploa chamissonis* preparado em acetonitrila a 1 mg/mL; (B) glucolídeo B (**4**, t_R : 3,28 min; m/z 439,1597 [$C_{21}H_{26}O_{10}+H$] $^+$).

Fração de AcOEt enriquecida em glucolídeo B (**4**) indicou uma remoção eficiente dos componentes lipofílicos mais indesejados e extraídos concomitantemente da superfície das folhas. Os valores de K_D obtidos para **4** na fração AcOEt de *L. chamissonis* frente aos três sistemas de solventes bifásicos testados (HEMWat M, N e P) são apresentados na Tabela 9, tanto para os modos de eluição de ASC como de DSC.

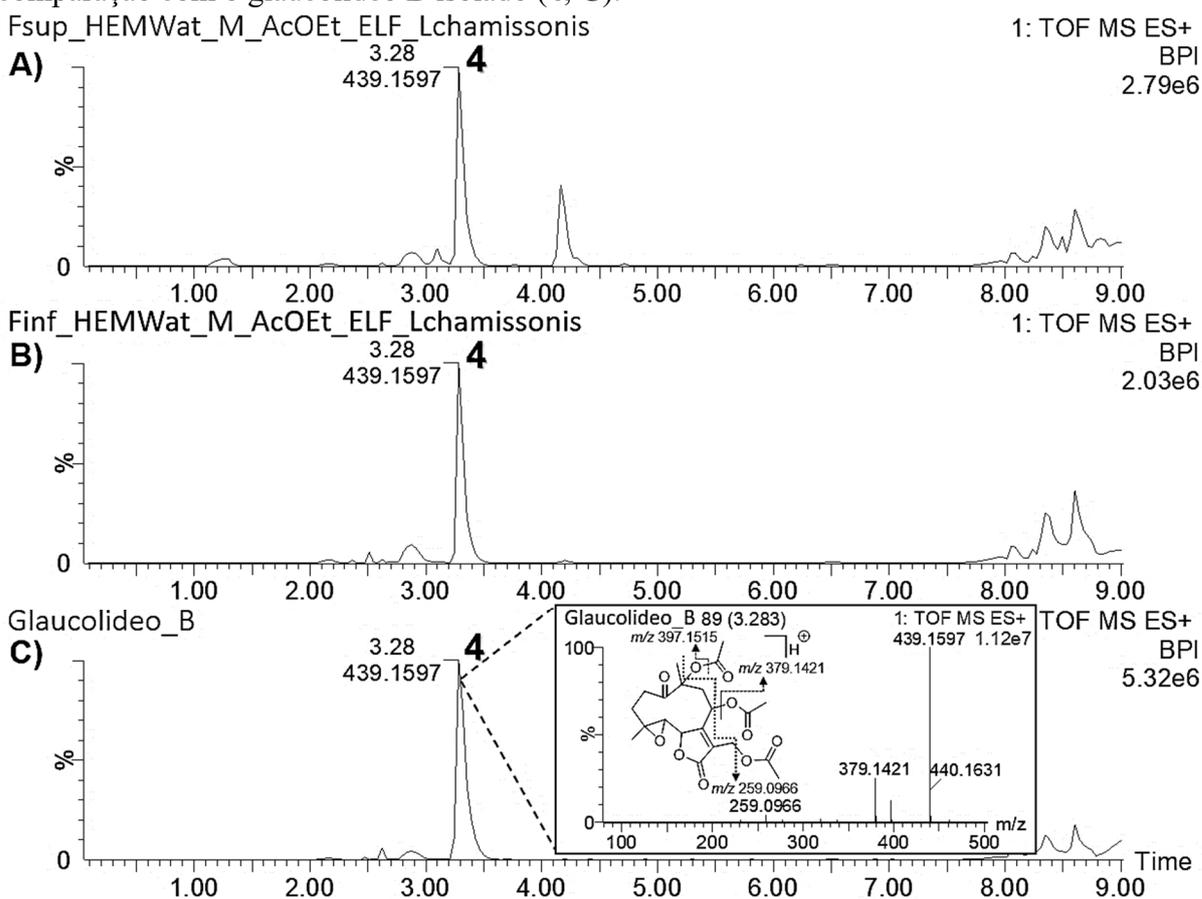
Tabela 9 – Valores de coeficiente de partição (K_D) obtidos para o glucolídeo B (**4**) na fração AcOEt de *L. chamissonis* frente aos sistemas HEMWat M, N e P.

Sistema bifásico de solventes	Glucolídeo B (4)			
	Área do pico ^a		Valor de K_D ^b	
	F _{Sup}	F _{Inf}	ASC	DSC
HEMWat (5/6/5/6) M	610444	459794	0,75	1,33
HEMWat (1/1/1/1) N	862778	837835	0,97	1,03
HEMWat (6/5/6/5) P	286813	685251	2,39	0,42

^a, áreas do pico do glucolídeo B (**4**, t_R : 3,28 min) obtidas a partir das análises de CLUE-EM da fração AcOEt de *L. chamissonis*; ^b, valores de K_D estabelecidos em modo ascendente (ASC) e descendente (DSC) dividindo-se a área do pico na fase estacionária pela área na fase móvel; **HEMWat**, combinação dos solventes *n*-hexano/AcOEt/metanol/água; F_{Sup}, fase superior; F_{Inf}, fase inferior.

A Figura 27 mostra o perfil por CLUE-EM das fases superior e inferior da fração de AcOEt de *L. chamissonis* avaliadas no sistema de solvente HEMWat M (*n*-hexano/AcOEt/metanol/água, 5/6/5/6, v/v/v/v) selecionado, o qual proporcionou um valor de K_D de 1,33 para o glaucolídeo B (**4**) em modo de eluição DSC.

Figura 27 – Perfil de CLUE-EM das fases superior (A) e inferior (B) da fração AcOEt do ELF de *L. chamissonis* após teste de *shake flask* com o sistema de solvente HEMWat M, em comparação com o glaucolídeo B isolado (**4**, C).



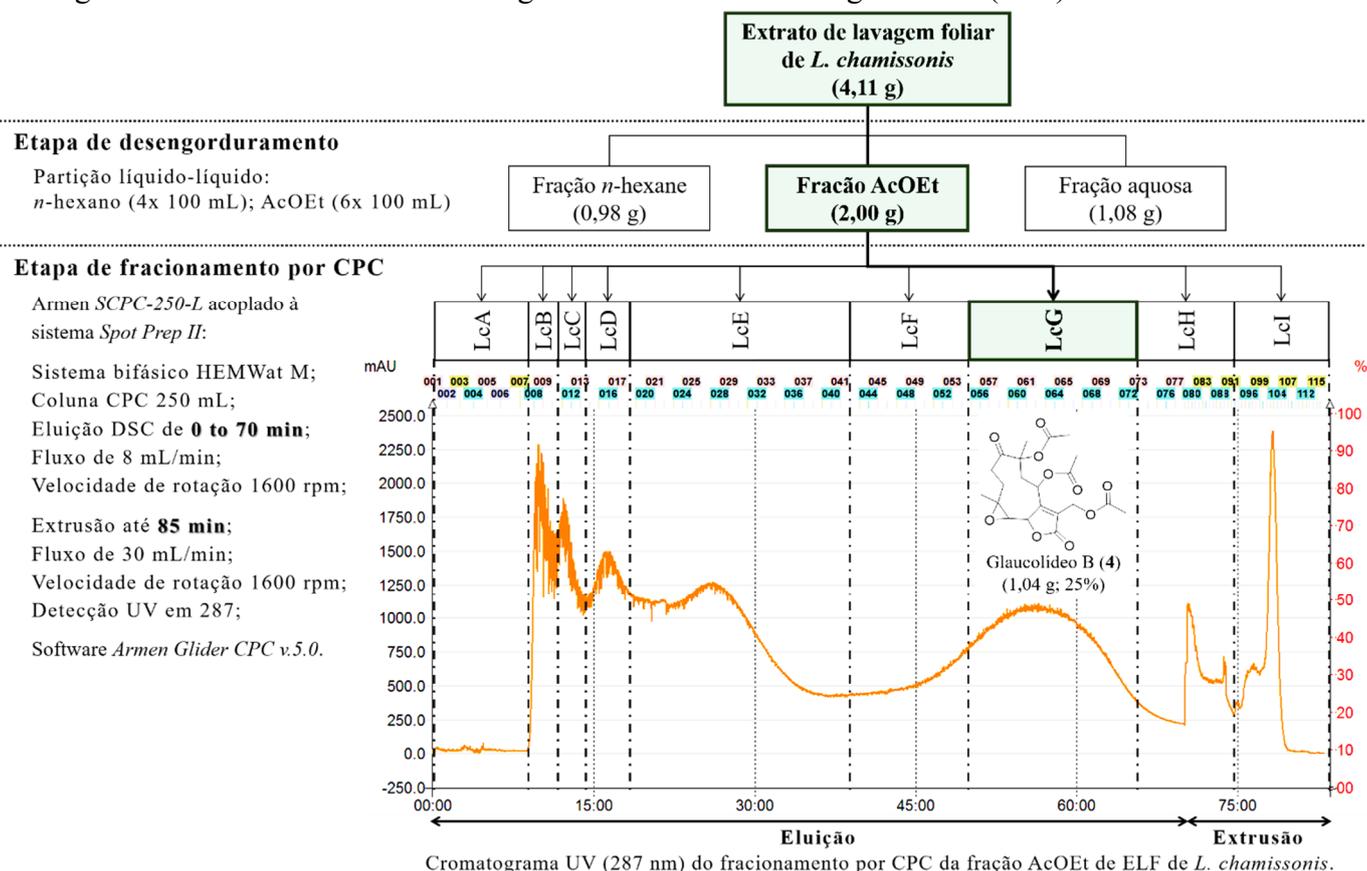
Cromatogramas de pico base obtidos por CLUE-EM em modo positivo de ionização (condições cromatográficas vide *item 4.5.2.1.1*). (**4**) glaucolídeo B (t_R : 3,28 min; m/z 439,1597 [$C_{21}H_{26}O_{10}+H$] $^+$), cujo espectro de massas *full scan* em ampliação.

Este valor de K_D permitiu boa retenção para **4** e um tempo de fracionamento apropriado. Para uma separação eficiente por CPC, recomenda-se que o valor de K_D do composto alvo compreenda o intervalo entre 0,5 e 2,0 (HU; PAN, 2012; KUMAR et al., 2014). Além disso, o valor S_f obtido de 83% está de acordo com a porcentagem de retenção de fase estacionária sugerida para uma análise de CPC, que deve ser superior a 60% (KUMAR et al., 2014).

O fracionamento cromatográfico da porção AcOEt do extrato de *L. chamissonis*, descrito no Fluxograma 4, permitiu o rápido isolamento do glaucolídeo B (**4**) por CPC em um

único passo e em grande quantidade (1,04 g), correspondendo ao rendimento de 25% do ELF bruto. Esses achados sugerem novamente que o processo de lavagem de folhas usado é bastante seletivo para essa extração desse tipo de LS.

Fluxograma 4 – Fracionamento cromatográfico do extrato de lavagem foliar (ELF) de *L. chamissonis*.



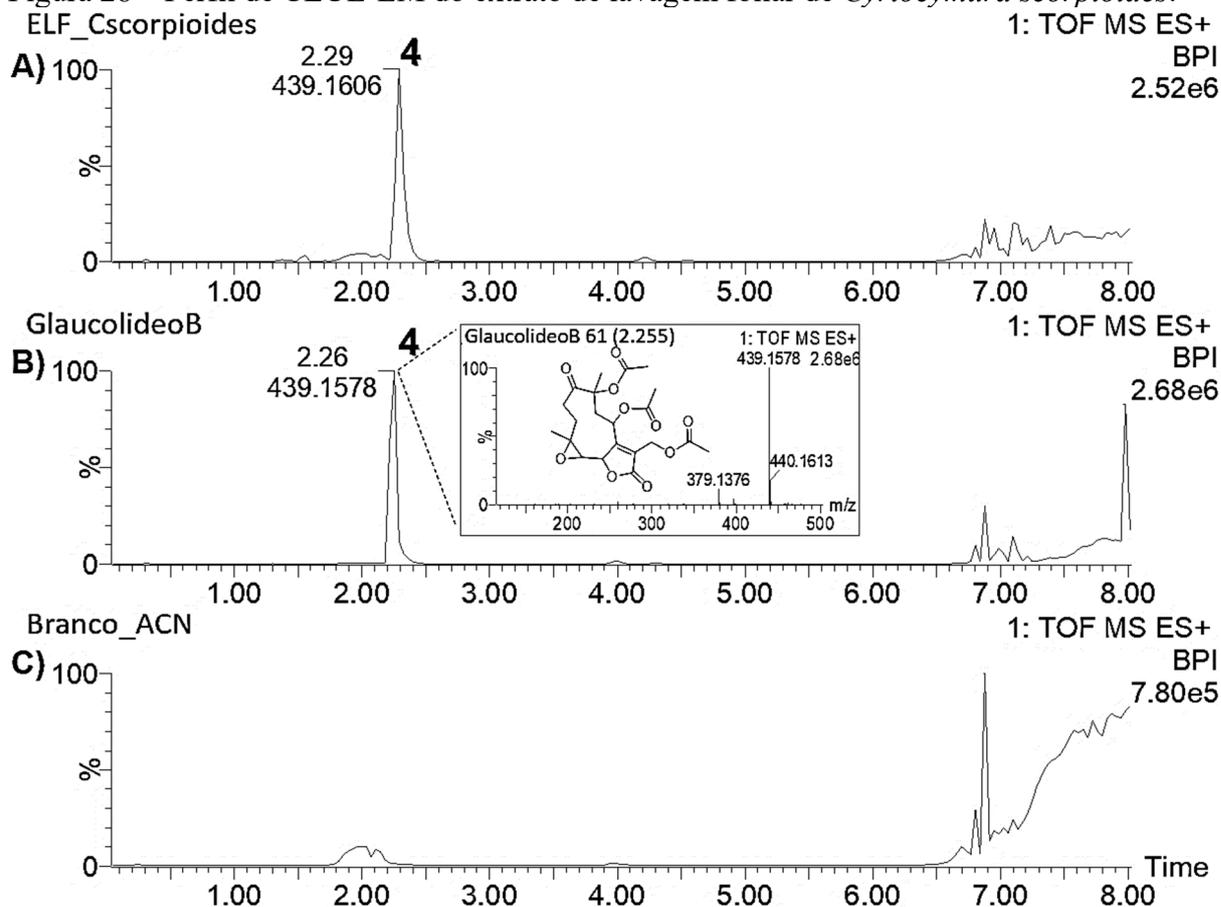
AcOEt, acetato de etila; **DSC**, modo de eluição descendente; **CPC**, cromatografia de partição centrífuga (para detalhes das condições cromatográficas do fracionamento vide *item 4.5.2*).

O método de CPC proposto para a purificação de glaucolídeo B (4) mostrou um melhor desempenho em comparação com os métodos previamente descritos para o isolamento de LS usando a mesma técnica (PINEL et al., 2007; GRAZIOSE et al., 2011; FISCHEDICK et al., 2012; FISCHEDICK et al., 2013; OLLIVIER et al., 2013; DESTANDAU et al., 2015; ADEKENOVA et al., 2016). A propósito, este método descrito foi mais rápido e forneceu maior pureza e/ou rendimento (relativo ao extrato bruto) do composto alvo, e/ou não exigiu procedimentos cromatográficos complementares. Além disso, é importante mencionar que esta é a primeira vez que um método de CPC é descrito para a purificação de uma LS do tipo glaucolídeo.

5.4.2 Obtenção e fracionamento do ELF de *Cyrtocymura scorpioides*

O processo de extração para o material vegetal de *C. scorpioides* por meio da técnica lavagem das folhas secas íntegras (541,0 g) promoveu a obtenção de 5,15 g de extrato bruto (ELF). A análise por CLUE-EM do ELF de *C. scorpioides* (Figura 28) revelou um extrato enriquecido na LS glaucolídeo B (**4**), assim como observado para o ELF de *L. chamissonis*.

Figura 28 – Perfil de CLUE-EM do extrato de lavagem foliar de *Cyrtocymura scorpioides*.



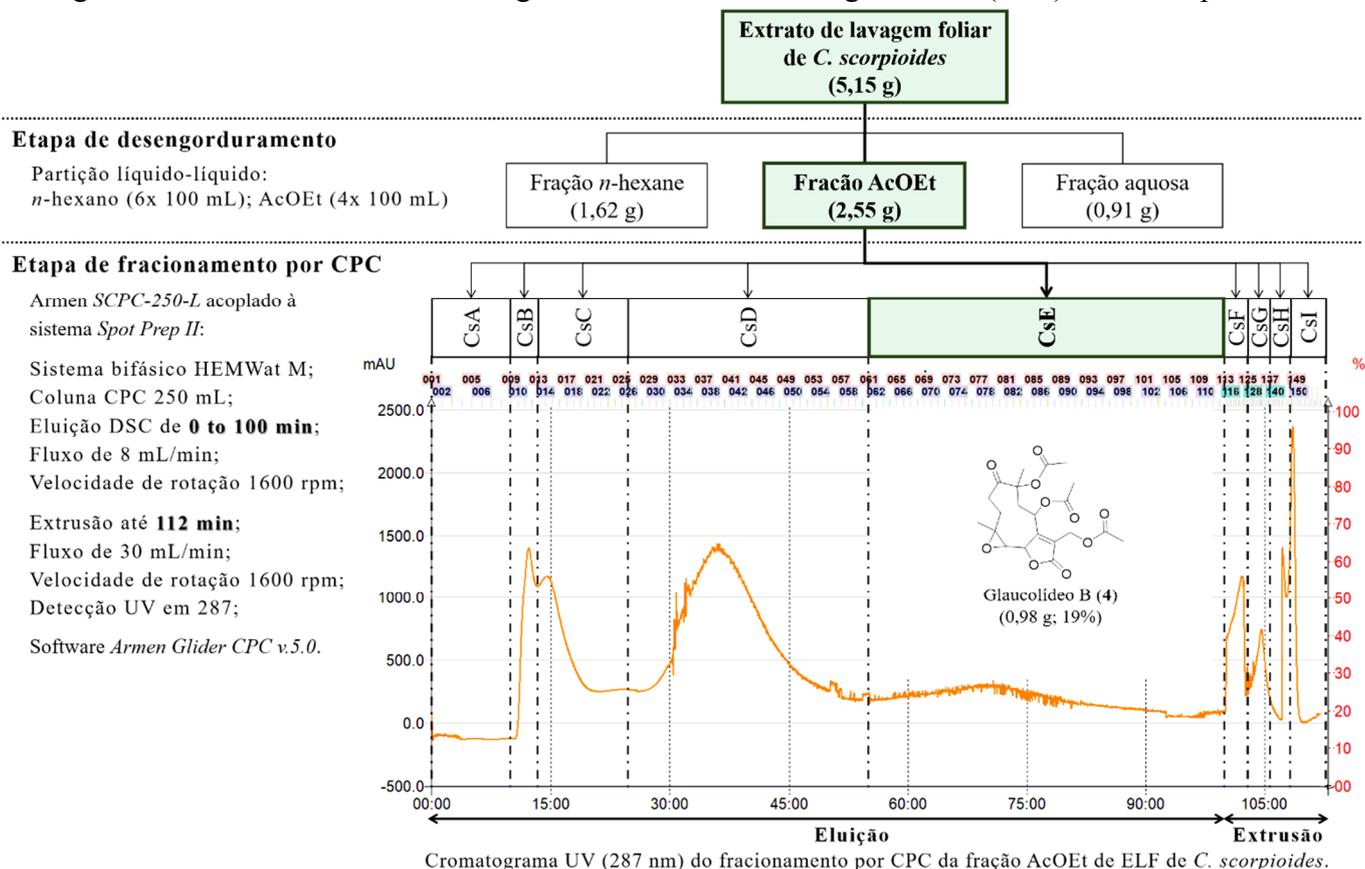
Cromatogramas de pico base (BPI) obtidos por CLUE-EM em modo positivo de ionização (condições cromatográficas vide *item 4.2.2.2*) do (A) extrato de lavagem foliar de *Cyrtocymura scorpioides* preparado em acetonitrila a 1 mg/mL; (B) glaucolídeo B (**4**, t_R : 2,26 min; m/z 439,1578 $[C_{21}H_{26}O_{10}+H]^+$); (C), branco (acetonitrila).

Por se tratar do mesmo constituinte de interesse, condições analíticas similares às empregadas no isolamento por CPC da LS **4** a partir da fração AcOEt de *L. chamissonis* (para detalhes vide *item 4.5.3*) foram selecionadas para a purificação deste componente majoritário a partir do ELF da espécie *C. scorpioides*, sem que fosse necessário a repetição do teste de K_D .

O tratamento do ELF de *C. scorpioides* com a etapa desengorduramento por partição líquido-líquido rendeu as frações *n*-hexano (1,62 g), AcOEt (2,55 g) e aquosa (0,91 g) residual,

cuja fração AcOEt enriquecida com LS glaucolídeo B (4) foi submetida ao fracionamento por CPC conforme descrito no Fluxograma 5.

Fluxograma 5 – Fracionamento cromatográfico do extrato de lavagem foliar (ELF) de *C. scorpioides*.

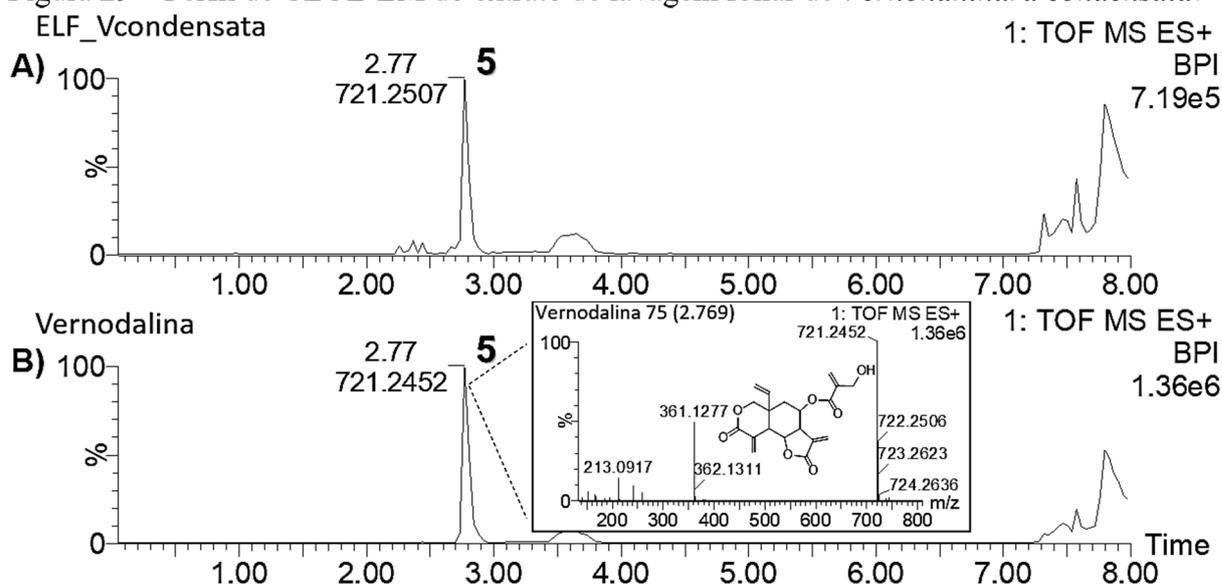


AcOEt, acetato de etila; **DSC**, modo de eluição descendente; **CPC**, cromatografia de partição centrífuga (para detalhes das condições cromatográficas do fracionamento vide *item 4.5.3*).

Estes achados indicaram que o método por CPC desenvolvido para a purificação do glaucolídeo B (4) a partir da fração AcOEt de ELF de *L. chamissonis* também foi eficiente para o isolamento de 4 a partir da espécie *C. scorpioides*, novamente em única etapa e em grande quantidade (0,98 g), correspondendo à 19% da massa de ELF de *C. scorpioides* de partida.

5.4.3 Obtenção e fracionamento do ELF de *Vernonanthura condensata*

As folhas secas íntegras de *V. condensata* (770,0 g) extraídas por lavagem renderam 6,50 g de extrato bruto (ELF) enriquecido em vernodalina (5), conforme ilustrado na Figura 29. O processo de desengorduramento do ELF de *V. condensata* rendeu as frações *n*-hexano (1,84 g), AcOEt (3,13 g) e aquosa (1,20 g) residual. Os valores de K_D foram determinados para a vernodalina (5) a partir fração AcOEt enriquecida de *V. condensata* frente aos sistemas HEMWat J, K, L, M e N, tanto em modo ASC como DSC, e estão apresentados na Tabela 10.

Figura 29 – Perfil de CLUE-EM do extrato de lavagem foliar de *Vernonanthura condensata*.

Cromatogramas de pico base (BPI) obtidos por CLUE-EM em modo positivo de ionização (condições cromatográficas vide *item 4.2.2.2*) do (A) extrato de lavagem foliar de *Vernonanthura condensata* preparado em acetonitrila a 1 mg/mL; (B) vernodalina (**5**, t_R : 2,77 min; m/z 361,1277 [$C_{19}H_{20}O_7+H$] $^+$).

Tabela 10 – Valores de coeficiente de partição (K_D) obtidos para a vernodalina (**5**) na fração AcOEt de *V condensata* frente aos sistemas HEMWat J, K, L, M e N.

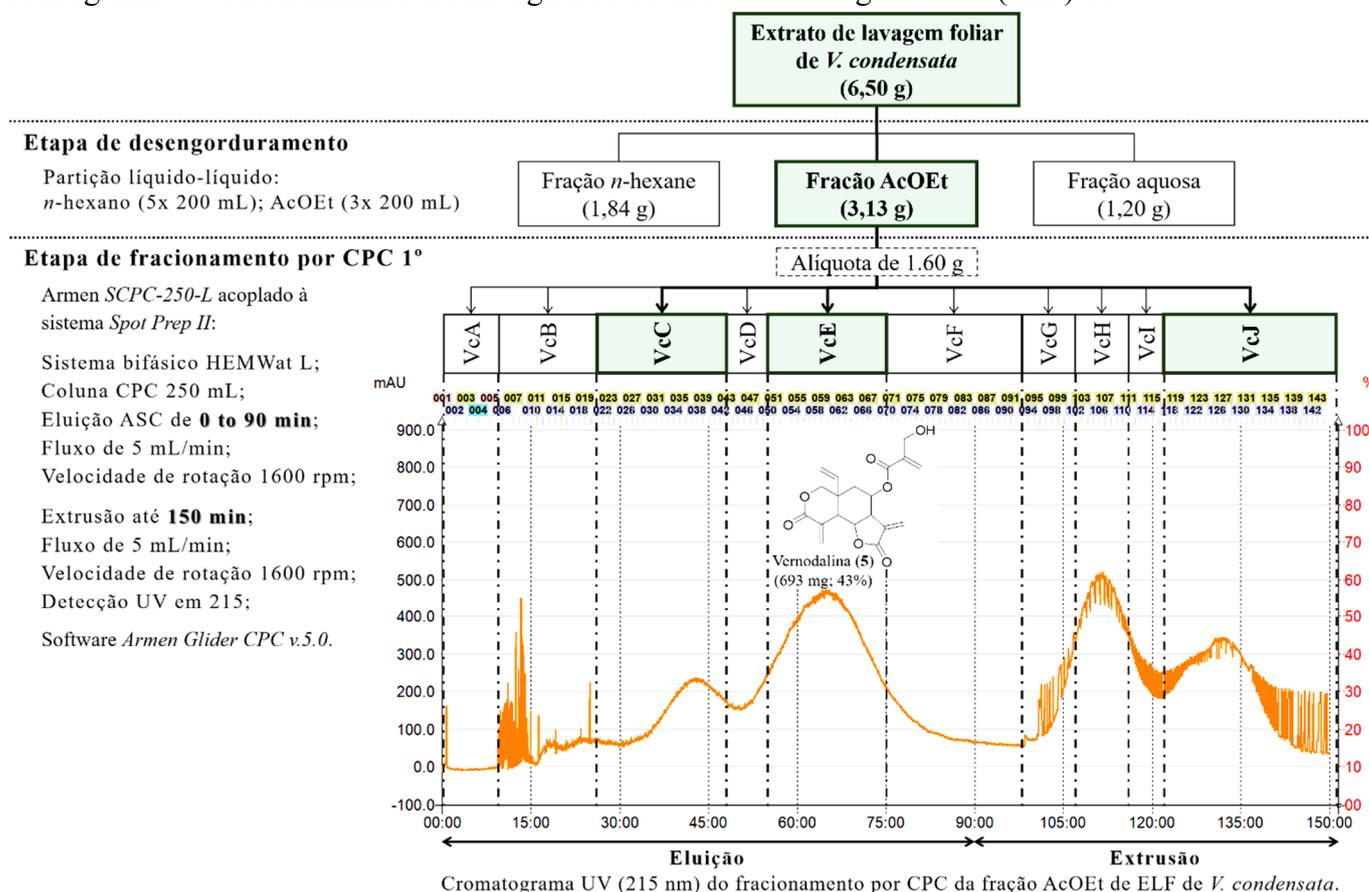
Sistema bifásico de solventes	Vernodalina (5)			
	Área do pico ^a		Valor de K_D ^b	
	F_{Sup}	F_{Inf}	ASC	DSC
HEMWat (2/5/2/5) J	41092	10969	0,27	3,75
HEMWat (1/2/1/2) K	27525	10823	0,39	2,54
HEMWat (2/3/2/3) L	19925	29966	1,50	0,66
HEMWat (5/6/5/6) M	11654	34874	2,99	0,33
HEMWat (1/1/1/1) N	6042	39960	6,61	0,15

^a, áreas do pico da vernodalina (**5**) obtidas a partir das análises de CLUE-EM da fração AcOEt de *V. condensata*; ^b, valores de K_D estabelecidos em modo ascendente (ASC) e descendente (DSC) dividindo-se a área do pico na fase estacionária pela área na fase móvel; **HEMWat**, combinação dos solventes *n*-hexano/AcOEt/metanol/água; F_{Sup} , fase superior; F_{Inf} , fase inferior.

O valor de K_D de 1,50 para vernodalina (**5**) indicou o sistema bifásico HEMWat L (*n*-hexano/AcOEt/metanol/água, 2/3/2/3, v/v/v/v), em modo de eluição ascendente, como o mais apropriado para a purificação do constituinte de interesse a partir da alíquota da fração de AcOEt (1,60 g) de ELF de *V. condensata*. Da mesma forma, o valor de K_D de 1,50 estando em acordo com o recomendado para uma análise por CPC também proporcionou um tempo de fracionamento apropriado para **5**. Além disso, a porcentagem de retenção de fase estacionária de 83% também se enquadra nos valores sugeridos na literatura. O fracionamento cromatográfico por CPC da porção AcOEt de ELF de *V. condensata*, descrito no Fluxograma

6, permitiu a obtenção de 693 mg da LS vernodalina (**5**) em única etapa e em boa quantidade, correspondendo a 43% da alíquota (1,60 g) da fração de partida.

Fluxograma 6 – Fracionamento cromatográfico do extrato de lavagem foliar (ELF) de *V. condensata*.



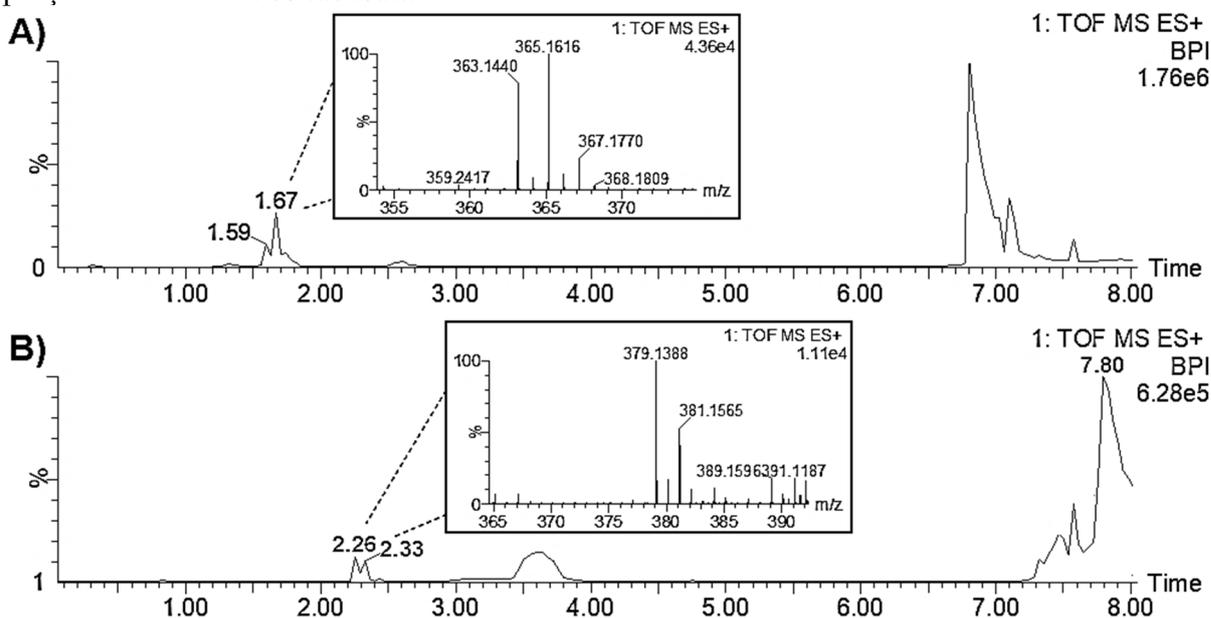
Cromatograma UV (215 nm) do fracionamento por CPC da fração AcOEt de ELF de *V. condensata*.

AcOEt, acetato de etila; **ASC**, modo de eluição ascendente; **CPC**, cromatografia de partição centrífuga (para condições cromatográficas detalhas do fracionamento vide *item 4.5.4*).

Estipulando-se uma massa de 1,35 g de vernodalina para a quantidade total da fração AcOEt (3,13 g) em função da quantidade obtida a partir da alíquota purificada (693 mg de **5** a partir de 1,60 g de fração), e posteriormente fazendo a relação deste valor com a massa de ELF de *C. scorpioides* (6,5 g), pode-se inferir que a vernodalina (**5**) deve corresponder a um percentual aproximado de 21% do ELF. Assim como abordado na revisão da literatura para *V. condensata* (para detalhes vide *item 2.2.1.3.1*), estudos fitoquímicos realizados com a espécie reportam, além da vernodalina, a presença de LS do tipo vernolídeo, entre as quais a vernolida e 11,13-dihidrovernolida, e seus derivados hidroxilados 19-hidroxivernolida e 19-hidroxi-11,13-dihidrovernolida (JAKUPOVIC et al., 1987).

Nesse sentido, a análise do perfil cromatográfico em CLUE-EM das subfrações VcC e VcJ (Figura 30A-B) provenientes do fracionamento por CPC da fração AcOEt de *V. condensata* sugeriu a presença dessas referidas LS.

Figura 30 – Perfil por CLUE-EM das subfrações VcC e VcJ oriundas do fracionamento da porção AcOEt de *V. condensata*.



Cromatogramas de pico base obtidos por CLUE-EM em modo positivo de ionização (condições cromatográficas vide *item 4.2.2.2*) das subfração VcC (A) e VcJ (B) do fracionamento por CPC da fração AcOEt de *V. condensata*. Em ampliação os respectivos espectros de massas *full scan* para os picos entre 1,55-1,85 min para A e entre 2,20-2,40 min para B.

Assim sendo, a fração VcC indicando uma mistura de vernolida (**8**, m/z 363,1440 $[C_{19}H_{22}O_7+H]^+$, calculado 363,1444), da dihidrovernalida (**7**, m/z 365,1616 $[C_{19}H_{24}O_7+H]^+$, calculado 365,1600), além de uma terceira LS identificada como tetrahidrovernalida (**6**, m/z 367,1770 $[C_{19}H_{26}O_7+H]^+$, calculado 367,1757), bem como a fração VcJ sugerindo a mistura de hidroxivernalida (**10**, m/z 379,1388 $[C_{19}H_{22}O_8+H]^+$, calculado 379,1393) e hidroxidihidrovernalida (**9**, m/z 381,1565 $[C_{19}H_{24}O_8+H]^+$, calculado 381,1549), foram ambas submetidas à uma segunda etapa de fracionamento também por CPC.

Para tanto, foram definidos os valores de K_D para os constituintes de interesse das subfrações VcC (compostos **6-8**) e VcJ (compostos **9-10**) em ambos os modos de eluição (ASC e DSC) frente à sistemas de solventes HEMWat testados, sendo apresentados nas Tabelas 11 e 12, respectivamente para os testes com as subfrações VcC e VcJ. O sistema bifásico HEMWat N (*n*-hexano/AcOEt/metanol/água, 1/1/1/1, v/v/v/v) em modo de eluição ASC, mostrou ser o mais apropriado para a separação com compostos **6**, **7** e **8** a partir da subfração VcC em função dos respectivos valores de K_D de 1,43; 1,72 e 2,32. Por outro lado, para a separação com compostos **9** e **10** a partir da subfração VcJ, os respectivos valores de K_D de 1,32 e 1,46 indicaram que o sistema mais adequado foi HEMWat J (*n*-hexano/AcOEt/metanol/água, 2/5/2/5, v/v/v/v), também em modo de eluição ASC. O Fluxograma 7 descreve os detalhes do fracionamento cromatográfico para subfrações VcC e VcJ.

Tabela 11 – Valores de coeficiente de partição (K_D) obtidos para os compostos **6**, **7** e **8** na subfração VcC de *V. condensata* frente aos sistemas HEMWat M, N, P, Q e R.

Sistema bifásico de solventes	Tetrahydrovernalida (6)				Dihydrovernalida (7)				Vernalida (8)			
	Área do pico ^a		Valor de K_D ^b		Área do pico ^a		Valor de K_D ^b		Área do pico ^a		Valor de K_D ^b	
	F _{Sup}	F _{Inf}	ASC	DSC	F _{Sup}	F _{Inf}	ASC	DSC	F _{Sup}	F _{Inf}	ASC	DSC
HEMWat (5/6/5/6) M	353	344	0,97	1,03	1009	1000	0,99	1,01	485	620	1,28	0,78
HEMWat (1/1/1/1) N	1663	2371	1,43	0,70	3336	5754	1,72	0,58	1836	4265	2,32	0,43
HEMWat (6/5/6/5) P	184	863	4,68	0,21	578	2102	3,63	0,28	281	1309	4,67	0,21
HEMWat (3/2/3/2) Q	62	877	14,1	0,07	302	2023	6,69	0,15	127	1365	10,7	0,09
HEMWat (2/1/2/1) R	13	458	35,8	0,03	94	1373	14,6	0,07	32	458	26,5	0,04

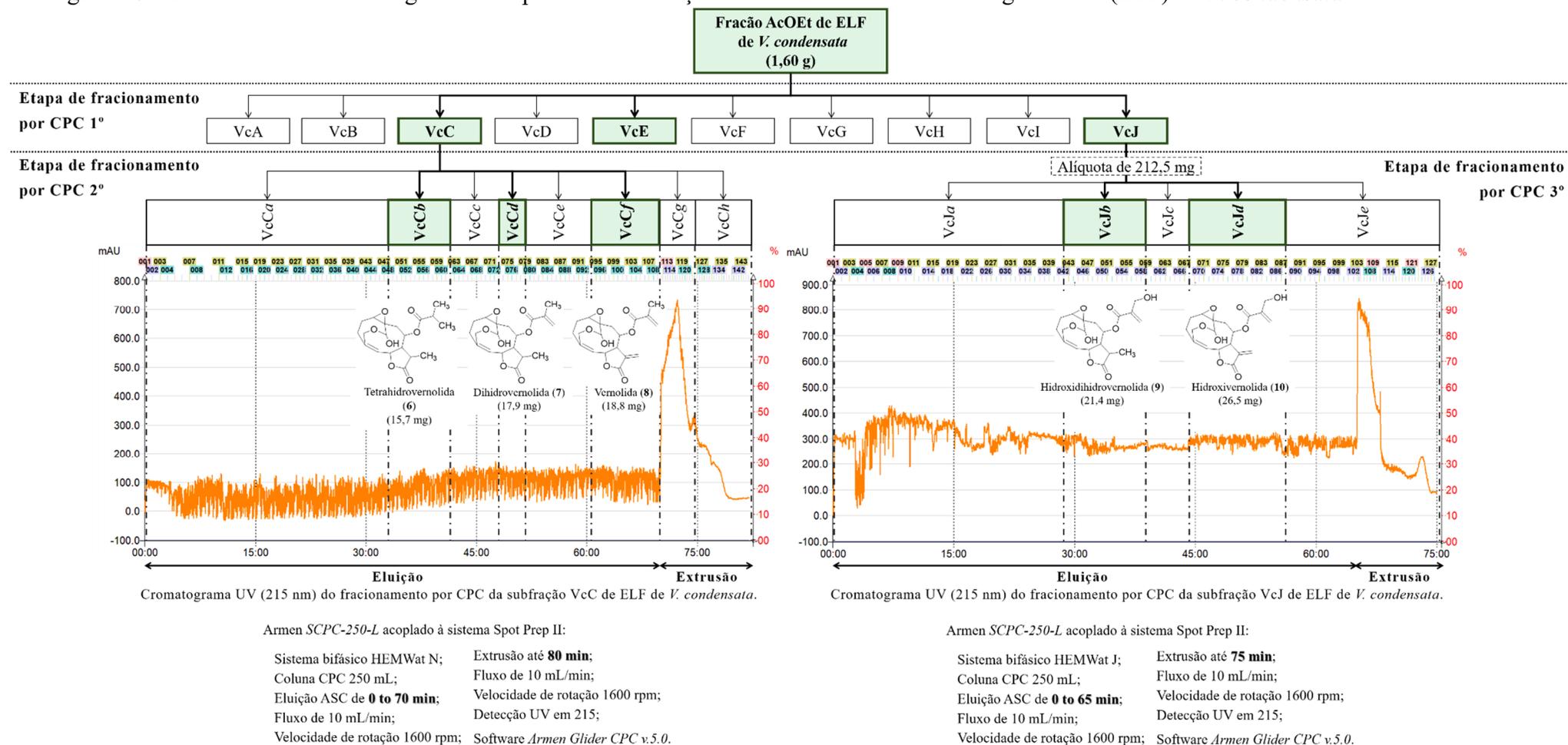
^a, áreas do pico dos compostos **6**, **7** e **8** obtidas a partir das análises de CLUE-EM da subfração VcC de *V. condensata*; ^b, valores de K_D estabelecidos em modo ascendente (ASC) e descendente (DSC) dividindo-se a área do pico na fase estacionária pela área na fase móvel; **HEMWat**, combinação dos solventes *n*-hexano/AcOEt/metanol/água; F_{Sup}, fase superior; F_{Inf}, fase inferior.

Tabela 12 – Valores de coeficiente de partição (K_D) obtidos para os compostos **9** e **10** na subfração VcJ de *V. condensata* frente aos sistemas HEMWat G, H, J e K.

Sistema bifásico de solventes	Hidroxidihydrovernalida (9)				Hidroxivernalida (10)			
	Área do pico ^a		Valor de K_D ^b		Área do pico ^a		Valor de K_D ^b	
	F _{Sup}	F _{Inf}	ASC	DSC	F _{Sup}	F _{Inf}	ASC	DSC
HEMWat (1/4/1/4) G	1879	1431	0,76	1,31	3064	2754	0,90	1,11
HEMWat (1/3/1/3) H	838	1041	1,24	0,81	1729	1727	1,00	1,00
HEMWat (2/5/2/5) J	634	839	1,32	0,75	1223	1782	1,46	0,69
HEMWat (1/2/1/2) K	523	1031	1,97	0,51	800	2016	2,52	0,40

^a, áreas do pico dos compostos **9** e **10** obtidas a partir das análises de CLUE-EM da subfração VcJ de *V. condensata*; ^b, valores de K_D estabelecidos em modo ascendente (ASC) e descendente (DSC) dividindo-se a área do pico na fase estacionária pela área na fase móvel; **HEMWat**, combinação dos solventes *n*-hexano/AcOEt/metanol/água; F_{Sup}, fase superior; F_{Inf}, fase inferior.

Fluxograma 7 – Fracionamento cromatográfico complementar da fração de AcOEt do extrato de lavagem foliar (ELF) de *V. condensata*.



AcOEt, acetato de etila; ASC, modo de eluição ascendente; CPC, cromatografia de partição centrífuga (para condições cromatográficas detalhas do fracionamento vide item 4.5.4).

O fracionamento complementar por CPC da subfração VcC forneceu, em única etapa adicional, 15,7 mg da tetrahidroveranolida (6), 17,9 mg da dihidroveranolida (7) e 18,8 mg da veranolida (8). Da mesma maneira, a partir da subfração VcJ a separação por CPC permitiu a obtenção de 21,4 mg da hidroxidihidroveranolida (9) e 26,5 mg da hidroxiveranolida (10).

5.5 PREPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS DE LACTONAS SESQUITERPÊNICAS

Uma vez obtida em grande quantidade a partir do fracionamento por CPC dos ELF de *C. scorpioides* e *L. chamissonis*, a LS glaucolídeo B (4) foi selecionada para ser utilizada como material de partida na produção de derivados semissintéticos de LS.

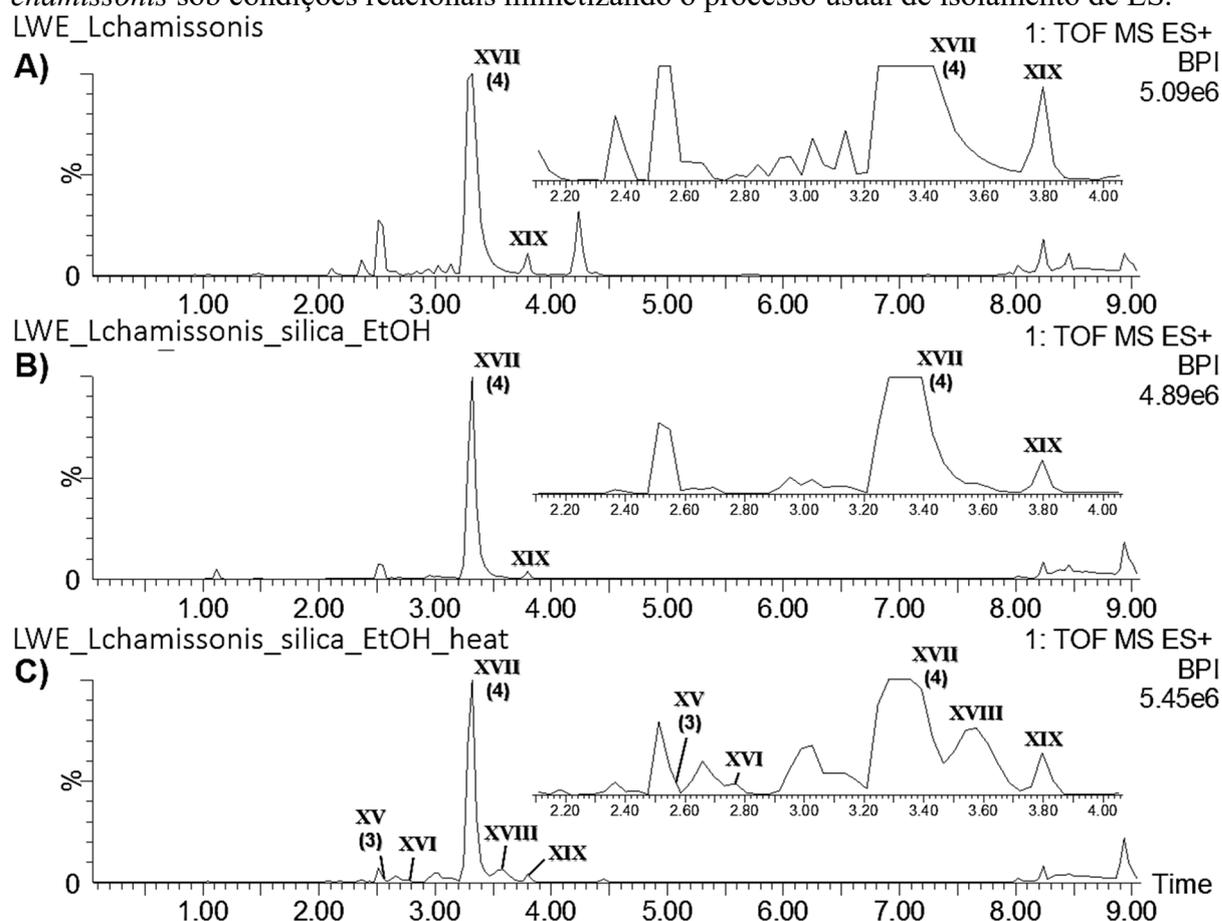
Assim como abordado previamente na seção de Revisão de literatura (vide *item 2.3.1*), os glaucolídeos parecem estar relacionados à formação de outros subtipos de LS (tais como hirsutinolídeos e cadinanolídeos) em função de uma conversão estrutural desencadeada a partir das condições do processo de extração e/ou purificação de extratos brutos, envolvendo usualmente adsorventes sólidos com caráter ácido (como sílica gel, terra bentonita) e solventes próticos (i.e. metanol, etanol) (BARDÓN et al., 1993; JIMENEZ et al., 1995; BAZON et al., 1997; BORKOSKY et al., 1997). No entanto, essa hipótese é questionada por alguns autores que sugerem que estes subtipos de LS, tidos como artefato, são, de fato metabólitos secundários produzidos pelo vegetal, uma vez que estão presentes em extratos brutos que não foram expostos às condições supracitadas (PILLAY et al., 2007; APPEZZATO-DA-GLORIA et al., 2012).

Diante dessa inconsistência de informações e com o intuito de melhor compreender as possibilidades de modificação estrutural do glaucolídeo B (4), submeteu-se o ELF de *L. chamissonis* (rico em glaucolídeo B, 4) a um teste reacional em presença de sílica gel e solvente prótico (vide *item 4.6.1*), mimetizando o processo usual de purificação de LS (MARTÍNEZ-VÁZQUEZ et al., 1992).

A Figura 31A,B mostra que em comparação com o extrato bruto de partida, o perfil cromatográfico por CLUE-EM do ELF de *L. chamissonis* praticamente não foi alterado após a exposição à sílica e etanol em temperatura ambiente à 25 °C, durante 24 h. A busca por LS em ambas as amostras revelou que, como esperado, o pico mais intenso (XVII, t_R : 3,28 min) corresponde ao glaucolídeo B (4, m/z 439,1631 [$C_{21}H_{26}O_{10}+H$]⁺, calculado para 439,1604) (Tabela 13), cuja determinação se deu em função da comparação do t_R após coinjeção do composto isolado e com seu perfil ESI-EM e EM/EM previamente estabelecido (vide *item*

5.3.1). Além deste, o pico **XIX** (t_R : 3,80 min, m/z 425,1816 $[C_{21}H_{28}O_9+H]^+$, calculado para 425,1812) também sugere um derivado de LS do tipo glaucolídeo (uma vez que seu perfil MS mostra um pico base $[M+H]^+$). O espectro de EM/EM do pico **XIX** mostra fragmentos em m/z 365,1599 e m/z 305,1388, formados pelas perdas de AcOH (60 Da) e dois AcOH (120 Da), respectivamente. Adicionalmente, a perda de dois AcOH (120 Da) seguida de ceteno (42 Da) gerou o íon m/z 263,1281, a partir do qual foram formados os fragmentos m/z 245,1175; 227,1069; 217,1225; 199,1119 e m/z 171,1170, respectivamente pelas perdas de H_2O (18 Da), duas H_2O (36 Da), H_2O mais CO (46 Da), duas H_2O mais CO (64 Da), e duas H_2O mais dois CO (92 Da) (Tabela 13). O perfil de fragmentação similar ao apresentado pelas LS já investigadas neste estudo (vide *item 5.3.1*), juntamente com os dados quimiotaxonômicos da tribo Vernoniae, permitiu caracterizar o pico **XIX** como sendo o composto confertolídeo, já obtido a partir da espécie *Vernonia conferta* Benth. (TOUBIANA; TOUBIANA; DAS, 1972).

Figura 31 – Análise comparativa por CLUE-EM do extrato bruto de lavagem foliar de *L. chamissonis* sob condições reacionais mimetizando o processo usual de isolamento de LS.



Cromatogramas de pico base obtidos por CLUE-EM (em modo positivo de ionização – condições cromatográficas vide *item 4.5.2.1.1*) comparando o ELF de *L. chamissonis* de partida (**A**) com o mesmo extrato em presença de sílica gel 60 e etanol, em temperatura ambiente à 25 °C (**B**) e sob aquecimento à 35 °C (**C**).

Tabela 13 – Compostos identificados na análise comparativa por CLUE-EM (ESI positivo) do extrato de lavagem foliar de *L. chamissonis* sob condições reacionais mimetizando o processo usual de isolamento de LS.

Nº do pico	Proposta de identificação	Tempo de retenção (min)	Fórmula molecular	m/z experimental (abundância relativa, %)	Erro (ppm)	Fragmentos EM/EM (m/z)	Íons m/z relevantes observados no espectro EM (abundância relativa, %)	Condições reacionais com detecção do pico
XV	Diacetilpiptocarfol (3) (<i>hirsutinolídeo</i>)	2,55	C ₁₉ H ₂₄ O ₉	419,1313 (29) [M+Na] ⁺ ^a	-1,2	359,1099; 277,1077; 259,0984; 241,0859; 231,1019; 217,0874; 213,0920; 199,0763; 189,0912; 185,0966; 173,0610; 171,0796	379,1395 (pb) [M+H-H ₂ O] ⁺	SE35
XVI	8-acetil-13-etoxipiptocarfol (<i>hirsutinolídeo</i>)	2,73	C ₁₉ H ₂₆ O ₈	405,1539 (19) [M+Na] ⁺ ^a	3,5	259,0985; 241,0868; 231,1024; 217,0869; 213,0924; 199,0751; 189,0925; 185,0973; 173,0607; 161,0604	365,1595 (pb) [M+H-H ₂ O] ⁺	SE35
XVII	Glaucolídeo B (4)	3,28	C ₂₁ H ₂₆ O ₁₀	439,1631 (pb) [M+H] ⁺	6,1	-	-	EP, SE25, SE35
XVIII	1,4-epoxi-1-etoxi-8,13-diacetoxi-10-hidroxi-germacra-5(11)-dien-6(12)-olídeo (<i>hirsutinolídeo</i>)	3,58	C ₂₁ H ₂₈ O ₉	447,1614 (5) [M+Na] ⁺ ^a	-3,8	387,1417; 345,1323; 301,1063; 259,0951; 241,0854; 231,1014; 217,0865; 213,0921; 199,0762; 189,0932; 185,0965; 173,0602; 171,0815	407,1692 (pb) [M+H-H ₂ O] ⁺	SE35
XIX	Confertolídeo (<i>glaucolídeo</i>)	3,80	C ₂₁ H ₂₈ O ₉	425,1816 (pb) [M+H] ⁺	0,9	365,1599; 305,1388; 263,1281; 245,1175; 235,1330; 227,1069; 217,1225; 203,1070; 199,1119; 189,1276; 187,0757; 171,1170;	-	EP, SE25, SE35

^a, O aduto de Na⁺ foi selecionado para a fragmentação EM/EM uma vez que o respectivo aduto de H⁺ apresentou uma intensidade muito baixa; **pb**, pico base (abundância relativa de 100%); Condições reacionais: **EP**, ELF de *L. chamissonis* de partida; **SE25**, ELF de *L. chamissonis* em presença de sílica e etanol à 25 °C por 24 h; **SE35**, ELF de *L. chamissonis* em presença de sílica e etanol à 35 °C por 24 h.

Por outro lado, a exposição à sílica e etanol sob refluxo à 35 °C, durante 24 h, promoveu uma mudança mais perceptível no perfil cromatográfico por CLUE-EM do ELF de *L. chamissonis* quando comparado ao extrato bruto de partida (Figura 31A,C). A investigação de possíveis derivados de LS no cromatograma do ELF de *L. chamissonis* sujeito condição mais extremas de temperatura se deu a partir da busca de íons diagnósticos já propostos (vide *item 5.3.1*) para os subtipos glaucolídeo e hirsutinolídeo, e indicou a presença de três picos sugestivos de LS. O pico **XV** (t_R : 2,55 min, m/z 419,1313 $[C_{19}H_{24}O_9+Na]^+$, calculado para 419,1318) apresentou um perfil EM correspondente com o núcleo hirsutinolídeo. A coincidência no perfil ESI-EM e EM/EM (Tabela 13) com as LS já estudadas (vide *item 5.3.1*) e no t_R após coinjeção do composto isolado permitiu caracterizar o pico **XV** como sendo o composto diacetilpiptocarfol (**3**). Este composto, que foi previamente isolado do macerado etanólico de caules e flores de *L. chamissonis* (vide *item 4.2.2.1.1*), também já foi reportado para outras espécie da tribo Vernonieae em condições similares de extração/purificação (CATALÁN et al., 1986; BUSKUHL et al., 2010; GIRARDI et al., 2015).

Da mesma forma, o pico **XVIII** (t_R : 3,58 min, m/z 447,1614 $[C_{21}H_{28}O_9+Na]^+$, calculado para 447,1631), indica se tratar de uma LS com esqueleto hirsutinolídeo, cujo espectro de EM apresenta o pico base m/z 407,1692 correspondendo ao aduto protonado com perda de água na fonte $[M+H-H_2O]^+$ (Tabela 13). O espectro EM/EM do precursor m/z 447 apresentou os fragmentos m/z 387,1417; 345,1323 e m/z 301,1063, formados pela perda de AcOH (60 Da), AcOH mais ceteno (102 Da), e etanol mais H₂O mais acetato de sódio (146 Da), respectivamente. Além desses, os fragmentos propostos como diagnósticos de hirsutinolídeos também foram detectados em m/z 259,0951; 241,0854 e m/z 231,1014, bem como os demais íons produtos em m/z 217,0865; 213,0921; 199,0762; 189,0932; 185,0965; 173,0602 e m/z 171,0815, oriundos do mecanismos de fragmentação de hirsutinolídeos já previamente abordados (vide *item 4.2.2.1.1*). A partir da quimiotaxonomia da tribo Vernonieae (sendo isolado da espécie *Chrysoleaena verbascifolia*) e pela concordância dos dados de EM e EM/EM (Tabela 13) com o reportado na literatura (BARDÓN et al., 1993), o pico **XVIII** foi caracterizado como sendo 1,4-epoxi-1-etoxi-8,13-diacetoxi-10-hidroxi-germacra-5(11)-dien-6(12)-olídeo. Assim com o pico **XVIII**, o pico **XVI** (t_R : 2,73 min), com íon precursor m/z 405,1539 $[C_{19}H_{26}O_8+Na]^+$ (calculado para 405,1525), também apresentou um perfil EM sugestivo do subtipo de LS hirsutinolídeo com pico base em m/z 365,1595 $[M+H-H_2O]^+$. Seu espectro de massas em tandem indicou a formação de íons fragmentos similares aos observados para os hirsutinolídeos já investigados (vide *item 4.2.2.1.1*), incluindo os íons propostos como diagnósticos para este esqueleto. Considerando o perfil ESI-EM e EM/EM (Tabela 13) em

acordo com o descrito na literatura (GIRARDI et al., 2016) e a quimiotaxonomia da tribo, já tendo sido isolado da espécie *Cyrtocymura scorpioides* (BUSKUHL et al., 2010), o pico **XVI** foi caracterizado como 8-acetil-13-etoxiptocarfol.

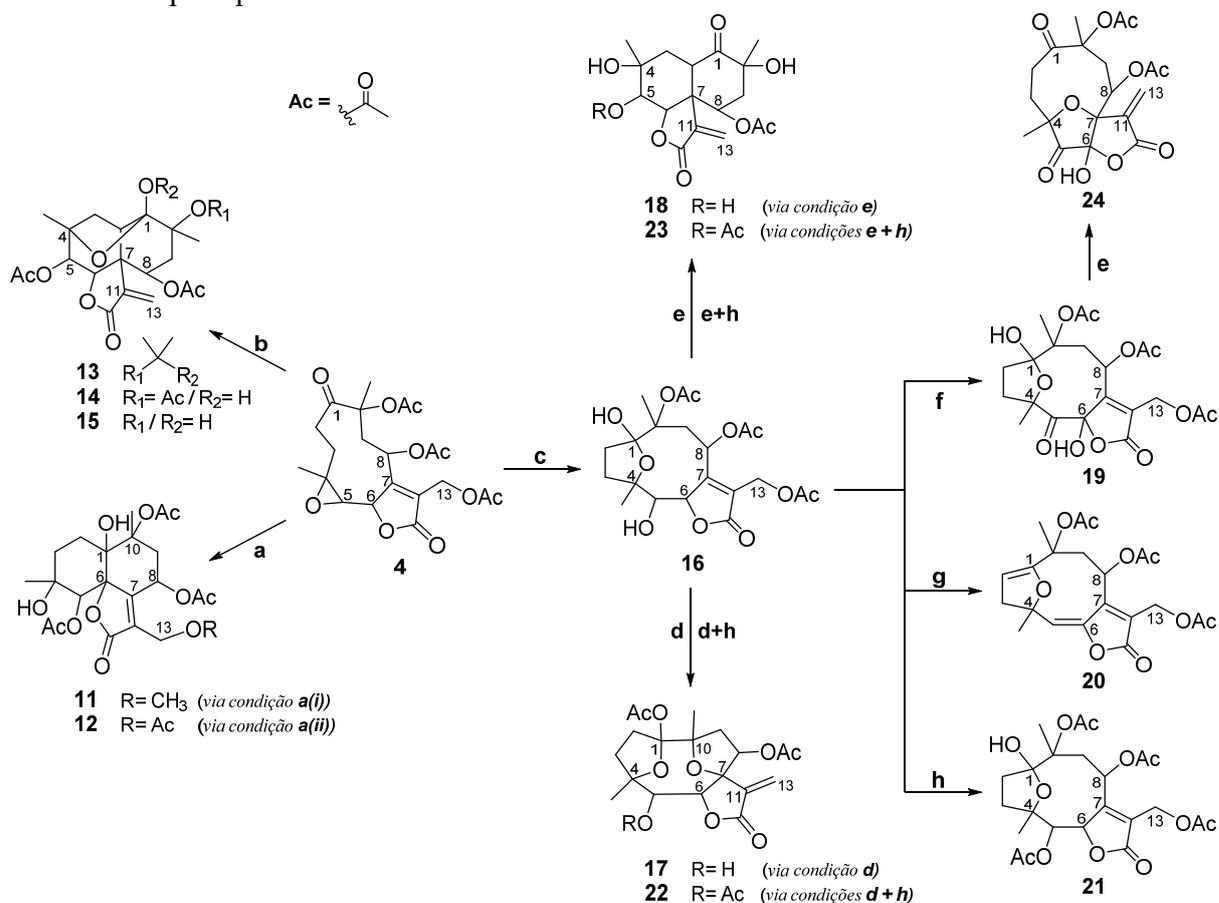
A formação do composto **XV**, correspondendo ao hirsutinolídeo diacetilptocarfol (**3**), bem como de seus derivados etoxilados em C-13 e C-1 (**XVI** e **XVIII**, respectivamente) – estes muito provavelmente formados como artefatos reacionais de **XV**, parece estar relacionada à conversão a partir do componente majoritário do ELF de *L. chamissonis*, o glaucolídeo B (**4**). Essa proposta é fundamenta no fato de que a obtenção de hirsutinolídeos, incluído aqueles com substituintes etoxi, já foi demonstrado anteriormente por Martínez-Vázquez e colaboradores (1992) em reações a partir de esqueleto glaucolídeo em presença de sílica gel e etanol.

A partir desses dados observados no teste de exposição do ELF de *L. chamissonis* às condições envolvendo sílica e solvente prótico, foi possível identificar que de fato há, nas condições ensaiadas, um potencial de conversão do esqueleto glaucolídeo em outros subtipos de LS. Apesar disso, essa transformação não se mostrou evidente e instantânea, tendo em vistas as baixas intensidades no cromatograma para os picos correspondentes a estes possíveis artefatos (**XV**, **XVI** e **XVIII**) de conversão estrutural.

Esses achados sugeriram a hipótese de que o meio ao qual o esqueleto glaucolídeo está exposto, seja em virtude do tipo de solvente utilizado na extração/purificação, do suporte empregado no fracionamento cromatográfico e até mesmo da influência da complexidade de compostos presentes na amostra, podem desencadear a transformação do esqueleto carbocíclico por diferentes formas/vias.

Nesse sentido, com o intuito de se avaliar a sensibilidade das LS ao meio ácido-básico e influência dessas condições reacionais perante a conversão do esqueleto de LS, a estratégia baseada na utilização de catalisadores com propriedades ácido-base variadas em reações de ciclização transanular a partir do glaucolídeo B (**4**) possibilitou a produção de diferentes núcleos carbocíclicos de LS. A escolha por agentes catalíticos com diferentes características ácido-base se deu em função dos variados valores de pKa dos solventes e suportes cromatográficos utilizados no isolamento dessa classe de compostos (que além da sílica gel e bentonita com propriedades ácidas, também são utilizados florisil e alumina que apresentam características básicas). Em paralelo, a produção de análogos de alguns dos derivados produzidos desse processo de conversão das LS foi também desenvolvida com sucesso, sendo obtidos compostos com modificados substituintes estruturais. O Esquema 23 apresenta de forma resumida as condições reacionais exploradas nesse estudo para a produção dos derivados semissintéticos **11-24** de LS (para maiores detalhes das condições reacionais vide *item 4.6.3*).

Esquema 23 – Esquema reacional geral de produção dos derivados semissintéticos (**11-24**) de lactonas sesquiterpênicas.



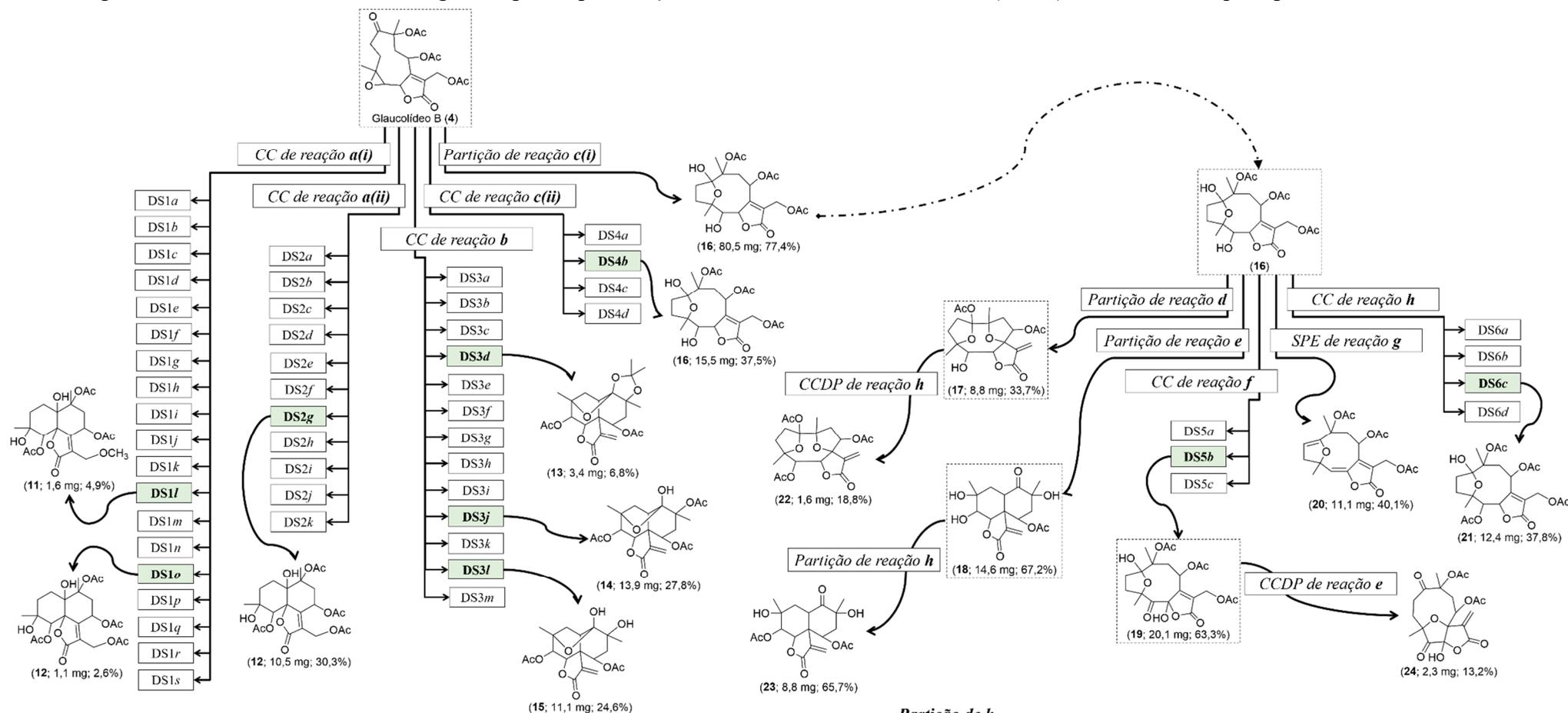
Condições reacionais: **(a)** (i) DMAP, MeOH, refluxo a 60 °C, 3 h **ou** (ii) DMAP, DCM, rt, 0,5 h; **(b)** BiCl₃, Ac₂O, DCM, Ar, rt, 2 h; **(c)** (i) BiCl₃, DCM, Ar, rt, 3 h **ou** (ii) TFA-H₂O, DCM, -2 °C-rt, 24 h; **(d)** K₂CO₃ (aq.), THF, refluxo a 45 °C, 2 h; **(e)** BiCl₃, DCM, refluxo a 50 °C, 15 h; **(f)** PCC/SiO₂ (1:1), DCM, Ar, rt, 48 h; **(g)** SOCl₂, piridina, Ar, DCM, -10 °C (0,5 h) seguido por refluxo a 60 °C (3,5 h); **(h)** 1) DMAP, Et₃N, Ac₂O, DCM, -10 °C, 0,5 h, 2) derivado (**16, 17 ou 18**), DCM, rt, 0,5 h.

A estratégia de ciclização transanular vem se mostrando uma ferramenta interessante para síntese de produtos naturais (CLARKE; REEDER; WINN, 2009; YANG; XUE, 2013; MENG; FÜRSTNER, 2019).

Da mesma forma, essa abordagem também tem sido empregada na produção de derivados semissintéticos de LS (DE MIERI et al., 2015; DE MIERI et al., 2017b; ÁLVAREZ-CALERO et al., 2018).

Os detalhes do fracionamento e purificação dos derivados semissintéticos (**11-24**) produzidos estão descritos no Fluxograma 8.

Fluxograma 8 – Fracionamento cromatográfico para a purificação dos derivados semissintéticos (11-24) de lactonas sesquiterpênicas.



CC de reação a(i) em sílica gel

Sistema eluente gradiente:
acetona em *n*-hexano (20-50%)

CC de reação b em sílica gel

Sistema eluente gradiente:
acetona em CHCl₃ (10-30%)

Partição de reação c(i)

Extração com DCM (3x15 mL)

Partição de h

Extração com DCM (3x15 mL)

SPE de reação g

Sistema eluente isocrático:
acetona 100%

CC de reação h em sílica gel

Sistema eluente gradiente:
acetona em *n*-hexano (30-50%)

CC de reação a(ii) em sílica gel

Sistema eluente gradiente:
acetona em *n*-hexano (20-100%)

CC de reação c(ii) em sílica gel

Sistema eluente isocrático:
n-hexano/acetona 70:30 (v/v)

CCDP de reação h em sílica gel

Sistema eluente isocrático:
n-hexano/acetona 70:30 (v/v) - Rf≅0,40

Partição de reação d

Extração com DCM (3x15 mL)

Partição de reação e

Extração com DCM (3x15 mL)

CC de reação f em sílica gel

Sistema eluente isocrático:
DCM/acetona 80:20 (v/v)

CCDP de reação e em sílica gel

Sistema eluente isocrático:
n-hexano/acetona 60:40 (v/v) - Rf≅0,46

Condições reacionais: (a) (i) DMAP, MeOH, refluxo a 60 °C, 3 h ou (ii) DMAP, DCM, rt, 0,5 h; (b) BiCl₃, Ac₂O, DCM, Ar, rt, 2 h; (c) (i) BiCl₃, DCM, Ar, rt, 3 h ou (ii) TFA-H₂O, DCM, -2 °C-rt, 24 h; (d) K₂CO₃ (aq.), THF, refluxo a 45 °C, 2 h; (e) BiCl₃, DCM, refluxo a 50 °C, 15 h; (f) PCC/SiO₂ (1:1), DCM, Ar, rt, 48 h; (g) SOCl₂, piridina, Ar, DCM, -10 °C (0,5 h) seguido por refluxo a 60 °C (3,5 h); (h) 1) DMAP, Et₃N, Ac₂O, DCM, -10 °C, 0,5 h, 2) derivado (16, 17 ou 18), DCM, rt, 0,5 h; CC, cromatografia em coluna clássica; CCDP, cromatografia em camada delgada preparativa; SPE, extração em fase sólida

Os derivados (**11-24**) obtidos e caracterizados foram encaminhados para a avaliação do seu potencial biológico (em parceria).

5.6 CARACTERIZAÇÃO E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DAS LACTONAS SESQUITERPÊNICAS ISOLADAS E DOS DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS

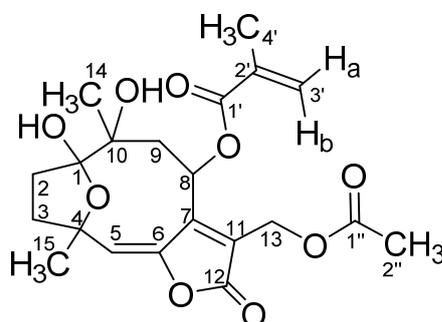
A análise de RMN ^1H em temperatura ambiente para algumas das LS investigadas evidenciou a presença de sinais alargados e com multiplicidade pouco definida, dificultando sua interpretação. Isso se deve provavelmente devido à entalpia que a temperatura ambiente confere a este compostos, proporcionando, em virtude da flexibilidade das estruturas (anéis carbocíclicos de muitos membros), a presença de vários conformêros do mesmo composto em equilíbrio (BARDÓN et al., 1990), afetando a resolução dos seus sinais no espectro.

Esse comportamento, já observado para diferentes LS do mesmo tipo sujeitas à mesma condição analítica (COSTA et al., 2000; BUSKUHL et al., 2010), foi contornado desenvolvendo-se as análises de RMN em temperatura reduzida, a 263 K (-10,1 °C), 273 K (-0,1 °C) ou a 283 K (9,8 °C).

5.6.1 Lactonas sesquiterpênicas isoladas a partir de espécies selecionadas de Vernoniaeae: compostos 1-10

5.6.1.1 Composto (**1**): piptocarfina A

Figura 32 – Estrutura molecular da piptocarfina A (**1**) de *Vernonanthura tweedieana*.



Fonte: adaptado de Cowall et al. (1981), Liao et al. (2012) e Igual et al. (2013).

Os dados espectroscópicos de RMN ^1H e RMN ^{13}C (obtidos das projeções dos experimentos bidimensionais) observados para o composto **1** foram comparados com dados da literatura, cujas informações estão apresentadas na Tabela 14.

Tabela 14 – Dados de RMN ¹H e RMN ¹³C para a piptocarфина A (**1**) de *Vernonanthura tweedieana* e dados comparativos da literatura.

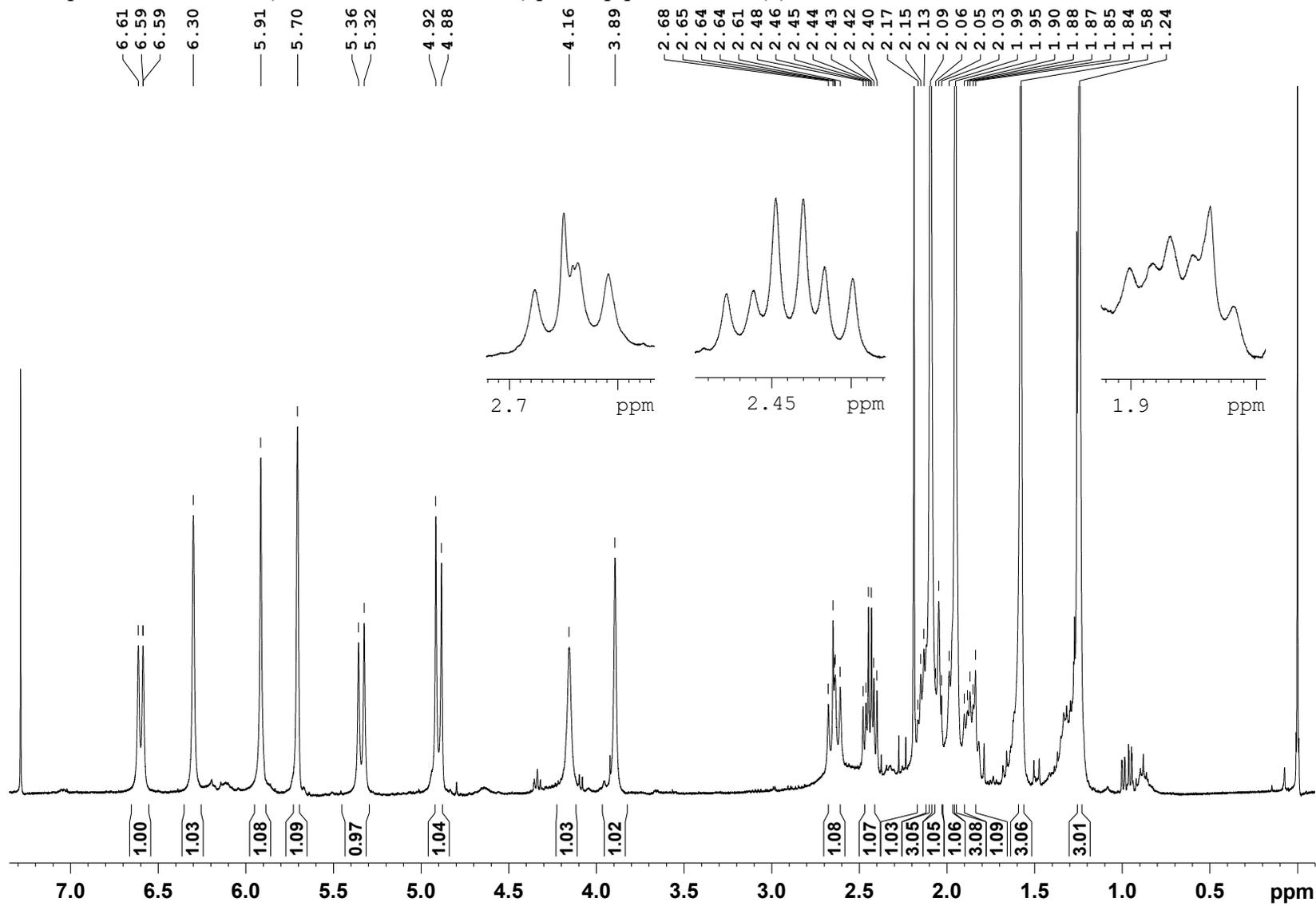
Posição	(1)		(COWALL et al., 1981)	
	δ ¹ H mult. (J Hz)	δ ¹³ C	δ ¹ H mult. (J Hz)	δ ¹³ C
1	-	108,5	-	108,5
2a	1,96 <i>ddd</i> (12,4; 12,2; 6,6)	31,8	2,44 <i>dt</i> (12,5; 7,1)	32,0
2b	1,86 <i>ddd</i> (13,0; 12,2; 7,1)		1,8-2,2 <i>m</i>	
3a	2,44 <i>ddd</i> (13,0; 12,7; 6,6)	38,0	1,8-2,2 <i>m</i>	37,4
3b	2,12 <i>ddd</i> (12,7; 12,4; 7,1)		1,8-2,2 <i>m</i>	
4	-	82,3	-	82,1
5	5,91 <i>sl</i>	126,9	5,91 <i>s</i>	126,5
6	-	144,1	-	149,5
7	-	149,2	-	143,9
8	6,60 <i>d</i> (10,8)	66,1	6,54 <i>dl</i> (10,6)	66,1
9a	2,64 <i>dd</i> (16,1; 10,8)	37,2	2,63 <i>dd</i> (10,6; 9,8)	37,9
9b	2,06 <i>d</i> (16,1)		1,8-2,2 <i>m</i>	
10	-	78,0	-	77,9
11	-	131,2	-	130,9
12	-	167,2	-	166,8
13a	5,34 <i>d</i> (12,8)	55,7	5,30 <i>d</i> (12,9)	55,5
13b	4,90 <i>d</i> (12,8)		4,89 <i>d</i> (12,9)	
14	1,24 <i>s</i>	25,4	1,24 <i>s</i>	25,2
15	1,57 <i>s</i>	29,2	1,57 <i>s</i>	29,1
OH-1	4,15 <i>s</i>	-	4,14 <i>sl</i>	-
OH-10	3,89 <i>s</i>	-	3,82 <i>sl</i>	-
1'	-	165,8	-	165,7
2'	-	136,8	-	135,6
3'a	6,30 <i>sl</i>	127,4	6,28 <i>dq</i> (1,25; 0,8)	127,2
3'b	5,71 <i>sl</i>		5,68 <i>dq</i> (1,5; 1,25)	
4'	1,95 <i>s</i>	18,0	1,94 <i>dd</i> (1,5; 0,8)	17,9
1''	-	170,7	-	170,3
2''	2,09 <i>s</i>	20,8	2,07 <i>s</i>	20,6

(400 MHz ¹H, 100 MHz ¹³C, CDCl₃, 283 K) (360 MHz ¹H, 90 MHz ¹³C, CDCl₃, temperatura não indicada)

As análises de RMN ¹H e bidimensionais para o composto **1** foram desenvolvidas em temperatura reduzida, a 283 K (9,8 °C) – experimentos de RMN ¹H a 263 K (-10,1 °C) também realizados para favorecer a interpretação da multiplicidade de alguns sinais.

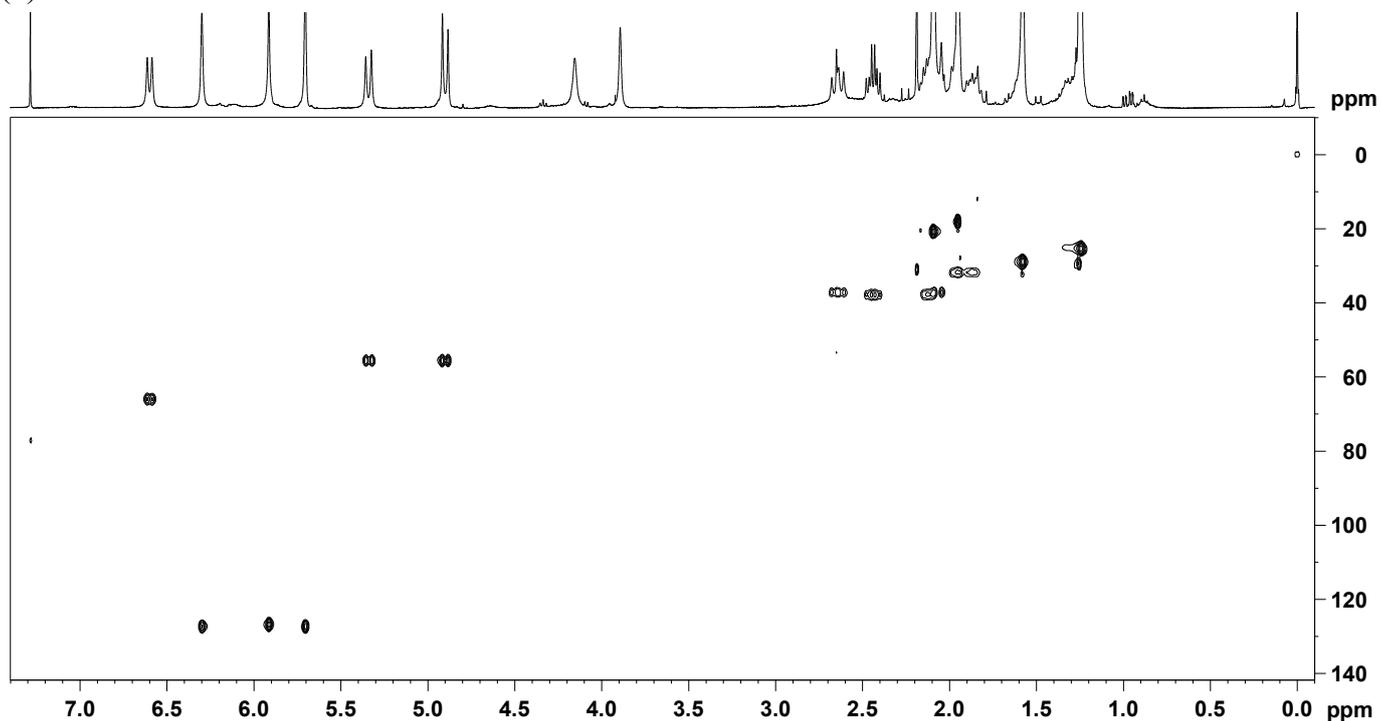
A partir dos dados espectrais de RMN ¹H (Figura 33) e dos mapas de correlações de HSQC (Figura 34) e HMBC (Figura 35) foi possível identificar a presença do grupo metacrilóiloxi por meio das correlações dos hidrogênios olefinicos na forma de multipletto (*m*) ressonando em δ 5,71 (1H, H-3'b) e δ 6,30 (1H, H-3'a) (C-3' em 127,4 ppm) e dos hidrogênios da metila (CH₃) em δ 1,95 (3H, H-4') na forma de simpleto (*s*) com a carbonila em δ 165,8 (C-1') e com o segundo carbono olefínico em δ 136,8 (C-2') (LIAO et al., 2012). A correlação entre o hidrogênio oximetínico δ 6,60 (1H, H-8) na forma de dupletto (*d*) com a carbonila em δ 165,8 do metacrilóiloxi confirmou a posição desse substituinte em C-8 (δ 66,8).

Figura 33 – Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , 283 K) para a piptocarфина A (**1**) de *Vernonanthura tweedieana*.



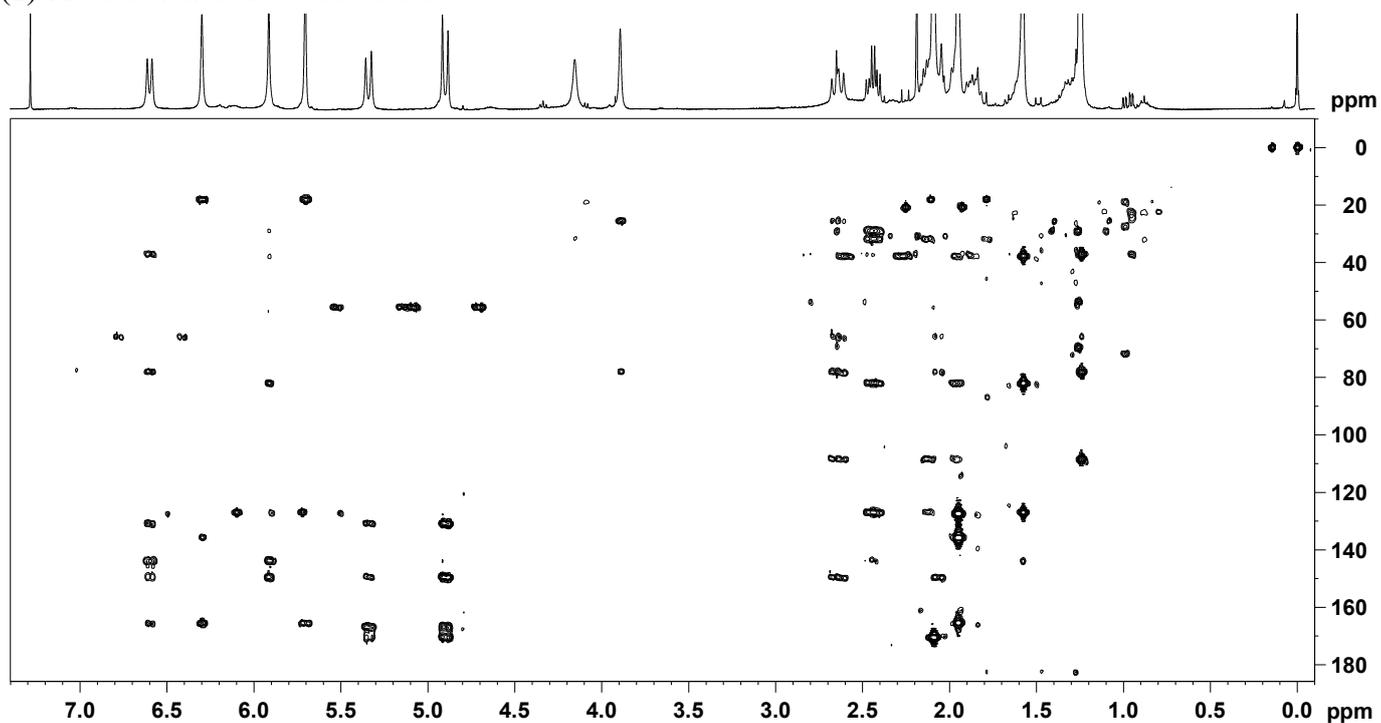
Eixo Y: intensidade; Eixo X: deslocamento químico, expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00).

Figura 34 – Mapa de correlação HSQC (400 MHz ^1H e 100 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 283 K) para a piptocarфина A (1) de *Vernonanthura tweedieana*.



Eixo Y: projeção para ^{13}C , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00); Eixo X: deslocamento químico ^1H , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00).

Figura 35 – Mapa de correlação HMBC (400 MHz ^1H e 100 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 283 K) para a piptocarфина A (1) de *Vernonanthura tweedieana*.



Eixo Y: projeção para ^{13}C , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00); Eixo X: deslocamento químico ^1H , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00).

A correlação entre hidrogênio diastereotópicos na forma de duplete (*d*) em δ 4,90 (1H; $J=12,8$ Hz; H-13b) e δ 5,34 (1H; $J=12,8$ Hz; H-13a) com a carbonila em 167,2 ppm (C-12) e com os carbonos olefínicos α -carbono em δ 131,2 (C-11), β -carbono em δ 149,2 (C-7) e o γ -carbono em δ 144,1 (C-6) indicaram a existência de um anel γ -lactônico com uma α,β -insaturação endocíclica, característico para as LS da tribo Vernoniaceae (BORKOSKY et al., 2009; GALLON et al., 2018). O simpleto largo (*sl*) em δ 5,91 (1H, H-5), com carbono sp^2 δ 144,1 (C-5) mostrou uma olefina conjugada à lactona, confirmado pela correlação deste H com o β -carbono do anel. Os hidrogênios do simpleto em δ 2,09, apresentando correlação com a carbonila em δ 170,7 (C-1"), indicou a presença de um substituinte acetoxi ligado ao carbono na posição alílica em C-13 (δ 55,7) devido à correlação dos hidrogênios do metileno em C-13 (δ 4,90 *d* e δ 5,34 *d*) com a carbonila em C-1" (δ 170,7).

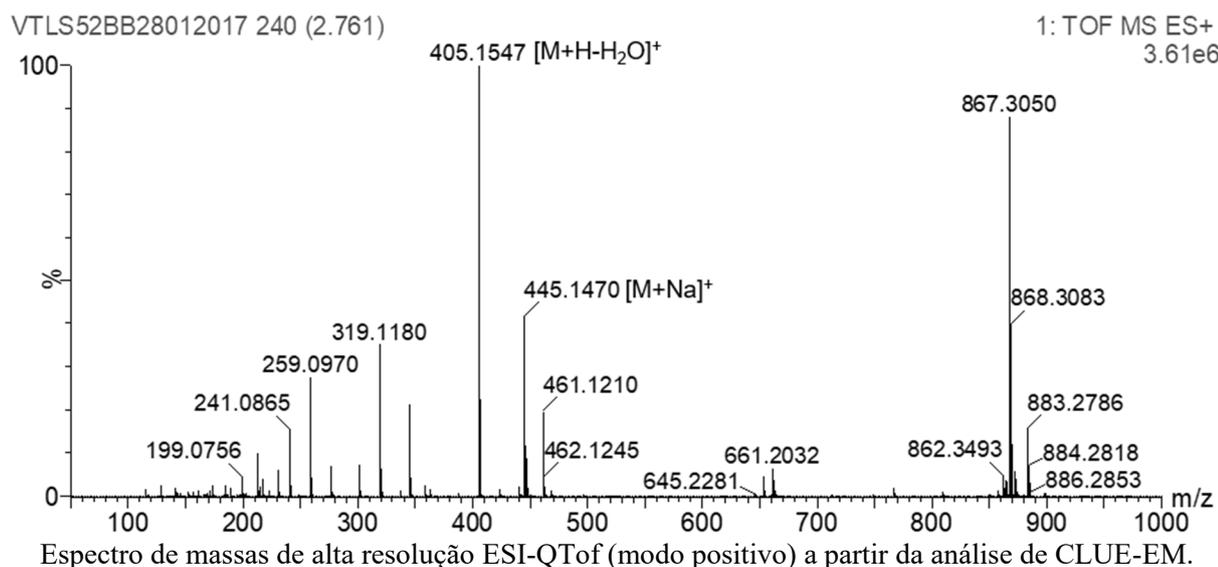
Além deste, foram identificados outros três grupos metilenos nas posições C-2 (δ 31,8), C-3 (δ 38,0) e C-9 (δ 37,2), com hidrogênios ressonando em δ 1,86 *ddd* (1H, $J=10,3$; 12,2; 7,1, H-2a) e δ 1,96 *ddd* (1H, $J=12,4$; 12,2; 6,6, H-2b), em δ 2,12 *ddd* (1H, $J=12,7$; 12,4; 7,1, H-3b) e δ 2,44 *ddd* (1H, $J=13,0$; 12,7; 6,6, H-3a), e em δ 2,06 *d* (1H, $J=16,1$, H-9b) e δ 2,64 *dd* (1H, $J=16,1$; 10,8, H-9a), respectivamente.

Foi possível observar também a correlação entre os hidrogênios de metilas em δ 1,24 *s* (3H, H-14) e δ 1,57 *s* (3H, H-15) respectivamente com carbonos oxigenados em δ 78,0 (C-10) e δ 108,5 (C-1), e carbono em δ 82,3 (C-4), cujos valores de descolamento químico sugeriram carbonos oxigenados. Além disso, o carbono em 108,5 ppm indicou a presença de uma função hemiacetal em C-1, que juntamente com o carbono δ 82,3 (C-4) e os carbonos metilênicos em δ 31,8 (C-2) e δ 38,0 (C-3), sugeriram um anel tetrahydrofurano em C-1/C-4. Estes achados corroboraram com um núcleo de LS do tipo hirsutinolídeo (JAKUPOVIC et al., 1986b).

A partir da análise de HMBC do composto **1** também foi possível corrigir as atribuições para os carbonos C-6 e C-7 realizadas de forma inversa por Cowall e colaboradores (1981), assim como as atribuições dos carbonos C-3 e C-9, também designados de maneira inversa apesar da indicação dessa possibilidades pelos mesmos autores.

A análise de ESI-QToF EM confirmou se tratar da piptocarфина A (**1**) (Figura 32), assim como abordado previamente na etapa de caracterização das LS do tipo hirsutinolídeo em presença de fase móvel aquosa acidificada, observou-se a presença do pico base na forma de aduto protonado com perda de água na fonte m/z 405,1547 [$C_{21}H_{26}O_9+H-H_2O$]⁺ (calculado 405,1549), além do íon molecular na forma de aduto com sódio m/z 445,1470 [$C_{21}H_{26}O_9+Na$]⁺ (calculado 445,1475) no espectro de EM *full scan* (Figura 36). Estes dados que estão em acordo ao descrito na literatura para a piptocarфина A (GIRARDI et al., 2016).

Figura 36 – Espectro ESI-QToF EM *full scan* (100-1200 Da) para a piptocarфина A (**1**) de *Vernonanthura tweedieana*.

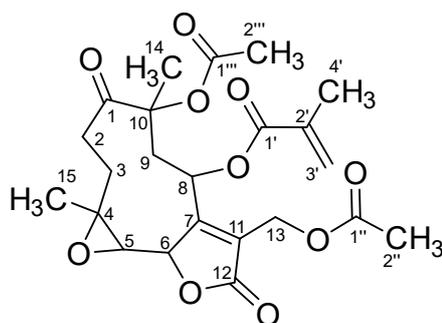


Sendo assim, a partir destes dados foi possível determinar que o composto **1** correspondeu à LS do tipo hirsutinolídeo, piptocarфина A (Figura 32), cuja fórmula molecular é C₂₁H₂₆O₉ (BOHLMANN; BRINDÖPKE; RASTOGI, 1978; COWALL et al., 1981; CATALÁN et al., 1986; ABDEL-SATTAR; MOSSA; EL-ASKARY, 2000; LIAO et al., 2012).

Martucci e colaboradores (2014), na investigação metabolômica de dez espécies do gênero *Vernonanthura*, identificaram a piptocarфина A nas espécies *V. brasiliiana* e *V. phosphorica*. A piptocarфина A foi também isolada a partir de *V. squamulosa*, *V. phosphorica* e *V. chamaedrys* (CATALÁN et al., 1986; CATALÁN et al., 1988; KOTOWICZ et al., 1998; IGUAL et al., 2013), corroborando com a proposta de isolamento para a espécie *V. tweedieana*.

5.6.1.2 Composto (**2**): glaucolídeo A

Figura 37 – Estrutura molecular do glaucolídeo A (**2**) de *Vernonanthura tweedieana*.



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

Os dados observados de RMN ^1H e RMN ^{13}C para o glaucolídeo A (**2**), juntamente com os dados comparativos da literatura, estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 – Dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C para o glaucolídeo A (**2**) de *Vernonanthura tweedieana* e dados comparativos da literatura.

Posição	(2)		(BARDÓN et al., 1990)	
	δ $^1\text{H mult. (J Hz)}$	δ ^{13}C	δ $^1\text{H mult. (J Hz)}$	δ ^{13}C
1	-	206,7	-	207,7
2a	2,96 <i>ddd</i> (17,3; 12,7; 4,8)	32,6	2,93 <i>ddd</i> (17,0; 11,5; 5,0)	33,3
2b	2,25-2,36 <i>m</i>		2,50 <i>m</i>	
3a	2,63 <i>ddd</i> (14,0; 13,5; 4,8)	31,4	2,50 <i>m</i>	32,5
3b	1,61-1,72 <i>m</i>		1,70 ~	
4	-	61,5	-	61,0
5	2,84 <i>d</i> (9,5)	58,5	2,74 <i>d</i> (9,5)	59,5
6	4,95 <i>d</i> (9,5)	80,7	4,89 <i>d</i> (9,5)	81,1
7	-	163,6	-	162,8
8	4,76 <i>d</i> (8,3)	64,3	4,93 <i>d</i> (7,5)	64,5
9a	2,84 <i>dd</i> (16,2; 8,3)	40,0	2,82 <i>dd</i> (15,5; 7,5)	41,9
9b	2,28 <i>d</i> (16,2)		2,41 <i>dl</i> (15,5)	
10	-	84,4	-	84,5
11	-	124,6	-	126,0
12	-	169,5	-	169,4
13a	4,81 <i>sl</i>	54,9	4,90 <i>dd</i> (13,1)	55,3
13b	4,81 <i>sl</i>		4,83 <i>dd</i> (13,1)	
14	1,55 <i>s</i>	18,7	1,67 <i>s</i>	19,1
15	1,68 <i>s</i>	22,5	1,61 <i>s</i>	19,1
1'	-	166,2	-	166,3
2'	-	134,4	-	135,2
3'a	6,16-6,18 <i>m</i>	128,0	6,16 <i>tl</i> (1,0)	127,2
3'b	5,74-5,76 <i>m</i>		5,69 <i>tl</i> (1,0)	
4'	1,94 <i>sl</i>	18,1	1,96 <i>q</i> (1,0)	17,8
1''	-	170,4	-	170,6
2''	2,07 <i>s</i>	20,8	2,07 <i>s</i>	20,8
1'''	-	169,8	-	169,9
2'''	2,11 <i>s</i>	21,0	2,06 <i>s</i>	20,5

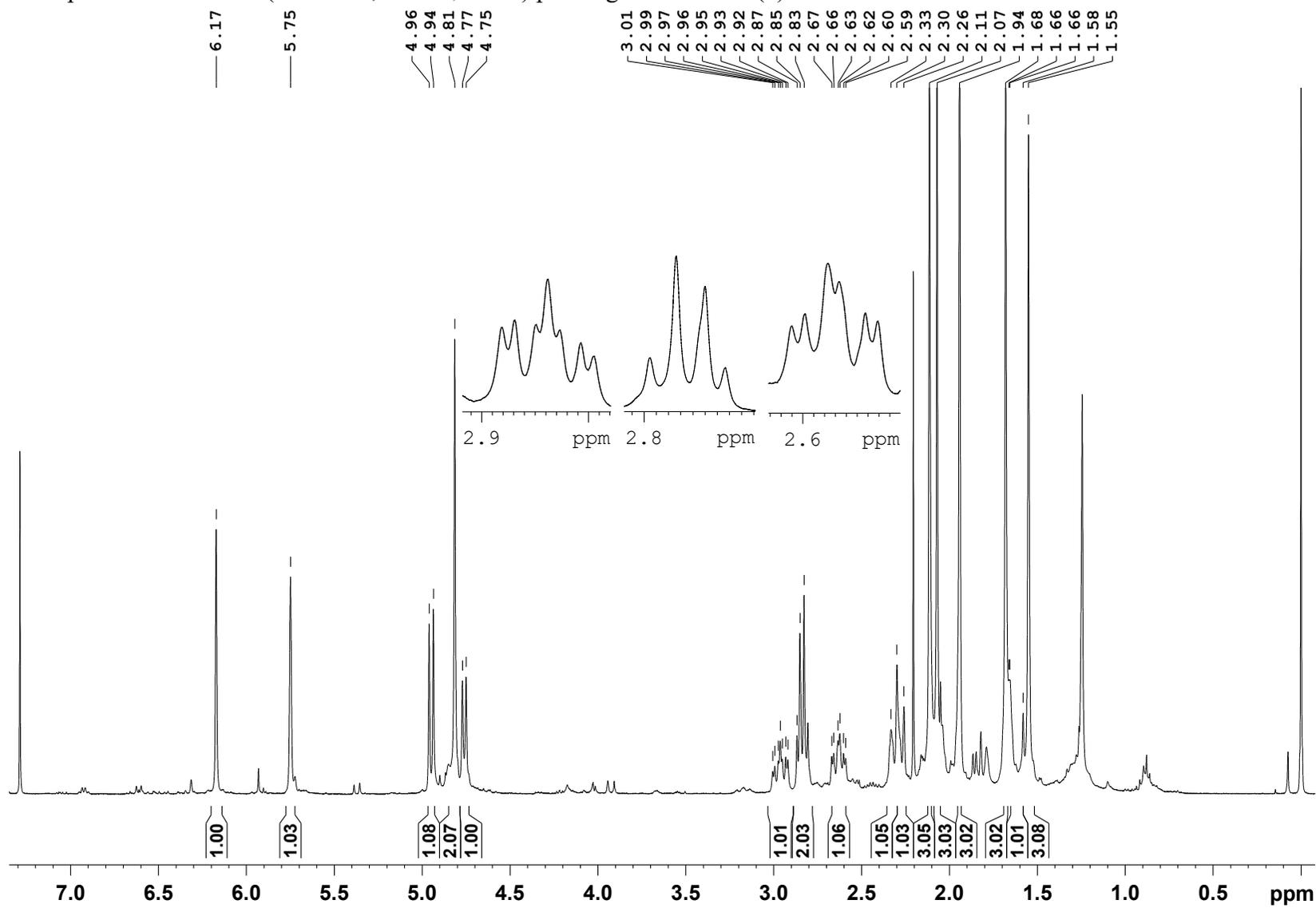
(400 MHz ^1H , 100 MHz ^{13}C ,
CDCl₃, 263 K)

(270 MHz ^1H , 67 MHz ^{13}C ,
CDCl₃, 330 K)

As análises de RMN ^1H e bidimensionais para o composto **2** também foram desenvolvidas em temperatura reduzida, a 263 K (-10,1 °C).

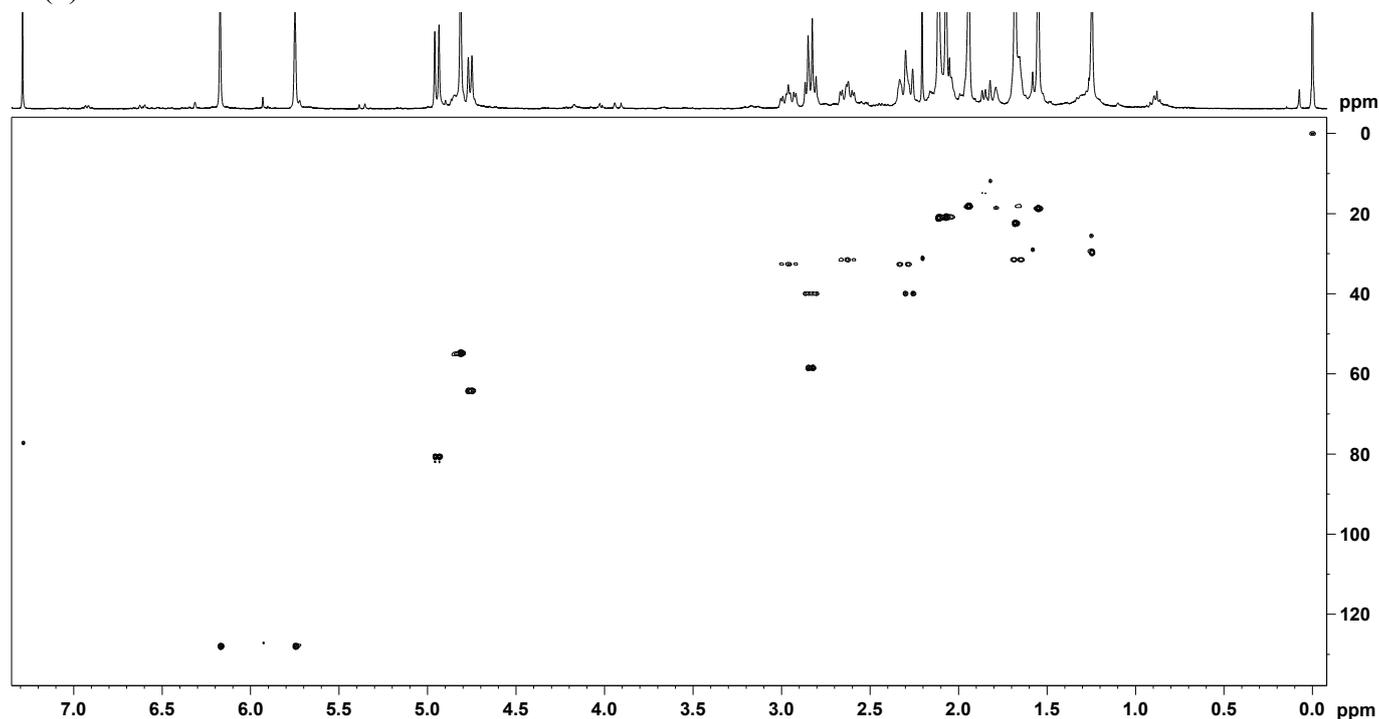
A partir dos dados espectrais de RMN ^1H (Figura 38) e dos mapas de correlações de HSQC (Figura 39) e HMBC (Figura 40) para o composto **2**, foi possível observar a presença sinais semelhantes à LS piptocarфина A (**1**) (para maiores detalhes vide *item 5.6.1.1*), sugerindo a presença de um substituinte metacrililoíxi em C-8 e um anel butirólactona em C-6/C-7 contendo um grupo acetoxi conjugado na posição alílica C-13.

Figura 38 – Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , 263 K) para o glicolídeo A (**2**) de *Vernonanthura tweedieana*.



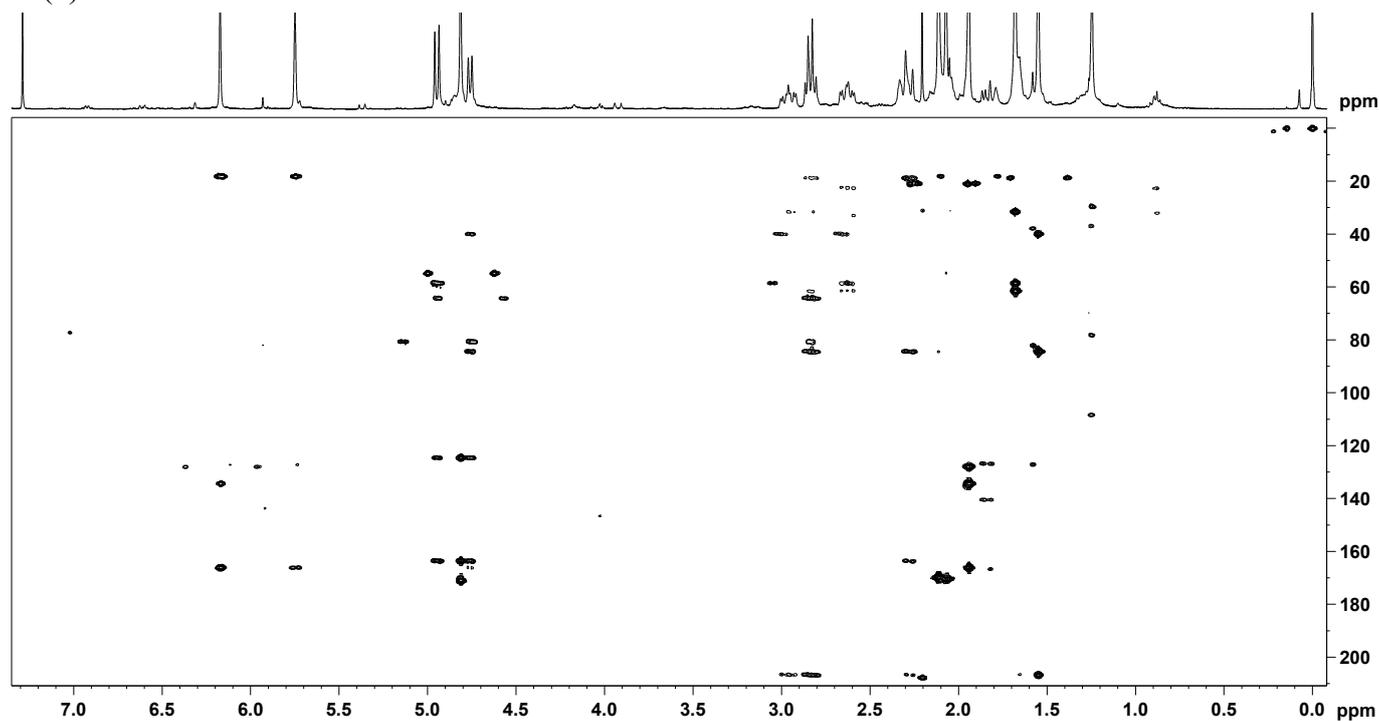
Eixo Y: intensidade; Eixo X: deslocamento químico, expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00).

Figura 39 – Mapa de correlação HSQC (400 MHz ^1H e 100 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 263 K) para o glaucolídeo A (2) de *Vernonanthura tweedieana*.



Eixo Y: projeção para ^{13}C , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00); Eixo X: deslocamento químico ^1H , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00).

Figura 40 – Mapa de correlação HMBC (400 MHz ^1H e 100 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 263 K) para o glaucolídeo A (2) de *Vernonanthura tweedieana*.



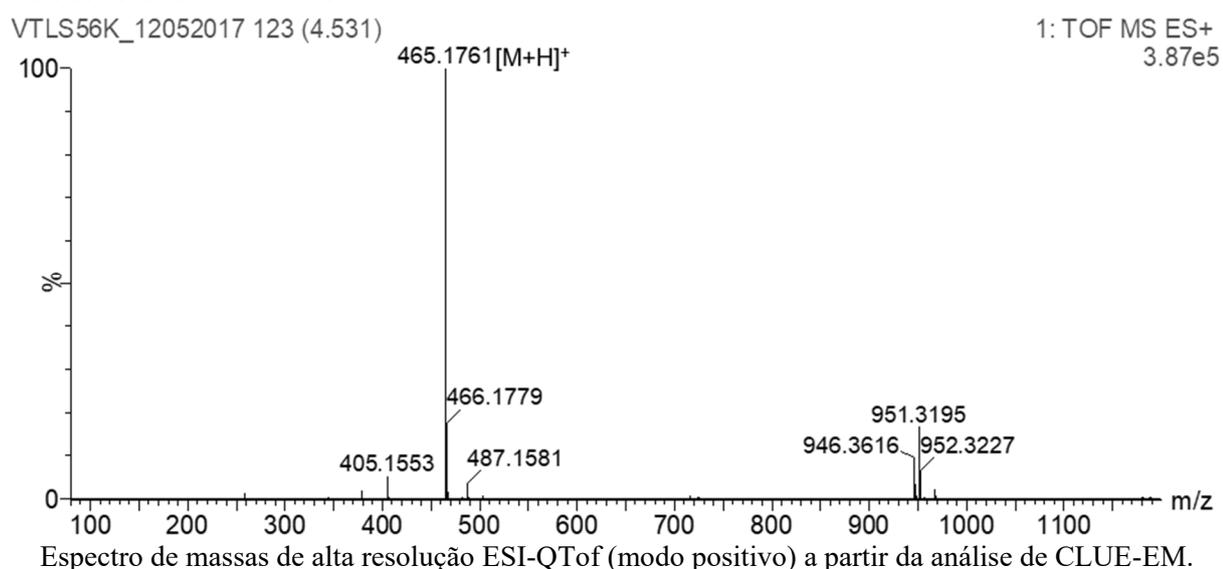
Eixo Y: projeção para ^{13}C , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00); Eixo X: deslocamento químico ^1H , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00).

Entretanto, diferentemente ao observado para o composto **1**, o composto **2** apresentou sinais de hidrogênio duplete em δ 2,84 (1H, $J=9,5$, H-5) e δ 4,95 (1H, $J=9,5$, H-6), cujo valor de constante de acoplamento (J) entre estes sugeriu se tratarem de metinos vicinais. A correlação entre o hidrogênio oximetínico δ 4,95 *d* em C-6 (δ 80,7) com os carbonos oxigenados ressonando em δ 58,5 (C-5) e δ 61,5 (C-4) indicou a presença de um anel epóxido em C-4/C-5.

Além desta, a principal diferença em relação ao composto **1** se dá pela presença de um sinal de carbono carbonílico na posição C-1 ressonando em 206,7 ppm, sugerindo uma cetona cíclica, confirmado pela correlação a partir dos hidrogênios do CH₃ em δ 1,55 (3H, H-14) do metileno em C-2 (δ 2,31 e δ 2,96). Ainda, observou-se a existência de um segundo substituinte acetoxi em C-10 (δ 84,4) formado pelo hidrogênio simpleto em δ 2,11 (3H, H-2'') com carbono em δ 169,8 (C-1'''). Esses achados corroboraram com um núcleo glaucolídeo para o composto **2** (JAKUPOVIC et al., 1986b; KOTOWICZ et al., 1998).

A análise de ESI-Q-ToF EM confirmou se tratar do glaucolídeo A (**2**), como abordado na etapa de caracterização das LS do tipo glaucolídeo em presença de fase móvel aquosa acidificada, observou-se no espectro de EM *full scan* (Figura 41) a presença do íon molecular adutado com hidrogênio m/z 465,1761 [C₂₃H₂₈O₁₀+H]⁺ (calculado 465,1761), conforme descrito na literatura para o glaucolídeo A (GALLON; JAIYESIMI; GOBBO-NETO, 2018).

Figura 41 – Espectro ESI-QToF EM *full scan* (100-1200 Da) para o glaucolídeo A (**2**) de *Vernonanthura tweedieana*.



O composto **2** correspondeu à LS do tipo glaucolídeo, glaucolídeo A (Figura 37), com fórmula molecular C₂₃H₂₈O₁₀ (CARTAGENA et al., 2007). Incidente no gênero *Vernonia* (ABDEL-BASET et al., 1971; PADOLINA et al., 1974; MABRY et al., 1975b; JAKUPOVIC

Os dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C (obtidos das projeções dos experimentos bidimensionais) observados para o composto **3** foram comparados com dados da literatura conforme apresentado na Tabela 16.

As análises de RMN ^1H e bidimensionais para o composto **3** também foram desenvolvidas em temperatura reduzida, a 263 K (-10,1 °C).

A partir da análise dos dados do espectro de RMN ^1H (Figura 43) e dos mapas de correlações HSQC (Figura 44) e HMBC (Figura 45) para o composto **3**, foi possível identificar um conjunto de sinais muito similares aos observados para a LS do tipo hirsutinolídeo, piptocarfina A (**1**) (para maiores detalhes vide *item 5.6.1.1*).

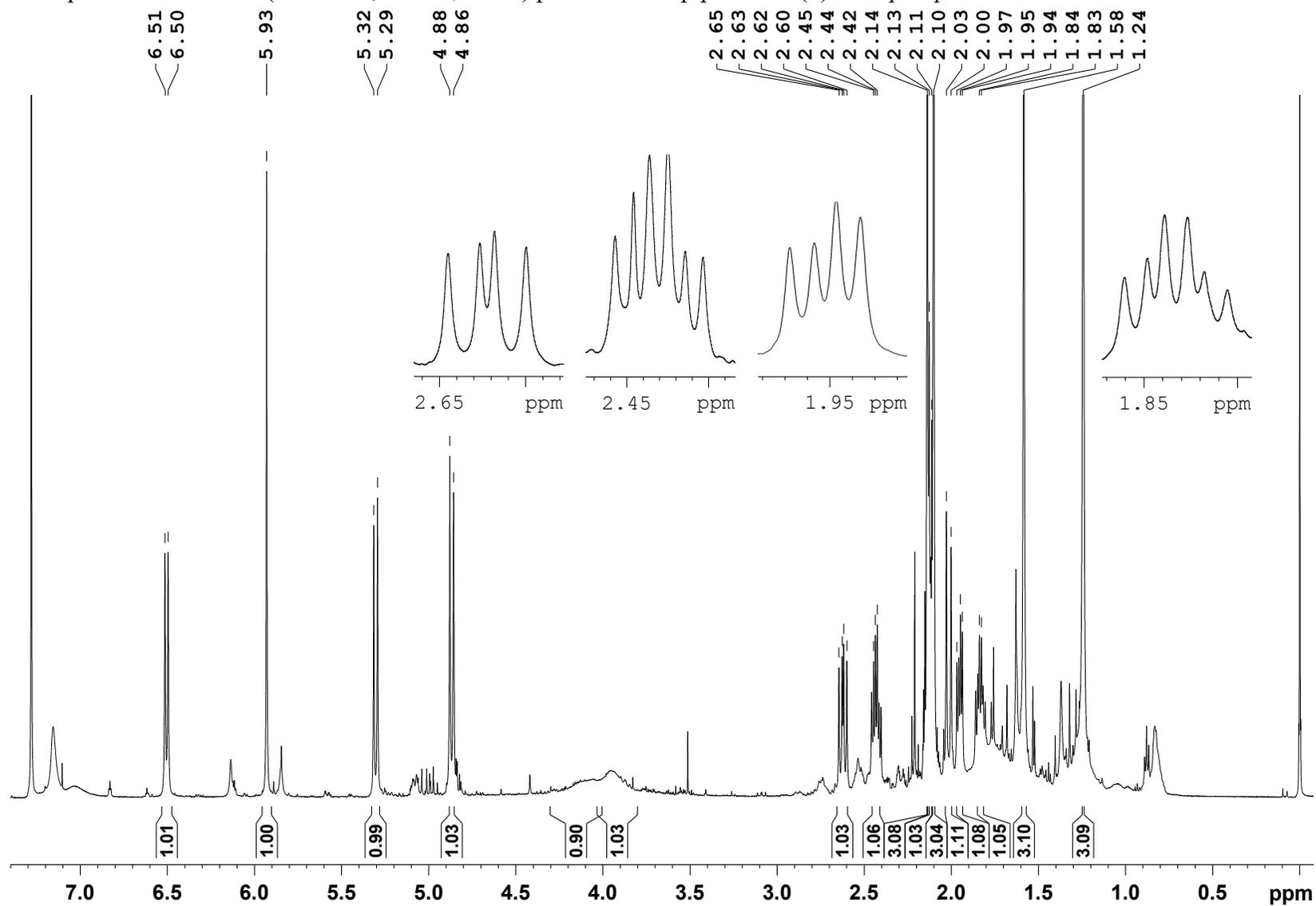
Além do anel γ -lactona em C-6/C-7 contendo o substituinte acetoxi na posição C-13, observou-se a insaturação em C-5/C-6 pela presença dos sinais do hidrogênio olefínico ressonando em δ 5,95 *sl* (1H, H-5) e o anel tetrahydrofurano em C-1/C-4 formado pelos carbonos oxigenados δ 82,2 (C-4) e δ 108,7 (C-1).

A única diferença fundamental do composto **3** em relação ao **1** se deu pela presença de um segundo grupamento acetoxi na posição C-8 (δ 66,5) para **3** em vez de um grupo metacrilóiloxi em **1**, sendo evidenciado pelos sinais de hidrogênio simpleto em δ 2,11 (3H, H-2') e do carbono carbonílico ressonando em δ 170,4 (C-1'). A confirmação da posição deste substituinte foi definida pela correlação entre o hidrogênio oximetínico em δ 6,51 *d* (1H, $J=11,0$, H-8) em C-8 com a carbonila em C-1' do acetoxi. Esses dados condisseram novamente com o esqueleto hirsutinolídeo (KOTOWICZ et al., 1998).

A análise de ESI-QToF EM confirmou se tratar do diacetilpiptocarfol (**3**), assim como abordado previamente na etapa de caracterização das LS do tipo hirsutinolídeo em presença de fase móvel aquosa acidificada, observando-se a presença do pico base na forma de aduto protonado com perda de água na fonte m/z 379,1387 [$\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{O}_9 + \text{H} - \text{H}_2\text{O}$] $^+$ (calculado 379,1393), além íon molecular na forma de aduto com sódio m/z 419,1316 [$\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{O}_9 + \text{Na}$] $^+$ (calculado 419,1318) no espectro de EM *full scan* (Figura 46), conforme reportado na literatura para o diacetilpiptocarfol (GIRARDI et al., 2016).

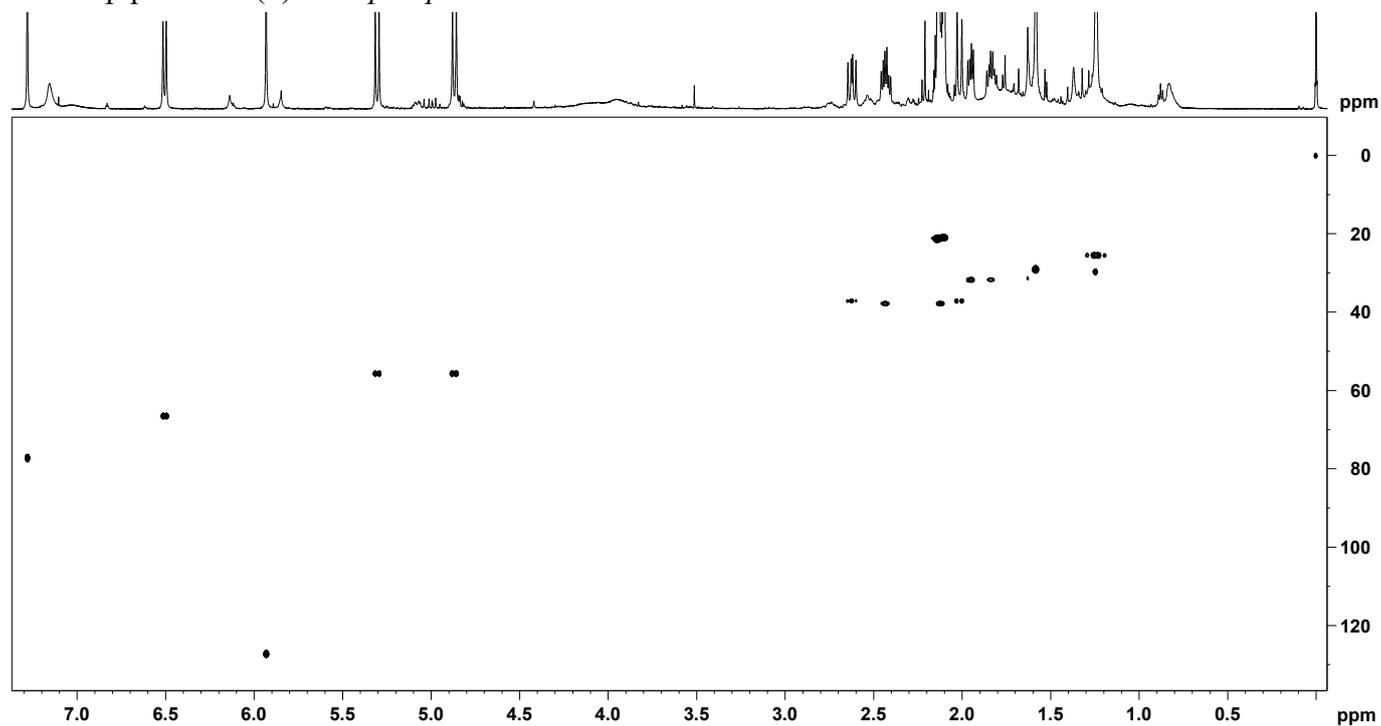
Esses achados permitiram determinar que o composto **3** correspondeu à LS hirsutinolídeo, diacetilpiptocarfol (Figura 42), cuja fórmula molecular é $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{O}_9$. Do ponto de vista quimiotaxonômico, o diacetilpiptocarfol já foi reportado previamente em outras espécies do gênero *Lepidaploa* (VALDÉS et al., 1998; BORKOSKY et al., 2003; MARTUCCI et al., 2014), corroborando para a sua identificação a partir da espécie *L. chamissonis*.

Figura 43 – Espectro de RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3 , 263 K) para o diacetilpiptocarfol (**3**) de *Lepidaploa chamissonis*.



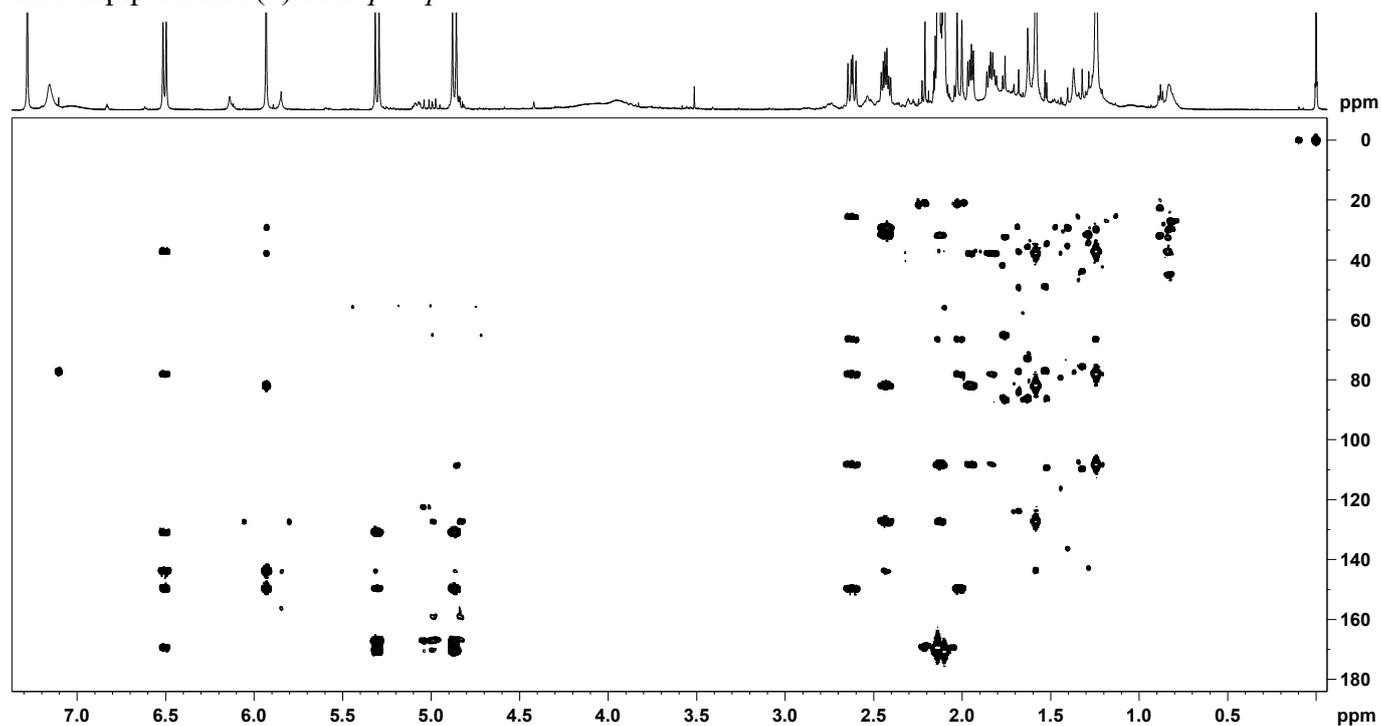
Eixo Y: intensidade; Eixo X: deslocamento químico, expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00).

Figura 44 – Mapa de correlação HSQC (600 MHz ^1H e 150 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 263 K) para o diacetilpiptocarfol (**3**) de *Lepidaploa chamissonis*.



Eixo Y: projeção para ^{13}C , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00); Eixo X: deslocamento químico ^1H , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00).

Figura 45 – Mapa de correlação HMBC (600 MHz ^1H e 150 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 263 K) para o diacetilpiptocarfol (**3**) de *Lepidaploa chamissonis*.

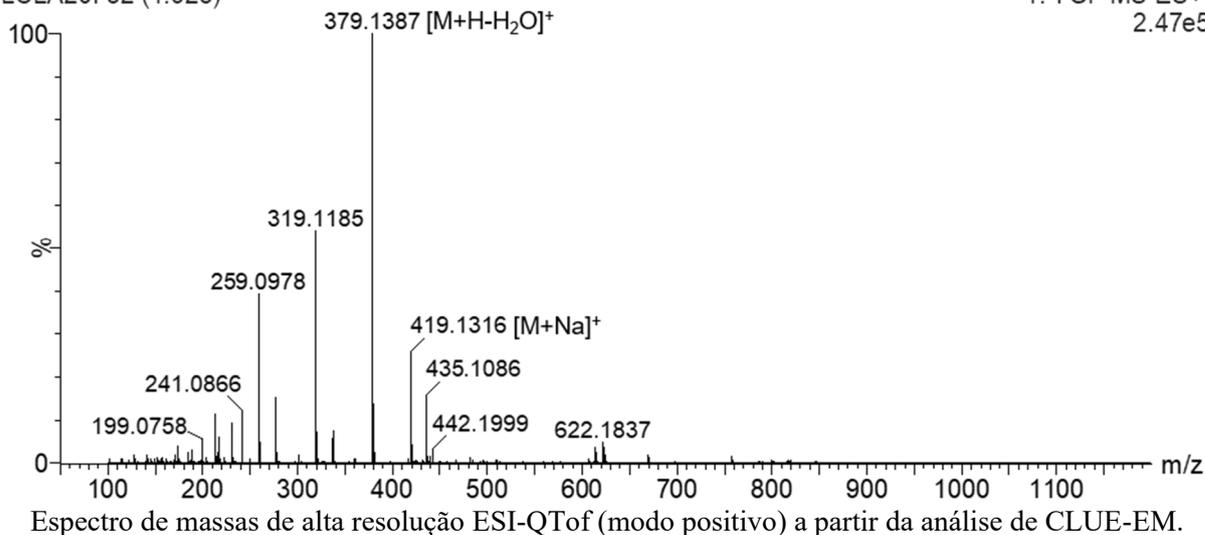


Eixo Y: projeção para ^{13}C , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00); Eixo X: deslocamento químico ^1H , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00).

Figura 46 – Espectro ESI-QToF EM *full scan* (100-1200 Da) para o diacetilpiptocarfol (**3**) de *Lepidaploa chamissonis*.

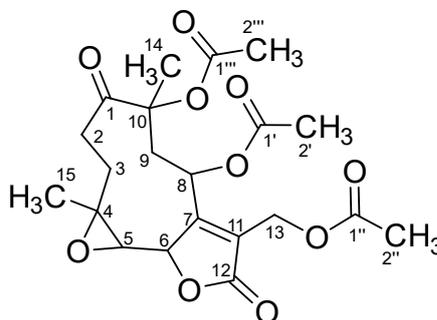
LCLA20I 52 (1.925)

1: TOF MS ES+
2.47e5



5.6.1.4 Composto (**4**): glaucolídeo B

Figura 47 – Estrutura molecular do glaucolídeo B (**4**) de *Lepidaploa chamissonis*.



Fonte: adaptado de Costa e colaboradores (2000).

A Tabela 17 apresenta os dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C observados para o composto **4**, os quais foram comparados com dados da literatura.

A análise de RMN ^1H e bidimensionais (HSQC e HMBC) para o composto **4** também foram desenvolvidas em temperatura reduzida, a 273 K (-0,1 °C). Os dados obtidos a partir do espectro de RMN ^1H (Figura 48) e dos mapas de correlações HSQC (Figura 49) e HMBC (Figura 50) para o composto **4** permitiram identificar novamente os sinais apresentados para a LS do tipo glaucolídeo do composto **2** (para maiores detalhes vide *item 5.6.1.2*).

Confirmou-se a existência do anel lactônico em C-6/C-7 em função da correlação dos hidrogênios oximetilênicos em δ 4,86 *d* (1H, H-13b) e δ 4,91 *d* (1H, H-13a) com os carbonos do anel, além de se observar a presença da carbonila cetônica em δ 208,1 (C-1) a partir dos hidrogênios *ddd* (δ 3,25 e δ 2,22) do metileno em C-2 (δ 33,4) e do simpleto (δ 1,49) em C-14.

Tabela 17 – Dados de RMN ¹H e RMN ¹³C para o glaucolídeo B (**4**) de *Lepidaploa chamissonis* e dados comparativos da literatura.

Posição	(4)		(COSTA et al., 2000) ^a	
	δ ¹ H <i>mult.</i> (J Hz)	δ ¹³ C	δ ¹ H <i>mult.</i> (J Hz)	δ ¹³ C
1	-	208,1	-	206,8
2a	3,25 <i>ddd</i> (17,9; 13,8; 4,9)	33,4	2,96 <i>ddd</i> (17,2; 12,7 4,9)	32,5
2b	2,22 <i>ddd</i> (17,9; 4,8; 4,0)		2,27 <i>ddd</i> (17,2; 4,6; 2,9)	
3a	2,51 <i>ddd</i> (14,6; 13,8; 4,8)	32,4	2,60 <i>ddd</i> (17,8; 12,9; 4,9)	31,3
3b	1,54 <i>ddd</i> (14,6; 4,9; 4,0)		1,62-1,67 <i>m</i>	
4	-	61,7	-	61,4
5	3,27 <i>d</i> (9,5)	58,8	2,83 <i>d</i> (9,6)	58,4
6	4,90 <i>d</i> (9,5)	81,6	4,89 <i>d</i> (9,6)	80,6
7	-	164,0	-	162,8
8	4,77 <i>d</i> (8,6)	64,7	4,69 <i>d</i> (8,6)	63,8
9a	2,84 <i>dd</i> (16,4; 8,6)	40,0	2,76 <i>dd</i> (16,2; 8,6)	39,8
9b	2,58 <i>dd</i> (16,4)		2,25 <i>dd</i> (16,2)	
10	-	85,4	-	84,3
11	-	125,4	-	124,6
12	-	163,8	-	169,8
13a	4,91 <i>d</i> (12,7)	55,8	4,91 <i>d</i> (12,7)	54,9
13b	4,86 <i>d</i> (12,7)		4,84 <i>d</i> (12,7)	
14	1,49 <i>s</i>	18,9	1,54 <i>s</i>	18,6
15	1,61 <i>s</i>	22,6	1,65 <i>s</i>	20,3
1'	-	171,0	-	170,9
2'	2,13 <i>s</i>	20,5	2,16 <i>s</i>	22,2
1''	-	170,7	-	170,3
2''	2,09 <i>s</i>	20,9	2,12 <i>s</i>	21,0
1'''	-	170,7	-	170,2
2'''	2,08 <i>s</i>	20,8	2,11 <i>s</i>	21,0

(400 MHz ¹H, 100 MHz ¹³C,
acetona-d₆, 273 K)

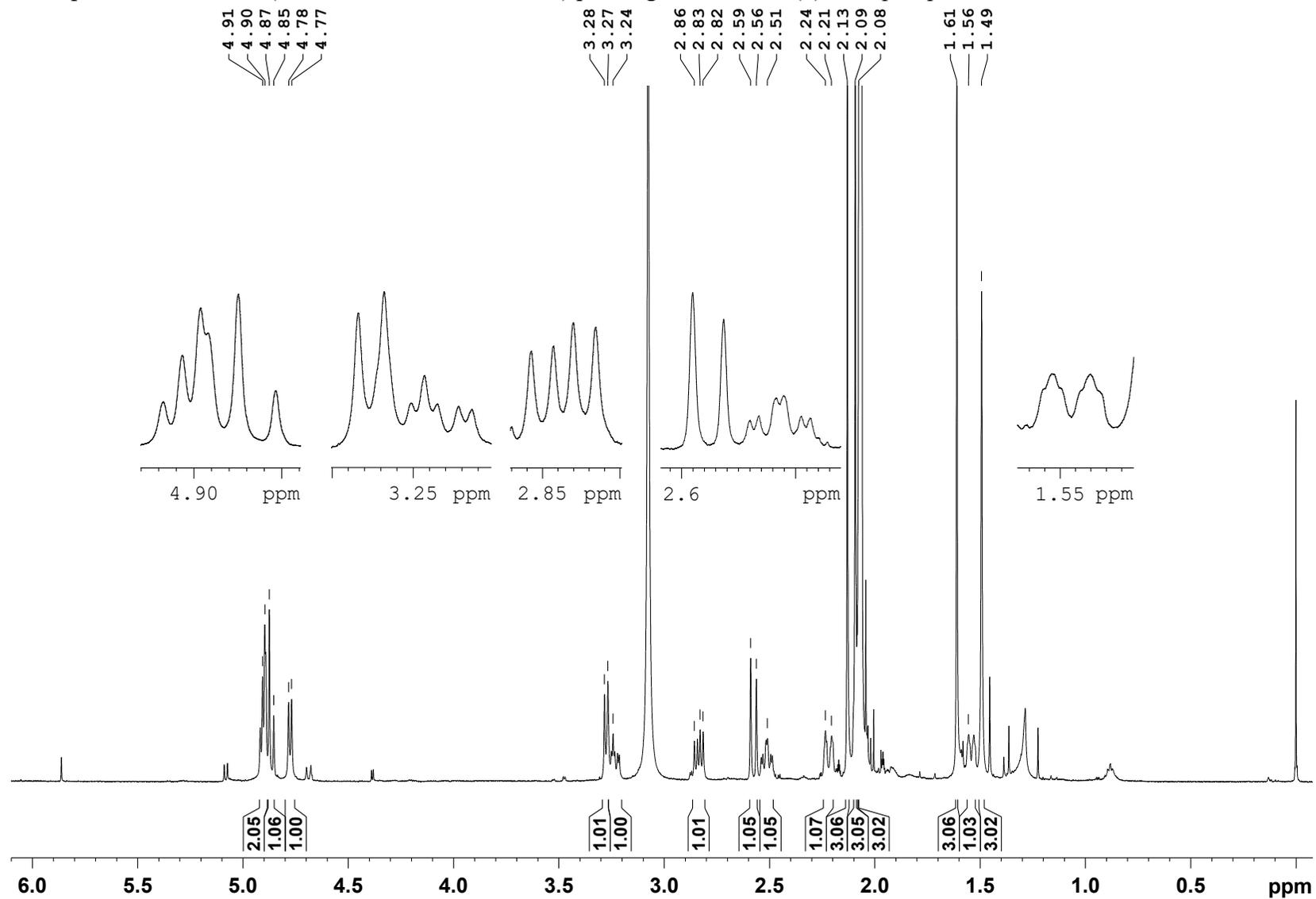
(400 MHz ¹H, 100 MHz ¹³C,
CDCl₃, 260 K)

^a. realizou-se a comparação dos dados de RMN do composto **4** com experimento desenvolvido em CDCl₃ já que não foram encontrados na literatura relatos da análise de RMN em acetona-d₆, podendo explicar quaisquer variações nos valores de deslocamento químico entre os dados.

Todavia, assim como observado na comparação entre os hirsutinolídeos **1** e **3**, a diferença entre os glaucolídeos **2** e **4** correspondeu à presença do substituinte acetoxi na posição C-8 (δ 64,7) para **4** em vez de um metacriloiloxi em **2**. Essa porção acetila foi confirmada pela presença do sinal de simpleto δ 2,13 (3H, H-2') com carbono carbonílico em δ 171,0 (C-1'), o qual teve correlação observada a partir do hidrogênio em δ 4,77 *d* (1H, *J*=8,6, H-8) em C-8.

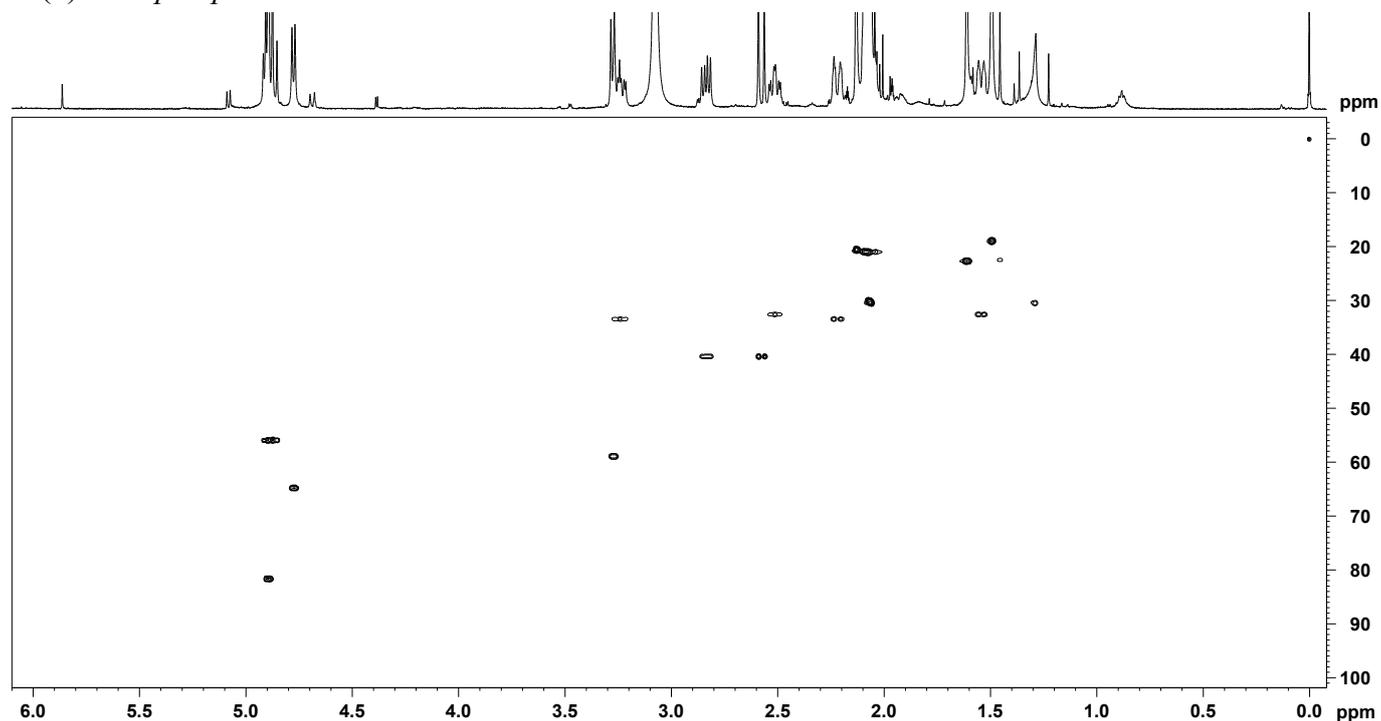
A análise de ESI-QToF EM confirmou se tratar do glaucolídeo B (**4**), assim como abordado previamente na etapa de caracterização das LS do tipo glaucolídeo em presença de fase móvel aquosa acidificada, observou-se no espectro de EM *full scan* (Figura 51) a presença do íon molecular na forma de aduto com hidrogênio *m/z* 439,1592 [C₂₁H₂₆O₁₀+H]⁺ (calculado 439,1604), em acordo ao reportado na literatura para o glaucolídeo B (GALLON; JAIYESIMI; GOBBO-NETO, 2018).

Figura 48 – Espectro de RMN ^1H (400 MHz, acetona- d_6 , 273 K) para o glucolídeo B (4) de *Lepidaploa chamissonis*.



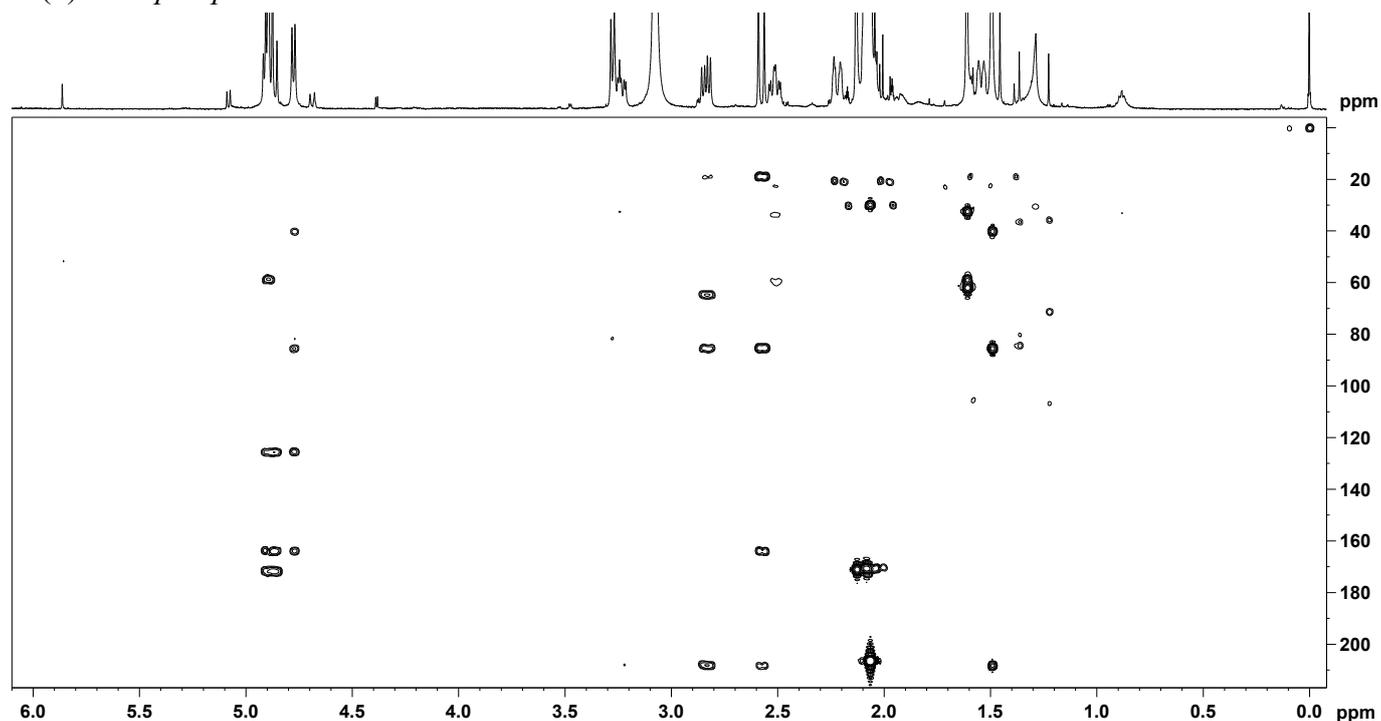
Eixo Y: intensidade; Eixo X: deslocamento químico, expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00).

Figura 49 – Mapa de correlação HSQC (400 MHz ^1H e 100 MHz ^{13}C , acetona- d_6 , 273 K) para o glaucolídeo B (4) de *Lepidaploa chamissonis*.



Eixo Y: projeção para ^{13}C , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00); Eixo X: deslocamento químico ^1H , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00).

Figura 50 – Mapa de correlação HMBC (400 MHz ^1H e 100 MHz ^{13}C , acetona- d_6 , 273 K) para o glaucolídeo B (4) de *Lepidaploa chamissonis*.

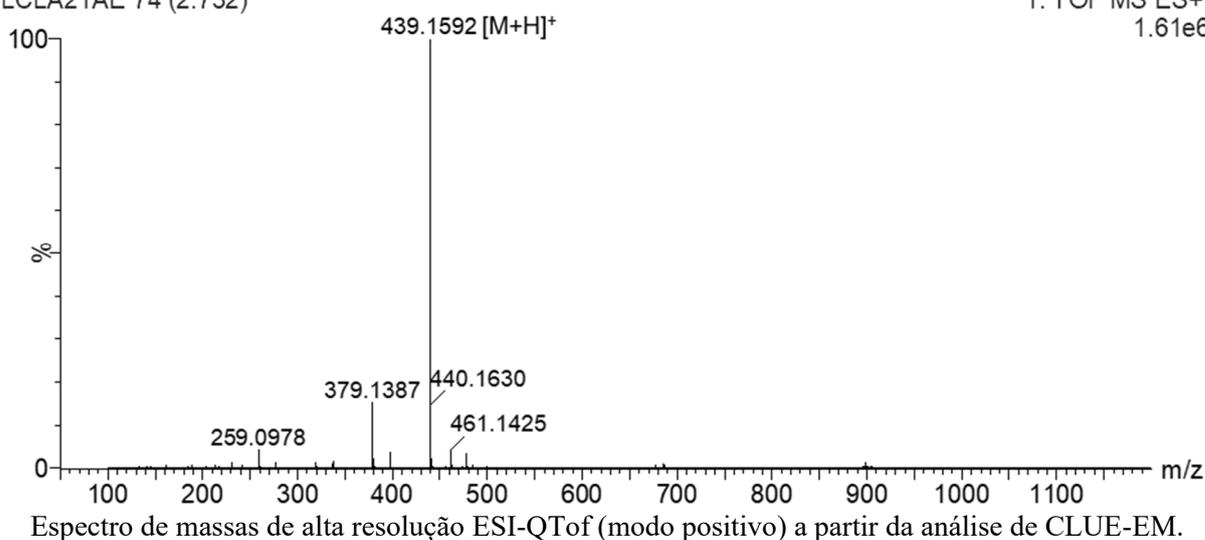


Eixo Y: projeção para ^{13}C , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00); Eixo X: deslocamento químico ^1H , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00).

Figura 51 – Espectro ESI-QToF EM *full scan* (100-1200 Da) para o glaucolídeo B (**4**) de *Lepidaploa chamissonis*.

LCLA21AE 74 (2.732)

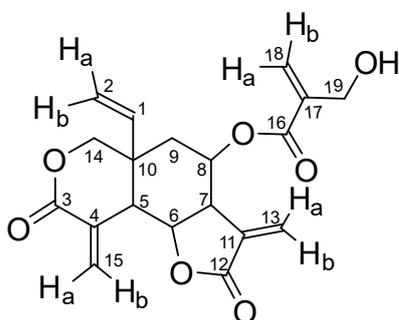
1: TOF MS ES+
1.61e6



O composto **4** correspondeu a LS do tipo glaucolídeo, cuja estrutura foi deduzida como glaucolídeo B (Figura 47), a partir dos dados espectroscópicos, com fórmula molecular $C_{21}H_{26}O_{10}$. Em termos quimiotaxonômicos, o glaucolídeo B já foi relatado anteriormente em outras espécies do gênero *Lepidaploa* (VALDÉS et al., 1998; COSTA et al., 2000; MARTUCCI et al., 2014; GALLON et al., 2018), suportando a proposta de sua obtenção a partir da espécie *L. chamissonis*.

5.6.1.5 Composto (**5**): vernodalina

Figura 52 – Estrutura molecular da vernodalina (**5**) de *Vernonanthura condensata*.



Fonte: adaptado Jakupovic e colaboradores (1987).

Os dados observados de RMN 1H e RMN ^{13}C para o composto **5** foram comparados com dados da literatura conforme apresentado na Tabela 18. A análise de RMN 1H e bidimensionais (HSQC e HMBC) para o composto **5** também foram desenvolvidas em temperatura reduzida, a 273 K (-0,1 °C).

Tabela 18 – Dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C para a vernodalina (**5**) de *Vernonanthura condensata* e dados comparativos da literatura.

Posição	(5)		(LOOI et al., 2013)	
	δ ^1H <i>mult.</i> (J Hz)	δ ^{13}C	δ ^1H <i>mult.</i> (J Hz)	δ ^{13}C
1	5,72 <i>dd</i> (17,5; 10,9)	139,3	5,71 <i>dd</i> (17,4; 11,0)	138,8
2a	5,33 <i>d</i> (10,9)	117,2	5,32 <i>dd</i> (11,0; 6,8)	117,2
2b	5,30 <i>d</i> (17,5)		5,32 <i>dd</i> (11,0; 6,8)	
3	-	163,2	-	163,2
4	-	129,4	-	129,9
5	3,06 <i>d</i> (11,2)	46,3	3,03 <i>m</i>	46,7
6	4,09 <i>dd</i> (11,2; 11,2)	77,9	4,06 <i>t</i> (11,0)	78,1
7	3,03 <i>dddd</i> (11,2; 11,0; 3,1; 2,9)	50,3	3,03 <i>m</i>	50,5
8	5,18 <i>ddd</i> (11,0; 10,8; 4,7)	68,7	5,13 <i>td</i> (10,5; 4,5)	68,8
9a	2,24 <i>dd</i> (14,3; 4,7)	38,8	2,24 <i>dd</i> (14,2; 4,6)	39,0
9b	1,69 <i>dd</i> (14,3; 10,8)		1,71 <i>dd</i> (14,2; 10,5)	
10	-	40,9	-	41,1
11	-	135,3	-	135,6
12	-	168,6	-	168,4
13a	6,24 <i>d</i> (3,1)	121,9	6,20 <i>d</i> (3,2)	121,7
13b	5,69 <i>d</i> (2,9)		5,64 <i>d</i> (3,2)	
14a	4,51 <i>d</i> (12,3)	70,5	4,48 <i>d</i> (12,3)	70,6
14b	4,31 <i>d</i> (12,3)		4,28 <i>dd</i> (12,3; 1,3)	
15a	6,78 <i>sl</i>	136,4	6,74 <i>s</i>	136,0
15b	5,99 <i>sl</i>		5,96 <i>s</i>	
16	-	165,0	-	165,1
17	-	138,5	-	139,6
18a	6,32 <i>sl</i>	127,3	6,29 <i>s</i>	127,2
18b	6,00 <i>sl</i>		5,96 <i>s</i>	
19a	4,38 <i>sl</i>	62,1	4,35 <i>s</i>	62,0
19b	4,37 <i>sl</i>		4,35 <i>s</i>	

(400 MHz ^1H , 100 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 273 K) (400 MHz ^1H , 100 MHz ^{13}C , CDCl_3 , temperatura não indicada)

Os dados obtidos a partir do espectro de RMN ^1H (Figura 53) e dos mapas de correlações HSQC (Figura 54) e HMBC (Figura 55) para o composto **5** permitiram identificar sinais diferentes dos observados para as LS do tipo hirsutinolídeo (**1** e **3**) e glaucolídeo (**2** e **4**).

A começar, pelos sinais hidrogênios metilênicos em δ 6,24 *d* (1H, $J=3,1$, H-13a) e δ 5,69 *d* (1H, $J=2,9$, H-13b), em carbono sp^2 δ 121,9 (C-13), que correlacionaram com os carbonos em 168,6 ppm (C-12), 135,43 ppm (C-11) e 50,3 ppm (C-7), sugeriu a presença de um anel γ -lactônico α,β -insaturado mas com um metileno exocíclico.

A existência de um segundo éster cíclico correspondente à um anel δ -lactona lactônico α,β -insaturado com metileno também exocíclico foi confirmada a partir dos sinais de hidrogênios olefínicos ressonando em 6,78 ppm (*sl*, 1H, H-15a) e 5,99 ppm (*sl*, 1H, H-15b) na posição C-15 (δ 136,4), correlacionando com o segundo carbono da porção olefina em δ 129,4 (C-4), e os carbonos metínico em δ 46,3 (C-5) e carbonílico em δ 163,2 (C-3).

Figura 53 – Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , 273 K) para a vernodalina (**5**) de *Vernonanthura condensata*.

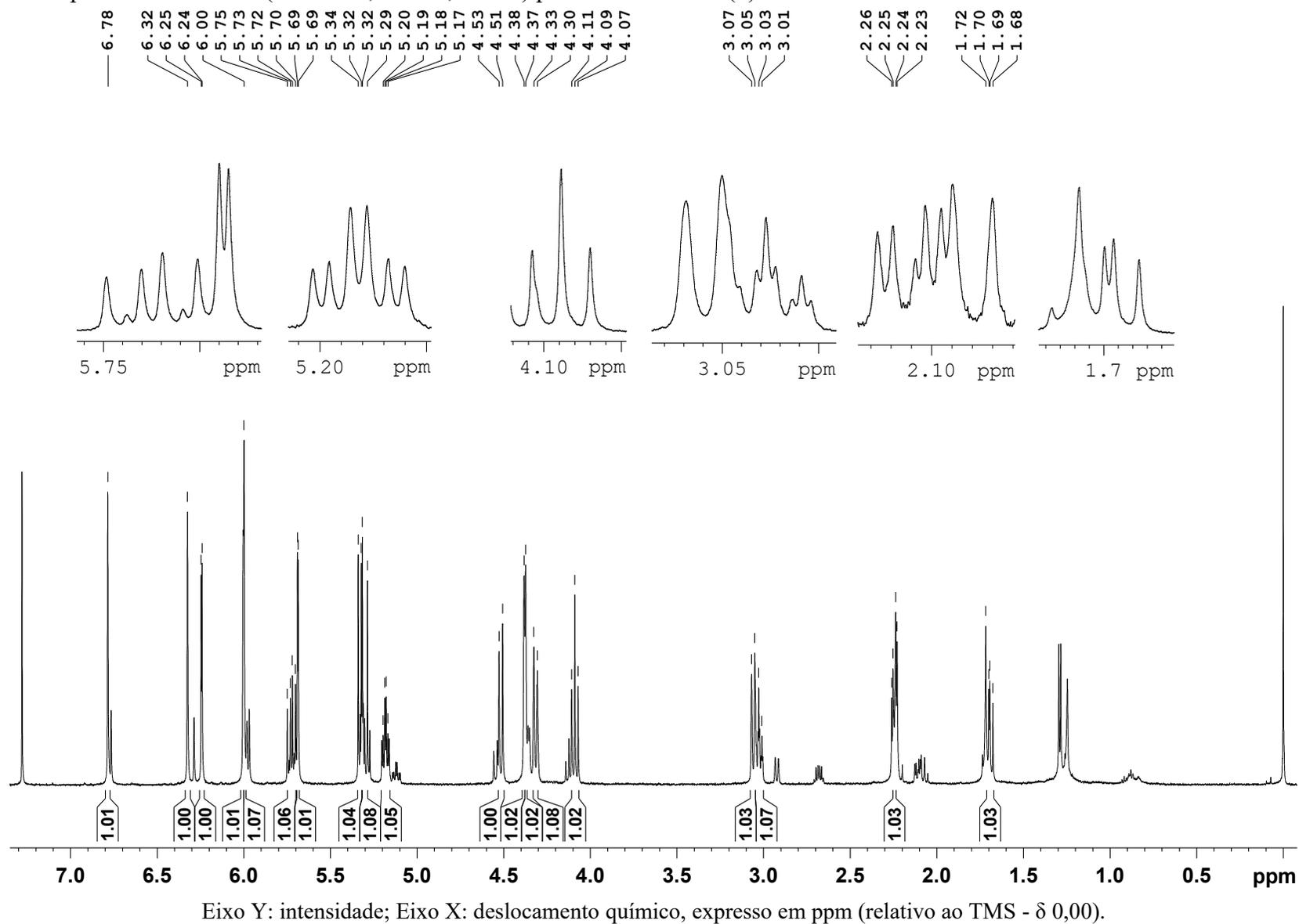
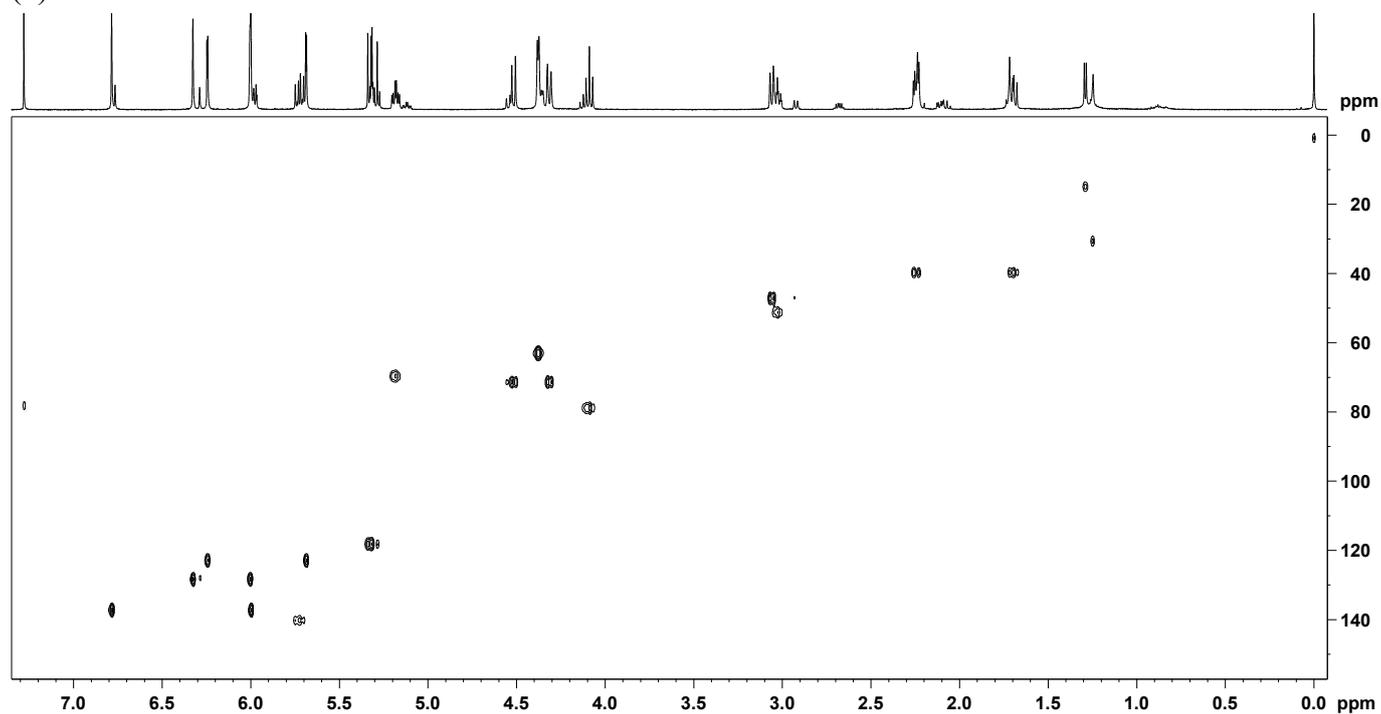
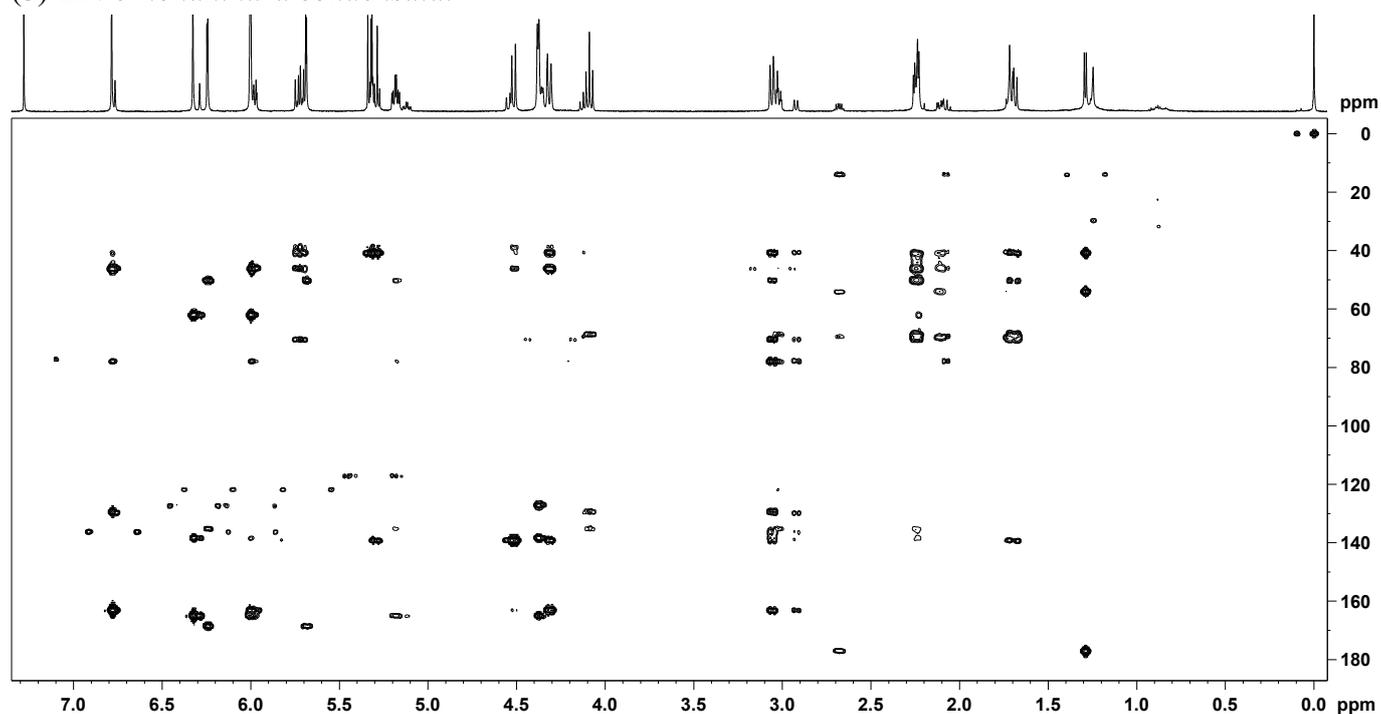


Figura 54 – Mapa de correlação HSQC (400 MHz ^1H e 100 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 273 K) para a vernodalina (5) de *Vernonanthura condensata*.



Eixo Y: projeção para ^{13}C , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00); Eixo X: deslocamento químico ^1H , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00).

Figura 55 – Mapa de correlação HMBC (400 MHz ^1H e 100 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 273 K) para a vernodalina (5) de *Vernonanthura condensata*.

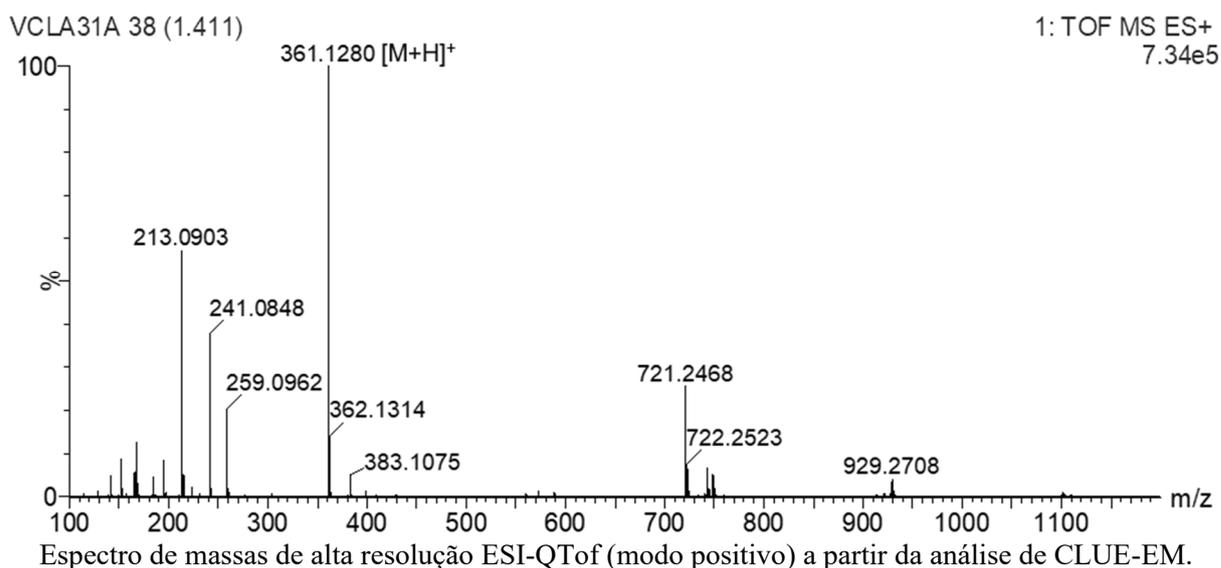


Eixo Y: projeção para ^{13}C , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00); Eixo X: deslocamento químico ^1H , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00).

A correlação entre o hidrogênio metínico (δ 3,06 *d*, 1H, H-5) na posição C-5 com os carbonos de ambos os anéis lactônicos, bem como com os carbonos em C-9 (δ 38,8) e C-14 (70,5) dos grupos metileno formados respectivamente pelos hidrogênios δ 2,24 *dd* (1H, $J=14,3$; 4,7, H-9a) e δ 1,69 *dd* (1H, $J=14,3$, 10,8, H-9b), e pelos hidrogênios em δ 4,51 *d* (1H, $J=12,3$, H-14a) e δ 4,31 *d* (1H, $J=12,3$, H-14b), indicaram uma LS com núcleo elemanolídeo (ITO et al., 2016). Ainda, foi identificado um substituinte hidroximetacrilato na posição C-8 (δ 68,7) em função da correlação entre os hidrogênios olefínicos δ 6,32 *sl* (1H, H-18a) e δ 6,00 *sl* (1H, H-18b) em C-18 (δ 127,3) e oximetilênicos δ 4,38 *sl* (1H, H-19a) e δ 4,37 *sl* (1H, H-19b) em C-19 (δ 62,1), com os carbonos olefínico em δ 138,5 (C-17) e carbonílico em δ 165,0 (C-16). A substituição na posição C-8 se confirmou pela correlação entre o hidrogênio oximetínico em δ 5,18 *ddd* (1H, $J=11,0$, 10,8, 4,7, H-8) com a carbonila (δ 165,0) de hidroximetacrilato.

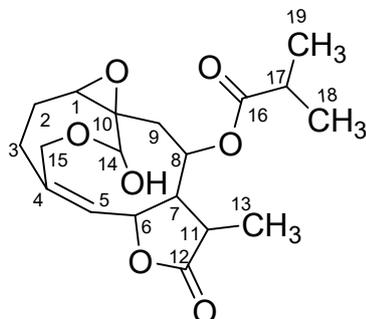
A análise de ESI-QToF EM confirmou se tratar da vernodalina (**5**) a partir da presença do íon molecular protonado m/z 361,1280 [$C_{19}H_{20}O_7+H$]⁺ (calculado 361,1287) no espectro de EM *full scan* (Figura 56), conforme descrito na literatura para a vernodalina (CHUKWUJEKWU et al., 2009).

Figura 56 – Espectro ESI-QToF EM *full scan* (100-1200 Da) para a vernodalina (**5**) de *Vernonanthura condensata*.



Esses dados, juntamente com as informações quimiotaxonômicas para a espécie *V. condensata* indicaram que o composto **5** correspondeu à LS do tipo elemanolídeo, vernodalina (Figura 52), cuja fórmula molecular é $C_{19}H_{20}O_7$. Reportada em espécies de *Vernonieae* (CHUKWUJEKWU et al., 2009; ITO et al., 2016; KIMANI et al., 2018), a vernodalina já foi previamente obtida a partir da espécie *Vernonanthura condensata* (JAKUPOVIC et al., 1987).

5.6.1.6 Composto (6): 11,13,16,17-tetrahidroveranolida

Figura 57 – Estrutura molecular da 11,13,16,17-tetrahidroveranolida (6) de *Vernonanthura condensata*.

Fonte: adaptado de Jakupovic e colaboradores (1987).

Tabela 19 – Dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C para a 11,13,16,17-tetrahidroveranolida (6) de *Vernonanthura condensata* e dados comparativos da literatura.

Posição	(6)		(RABE; MULLHOLLAND; VAN STADEN, 2002) ^a	
	δ ^1H mult. (J Hz)	δ ^{13}C	δ ^1H mult. (J Hz)	δ ^{13}C
1	2,74 <i>dd</i> (11,5; 4,3)	66,6	2,70 <i>dd</i> (11,5; 4,5)	66,3
2a	2,29-2,34 <i>m</i>	22,6	2,29 <i>m</i>	22,7
2b	1,64-1,71 <i>m</i>		1,68 <i>m</i>	
3a	2,40-2,44 <i>m</i>	33,5	2,37 <i>m</i>	33,6
3b	2,40-2,44 <i>m</i>		2,37 <i>m</i>	
4	-	143,1	-	142,8
5	5,525 <i>d</i> (9,4)	128,8	5,49 <i>d</i> (9,6)	129,2
6	5,12 <i>dd</i> (9,4; 9,3)	77,4	5,12 <i>t</i> (9,9)	77,3
7	2,19 <i>ddd</i> (11,5; 9,3; 9,3)	56,8	2,18 <i>m</i>	57,1
8	5,518 <i>ddd</i> (10,8; 9,3; 1,0)	70,8	5,66	71,5
9a	2,56 <i>dl</i> (14,7)	40,5	2,62 <i>d</i> (14,2)	40,8
9b	1,32 <i>dd</i> (14,7; 10,8)		1,30 <i>dd</i> (14,6; 10,6)	
10	-	58,7	-	58,9
11	2,63 <i>dddd</i> (11,5; 6,9; 6,9; 6,9)	40,1	2,65 <i>m</i>	39,9
12	-	177,8	-	177,7
13	1,48 <i>d</i> (6,9)	16,8	1,43 <i>d</i> (6,9)	16,7
14	4,54 <i>sl</i>	99,4	4,53 <i>d</i> (11,0)	99,5
15a	4,60 <i>dd</i> (13,7; 1,5)	64,2	4,57 <i>d</i> (13,7)	64,3
15b	3,70 <i>dd</i> (13,7; 1,1)		3,67 <i>d</i> (13,7)	
16	-	178,5	-	168,0
17	2,62 <i>sept</i> (7,0)	34,0	-	135,6
18a	1,20 <i>d</i> (7,0)	18,8	6,14 <i>d</i> (1,8)	127,4
18b	-	-	5,67 <i>d</i> (1,8)	
19	1,20 <i>d</i> (7,0)	18,8	1,96 <i>s</i>	18,3
OH-14	-	-	5,21 <i>d</i> (11,0)	-

(600 MHz ^1H , 150 MHz ^{13}C ,
CDCl₃, 263 K)

(500 MHz ^1H , 125 MHz ^{13}C , CDCl₃,
temperatura não indicada)

^a, devido ao fato de não terem sido encontrados relatos na literatura para os dados de RMN do composto 6, este foi comparado ao análogo 11,13-dihidroveranolida (7), cuja diferença na comparação com 6 se dá apenas pelo substituinte éster em C-8 (com um metacrilóiloxi em vez do isobutirolóxi em 6).

Os dados observados de RMN ^1H e RMN ^{13}C para o composto **6** foram comparados com dados da literatura conforme apresentado na Tabela 19. A análise de RMN ^1H e bidimensionais (HSQC e HMBC) para o composto **6** também foram desenvolvidas em temperatura reduzida, a 263 K (-0,1 °C).

Os dados obtidos a partir do espectro de RMN ^1H (Figura 58) e dos mapas de correlações HSQC (Figura 59) e HMBC (Figura 60) para o composto **6** permitiram identificar sinais distintos em relação aos observados para as LS abordadas anterior do tipo hirsutinolídeo (**1** e **3**), glaucolídeo (**2** e **4**) e elemanolídeo (**5**).

As correlações entre o hidrogênio metínico ressonando em δ 2,63 *dddd* (1H, $J=11,5$; 6,9; 6,9; 6,9 Hz, H-11) na posição C-11 (δ 40,1) e os hidrogênios da metila δ 1,48 *d* (3H; $J=6,9$ Hz, H-13) em C-13 (δ 16,8) com os carbonos em δ 77,4 (C-6), δ 56,8 (C-7) e δ 177,8 (C-12) sugeriu a presença de um anel γ -lactônico sem insaturação e contendo um grupo metila na posição α à carbonila.

Observou-se também a presença de um grupo olefínico vicinal ao anel lactônico a partir da correlação entre o hidrogênio oximetínico em δ 5,12 *dd* ($J=9,4$; 9,3 Hz; H-6) em C-6 com o carbono sp^2 em δ 128,8 (C-5) e do acoplamento do mesmo hidrogênio com o hidrogênio δ 5,525 *d* ($J=9,4$ Hz, H-5). Adicionalmente, a correlação entre os hidrogênios diastereotópicos em δ 3,70 *dd* (1H; $J=13,1$; 1,1 Hz; H-15b) e δ 4,60 *dd* (1H; $J=13,1$; 1,5 Hz; H-15a) em C-15 (δ 64,2) com o segundo carbono olefínico em 143,1 ppm (C-4) confirmou a posição dessa insaturação em C-4/C-5.

Além disso, a identificação de um anel oxirano em C-1/C-10 em função da correlação entre o hidrogênio oximetínico δ 2,74 *dd* (1H, $J=11,5$; 4,3 Hz, H-1) em C-1 (δ 66,6) e o carbono oxigenado ressonando em 58,7 ppm (C-10), e a confirmação de um grupamento hemiacetal em C-14 (δ 99,4) formado pelo hidrogênio δ 4,57 *sl* (1H; H-14), sugeriu um esqueleto carbônico bicíclico fundido entre C-4/C-10, característico de LS com núcleo vernolídeo (RABE; MULLHOLLAND; VAN STADEN, 2002).

Ainda, detectou-se um substituinte isobutiroiloxi na posição C-8 (δ 70,8) a partir da correlação entre os hidrogênios de metilas simétricas em δ 1,27 *d* (6H, $J=7,0$ Hz; H-18a e H-19) em C-18 e C-19 (δ 18,8), e do hidrogênio metínico na forma de septeto (*sept*) δ 4,38 (1H, $J=7,0$ Hz; H-17) em C-17 (δ 34,0), com o carbono carbonílico em δ 178,5 (C-16). A posição do substituinte éster em C-8 foi confirmada pela correlação entre o hidrogênio oximetínico δ 5,518 *ddd* (1H, $J=10,8$; 9,3; 1,0 Hz; H-8) em C-8 com a carbonila do isobutiroiloxi.

Figura 58 – Espectro de RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3 , 263 K) para a 11,13,16,17-tetrahidrovernolida (**6**) de *Vernonanthura condensata*.

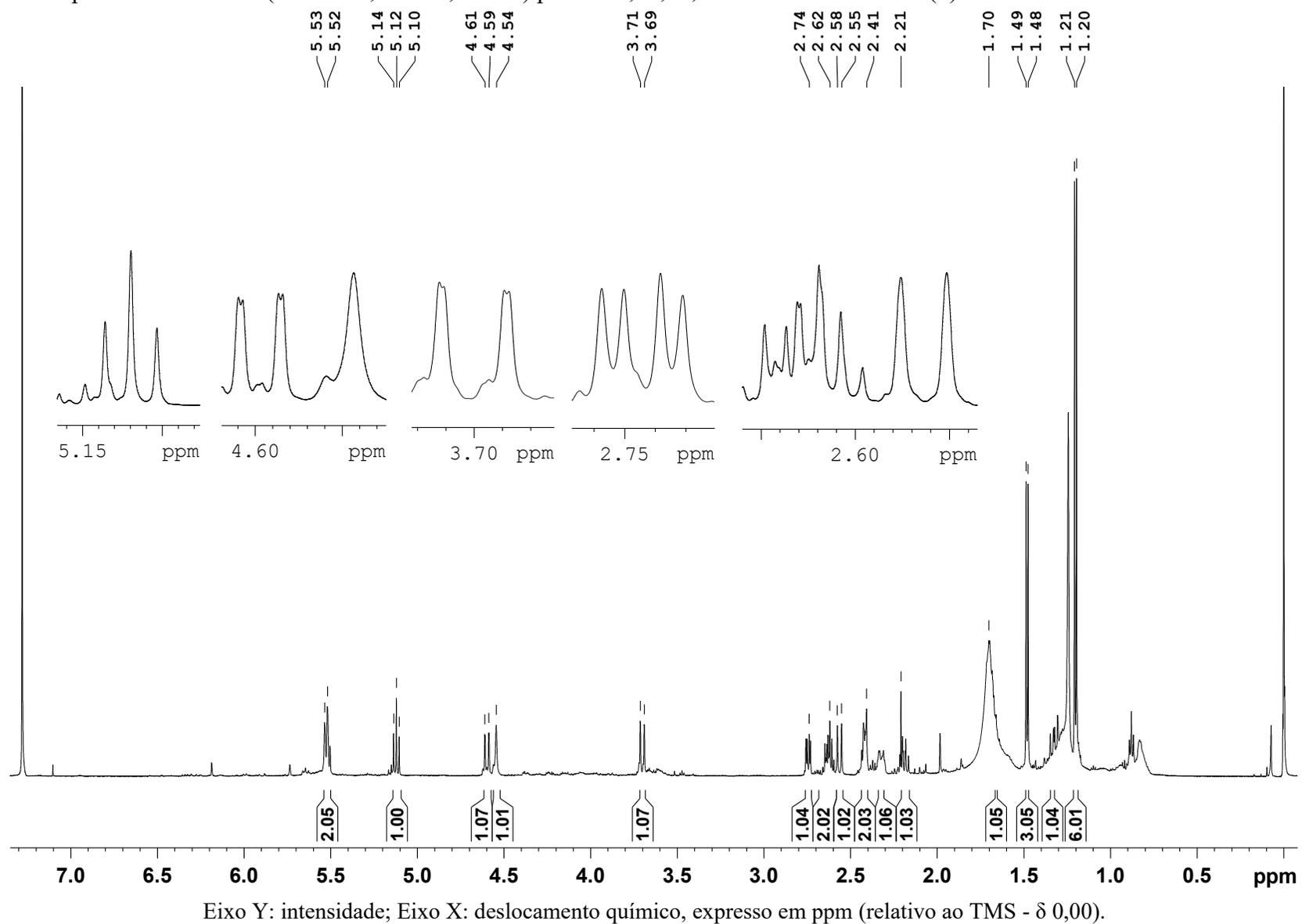
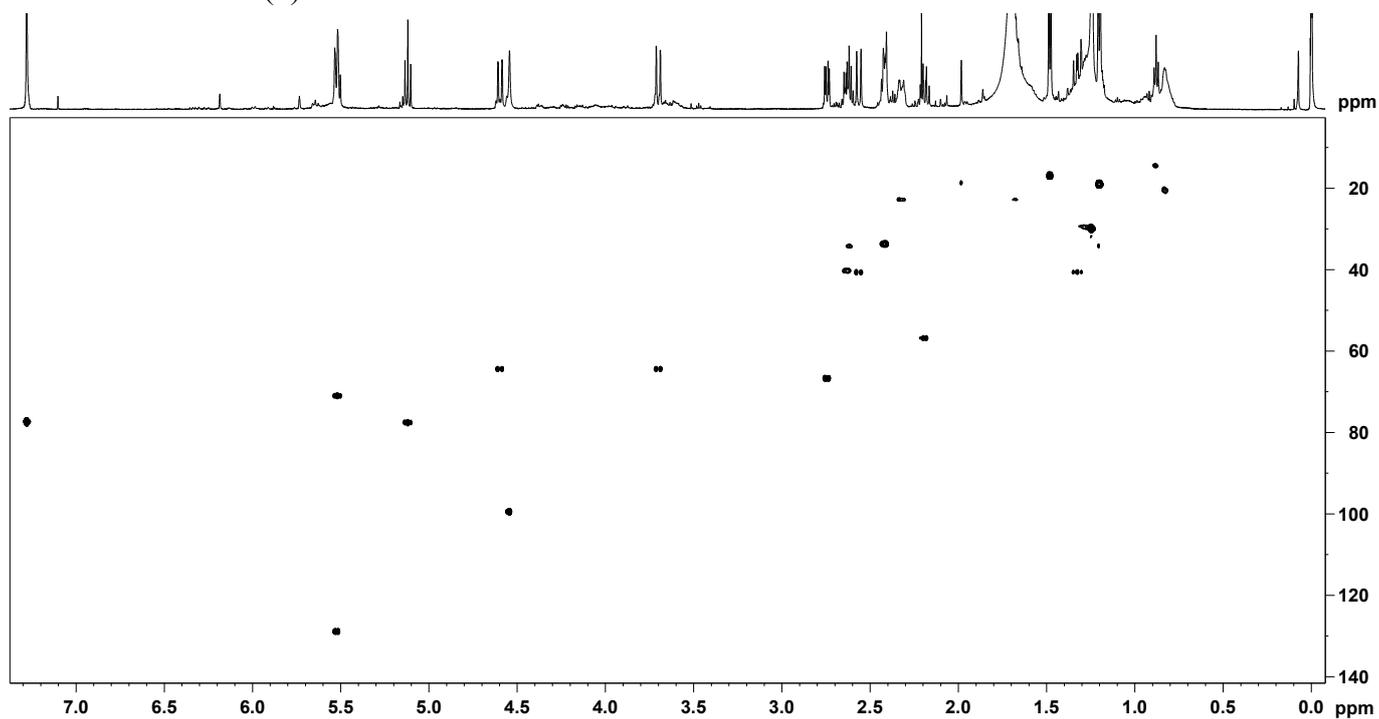
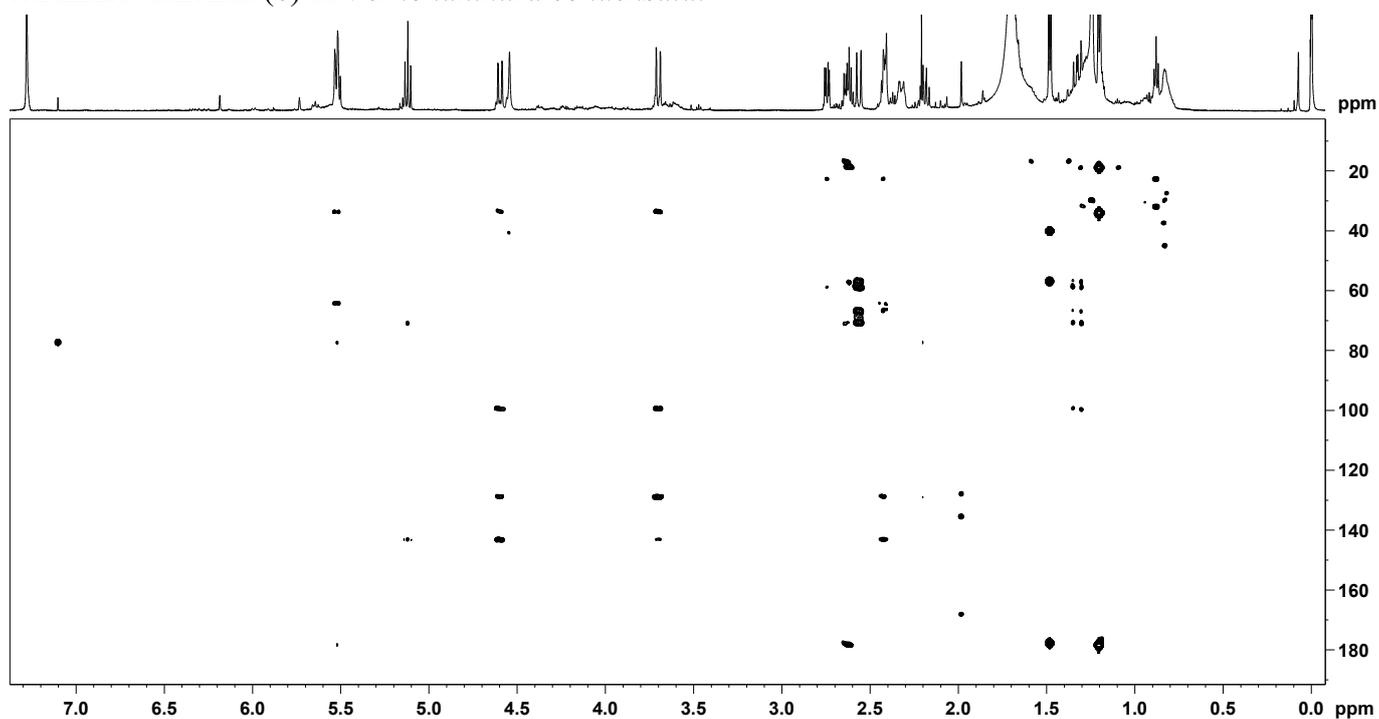


Figura 59 – Mapa de correlação HSQC (600 MHz ^1H e 150 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 263 K) para a 11,13,16,17-tetrahidroveranolida (**6**) de *Vernonanthura condensata*.



Eixo Y: projeção para ^{13}C , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00); Eixo X: deslocamento químico ^1H , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00).

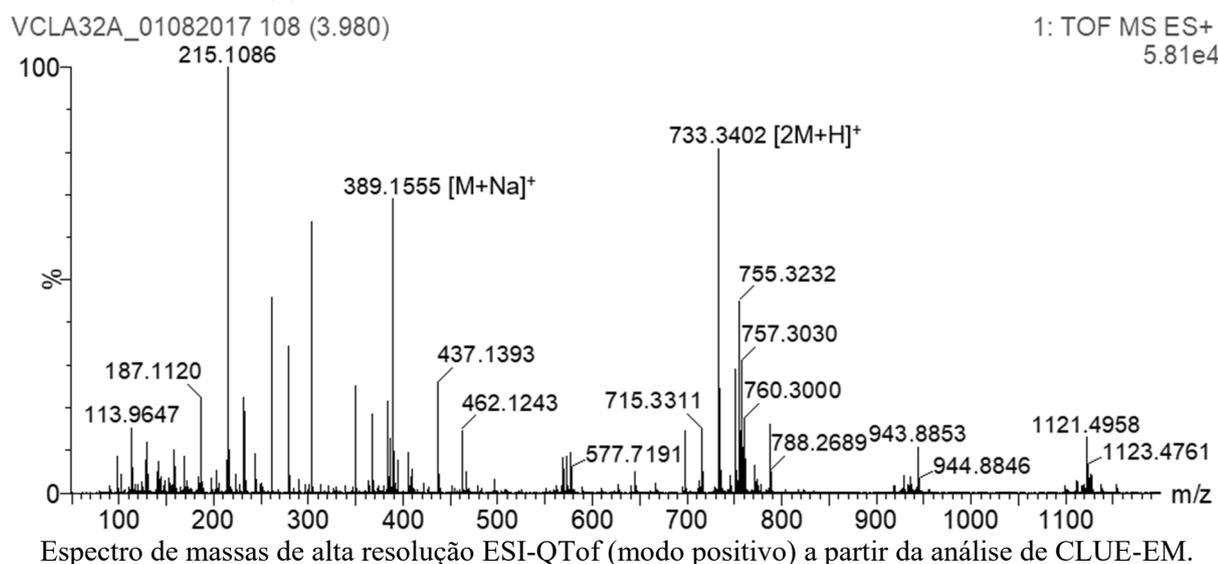
Figura 60 – Mapa de correlação HMBC (600 MHz ^1H e 150 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 263 K) para a 11,13,16,17-tetrahidroveranolida (**6**) de *Vernonanthura condensata*.



Eixo Y: projeção para ^{13}C , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00); Eixo X: deslocamento químico ^1H , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00).

A análise de ESI-QToF EM confirmou a proposta estrutural para a 11,13,16,17-tetrahidrovernalida (**6**) pela presença no espectro de EM *full scan* (Figura 61) do íon molecular adutado com sódio m/z 389,1555 $[C_{19}H_{26}O_7+Na]^+$ (calculado 389,1576), e em menor intensidade o aduto protonado m/z 367,1768 $[C_{19}H_{26}O_7+H]^+$ (calculado 367,1759), além do pico base correspondente ao dímero na forma de aduto de hidrogênio m/z 733,3402 $[2M+H]^+$ (calculado 733,3435).

Figura 61 – Espectro ESI-QToF EM *full scan* (100-1200 Da) para a 11,13,16,17-tetrahidrovernalida (**6**) de *Vernonanthura condensata*.

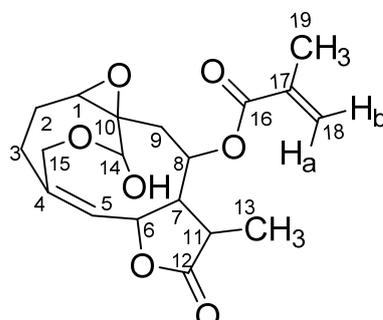


A partir desses achados espectroscópicos e espectrométricos, o composto **6** correspondeu à LS germacranolídeo do tipo vernolídeo, 11,13,16,17-tetrahidrovernalida (Figura 57), com fórmula molecular $C_{19}H_{26}O_7$.

O composto **6** já foi descrito anteriormente como produto da reação de hidrogenação a partir da LS vernolida (**8**) (TOUBIANA; GAUDEMER, 1967; KUPCHAN et al., 1969). Em termos quimiotaxonômicos, a 11,13,16,17-tetrahidrovernalida (**6**) também foi relatada em mistura com a LS 11,13-dihidrovernalida (**7**) a partir da espécie *Vernonia colorata* (KRAFT et al., 2003).

Apesar disso, está é a primeira vez que os dados de RMN e EM estão sendo descritos de forma completa para a LS 11,13,16,17-tetrahidrovernalida (**6**), além de ser a primeira vez que este composto está sendo reportado para a espécie *Vernonanthura condensata*.

5.6.1.7 Composto (7): 11,13-dihidroveranolida

Figura 62 – Estrutura molecular da 11,13-dihidroveranolida (7) de *Vernonanthura condensata*.

Fonte: adaptado de Jakupovic e colaboradores (1987).

Os dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C observados para o composto 7 foram comparados com dados da literatura e estão apresentados na Tabela 20.

Tabela 20 – Dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C para a 11,13-dihidroveranolida (7) de *Vernonanthura condensata* e dados comparativos da literatura.

Posição	(7)		(RABE; MULLHOLLAND; VAN STADEN, 2002)	
	δ ^1H mult. (J Hz)	δ ^{13}C	δ ^1H mult. (J Hz)	δ ^{13}C
1	2,72 <i>dd</i> (11,4; 4,3)	66,2	2,70 <i>dd</i> (11,5; 4,5)	66,3
2a	2,22-2,35 <i>m</i>		2,29 <i>m</i>	
2b	1,59-1,73 <i>m</i>	22,6	1,68 <i>m</i>	22,7
3a	2,32-2,46 <i>m</i>		2,37 <i>m</i>	
3b	2,32-2,46 <i>m</i>	33,4	2,37 <i>m</i>	33,6
4	-	142,7	-	142,8
5	5,51 <i>d</i> (9,9)	129,0	5,49 <i>d</i> (9,6)	129,2
6	5,14 <i>dd</i> (9,9; 9,5)	77,2	5,12 <i>t</i> (9,9)	77,3
7	2,20 <i>ddd</i> (11,2; 9,6; 9,5)	57,3	2,18 <i>m</i>	57,1
8	5,66 <i>ddd</i> (10,8; 9,6; 1,0)	71,4	5,66	71,5
9a	2,64 <i>dl</i> (14,4)		2,62 <i>d</i> (14,2)	
9b	1,32 <i>dd</i> (14,4; 10,8)	40,7	1,30 <i>dd</i> (14,6; 10,6)	40,8
10	-	58,5	-	58,9
11	2,66 <i>dddd</i> (11,2; 6,9; 6,9; 6,9)	39,9	2,65 <i>m</i>	39,9
12	-	177,3	-	177,7
13	1,45 <i>d</i> (6,9)	16,6	1,43 <i>d</i> (6,9)	16,7
14	4,55 <i>sl</i>	99,3	4,53 <i>d</i> (11,0)	99,5
15a	4,59 <i>dd</i> (13,8; 1,2)		4,57 <i>d</i> (13,7)	
15b	3,68 <i>dd</i> (13,8; 1,0)	64,2	3,67 <i>d</i> (13,7)	64,3
16	-	167,7	-	168,0
17	-	135,3	-	135,6
18a	6,16 <i>sl</i>		6,14 <i>d</i> (1,8)	
18b	5,70 <i>sl</i>	127,4	5,67 <i>d</i> (1,8)	127,4
19	1,97 <i>sl</i>	18,4	1,96 <i>s</i>	18,3
OH-14	-	-	5,21 <i>d</i> (11,0)	-
	(300 MHz ^1H , 75 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 295 K)		(500 MHz ^1H , 125 MHz ^{13}C , CDCl_3 , temperatura não indicada)	

A análise de RMN ^1H e bidimensionais (HSQC e HMBC) para o composto **7** foram desenvolvidas em temperatura ambiente de 295 K (21,8 °C).

Os dados obtidos a partir do espectro de RMN ^1H (Figura 63) e dos mapas de correlações HSQC (Figura 64) e HMBC (Figura 65) para o composto **7** permitiu identificar sinais muito semelhantes aos apresentados para a LS do tipo vernolídeo composto **6**.

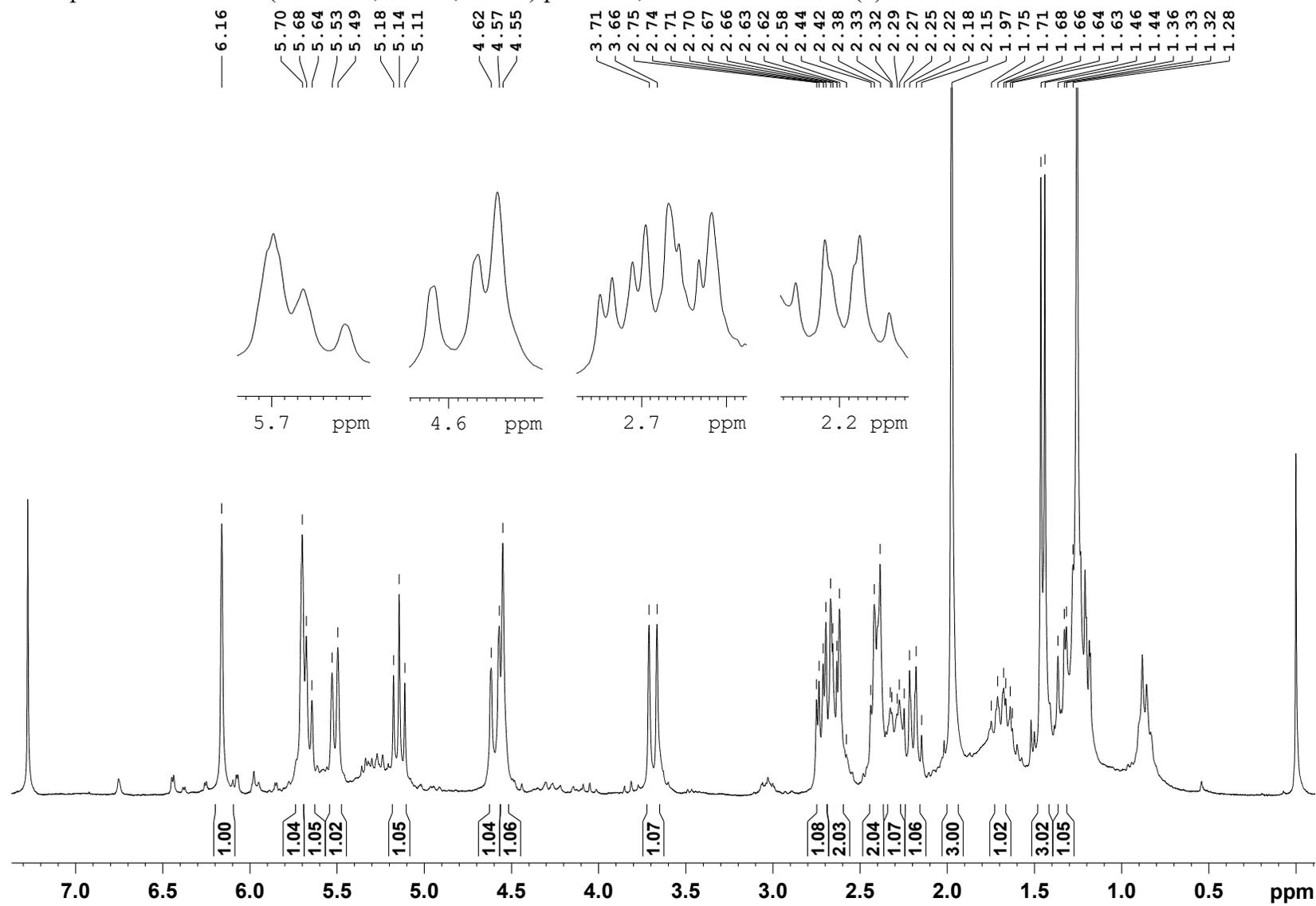
Foram observados os sinais confirmatórios das presenças do anel γ -lactônico metilado na posição C-11, da ligação π entre C-4/C-5, do anel epóxido em C-1/C-10 e da função hemiacetalica em C-14 (Tabela 19) conforme descrito anteriormente (para maiores detalhes vide *item 5.6.1.6*).

Entretanto, a comparação entre o vernolídeo **6** (11,13,16,17-tetrahidroveranolida) e o composto **7** mostrou que a diferença fundamental correspondeu ao substituinte éster na posição C-8, com a presença de um metacrilóiloxi para **7** em vez do isobutiroiloxi de **6**. Essa porção metacrilato foi confirmada a partir da correlação entre os hidrogênios olefínicos em δ 5,70 *sl* (1H, H-18b) e δ 6,16 *sl* (1H, H-18a) em C-18 (δ 127,4), e dos hidrogênios da metila δ 1,97 *sl* (3H, H-19) em C-19 (δ 18,4) com os carbonos carbonílico em δ 167,7 (C-16) e olefínico em δ 135,3 (C-17). A posição do substituinte em C-8 (δ 71,4) foi definida em função da correlação entre o hidrogênio oximetínico δ 5,66 *ddd* (1H; $J=10,8; 9,6; 1,0$; H-8) com a carbonila do metacrilóiloxi.

A análise de ESI-QToF EM confirmou a hipótese da 11,13-dihidroveranolida (**7**) pela presença no espectro de EM *full scan* (Figura 66) do íon molecular na forma de aduto de sódio m/z 387,1409 [$\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{O}_7+\text{Na}$] $^+$ (calculado 387,1420), e em menor intensidade o aduto protonado m/z 365,1613 [$\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{O}_7+\text{H}$] $^+$ (calculado 365,1600), conforme descrito na literatura para o composto **7** (RABE; MULLHOLLAND; VAN STADEN, 2002). Além deste, o pico base correspondente ao dímero na forma de aduto de hidrogênio m/z 729,3084 [$2\text{M}+\text{H}$] $^+$ (calculado 729,3122) também sustentou a hipótese do composto **7** se tratar da 11,13-dihidroveranolida.

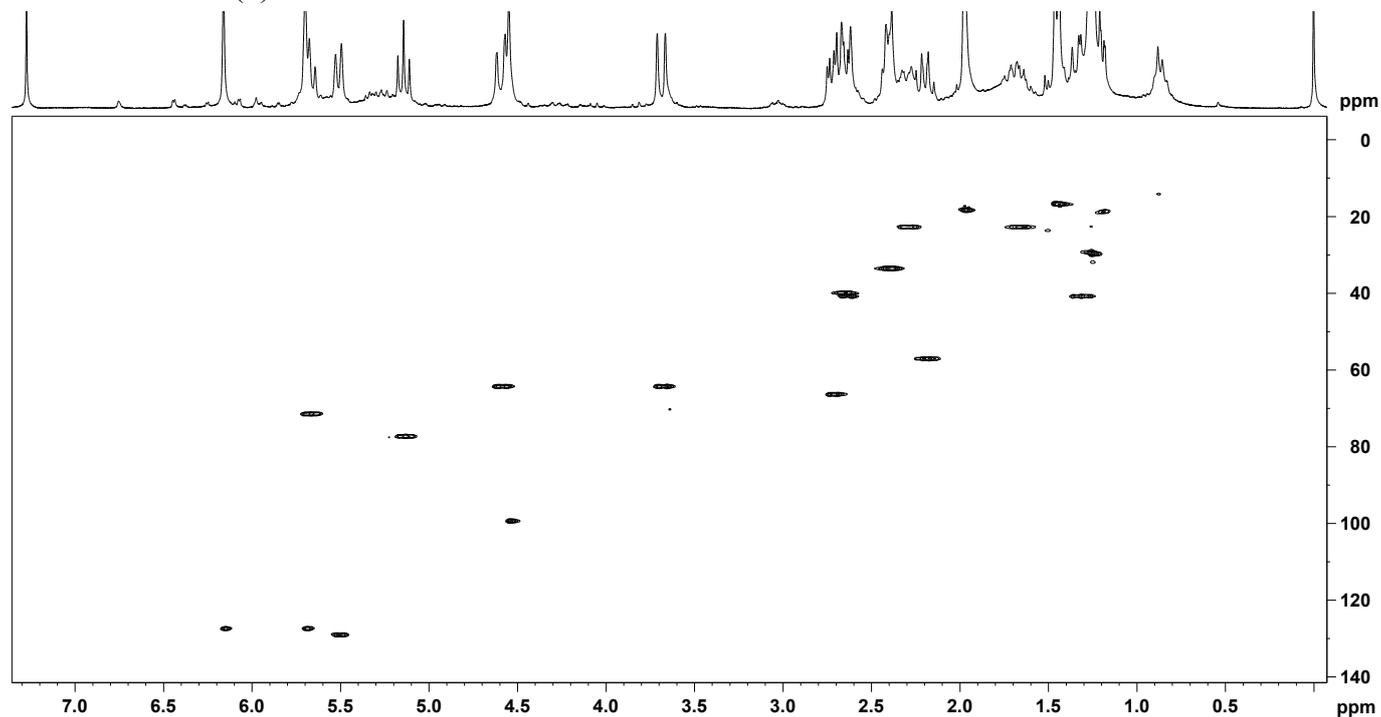
A partir das informações oriundas dos experimentos de RMN e EM, o composto **7** correspondeu à LS germacranolídeo do tipo vernolídeo, 11,13-dihidroveranolida (Figura 62), com fórmula molecular $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{O}_7$. Do ponto de vista quimiotaxonômico, a 11,13-dihidroveranolida (**7**) já foi relatada em outras espécies de Vernoniae (RABE; MULLHOLLAND; VAN STADEN, 2002; SINISI et al., 2015; KIMANI et al., 2018), assim como já foi obtida anteriormente a partir da espécie *Vernonanthura condensata* (JAKUPOVIC et al., 1987).

Figura 63 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , 295 K) para a 11,13-dihidrovernolida (**7**) de *Vernonanthura condensata*.



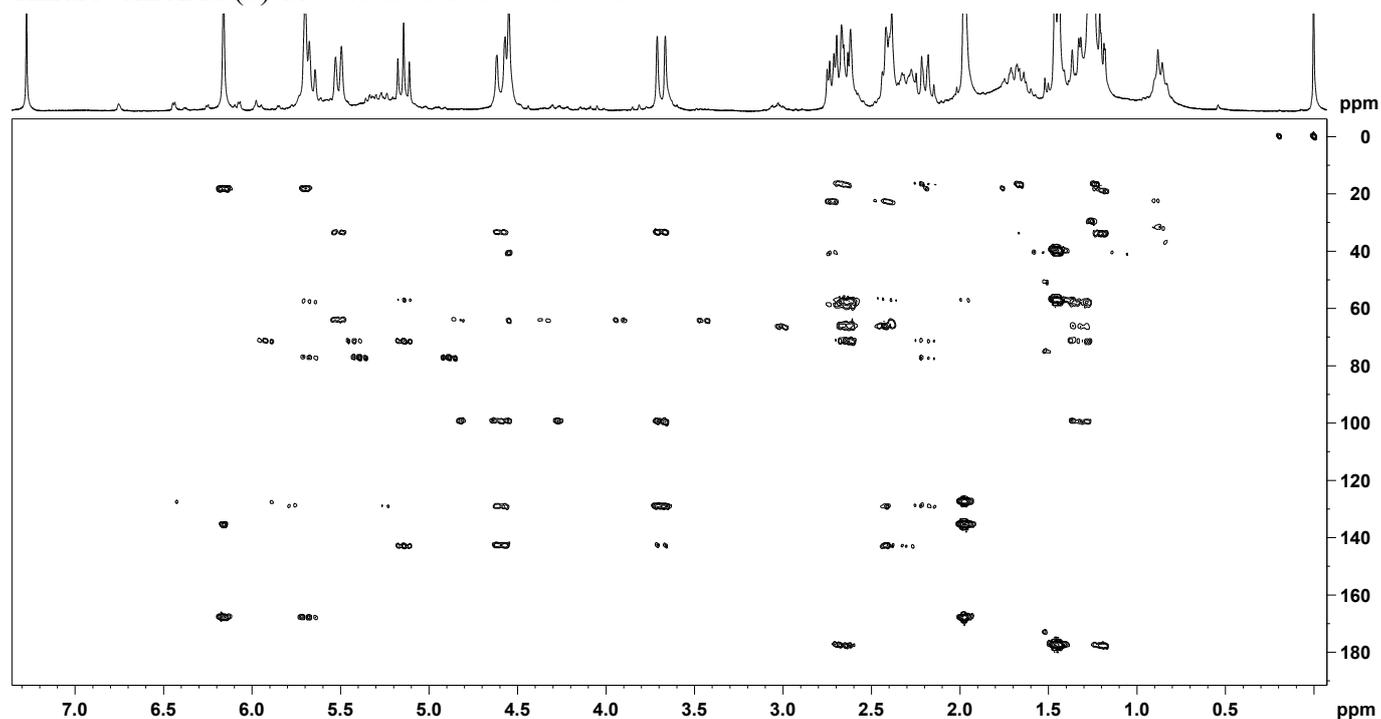
Eixo Y: intensidade; Eixo X: deslocamento químico, expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00).

Figura 64 – Mapa de correlação HSQC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 295 K) para a 11,13-dihidroveranolida (7) de *Vernonanthura condensata*.



Eixo Y: projeção para ^{13}C , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00); Eixo X: deslocamento químico ^1H , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00).

Figura 65 – Mapa de correlação HMBC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 295 K) para a 11,13-dihidroveranolida (7) de *Vernonanthura condensata*.

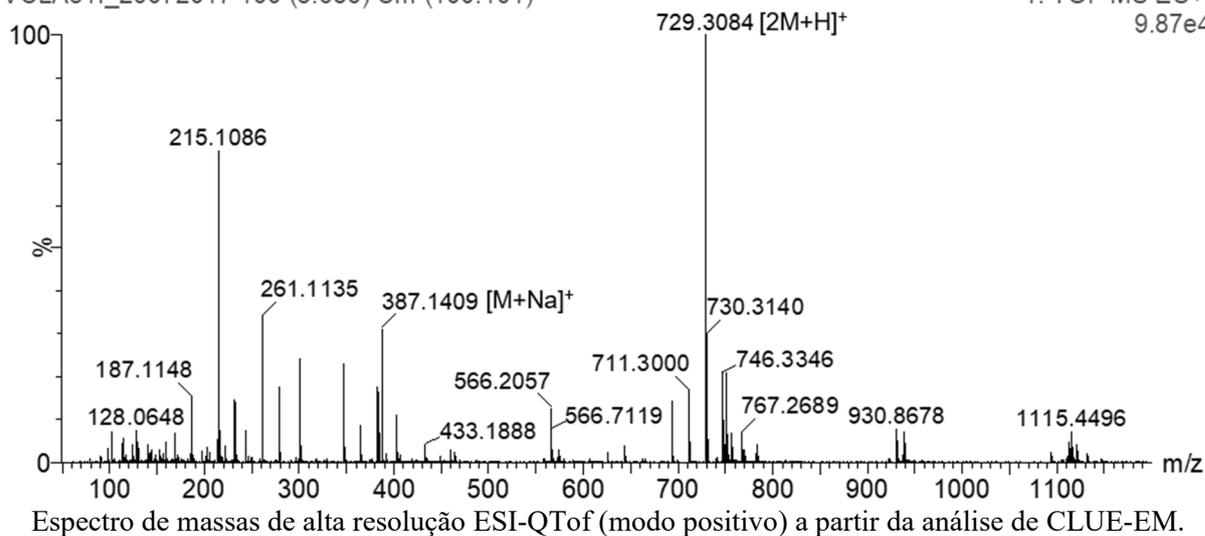


Eixo Y: projeção para ^{13}C , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00); Eixo X: deslocamento químico ^1H , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00).

Figura 66 – Espectro ESI-QToF EM *full scan* (100-1200 Da) para a 11,13-dihidrovernolida (**7**) de *Vernonanthura condensata*.

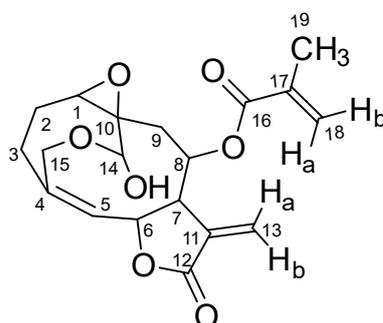
VCLA311_29072017 100 (3.686) Cm (100:101)

1: TOF MS ES+
9.87e4



5.6.1.8 Composto (**8**): vernolida

Figura 67 – Estrutura molecular da vernolida (**8**) de *Vernonanthura condensata*.



Fonte: adaptado de Jakupovic e colaboradores (1987).

Os dados observados de RMN ^1H e RMN ^{13}C para o composto **8** foram comparados com dados da literatura conforme apresentado na Tabela 21. A análise de RMN ^1H e bidimensionais (HSQC e HMBC) para o composto **6** foram desenvolvidas em temperatura reduzida, a 273 K (-0,1 °C).

Assim como observado para os compostos **6** (11,13,16,17-tetrahidrovernolida) e **7** (11,13-dihidrovernolida) (para maiores detalhes vide *itens 5.6.1.6 e 5.6.1.7*), os dados obtidos a partir do espectro de RMN ^1H (Figura 68) e dos mapas de correlações HSQC (Figura 69) e HMBC (Figura 70) para o composto **8** também demonstraram corresponder aos sinais de LS com núcleo vernolídeo.

Foram detectados os sinais condizentes à ligação π entre C-4/C-5, ao anel epóxido em C-1/C-10 e à função hemiacetálica em C-14 (Tabela 19) conforme abordado anteriormente.

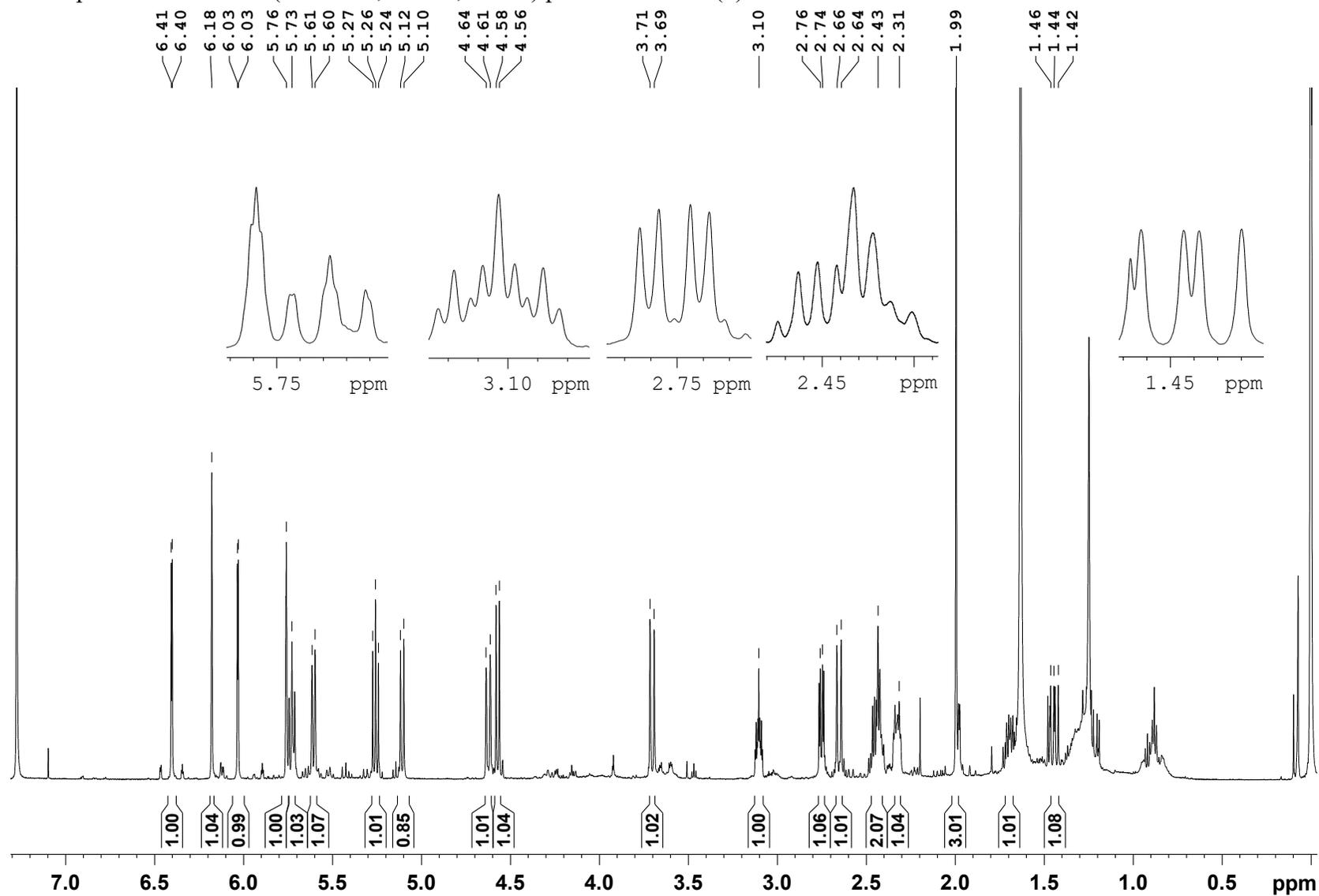
Tabela 21 – Dados de RMN ¹H e RMN ¹³C para a vernolida (**8**) de *Vernonanthura condensata* e dados comparativos da literatura.

Posição	(8)		(RABE; MULLHOLLAND; VAN STADEN, 2002)	
	δ ¹ H <i>mult.</i> (J Hz)	δ ¹³ C	δ ¹ H <i>mult.</i> (J Hz)	δ ¹³ C
1	2,75 <i>dd</i> (11,5; 4,3)	66,8	2,72 <i>dd</i> (11,5; 4,5)	66,4
2a	2,30-2,35 <i>m</i>	22,8	2,30 <i>m</i>	22,8
2b	1,69 <i>dddd</i> (13,9; 11,9; 11,5; 7,3)		1,69 <i>m</i>	
3a	2,39-2,49 <i>m</i>	33,6	2,40 <i>m</i>	33,5
3b	2,39-2,49 <i>m</i>		2,40 <i>m</i>	
4	-	144,2	-	143,8
5	5,60 <i>d</i> (10,2)	128,5	5,57 <i>d</i> (9,5)	128,7
6	5,26 <i>dd</i> (10,2; 9,3)	77,6	5,25 <i>t</i> (10,1)	77,4
7	3,10 <i>dddd</i> (9,3; 9,0; 3,1; 3,3)	52,0	3,05 <i>m</i>	51,9
8	5,73 <i>ddd</i> (10,8; 9,0; 1,0)	70,7	5,74	70,7
9a	2,65 <i>dl</i> (14,7)	41,3	2,65 <i>d</i> (14,6)	41,3
9b	1,44 <i>dd</i> (14,7; 10,8)		1,39 <i>dd</i> (14,2; 10,7)	
10	-	59,0	-	58,9
11	-	134,7	-	134,8
12	-	169,6	-	169,4
13a	6,40 <i>dd</i> (3,3; 0,5)	127,0	6,35 <i>d</i> (2,7)	126,1
13b	6,03 <i>dd</i> (3,1; 0,5)		5,95 <i>d</i> (2,7)	
14	4,57 <i>d</i> (11,1)	99,4	4,55 <i>d</i> (10,1)	99,3
15a	4,62 <i>dd</i> (13,8; 1,2)	64,4	4,59 <i>d</i> (13,7)	64,3
15b	3,70 <i>dd</i> (13,8; 1,0)		3,67 <i>d</i> (13,7)	
16	-	167,6	-	167,2
17	-	135,6	-	135,8
18a	6,18 <i>dd</i> (1,2; 1,0)	127,8	6,16 <i>d</i> (1,8)	127,2
18b	5,76 <i>dd</i> (1,3; 1,2)		5,71 <i>d</i> (1,8)	
19	1,99 <i>dd</i> (1,3; 1,0)	18,5	1,96 <i>s</i>	18,3
OH-14	5,11 <i>d</i> (11,1)	-	4,91 <i>d</i> (10,1)	-
	(600 MHz ¹ H, 150 MHz ¹³ C, CDCl ₃ , 273 K)		(500 MHz ¹ H, 125 MHz ¹³ C, CDCl ₃ , temperatura não indicada)	

Contudo, duas diferenças foram observadas para o composto **8** em relação aos vernolídeos **6** e **7**. A primeira e mais importante das variações diz respeito à presença de um anel butirolatônico em C-6/C-7 contendo uma α,β -insaturação exocíclica, confirmado pela correlação entre os sinais hidrogênicos metilênicos em δ 6,40 *dd* (1H, $J=3,3; 0,5$ Hz; H-13a) e δ 6,03 *dd* (1H, $J=3,1; 0,5$ Hz; H-13b) em carbono sp^2 δ 127,0 (C-13), com os carbonos nas posições C-7 (δ 52,0), C-11 (δ 134,7) e C-12 (δ 169,6).

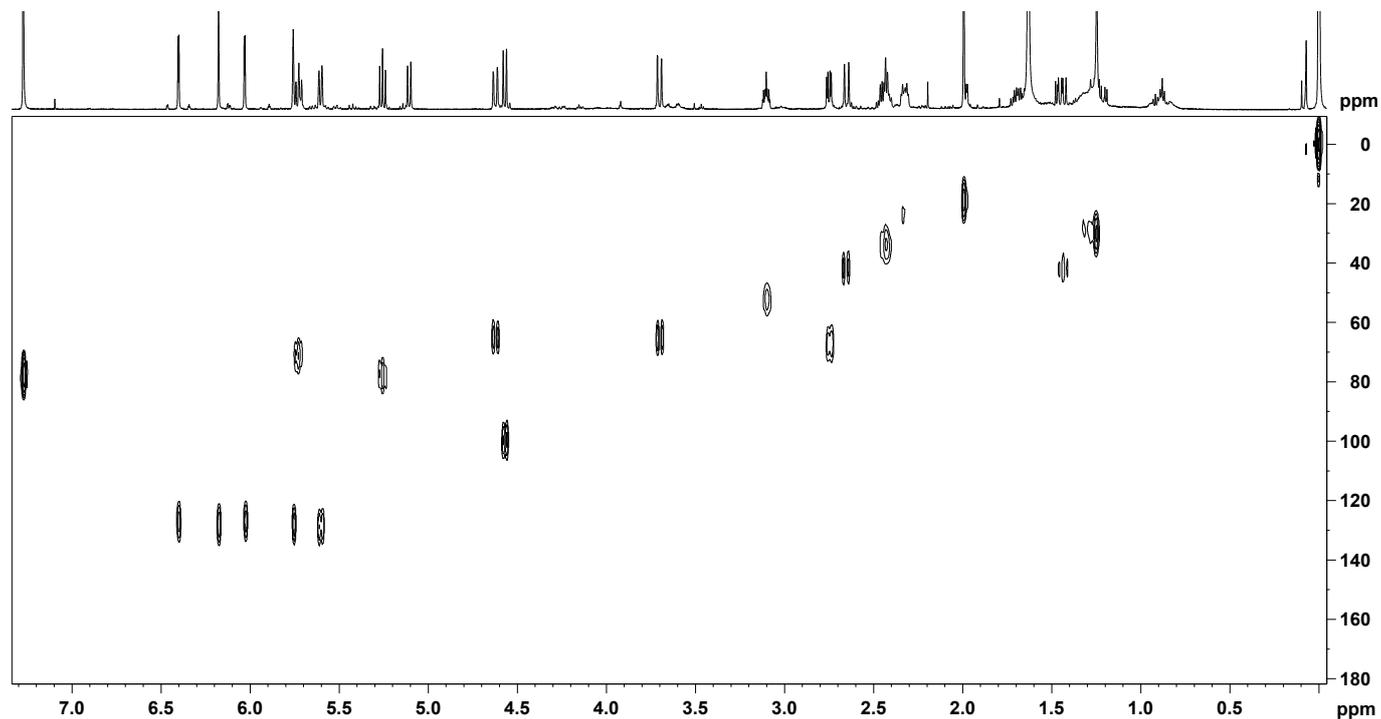
Adicionalmente, diferente do observado para o composto **6**, mas semelhante ao detectado para **7**, o composto **8** apresentou na posição C-8 (δ 70,7) um substituinte metacrilóiloxi formado pelos hidrogênios olefínicos em δ 5,76 *dd* (1H; $J=1,3; 1,2$; H-18b) e δ 6,18 *dd* (1H $J=1,2; 1,0$; H-18a) e metílicos δ 1,99 *dd* (3H; $J=1,3; 1,0$; H-19) em C-18 (δ 127,8) e C-19 (δ 18,5), bem como pela carbonila em C-16 (δ 169,6) e pelo carbono olefínico em δ 135,6 (C-17).

Figura 68 – Espectro de RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3 , 273 K) para a vernolida (**8**) de *Vernonanthura condensata*.



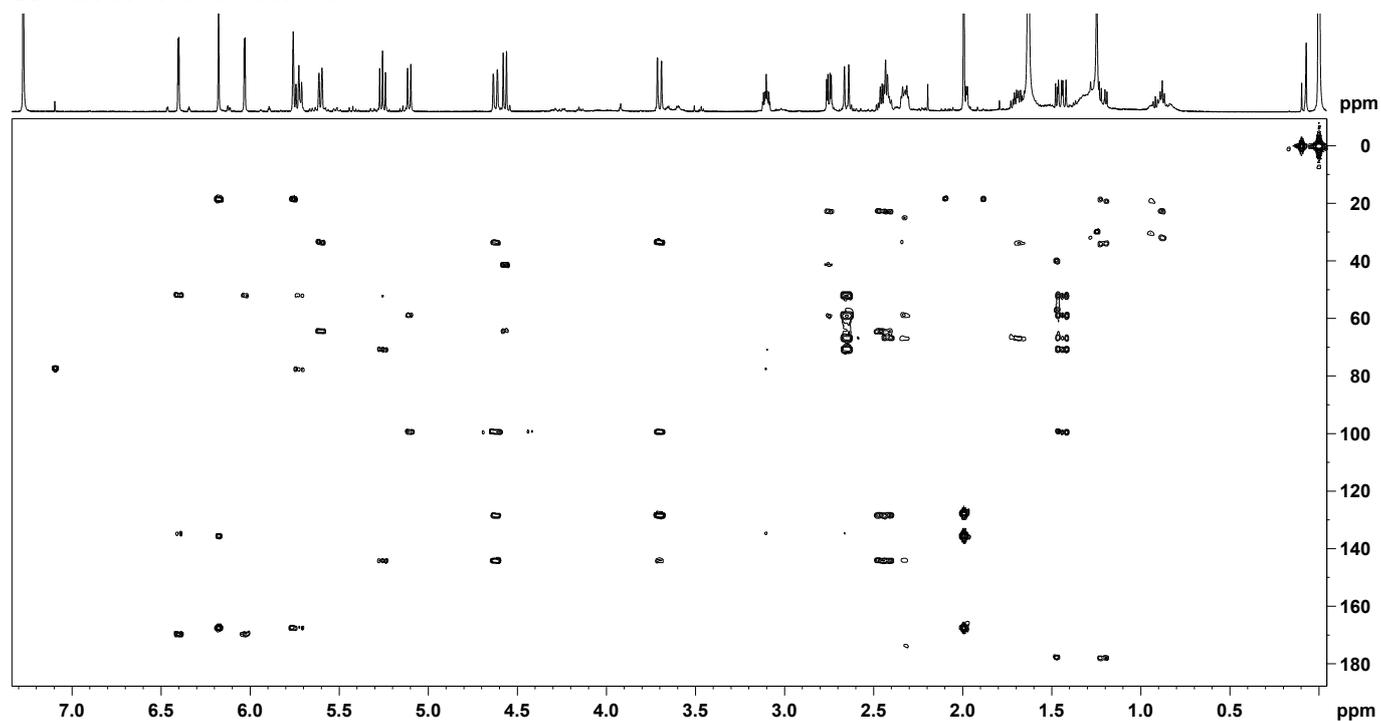
Eixo Y: intensidade; Eixo X: deslocamento químico, expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00).

Figura 69 – Mapa de correlação HSQC (600 MHz ^1H e 150 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 273 K) para a vernolida (8) de *Vernonanthura condensata*.



Eixo Y: projeção para ^{13}C , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00); Eixo X: deslocamento químico ^1H , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00).

Figura 70 – Mapa de correlação HMBC (600 MHz ^1H e 150 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 273 K) para a vernolida (8) de *Vernonanthura condensata*.



Eixo Y: projeção para ^{13}C , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00); Eixo X: deslocamento químico ^1H , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00).

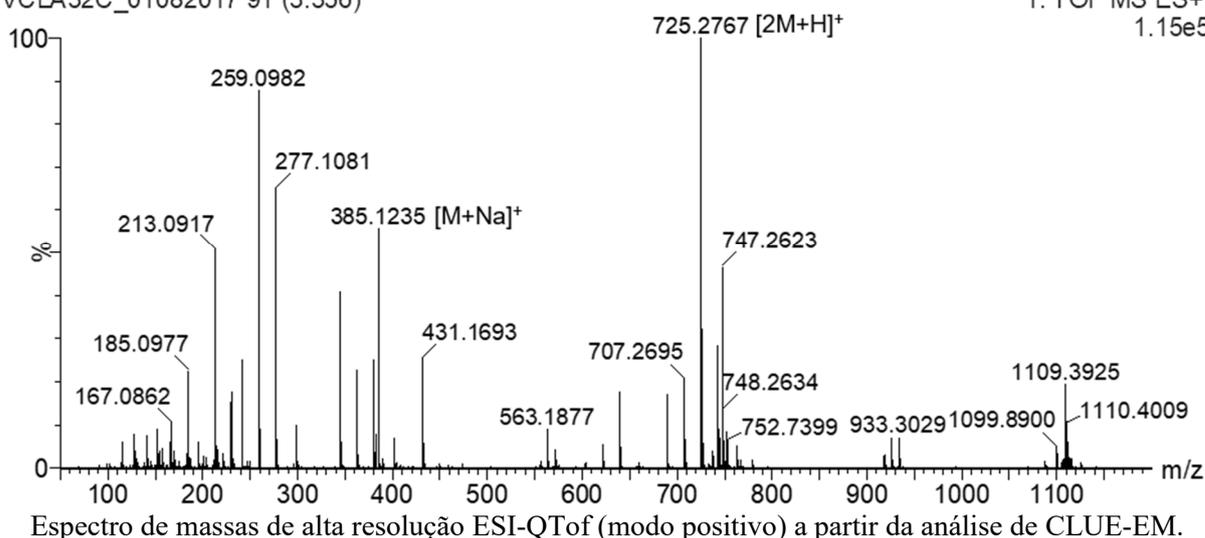
A análise de ESI-QToF EM confirmou a proposta estrutural para a vernolida (**8**) pela presença no espectro de EM *full scan* (Figura 71) do íon molecular na forma de aduto de sódio m/z 385,1235 $[C_{19}H_{22}O_7+Na]^+$ (calculado 385,1263), e em menor intensidade o aduto protonado m/z 363,1436 $[C_{19}H_{22}O_7+H]^+$ (calculado 363,1444), em acordo ao descrito na literatura para a vernolida (CHUKWUJEKWU et al., 2009).

Além disso, o pico base correspondente ao dímero na forma de aduto de hidrogênio m/z 725,2767 $[2M+H]^+$ (calculado 725,2809) também foi detectado no espectro de EM *full scan* corroborando com a proposta estrutural do composto **8**.

Figura 71 – Espectro ESI-QToF EM *full scan* (100-1200 Da) para a vernolida (**8**) de *Vernonanthura condensata*.

VCLA32C_01082017 91 (3.356)

1: TOF MS ES+
1.15e5

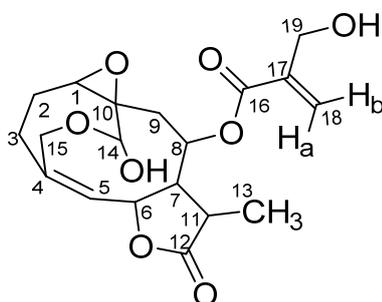


Considerando os dados obtidos das análises de RMN e EM, o composto **8** correspondeu à LS germacranolídeo do tipo vernolídeo, vernolida (Figura 67), cuja fórmula molecular é $C_{19}H_{22}O_7$.

Assim como observado para o composto **7**, a vernolida também já foi descrita em outras espécies de Vernoniae (RABE; MULLHOLLAND; VAN STADEN, 2002; SINISI et al., 2015; KIMANI et al., 2018), além de já ter sido isolada previamente a partir da espécie *Vernonanthura condensata* (JAKUPOVIC et al., 1987).

5.6.1.9 Composto (**9**): 19-hidroxi-11,13-dihidrovernalida

Figura 72 – Estrutura molecular da 19-hidroxi-11,13-dihidroveranolida (**9**) de *Vernonanthura condensata*.



Fonte: adaptado de Jakupovic e colaboradores (1987).

Os dados observados de RMN ^1H e RMN ^{13}C para o composto **9** foram comparados com dados da literatura conforme apresentado na Tabela 22.

Tabela 22 – Dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C para a 19-hidroxi-11,13-dihidroveranolida (**9**) de *Vernonanthura condensata* e dados comparativos da literatura.

Posição	(9)		(JAKUPOVIC et al., 1987) ^a	
	δ ^1H mult. (J Hz)	δ ^{13}C	δ ^{13}C	δ ^1H mult. (J Hz)
1	2,72 <i>dd</i> (11,4; 4,3)	66,6		2,72 <i>dd</i> (11; 4)
2a	2,25-2,36 <i>m</i>			2,31 <i>m</i>
2b	1,58-1,75 <i>m</i>	22,9		1,67 <i>dddd</i> (13; 11; 7)
3a	2,35-2,45 <i>m</i>			2,41 <i>m</i>
3b	2,35-2,45 <i>m</i>	33,7		2,41 <i>m</i>
4	-	143,1		-
5	5,51 <i>d</i> (9,7)	129,4		5,51 <i>dl</i> (10; 1,3)
6	5,16 <i>dd</i> (9,7; 9,6)	77,4		5,14 <i>t</i> (10)
7	2,17-2,26 <i>m</i>	57,2		2,21 <i>ddd</i> (11; 10; 9)
8	5,75 <i>ddl</i> (11,0; 10,8)	71,9		5,73 <i>ddd</i> (10; 9)
9a	2,66 <i>dl</i> (14,4)			2,66 <i>dl</i> (14)
9b	1,33 <i>dd</i> (14,4; 11,0)	40,8		1,34 <i>dd</i> (14; 10)
10	-	58,4		-
11	2,63-2,74 <i>m</i>	40,0		2,67 <i>dq</i> (11; 7)
12	-	177,8		-
13	1,43 <i>d</i> (7,0)	17,0		1,45 <i>d</i> (7)
14	4,55 <i>sl</i>	99,4		4,55 <i>dl</i> (11)
15a	4,59 <i>dl</i> (13,7)			4,59 <i>dd</i> (13,5; 1,3)
15b	3,68 <i>d</i> (13,7)	64,6		3,68 <i>dl</i> (13,5)
16	-	167,0		-
17	-	139,3		-
18a	6,28 <i>sl</i>			6,29 <i>sl</i>
18b	5,99 <i>sl</i>	127,2		6,00 <i>sl</i>
19a	4,39 <i>sl</i>			4,39 <i>dl</i> (1,5)
19b	4,39 <i>sl</i>	62,2		4,33 <i>dl</i> (1,5)
OH-14	-	-		4,95 <i>d</i> (11)
	(300 MHz ^1H , 75 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 295 K)			(400 MHz ^1H , CDCl_3 , temperatura não indicada)

^a, não foram encontrados relatos na literatura com a descrição dos dados de RMN ^{13}C para o composto **9**, por isso realizou-se a comparação apenas em relação aos dados de RMN ^1H .

A análise de RMN ^1H e bidimensionais (HSQC e HMBC) para o composto **9** foram desenvolvidas em temperatura ambiente de 295 K (21,8 °C).

Os dados obtidos a partir do espectro de RMN ^1H (Figura 73) e dos mapas de correlações HSQC (Figura 74) e HMBC (Figura 75) para o composto **9** permitiu identificar sinais bastante similares aos apresentados para a LS do tipo vernolídeo **7** (11,13-dihidrovernolida) (para maiores detalhes vide *item 5.6.1.7*).

As características indicativas do núcleo vernolídeo também foram identificadas considerando os sinais do anel γ -lactônico metilado na posição C-11, do anel oxirano em C-1/C-10, da insaturação em C-4/C-5, e do hemiacetal em C-14 (Tabela 20) conforme abordado previamente.

Entretanto, novamente a diferença entre esses dois compostos (**7** e **9**) se deu pela mudança do tipo de substituinte éster ligado na posição C-8. Observou-se os sinais correspondentes à porção hidroximetacrilóiloxi para **9** em vez do metacrilóiloxi do composto **7**.

O grupo hidroximetacrilato foi admitido considerando os hidrogênios olefínicos em δ 5,99 *sl* (1H, H-18b) e δ 6,28 *sl* (1H, H-18a), e oximetilênicos δ 4,39 *sl* (2H, H-19a e H-19b), bem como suas correlações com os carbonos da carbonila em δ 167,0 (C-16) e da olefina em δ 139,3 (C-17). A correlação entre o hidrogênio oximetínico δ 5,75 *ddl* (1H; $J=11,0$; 10,8 Hz; H-8) em C-8 (δ 71,9) e a carbonila do hidroximetacrilóiloxi auxiliou para a definição da posição do substituinte.

A análise de ESI-QToF EM confirmou a proposta estrutural para a 19-hidroxi-11,13-dihidrovernolida (**9**) pela presença no espectro de EM *full scan* (Figura 76) do íon molecular protonado m/z 381,1548 $[\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{O}_8+\text{H}]^+$ (calculado 381,1549), além do pico base correspondente ao dímero na forma de aduto de hidrogênio m/z 761,3015 $[2\text{M}+\text{H}]^+$ (calculado 761,3021).

Considerando os dados gerados a partir dos experimento de RMN e EM, o composto **9** correspondeu à LS germacranolídeo do tipo vernolídeo, 19-hidroxi-11,13-dihidrovernolida (Figura 72), com fórmula molecular $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{O}_8$.

As considerações quimiotaxonômicas mostraram que a 19-hidroxi-11,13-dihidrovernolida (**9**) já foi descrita anteriormente a partir de espécies da tribo Vernonieae, incluindo a *Vernonia amygdalina* (KIMANI et al., 2018), assim como para a espécie *Vernonanthura condensata* (JAKUPOVIC et al., 1987).

Figura 73 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , 295 K) para a 19-hidroxi-11,13-dihidrovernalida (**9**) de *Vernonanthura condensata*.

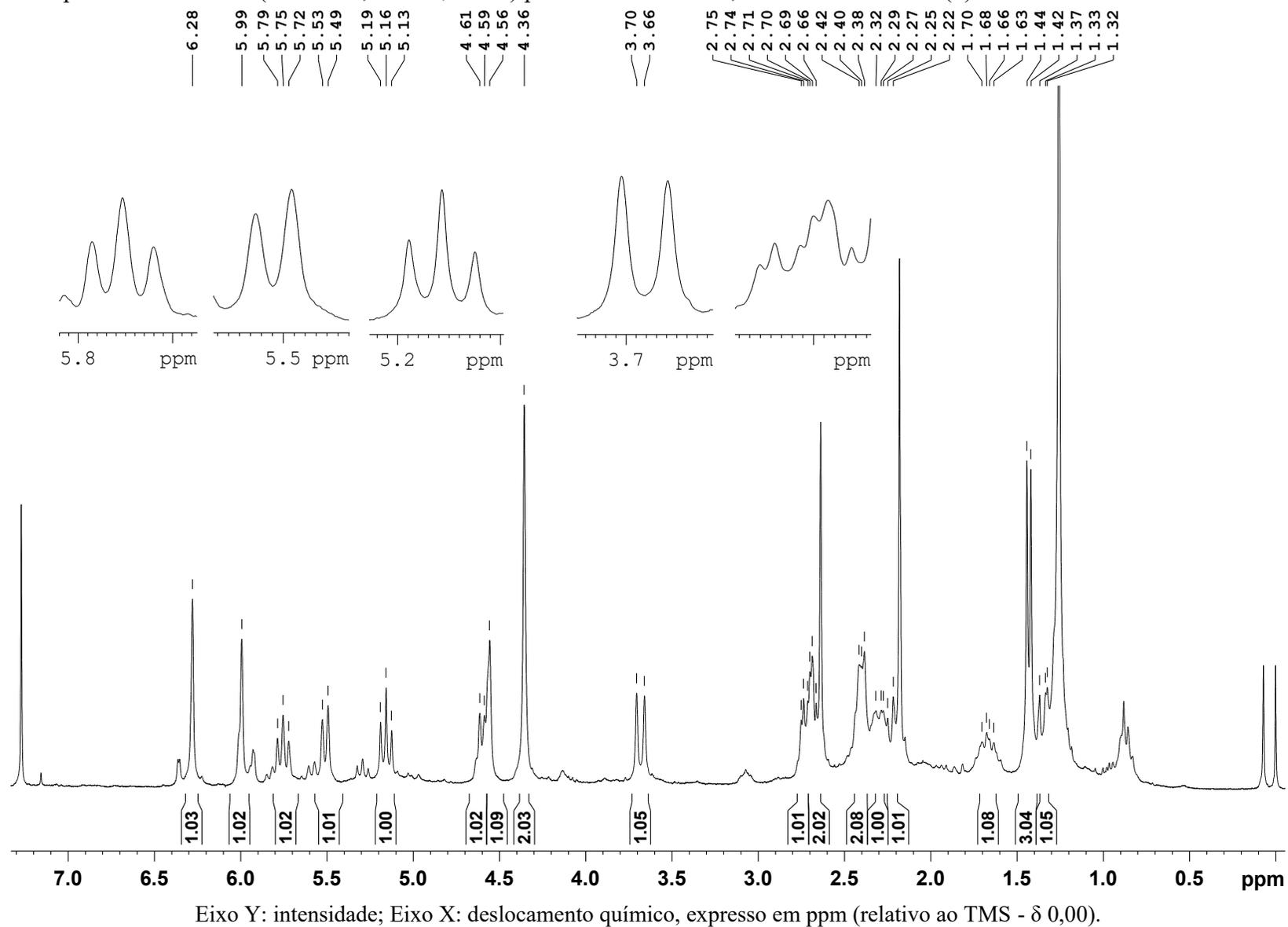
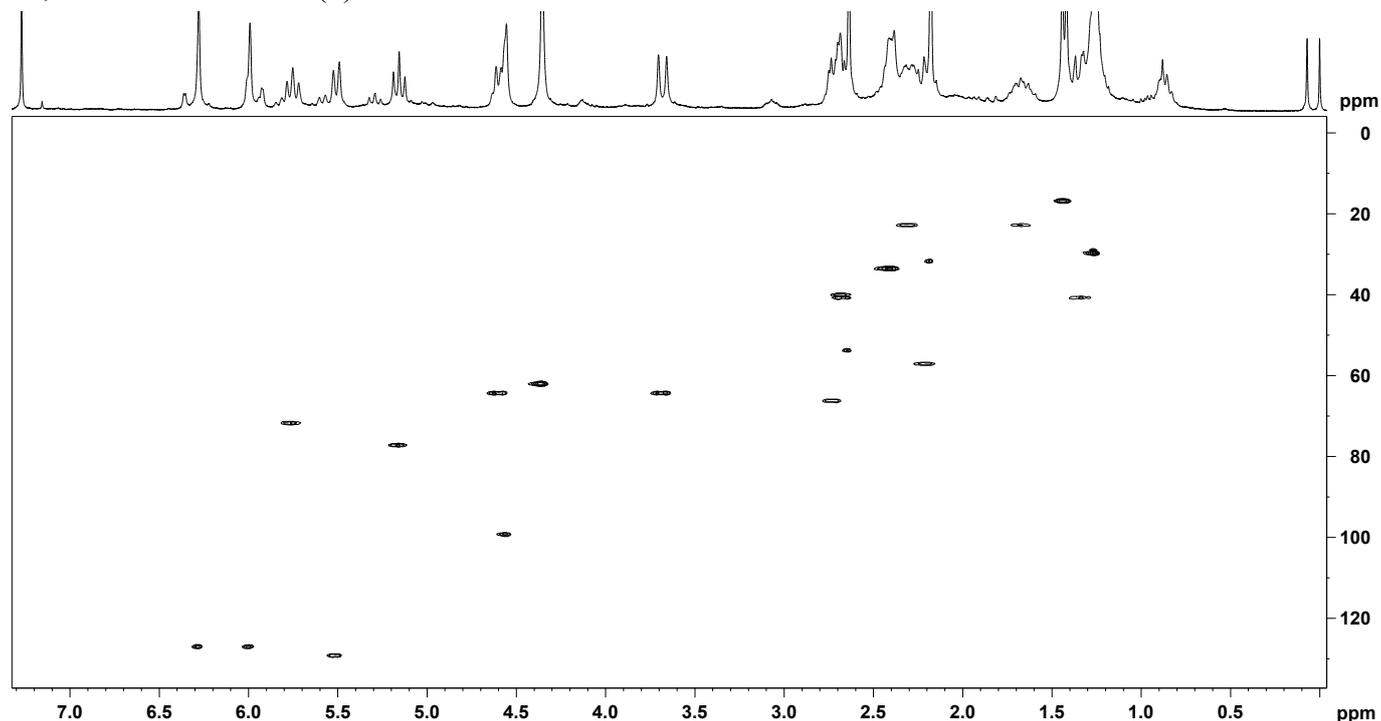
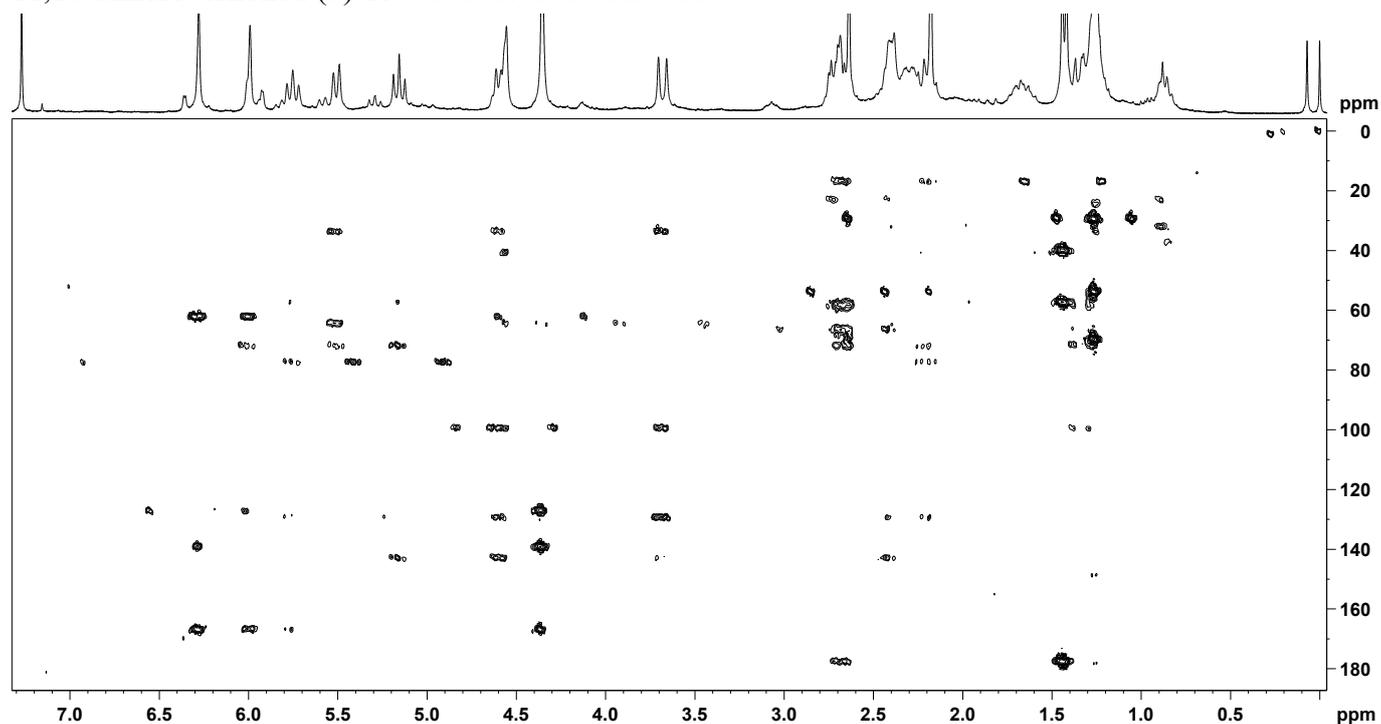


Figura 74 – Mapa de correlação HSQC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 295 K) para a 19-hidroxi-11,13-dihidroveranolida (**9**) de *Vernonanthura condensata*.



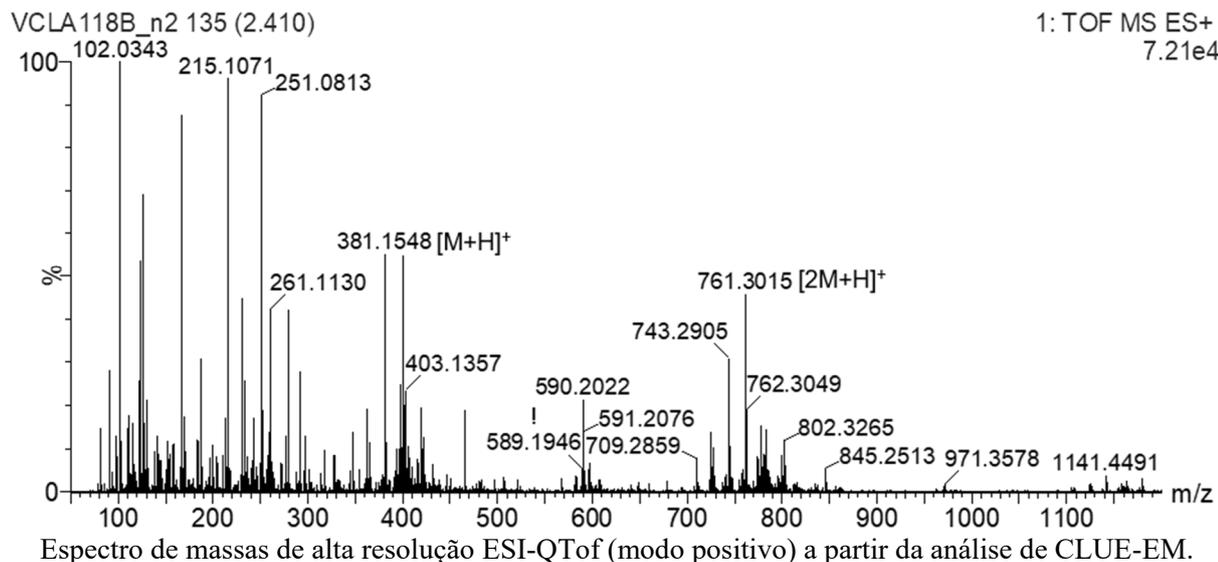
Eixo Y: projeção para ^{13}C , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00); Eixo X: deslocamento químico ^1H , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00).

Figura 75 – Mapa de correlação HMBC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 295 K) para a 19-hidroxi-11,13-dihidroveranolida (**9**) de *Vernonanthura condensata*.



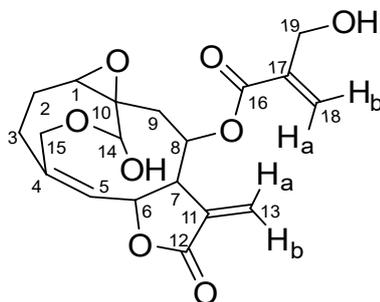
Eixo Y: projeção para ^{13}C , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00); Eixo X: deslocamento químico ^1H , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00).

Figura 76 – Espectro ESI-QToF EM *full scan* (100-1200 Da) para a 19-hidroxi-11,13-dihidrovornolida (**9**) de *Vernonanthura condensata*.



5.6.1.10 Composto (**10**): 19-hidroxivornolida

Figura 77 – Estrutura molecular da 19-hidroxivornolida (**10**) de *Vernonanthura condensata*.



Fonte: adaptado de Jakupovic e colaboradores (1987).

Os dados observados de RMN ^1H e RMN ^{13}C para o composto **10** foram comparados com dados da literatura conforme apresentado na Tabela 23. A análise de RMN ^1H e bidimensionais (HSQC e HMBC) para o composto **10** foram desenvolvidas em temperatura ambiente de 295 K (21,8 °C).

Os dados obtidos a partir do espectro de RMN ^1H (Figura 78) e dos mapas de correlações HSQC (Figura 79) e HMBC (Figura 80) para o composto **10** mostrou sinais bastante parecidos aos observados para as demais LS vernolídeo (**6-9**) (para maiores detalhes vide *itens 5.6.1.6 a 5.6.1.9*).

Quando com parado à vernolida (**8**) (Tabela 21), a modificação identificada no composto **10** se deu pela presença do substituinte hidroximetacrilóiloxi na posição C-8 em vez do metacrilóiloxi observado para o composto **8** (para maiores detalhes vide *item 5.6.1.9*).

Tabela 23 – Dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C para a 19-hidroxi vernolida (**10**) de *Vernonanthura condensata* e dados comparativos da literatura.

Posição	(10)		(RABE; MULLHOLLAND; VAN STADEN, 2002) ^a	
	δ $^1\text{H mult. (J Hz)}$	δ ^{13}C	δ $^1\text{H mult. (J Hz)}$	δ ^{13}C
1	2,75 <i>dd</i> (11,3; 4,3)	66,1	2,72 <i>dd</i> (11,5; 4,5)	66,4
2a	2,24-2,37 <i>m</i>	22,8	2,30 <i>m</i>	22,8
2b	1,60-1,77 <i>m</i>		1,69 <i>m</i>	
3a	2,35-2,48 <i>m</i>	33,3	2,40 <i>m</i>	33,5
3b	2,35-2,48 <i>m</i>		2,40 <i>m</i>	
4	-	143,4	-	143,8
5	5,58 <i>d</i> (10,1)	128,8	5,57 <i>d</i> (9,5)	128,7
6	5,29 <i>dd</i> (10,1; 9,0)	77,3	5,25 <i>t</i> (10,1)	77,4
7	3,07 <i>dddd</i> (9,0; 8,9; 3,3; 2,9)	51,8	3,05 <i>m</i>	51,9
8	5,81 <i>ddd</i> (10,8; 8,9; 1,3)	70,8	5,74	70,7
9a	2,71 <i>dd</i> (14,1; 1,3)	40,9	2,65 <i>d</i> (14,6)	41,3
9b	1,41 <i>dd</i> (14,1; 10,8)		1,39 <i>dd</i> (14,2; 10,7)	
10	-	58,8	-	58,9
11	-	134,8	-	134,8
12	-	169,4	-	169,4
13a	6,35 <i>d</i> (3,3)	126,1	6,35 <i>d</i> (2,7)	126,1
13b	5,92 <i>d</i> (2,9)		5,95 <i>d</i> (2,7)	
14	4,59 <i>sl</i>	99,1	4,55 <i>d</i> (10,1)	99,3
15a	4,61 <i>dd</i> (13,7; 1,2)	64,3	4,59 <i>d</i> (13,7)	64,3
15b	3,68 <i>dl</i> (13,7)		3,67 <i>d</i> (13,7)	
16	-	165,8	-	167,2
17	-	139,1	-	135,8
18a	6,28 <i>sl</i>	126,9	6,16 <i>d</i> (1,8)	127,2
18b	6,00 <i>sl</i>		5,71 <i>d</i> (1,8)	
19a	4,35 <i>sl</i>	61,8	1,96 <i>s</i>	18,3
19b	4,35 <i>sl</i>		-	
OH-14	-	-	4,91 <i>d</i> (10,1)	-

(300 MHz ^1H , 75 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 295 K) (500 MHz ^1H , 125 MHz ^{13}C , CDCl_3 , temperatura não indicada)

^a, uma vez que não foram encontrados relatos na literatura com a descrição dos dados de RMN do composto **10**, este foi comparado ao análogo vernolida (**8**), cuja diferença na comparação com **10** se dá apenas pelo substituinte éster em C-8 (com um metacrilóiloxi em vez do hidroximetacrilóiloxi em **10**).

Todavia, assim como observado na comparação entre as LS **7** e **8** (para maiores detalhes vide *itens 5.6.1.7 e 5.6.1.7*), a diferença entre os compostos **9** e **10** foi apenas a presença de uma α,β -insaturação exocíclica no anel γ -lactônico. A correlação entre os hidrogênios metilênicos em δ 6,35 *d* (1H, $J=3,3$ Hz; H-13a) e δ 5,92 *d* (1H, $J=2,9$ Hz; H-13b) com os carbonos δ 52,0 (C-7), δ 134,7 (C-11) e δ 169,6 (C-12) sustentaram o anel lactônico α,β -insaturado para **10**.

A análise de ESI-QToF EM confirmou a proposta estrutural para a 19-hidroxi vernolida (**10**) pela presença no espectro de EM *full scan* (Figura 81) do íon molecular protonado m/z 379,1399 $[\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_8+\text{H}]^+$ (calculado 379,1393), além do pico base correspondente ao dímero na forma aduto de hidrogênio m/z 757,2723 $[2\text{M}+\text{H}]^+$ (calculado 757,2708).

Figura 78 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , 295 K) para a 19-hidroxivernolida (**10**) de *Vernonanthura condensata*.

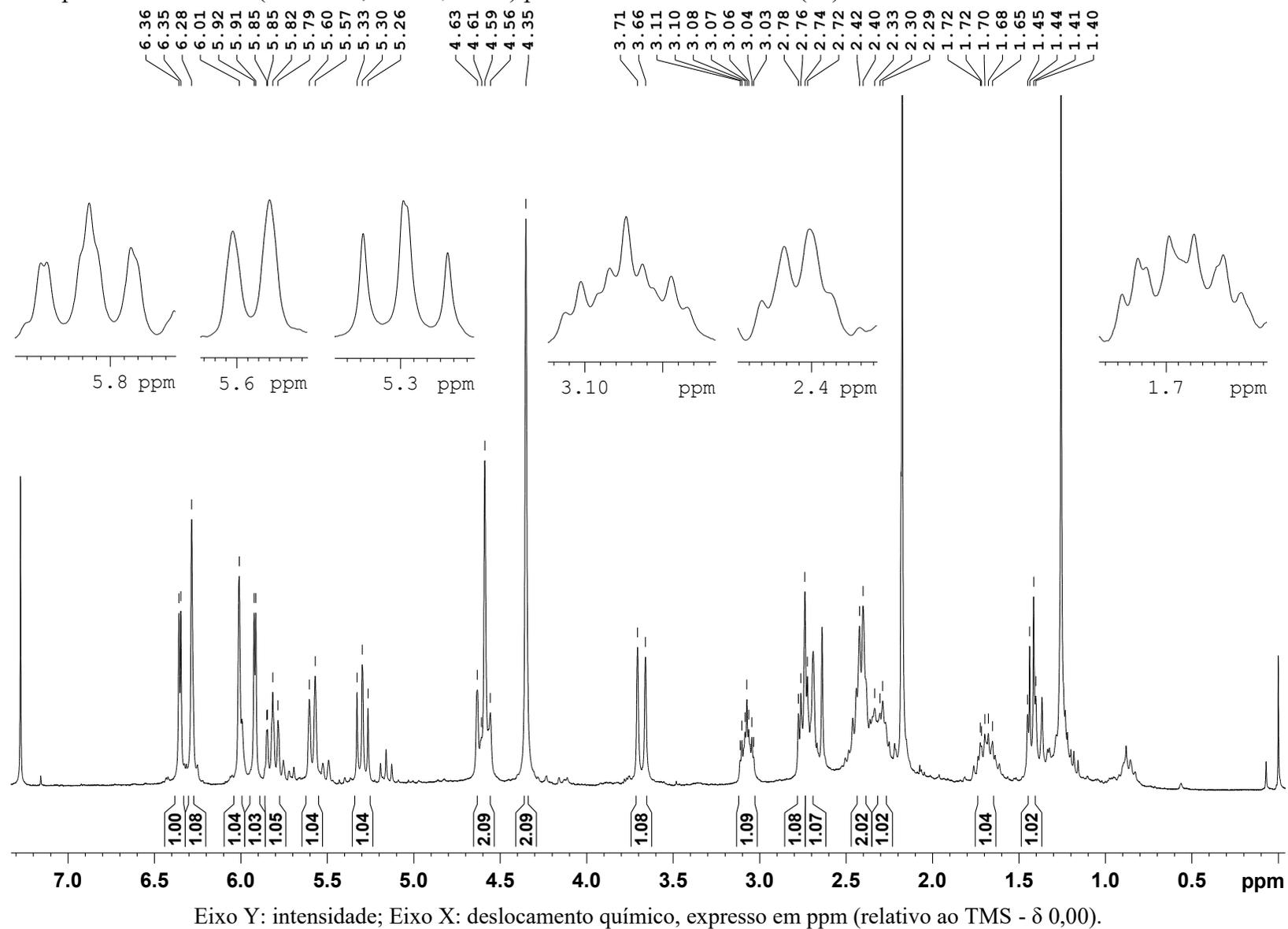
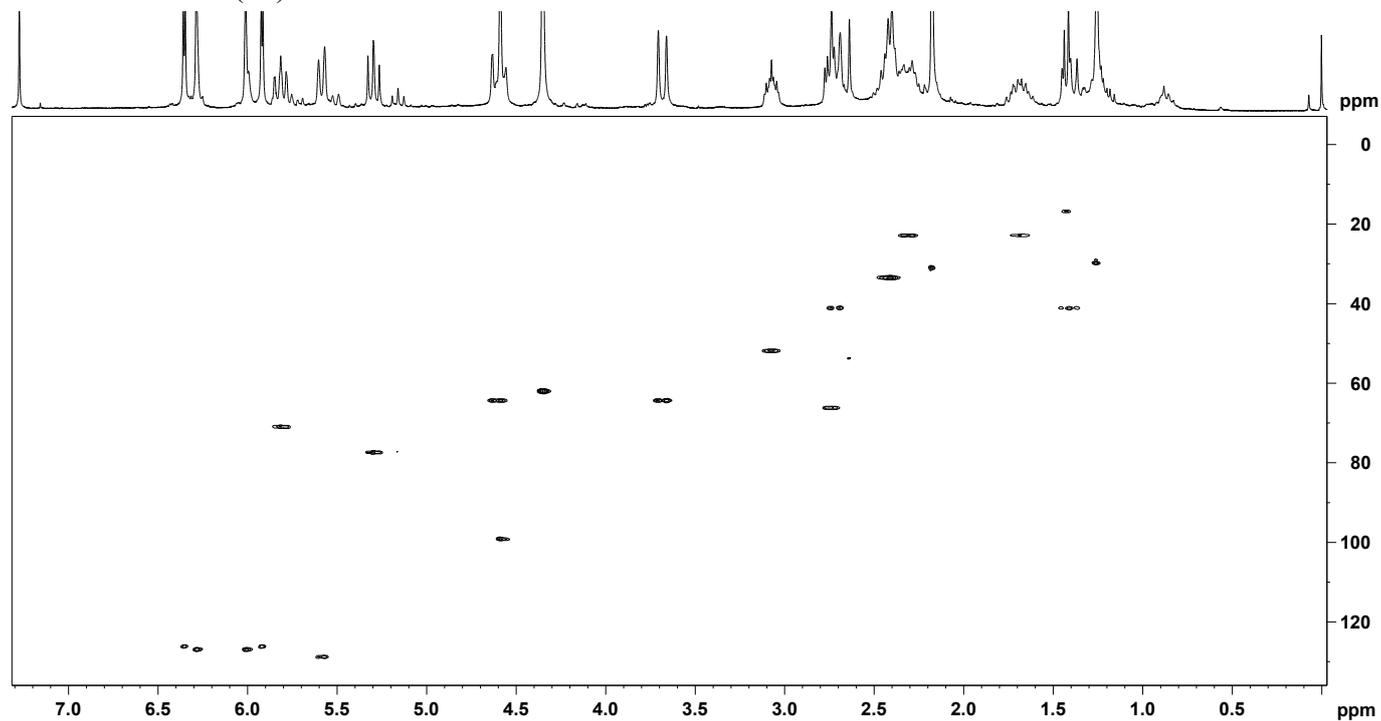
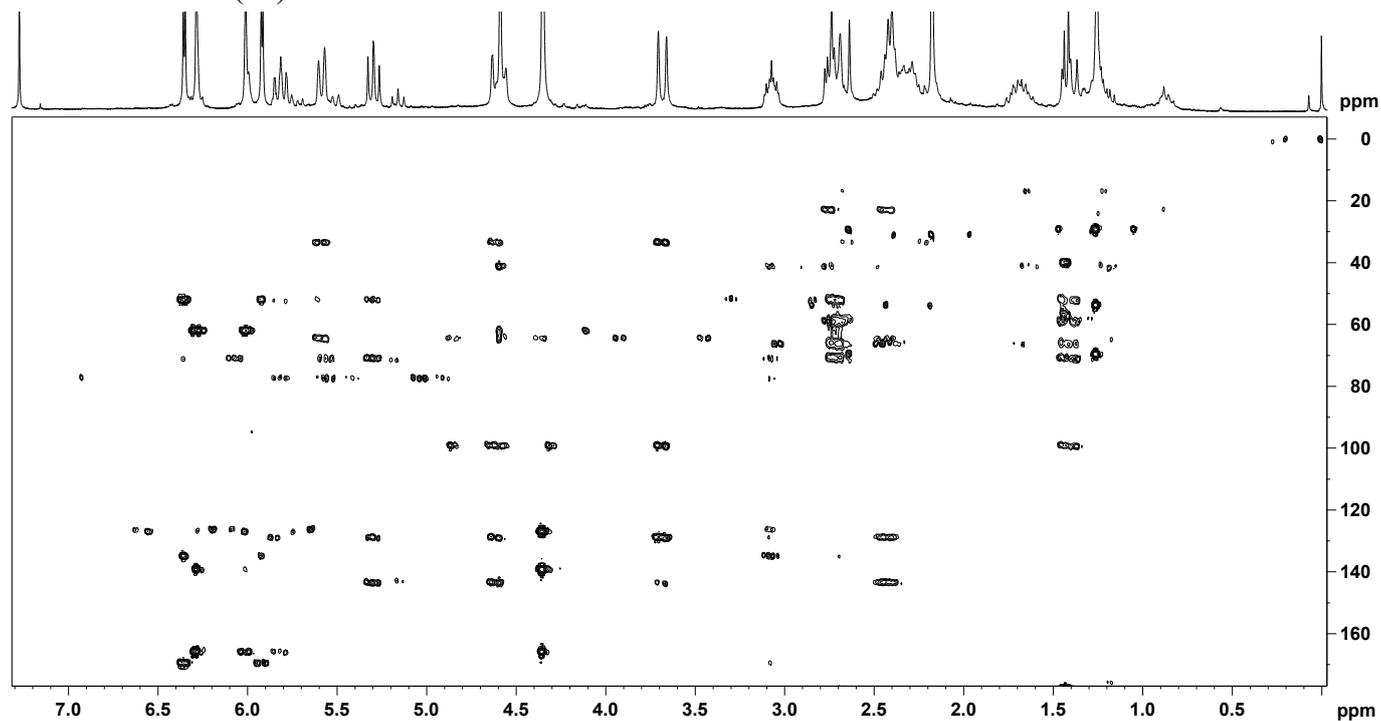


Figura 79 – Mapa de correlação HSQC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 295 K) para a 19-hidroxivernolida (**10**) de *Vernonanthura condensata*.



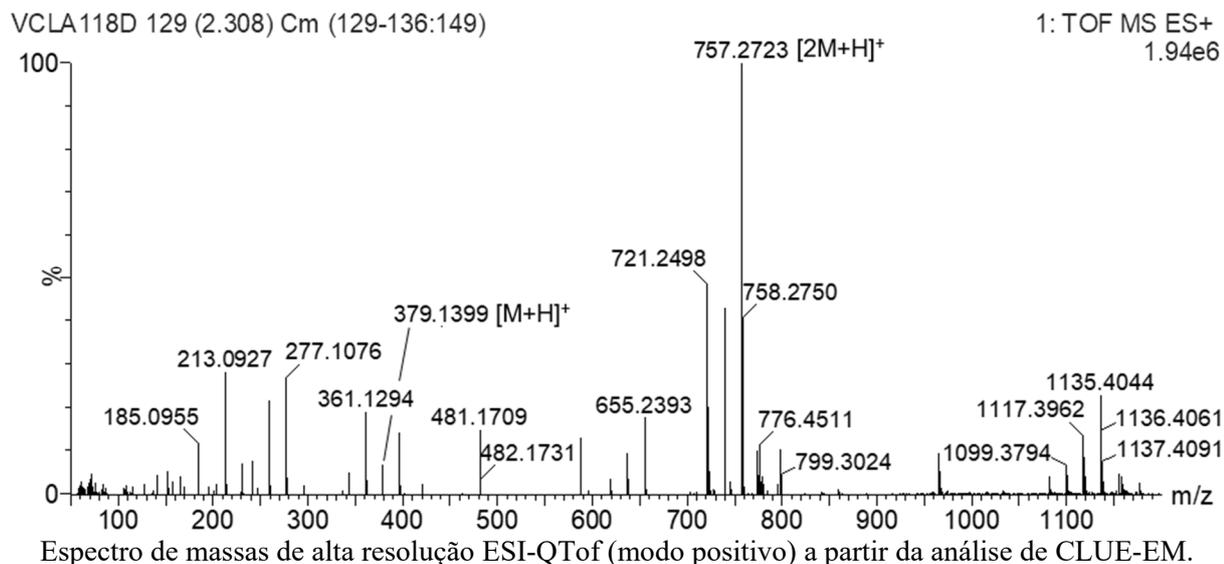
Eixo Y: projeção para ^{13}C , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00); Eixo X: deslocamento químico ^1H , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00).

Figura 80 – Mapa de correlação HMBC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 295 K) para a 19-hidroxivernolida (**10**) de *Vernonanthura condensata*.



Eixo Y: projeção para ^{13}C , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00); Eixo X: deslocamento químico ^1H , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00).

Figura 81 – Espectro ESI-QToF EM *full scan* (100-1200 Da) para a 19-hidroxivernolida (**10**) de *Vernonanthura condensata*.



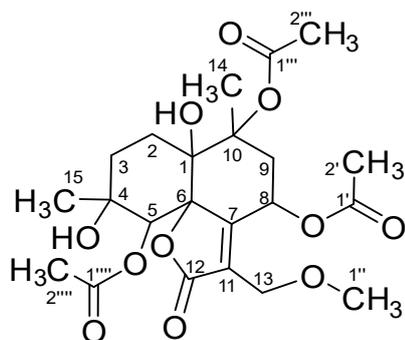
A partir dos dados espectrométricos e espectroscópicos, o composto **10** correspondeu à LS germacranolídeo do tipo vernolídeo, 19-hidroxivernolida (Figura 77), cuja fórmula molecular $C_{19}H_{22}O_8$.

Descrita para outras espécies de *Vernonieae* (SINISI et al., 2015; KIMANI et al., 2018), a 19-hidroxivernolida também já foi isolada previamente a partir da espécie *Vernonanthura condensata* (JAKUPOVIC et al., 1987).

5.6.2 Derivados semissintéticos de lactonas sesquiterpênicas: compostos 11-24

5.6.2.1 Derivado (**11**): 1,4-dihidroxi-5,8,10-triacetoxi-13-metoxicadin-7(11)-en-6(12)-olídeo

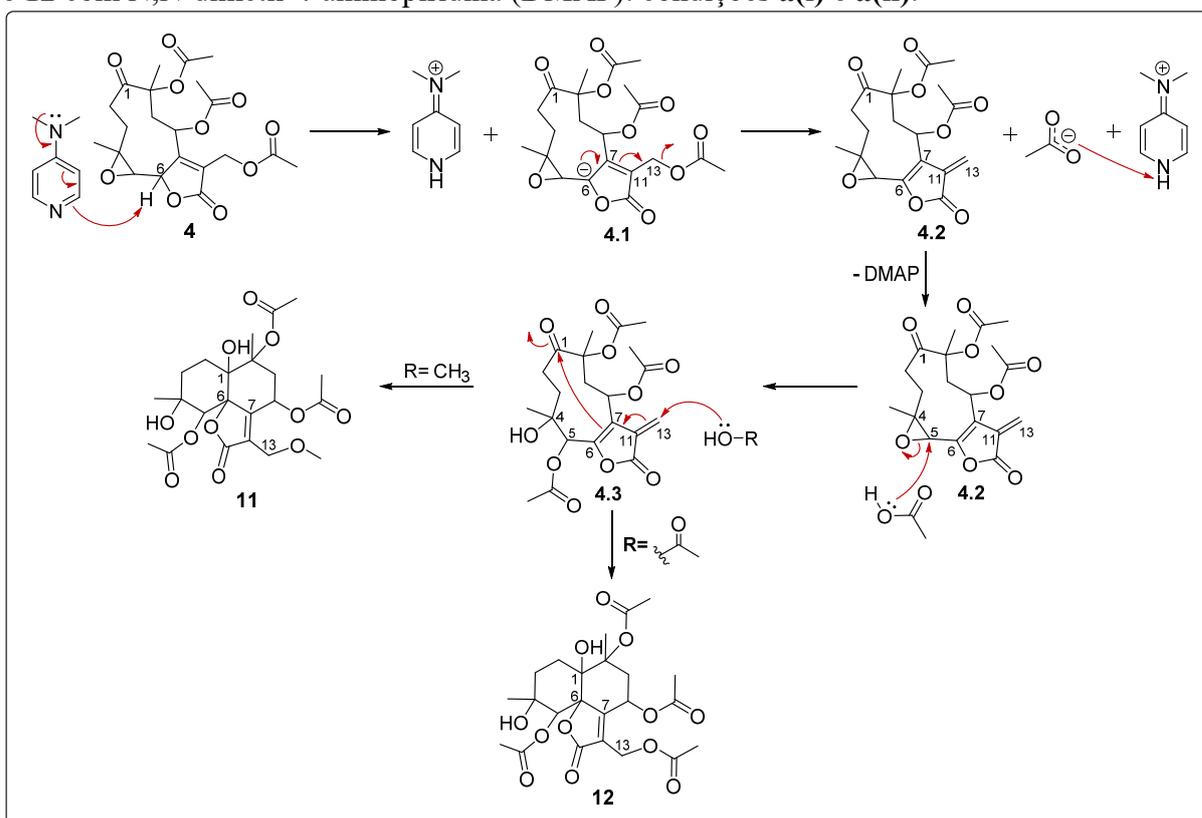
Figura 82 – Estrutura molecular do derivado semissintético (**11**) do glaucolídeo B (**4**).



Fonte: adaptado de Jakupovic e colaboradores (1986b).

A produção dos derivados semissintéticos **11** e **12** (sendo o composto **12** detalhado a seguir no *item 5.6.2.2*) a partir do glaucolídeo B (**4**) se deu a partir da utilização do catalisador básico DMAP, conforme mecanismo demonstrado no Esquema 24.

Esquema 24 – Mecanismo de reação proposto para produção dos derivados semissintéticos **11** e **12** com N,N-dimetil-4-aminopiridina (DMAP): condições **a(i)** e **a(ii)**.



Condições reacionais: **(a)** (i) DMAP, MeOH, refluxo a 60 °C, 3 h ou (ii) DMAP, DCM, rt, 0,5 h.

Para tanto, a primeira etapa de reação foi dependente da desprotonação do hidrogênio metínico na posição C-6 do glaucolídeo B (**4**), realizada pelo DMAP. Este passo reacional promoveu a formação de um intermediário carbânion (**4.1**) na mesma posição (C-6) além do íon N,N-dimetilaminopiridínio. Posteriormente, em mecanismo similar ao proposto por Matínez-Vázquez e colaboradores (1992), a base conjugada (**4.1**) sofreu um rearranjo que levou à eliminação alílica do grupo acetoxi da posição C-13 e a obtenção do intermediário germacra-6(7),11(13)-dien-6(12)-olídeo (**4.2**). O ânion acetato formado foi então estabilizado pelo N,N-dimetilaminopiridínio com conseqüente regeneração do catalisador DMAP e produção de ácido acético, o qual promoveu uma adição nucleofílica ao grupo oxirano em C-5, com a abertura do anel e formação de um intermediário 5-acetilado (**4.3**). Por fim, a presença do metanol na condição reacional **a(i)** desencadeou uma adição de Michael ao metileno exocíclico em C-13 e conseqüente rearranjo estrutural promovido pelo deslocamento dos elétrons π para a posição

C-7/C-11 (reestabelecendo o anel lactônico com α,β -insaturação endocíclica) seguido da ciclização transanular a partir do ataque nucleofílico à carbonila em C-1, com a obtenção de um núcleo decalina em C-1/C-6, correspondendo ao derivado 13-metoxi-cadinanolídeo (**11**).

A partir dos dados de RMN ^1H (Figura 83) e bidimensionais (HSQC e HMBC, Figuras 84 e 85) observados para o composto **11** foi possível confirmar a formação do derivado semissintético de interesse. Os dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C observados para o derivado **11** foram comparados com dados da literatura e estão apresentados na Tabela 24.

Tabela 24 – Dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C para o derivado semissintético (**11**) do glaucolídeo B (**4**) e dados comparativos da literatura.

Posição	(11)		(JAKUPOVIC et al., 1986b)	
	δ ^1H mult. (J Hz)	δ ^{13}C	δ ^1H mult. (J Hz)	δ ^{13}C
1	-	76,8	-	89,2
2a	2,33-2,42 <i>m</i>	30,9	2,38 <i>m</i>	30,6
2b	1,66-1,73 <i>m</i>		1,67 <i>m</i>	
3a	2,26-2,37 <i>m</i>	36,0	2,33 <i>m</i>	35,9
3b	1,81-1,92 <i>m</i>		1,86 <i>m</i>	
4	-	73,2	-	73,3
5	5,93 <i>s</i>	75,9	5,92 <i>s</i>	76,1
6	-	88,9	-	76,9
7	-	157,2	-	157,1
8	5,87 <i>dd</i> (4,0; 2,4)	65,0	5,87 <i>dd</i> (4,0; 2,0)	64,9
9a	3,32 <i>dd</i> (16,0; 2,4)	34,0	3,32 <i>dd</i> (15,0; 2,0)	34,1
9b	2,04 <i>dd</i> (16,0; 4,0)		2,03 <i>dd</i> (15,0; 4,0)	
10	-	84,2	-	84,4
11	-	129,5	-	129,7
12	-	171,4	-	168,9
13a	4,42 <i>d</i> (12,1)	63,1	4,41 <i>d</i> (11,5)	63,1
13b	4,23 <i>d</i> (12,1)		4,23 <i>d</i> (11,5)	
14	1,70 <i>s</i>	19,8	1,70 <i>s</i>	19,1
15	1,41 <i>s</i>	23,3	1,40 <i>s</i>	23,4
1'	-	170,5	-	171,3
2'	2,04 <i>s</i>	21,2	2,03 <i>s</i>	21,1
1''	3,35 <i>s</i>	58,7	3,34 <i>s</i>	58,5
1'''	-	168,9	-	170,4
2'''	2,22 <i>s</i>	23,0	2,21 <i>s</i>	22,9
1''''	-	171,4	-	171,1
2''''	1,98 <i>s</i>	20,5	1,97 <i>s</i>	20,4

(300 MHz ^1H , 75 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 295 K) (400 MHz ^1H , 100 MHz ^{13}C , CDCl_3 , temperatura não indicada)

A comparação com o material de partida (**4**) (para maiores detalhes vide *item 5.6.1.4*), revelou os sinais dos carbonos oxigenados nas posições C-1 (δ 76,8) e C-6 (δ 88,9) para o derivado **11**, confirmando a proposta de formação do núcleo decalínico (MARTÍNEZ-VÁZQUEZ et al., 1992).

Figura 83 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , 295 K) para o derivado semissintético (**11**) do glaucolídeo B (**4**).

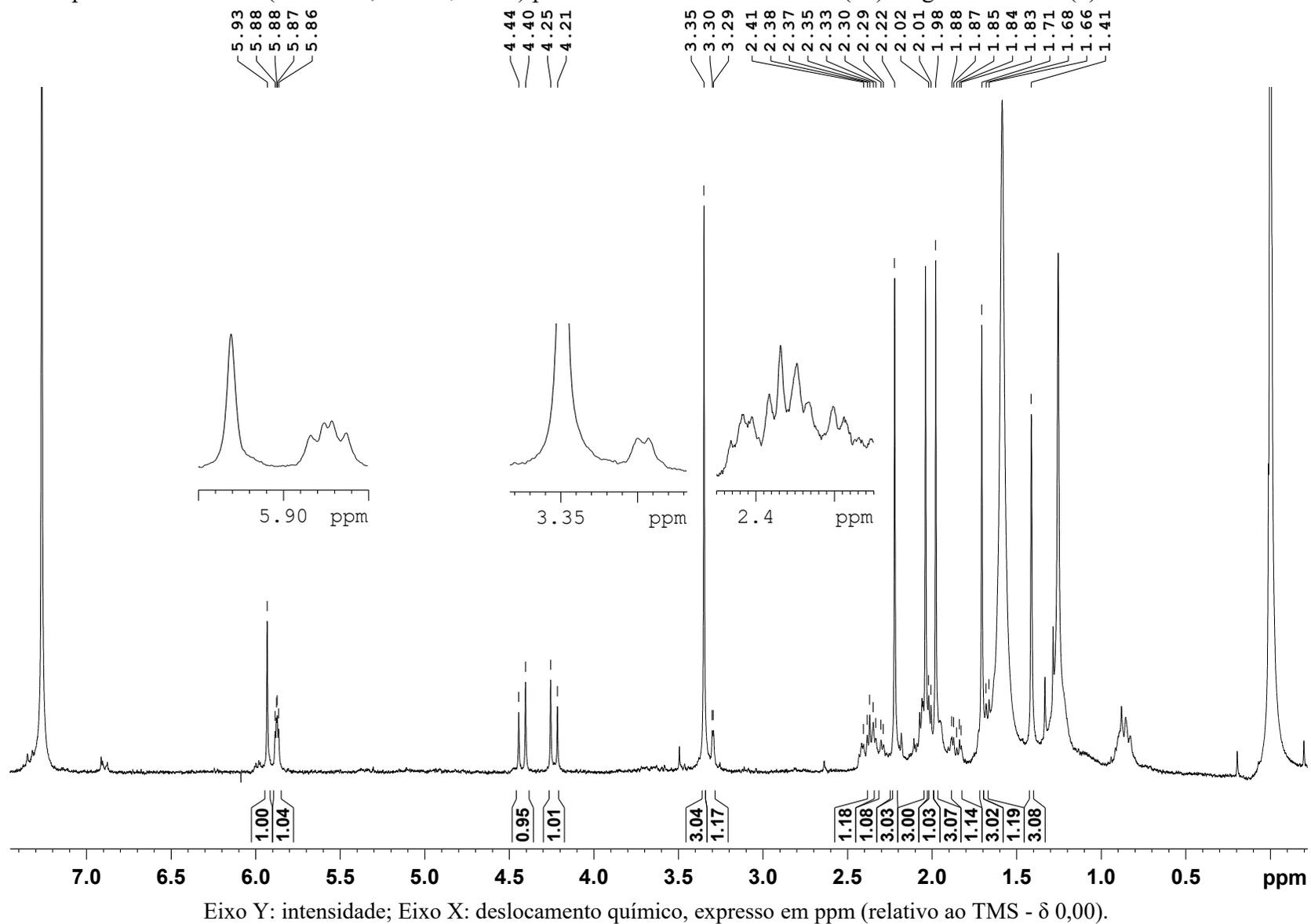
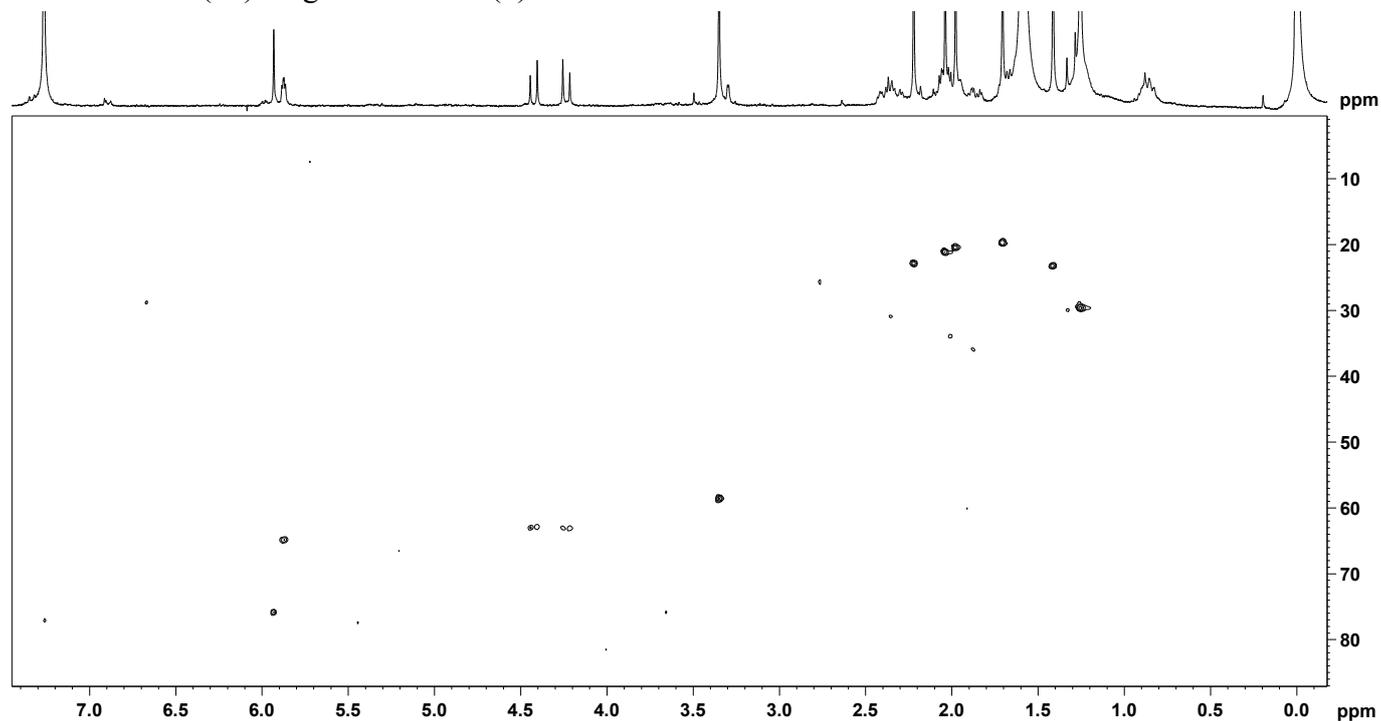
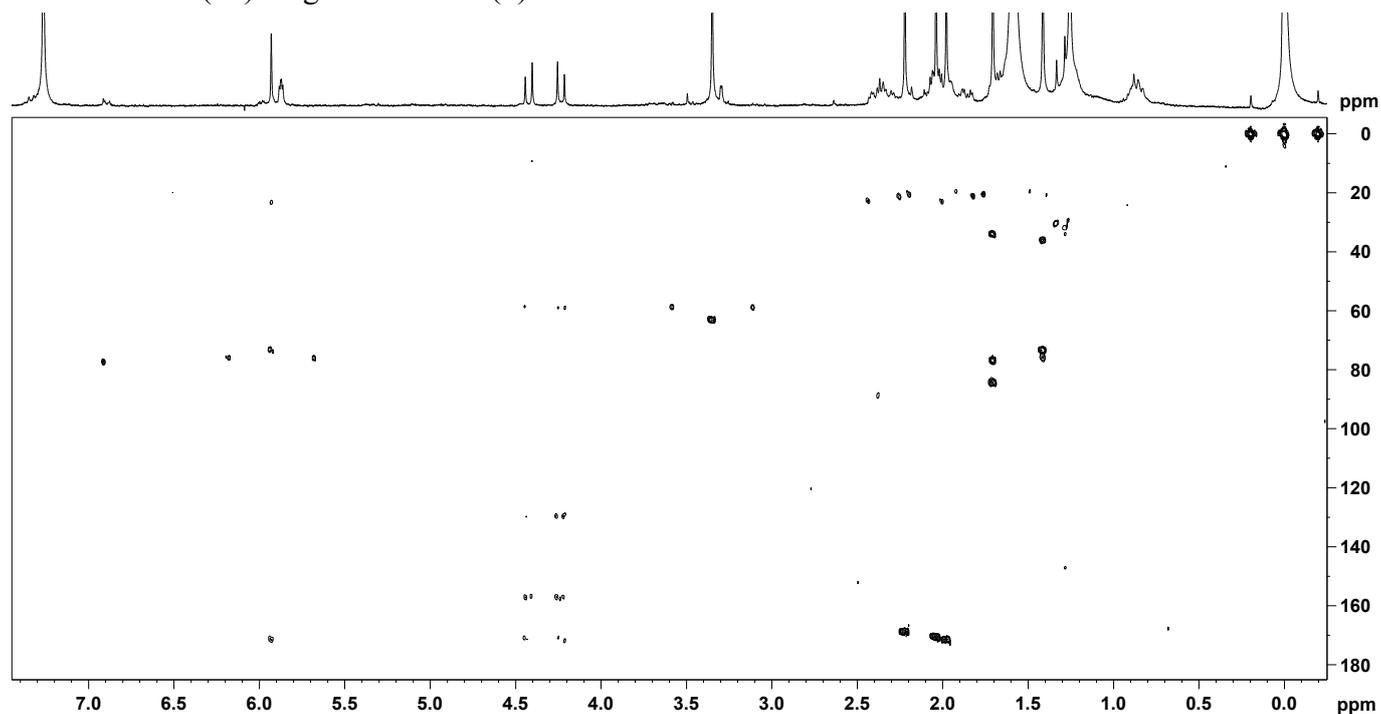


Figura 84 – Mapa de correlação HSQC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 295 K) para o derivado semissintético (11) do glaucolídeo B (4).



Eixo Y: projeção para ^{13}C , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00); Eixo X: deslocamento químico ^1H , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00).

Figura 85 – Mapa de correlação HMBC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 295 K) para o derivado semissintético (11) do glaucolídeo B (4).



Eixo Y: projeção para ^{13}C , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00); Eixo X: deslocamento químico ^1H , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00).

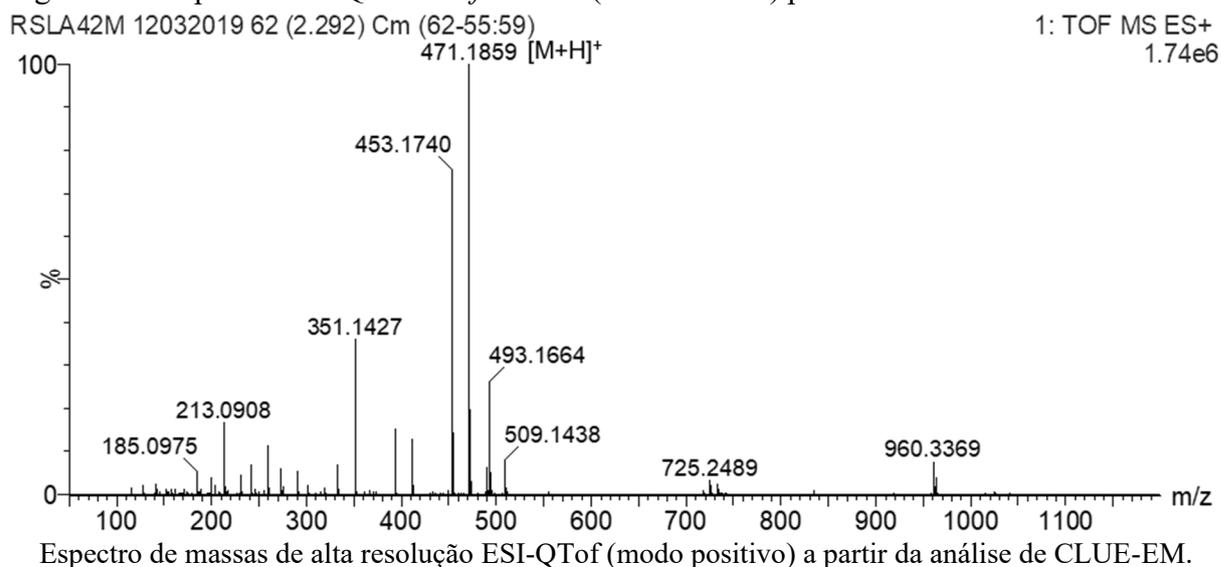
Nesse contexto, a partir da análise de HMBC do composto **11** foi possível corrigir as atribuições para os carbonos C-1 e C-6 realizadas de forma inversa por Jakupovic e colaboradores (1986b).

A presença de um anel γ -lactônico em C-6/C-7 contendo uma α,β -insaturação endocíclica (C-7/C-11) foi confirmada pela correlação dos sinais de hidrogênios metilênicos diastereotópicos em δ 4,23 *d* (1H, $J=12,1$ Hz, H-13a) e δ 4,42 *d* (1H, $J=12,1$ Hz, H-13b) com os carbonos em 171,4 ppm (C-12), 129,5 ppm (C-11) e 157,2 ppm (C-7). Entretanto, o substituinte acetoxi na posição alílica C-13 observado no material de partida (**4**) deu lugar ao grupo metoxi, confirmado pela correlação do hidrogênios em δ 3,35 *s* (3H, H-1'') com o carbono oximetilênico em C-13 (δ 63,1).

Por outro lado, foram mantidos os grupos acetoxi formados pelos sinais de hidrogênios δ 2,04 *s* (3H, H-2') δ 2,22 *s* (3H, H-2''') e nas posições C-8 e C-10, respectivamente. Além destes, identificou-se também o substituinte acetoxi de hidrogênio δ 1,98 *s* (3H, H-2''') na posição C-5 (δ 75,9) devido à correlação do hidrogênio oximetínico em δ 5,93 *s* (1H, H-5) com a carbonila em C-1'''' (δ 171,4) de respectiva acetila.

A análise de ESI-QToF EM confirmou a proposta estrutural para o derivado semissintético **11** pela presença no espectro de EM *full scan* (Figura 86) do íon molecular protonado m/z 471,1859 [$C_{22}H_{30}O_{11}+H$]⁺ (calculado 471,1866).

Figura 86 – Espectro ESI-QToF EM *full scan* (100-1200 Da) para o derivado semissintético **11**.

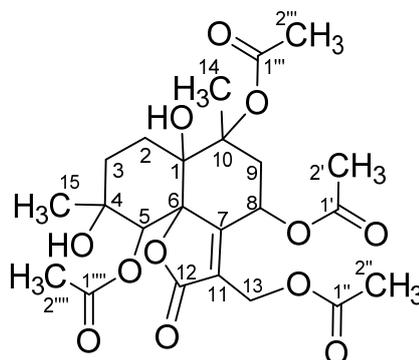


O derivado semissintético **11** correspondeu à LS do tipo cadinanolídeo, 1,4-dihidroxi-5,8,10-triacetoxi-13-metoxicadin-7(11)-en-6(12)-olídeo (Figura 80), cuja fórmula molecular é $C_{22}H_{30}O_{11}$. Embora não tenham sido encontrados relatos da obtenção do composto **11** utilizando

catalisadores básicos em uma abordagem semissintética, este já foi reportado na literatura a partir do esqueleto glaucolídeo, incluindo o glaucolídeo B (**4**) como composto de partida, em reações de ciclização transanular de LS com sílica e metanol sob refluxo (JAKUPOVIC et al., 1986b; BAZON et al., 1997).

5.6.2.2 Derivado (**12**): 1,4-dihidroxi-5,8,10,13-tetraacetocadin-7(11)-en-6(12)-olídeo

Figura 87 – Estrutura molecular do derivado semissintético (**12**) do glaucolídeo B (**4**).



Fonte: adaptado de Bardón e colaboradores (1993).

A formação do derivado semissintético **12** se deu de acordo com o mesmo mecanismo proposto para obtenção do derivado **11** (Esquema 24). A diferença fundamental entre ambos os derivados (**11** e **12**) diz respeito à etapa de adição de Michael com o intermediário **4.3**, sendo desencadeada pelo próprio ácido acético proveniente do passo reacional anterior, para a formação do derivado semissintético 13-acetoxi-cadinanolídeo (**12**), o qual foi identificado como componente minoritário na condição **a(i)**, mas obtido como majoritário na condição **a(ii)** em função da substituição do metanol pelo DCM como solvente.

A Tabela 25 apresenta os dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C observados para o derivado **12** juntamente com a comparação com dados reportados na literatura. As informações obtidas a partir dos experimentos de RMN ^1H (Figura 88) e bidimensionais (HSQC e HMBC, Figuras 89 e 90) para o composto **12** permitiram confirmar a formação do derivado semissintético de interesse.

Nesse sentido, também foram detectados os sinais sugestivos da presença do núcleo cadinanolídeo, assim como abordado anteriormente para derivado semissintético análogo **11** (para maiores detalhes vide *item 5.6.2.1*). Ainda, a comparação dos dados espectroscópicos de RMN entre o derivado **12** e seu análogo **11** mostrou que a única diferença estrutural refere-se à

presença da porção acetoxi na posição alílica C-13 para **12**, em vez do substituinte metoxi observado na mesma posição para o derivado **11**.

Tabela 25 – Dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C para o derivado semissintético (**12**) do glaucolídeo B (**4**) e dados comparativos da literatura.

Posição	(12)		(BARDÓN et al., 1993) ^a
	δ ^1H mult. (J Hz)	δ ^{13}C	δ ^1H mult. (J Hz)
1	-	76,8	-
2a	2,30-2,42 <i>m</i>	30,7	2,35 <i>m</i>
2b	1,60-1,73 <i>m</i>		1,68 <i>m</i>
3a	2,25-2,39 <i>m</i>	35,8	2,35 <i>m</i>
3b	1,77-1,90 <i>m</i>		1,85 <i>m</i>
4	-	73,3	-
5	5,92 <i>s</i>	75,9	5,92 <i>sl</i>
6	-	89,4	-
7	-	157,4	-
8	5,86 <i>dd</i> (4,1; 2,4)	65,3	5,85 <i>dd</i> (4,0; 2,5)
9a	3,32 <i>dd</i> (16,1; 2,4)	33,8	3,31 <i>dd</i> (16,0; 2,0)
9b	2,06 <i>dd</i> (16,1; 4,1)		2,05 <i>dd</i> (16,0; 4,0)
10	-	84,2	-
11	-	128,0	-
12	-	170,4	-
13a	5,12 <i>d</i> (12,9)	55,0	5,11 <i>d</i> (13,0)
13b	4,79 <i>d</i> (12,9)		4,79 <i>d</i> (13,0)
14	1,70 <i>s</i>	19,7	1,69 <i>s</i>
15	1,41 <i>s</i>	23,3	1,40 <i>s</i>
1'	-	170,7	-
2'	2,03 <i>s</i>	21,2	2,02 <i>s</i>
1''	-	170,5	-
2''	2,05 <i>s</i>	20,7	2,02 <i>s</i>
1'''	-	168,9	-
2'''	2,22 <i>s</i>	22,9	2,21 <i>s</i>
1''''	-	171,4	-
2''''	1,98 <i>s</i>	20,4	1,97 <i>s</i>
	(300 MHz ^1H , 75 MHz ^{13}C , CDCl ₃ , 295 K)		(500 MHz ^1H , CDCl ₃ , temperatura não indicada)

^a, não foram encontrados relatos na literatura com a descrição dos dados de RMN ^{13}C para o composto **12**, por isso realizou-se a comparação apenas em relação aos dados de RMN ^1H .

A confirmação da função acetila na posição C-13 do derivado **12** foi determinada a partir da correlação dos hidrogênios em δ 2,05 *s* (3H, H-2'') com o carbono oximetilênico δ 55,0 (C-13).

A análise de ESI-QToF EM confirmou a proposta estrutural para o derivado semissintético **12** pela presença no espectro de EM *full scan* (Figura 91) do íon molecular protonado m/z 499,1794 [C₂₃H₃₀O₁₂+H]⁺ (calculado 499,1816), conforme reportado na literatura para o derivado **12** (BARDÓN et al., 1993).

Figura 88 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , 295 K) para o derivado semissintético (**12**) do glaucolídeo B (**4**).

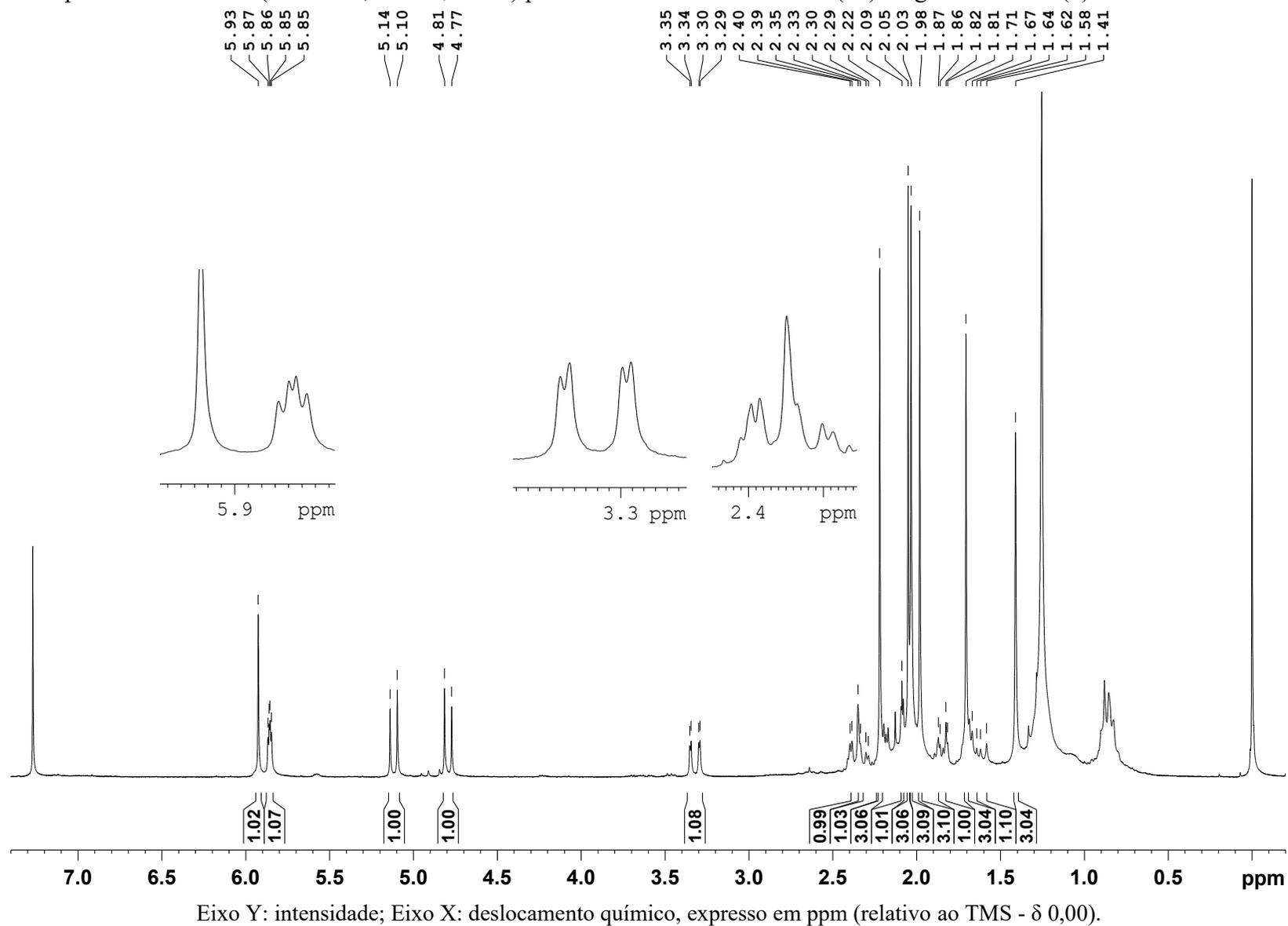
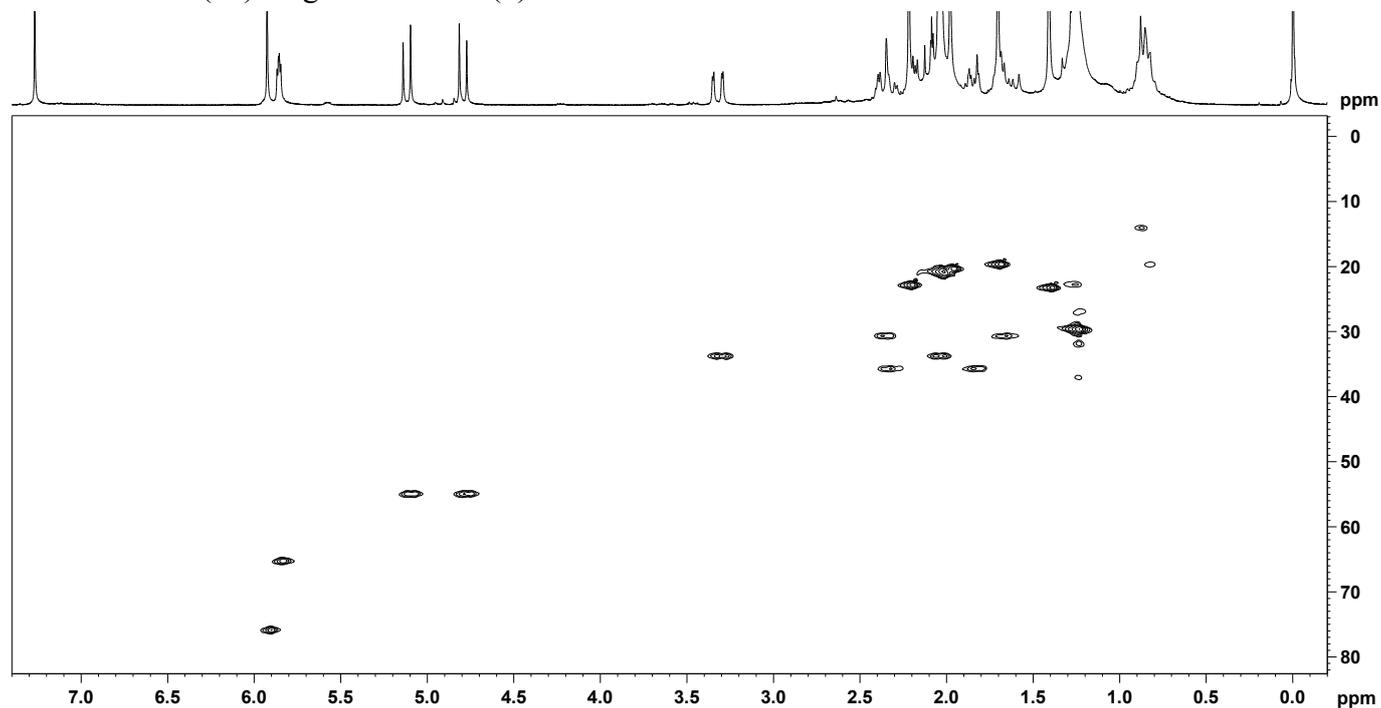
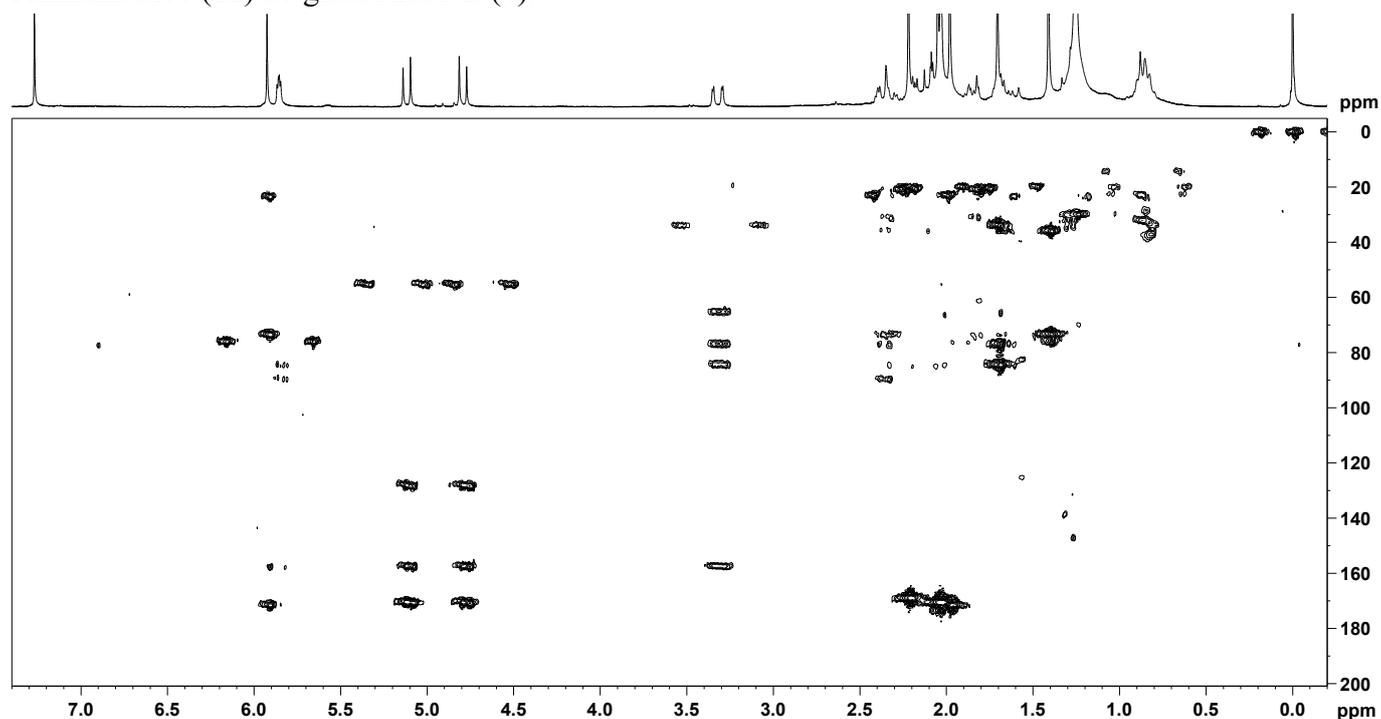


Figura 89 – Mapa de correlação HSQC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 295 K) para o derivado semissintético (12) do glaucolídeo B (4).



Eixo Y: projeção para ^{13}C , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00); Eixo X: deslocamento químico ^1H , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00).

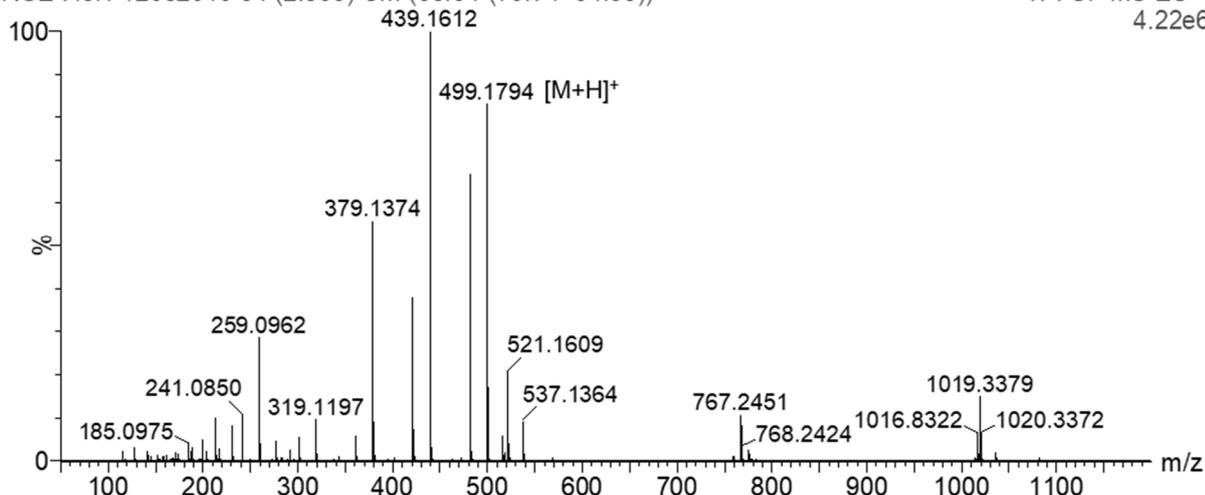
Figura 90 – Mapa de correlação HMBC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 295 K) para o derivado semissintético (12) do glaucolídeo B (4).



Eixo Y: projeção para ^{13}C , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00); Eixo X: deslocamento químico ^1H , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00).

Figura 91 – Espectro ESI-QToF EM *full scan* (100-1200 Da) para o derivado semissintético **12**.
 RSLA43H 12032019 64 (2.365) Cm (63:64-(70:74+54:55))

1: TOF MS ES+
4.22e6



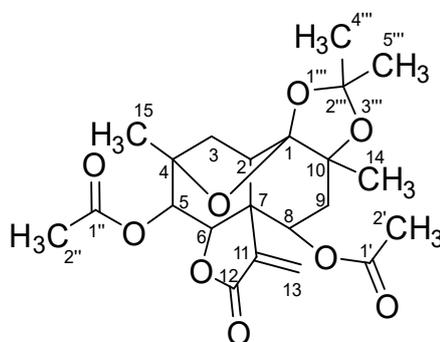
Espectro de massas de alta resolução ESI-QToF (modo positivo) a partir da análise de CLUE-EM.

O derivado semissintético **12** correspondeu ao cadinanólídeo 1,4-dihidroxi-5,8,10,13-tetraacetoxicadin-7(11)-en-6(12)-olídeo (Figura 87), com fórmula molecular $C_{23}H_{30}O_{12}$.

Em termos quimiotaxonômicos, o derivado **12** já foi previamente relatado para a espécie da tribo Vernonieae (BARDÓN et al., 1993; VALDÉS et al., 1998). Além disso, a proposta de um núcleo cadinanólídeo está condizente com o reportado na literatura, que demonstra a obtenção desse subtipo de LS por meio de reações de ciclização transanular a partir de LS do tipo glaucolídeo (MARTÍNEZ-VÁZQUEZ et al., 1992; BAZON et al., 1997).

5.6.2.3 Derivado (**13**): 1(10)-acetonida-5,8-diacetoxi-2-epi-vernomargolídeo-1(4)-ciclohemiacetal

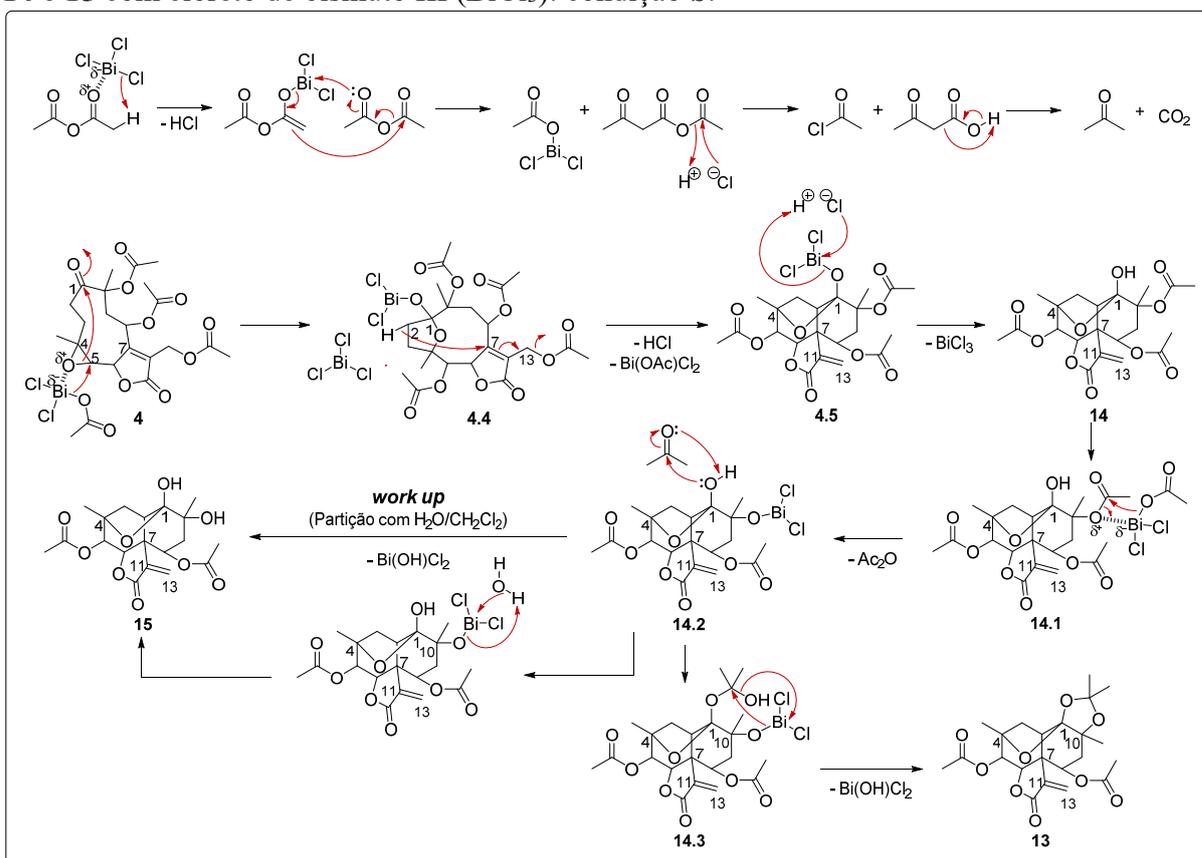
Figura 92 – Estrutura molecular do derivado semissintético (**13**) do glaucolídeo B (**4**).



Fonte: adaptado de Rodríguez-Hahn e colaboradores (1988).

A obtenção dos derivados semissintéticos **13**, **14** e **15** a partir do glaucolídeo **B** (**4**) foi possível pela reação catalisada pelo cloreto de bismuto em presença de anidrido acético (condição **b**), como demonstrado no Esquema 25.

Esquema 25 – Mecanismo de reação proposto para produção dos derivados semissintéticos **13**, **14** e **15** com cloreto de bismuto III (BiCl_3): condição **b**.



Condição reacional: (**b**) BiCl_3 , Ac_2O , DCM, Ar, rt, 2 h.

O passo reacional inicial foi dependente da abertura do anel epóxido em C-4/C-5 do composto de partida (**4**), realizada nesse caso pelo derivado catalítico denominado acetoxicloreto de bismuto [$\text{Bi}(\text{OAc})\text{Cl}_2$], em mecanismo similar ao proposto para a abertura de epóxidos por espécies de bismuto (SALVADOR; SILVESTRE; PINTO, 2011; ALAM; PARK, 2017). Para a formação paralela dessa espécie catalítica, o BiCl_3 complexou-se com o Ac_2O , promovendo a perda de HCl a partir do ataque de um dos átomos de cloro ao hidrogênio do anidrido. Em seguida, a condensação deste intermediário com nova molécula de Ac_2O , seguindo um mecanismo de condensação de Claisen, proporcionou a formação do $\text{Bi}(\text{OAc})\text{Cl}_2$ e de um β -ceto-éster.

Uma vez gerado, em função de sua acidez de Lewis em relação ao epóxido, o acetoxicloreto de bismuto interagiu com o oxigênio do grupo oxirano para formar um complexo

ativado "O-Bi(OAc)Cl₂". A abertura do anel epóxido foi causada pelo ataque da porção acetoxi do "O-Bi(OAc)Cl₂" ao carbono menos substituído do epóxido (C-5), formando um intermediário acetilado em C-5 (**4.4**), e o conseqüente rearranjo estrutural desencadeado pela adição nucleofílica à carbonila em C-1. Essa ciclização promoveu a formação de um anel tetrahydrofurânico em C-1/C-4 além de uma porção acetálica em C-1, estabilizada pela espécie de bismuto remanescente da etapa de abertura do oxirano ("O-BiCl₂").

Posteriormente, o BiCl₃ promoveu a desprotonação do hidrogênio metilênico na posição C-2 do intermediário **4.4** com a perda de HCl, desencadeando a ciclização transanular a partir do ataque nucleofílico ao carbono olefínico em C-7, seguido do deslocamento da dupla ligação para a posição C-11/C-13 e a perda do grupo acetoxi ligado na posição alílica C-13 na forma de Bi(OAc)Cl₂, originando um núcleo decalina em C-2/C-7, correspondendo ao intermediário **4.5**. A capacidade de desprotonação do BiCl₃ já foi demonstrada previamente em outras situações reacionais (MOHAMMADPOOR-BALTORK; ALIYAN, 1999; SALVADOR; PINTO; SILVESTRE, 2009). O HCl oriundo do passo reacional anterior promoveu o ataque à porção "O-BiCl₂" na posição C-1 do intermediário **4.5**, com conseqüente regeneração com catalisador BiCl₃ e formação de um hemiacetal na mesma posição, permitindo a obtenção do derivado semissintético vernomargolídeo hemiacetálico **14**.

O derivado **14**, por sua vez, sofreu uma segunda desacetilação na posição C-10 mediada por nova molécula de Bi(OAc)Cl₂, promovendo a perda de Ac₂O e formação do grupamento "O-BiCl₂" na mesma posição (C-10) no intermediário **14.2**. Em seguida, o grupo hidroxil da porção hemiacetal em C-1 do intermediário **14.2** atacou a molécula de acetona, a qual foi obtida da dissociação do β-ceto-ácido gerado a partir da desacetilação do β-ceto-éster (gerado anteriormente nas etapas iniciais da reação) em presença de HCl. O novo condensado intermediário (**14.3**) formado passou por mais um rearranjo com a eliminação de um molécula de Bi(OH)Cl₂ e a formação de um grupamento acetonida em C-1/C-10, correspondendo ao derivado semissintético **13**. A presença com do Ac₂O na reação catalisada por BiCl₃ provavelmente confere à reação um pH baixo (ácido), justificando a formação deste produto via um processo termodinâmico. A formação do anel dimetildioxolano já foi reportado previamente em condições de reações similares com ácidos de Lewis em presença de acetona (SOLLADIÉ-CAVALLO et al., 2006; KARAMÉ et al., 2011; DAUGEY et al., 2018).

Os dados de RMN ¹H e RMN ¹³C observados para o derivado **13** foram comparados com dados relatados na literatura para estrutura similar, cujas informações estão compiladas na Tabela 26, auxiliando na confirmação da formação do derivado de LS.

Tabela 26 – Dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C para o derivado semissintético (**13**) do glaucolídeo B (**4**) e dados comparativos da literatura.

Posição	(13)		(RODRÍGUEZ-HAHN et al., 1988) ^a	
	δ ^1H mult. (J Hz)	δ ^{13}C	δ ^1H mult. (J Hz)	δ ^{13}C
1	-	111,0	-	104,8
2	3,00 <i>d</i> (4,6)	43,2	2,87 <i>d</i> (4,0)	44,6
3a	2,32 <i>dd</i> (12,8; 4,6)	35,4	2,63 <i>dd</i> (12,2; 4,0)	36,5
3b	1,79 <i>d</i> (12,8)		1,67 <i>d</i> (12,2)	
4	-	82,3	-	83,0
5	4,75 <i>d</i> (6,0)	79,4	4,90 <i>d</i> (5,0)	80,3
6	4,32 <i>d</i> (6,0)	81,7	4,37 <i>d</i> (5,0)	84,2
7	-	49,4	-	50,8
8	4,74 <i>dd</i> (4,2; 2,3)	69,4	4,82 <i>t</i> (3,0)	70,0
9a	2,56 <i>dd</i> (17,0; 2,3)	35,5	3,30 <i>dd</i> (17,2; 3,0)	31,0
9b	1,97 <i>dd</i> (17,0; 4,2)		2,11 <i>dd</i> (17,2; 3,0)	
10	-	76,4	-	81,5
11	-	136,8	-	136,8
12	-	168,0	-	167,7
13a	6,46 <i>s</i>	125,1	6,47 <i>s</i>	125,5
13b	5,66 <i>s</i>		5,68 <i>s</i>	
14	1,41 <i>s</i>	25,5	1,67 <i>s</i>	22,6
15	1,29 <i>s</i>	21,0	1,32 <i>s</i>	21,9
1'	-	169,8	-	165,5
2'	2,16 <i>s</i>	20,8	-	136,4
3'a	-	-	6,07 <i>m</i>	126,0
3'b	-	-	5,63 <i>m</i>	
4'	-	-	1,92 <i>m</i>	18,3
1''	-	169,4	-	169,9
2''	2,03 <i>s</i>	20,7	2,17 <i>s</i>	19,3
1'''	-	-	-	169,9
2'''	-	106,1	1,98 <i>s</i>	20,7
3'''	-	-	-	-
4'''	1,52 <i>s</i>	29,4	-	-
5'''	1,45 <i>s</i>	28,8	-	-

(300 MHz ^1H , 75 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 295 K) (80 MHz ^1H , 20 MHz ^{13}C , CDCl_3 , temperatura não indicada)

^a, devido ao fato de não terem sido encontrados relatos na literatura para o derivado **13**, este foi comparado ao análogo C-8 metacrilóiloxi, hidroxilado em C-1 e acetilado em C-10, cujas diferenças na comparação com **13** se dá pelo substituinte éster em C-8 (com um metacrilóiloxi em vez do acetoxi em **13**) além da ausência do grupo C-1/C-10 acetonida de **13**.

Uma das variações mais contundentes observada nos dados de RMN ^1H (Figura 93) e bidimensionais (HSQC e HMBC, Figuras 94 e 95) do derivado **13** em comparação com o material de partida (**4**) (para maiores detalhes vide *item 5.6.1.4*) foi evidenciada pelas correlações entre o hidrogênio agora metínico δ 3,00 *d* (1H; $J=4,6$; H-2) na posição C-2 (δ 43,2) com os carbonos oximetínicos em C-6 (δ 81,7) e C-7 (δ 69,4) e quaternário em C-7 (δ 49,4), que sugeriram a formação de uma decalina em C-2/C-7.

Figura 93 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , 295 K) para o derivado semissintético (**13**) do glaucolídeo B (**4**).

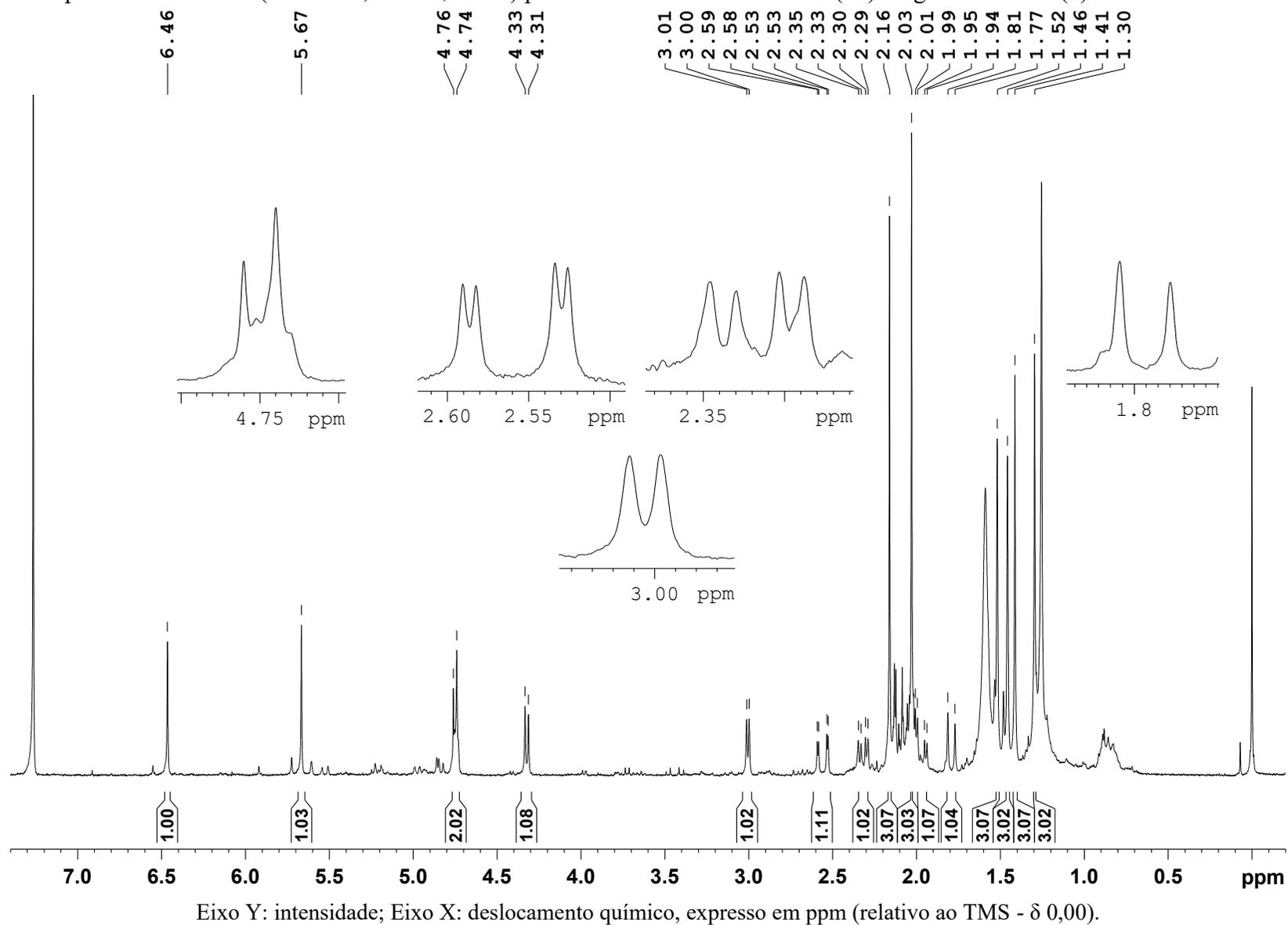
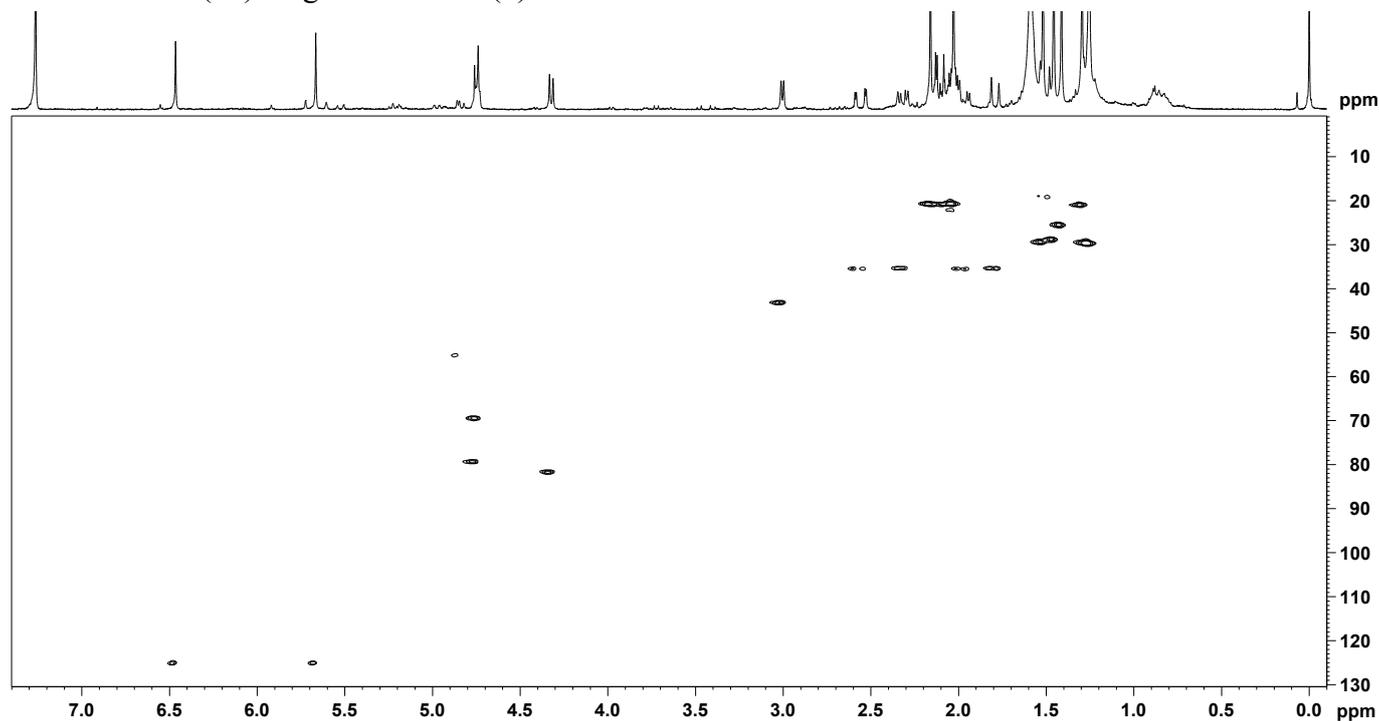
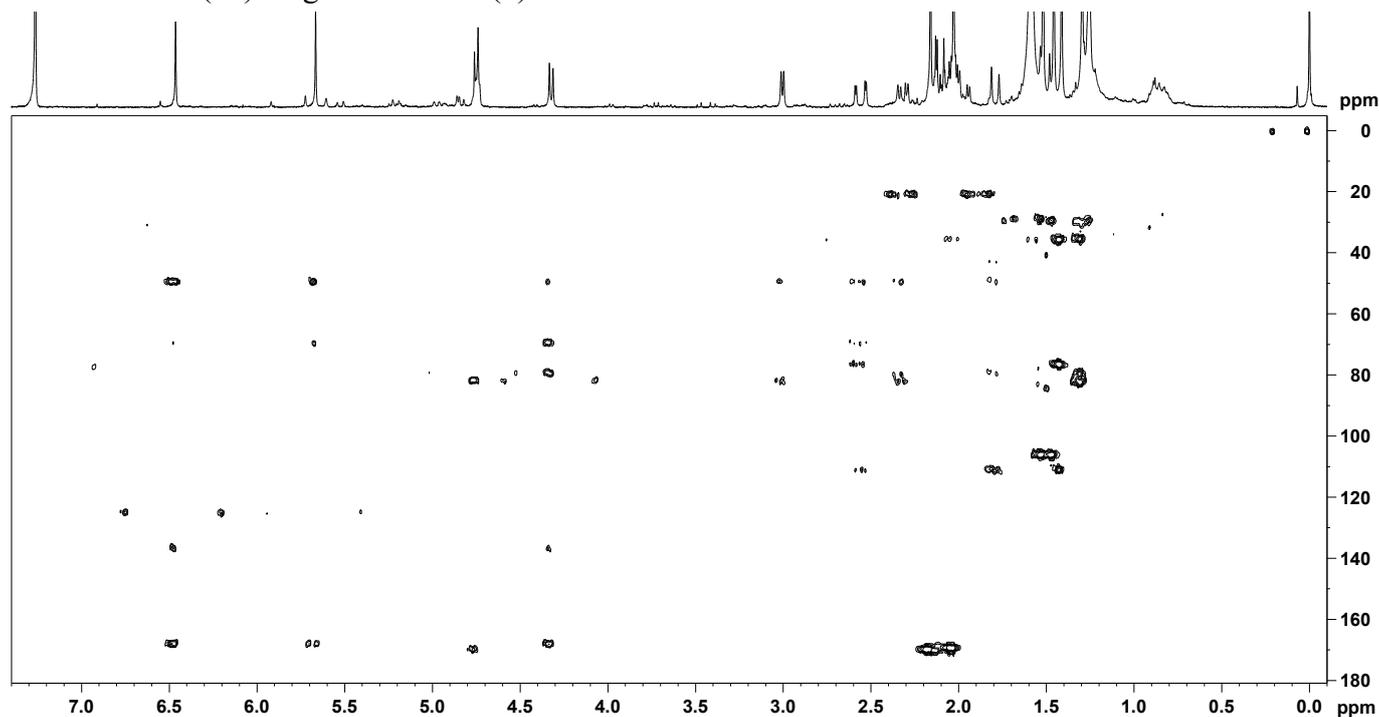


Figura 94 – Mapa de correlação HSQC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 295 K) para o derivado semissintético (**13**) do glaucolídeo B (**4**).



Eixo Y: projeção para ^{13}C , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00); Eixo X: deslocamento químico ^1H , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00).

Figura 95 – Mapa de correlação HMBC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 295 K) para o derivado semissintético (**13**) do glaucolídeo B (**4**).



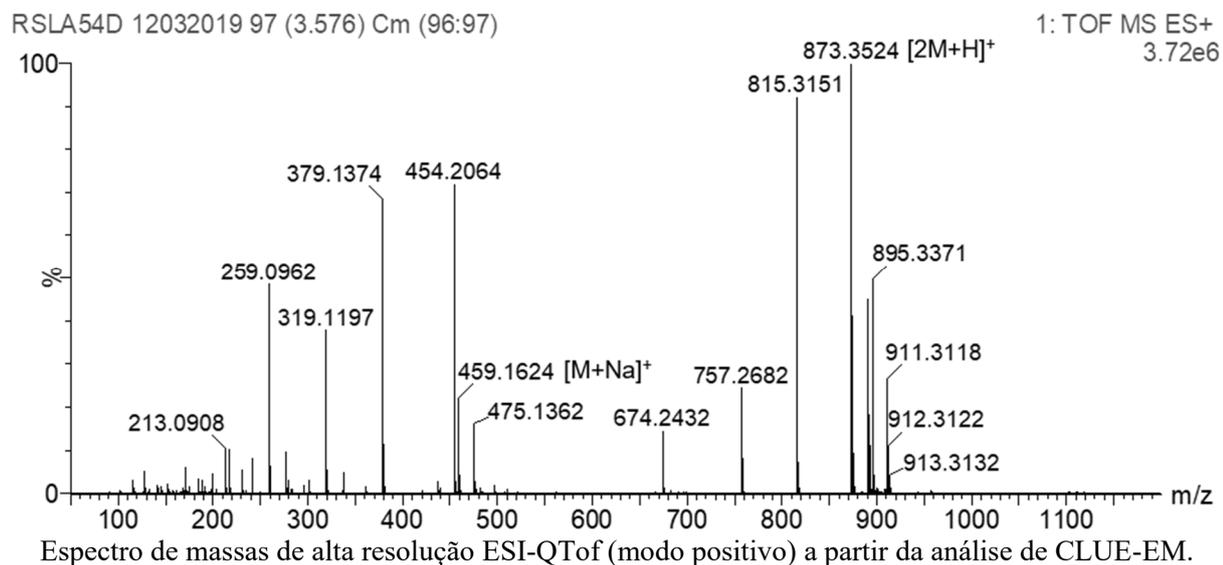
Eixo Y: projeção para ^{13}C , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00); Eixo X: deslocamento químico ^1H , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00).

Somadas à estas, as correlações entre o hidrogênio em C-2 e os hidrogênios metilênicos δ 2,32 *dd* (1H, $J=12,8$; 4,6 Hz, H-3a) e δ 1,79 *d* (1H, $J=12,8$ Hz, H-3b) do carbono em C-3 (δ 35,4) com os carbonos oxigenados em δ 82,3 (C-4) e δ 111,0 (C-1) – este último indicando uma função acetálica, indicaram a presença de um anel tetrahydrofurano em C-1/C-4. Esses achados associados corroboraram com a hipótese de obtenção do núcleo de LS do tipo vernomargolídeo acetálico (RODRÍGUEZ-HAHN et al., 1988).

Adicionalmente, identificou-se a presença do anel γ -lactônico em C-6/C-7 contendo uma α,β -insaturação exocíclica (C-11/C-13) pela correlação entre os hidrogênios metilênicos δ 6,46 *s* (1H, H-13a) e δ 5,66 (1H, H-13b) com os carbonos ressonando em 49,4 ppm (C-7), 136,8 ppm (C-11) e 168,0 ppm (C-12). Além do substituinte acetoxi na posição C-8 (δ 69,4), evidenciado pelos hidrogênios simpleto δ 2,16 (3H, H-2'), observou-se um segundo grupo acetálico (contendo hidrogênios δ 2,03 *s* [3H, H-2'']) ligado à posição C-5 (δ 79,4), confirmado a partir da correlação do hidrogênio oximetínico δ 4,90 *d* (1H, $J=6,0$ Hz, H-5) em C-5 com o carbono carbonílico de C-1'' (δ 169,4). A existência do anel acetona no derivado **13** foi ratificada pela correlação dos hidrogênios de metilas em δ 1,52 *s* (3H, H-4''') e δ 1,45 *s* (3H, H-5''') com o carbono em δ 106,1 (C-2'''). A posição do grupo dimetildioxolano em C-1/C-10 foi estabelecida em função da correlação entre os hidrogênios da metila em C-5''' (δ 28,8) com o carbono acetálico em C-1.

A análise de ESI-QToF EM confirmou a proposta estrutural para o derivado semissintético **13** pela presença do íon molecular na forma de aduto de sódio m/z 459,1624 [$C_{22}H_{28}O_9+Na$]⁺ (calculado 459,1631) no espectro de EM *full scan* (Figura 96), além do pico base na forma de dímero adutado com hidrogênio m/z 873,3524 [$2M+H$]⁺ (calculado 873,3545).

Figura 96 – Espectro ESI-QToF EM *full scan* (100-1200 Da) para o derivado semissintético **13**.

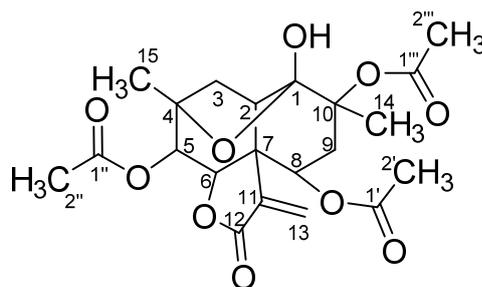


O derivado semissintético **13** correspondeu à LS vernomargolídeo 1(10)-acetonida-5,8-diacetoxi-2-epi-vernomargolídeo-1(4)-ciclohemiacetal (Figura 92), com fórmula molecular $C_{22}H_{28}O_9$. A subclasse de LS do tipo vernomargolídeo contendo funções hemiacetálicas na posição C-1 e variados substituintes éster já foi anteriormente reportada para espécies da tribo Vernonieae (JAKUPOVIC et al., 1986a; ALARCON; LOPES; HERZ, 1990; LOPES, 1991). Ainda, a obtenção de derivados de LS com esse tipo de esqueleto carbocíclico já foi descrita a partir de reações de ciclização transanular com LS do tipo glaucolídeo (RODRÍGUEZ-HAHN et al., 1988).

Todavia, essa é a primeira vez que composto **13** está sendo relatado na literatura.

5.6.2.4 Derivado (**14**): 5,8,10-triacetoxi-2-epi-vernomargolídeo-1(4)-ciclohemiacetal

Figura 97 – Estrutura molecular do derivado semissintético (**14**) do glaucolídeo B (**4**).



Fonte: adaptado de Rodríguez-Hahn e colaboradores (1988).

Como observado no Esquema 25 e descrito anteriormente, a produção do derivado semissintético **14** foi baseada na abertura do anel oxirano em C-4/C-5 do glaucolídeo B (**4**) pelo acetoxicloreto de bismuto, seguido da ciclização transanular decorrente da desprotonação do intermediário **4.4** e posterior regeneração do catalisador $BiCl_3$ em presença de HCl com formação da estrutura decalina (C-2/C-7), correspondente ao 5,8,10-triacetoxi-vernomargolídeo (**14**) de interesse.

Os dados observados de RMN 1H e RMN ^{13}C para o derivado **14** foram comparados com dados disponíveis na literatura e as informações foram compiladas na Tabela 27. A partir dos dados de RMN 1H (Figura 98) e bidimensionais (HSQC e HMBC, Figuras 99 e 100) do derivado **14** foi possível confirmar a formação do núcleo vernomargolídeo hemiacetálico, assim como observado e abordado anteriormente para o derivado semissintético análogo **13** (para maiores detalhes vide *item 5.6.2.3*). Contudo, identificou-se uma diferença fundamental na comparação dos dados espectroscópicos de RMN do derivado **14** em relação à seu análogo **13**, referindo-se nesse caso à ausência da porção acetonida entre as posições C-1/C-10.

Tabela 27 – Dados de RMN ¹H e RMN ¹³C para o derivado semissintético (**14**) do glaucolídeo B (**4**) e dados comparativos da literatura.

Posição	(14)		(RODRÍGUEZ-HAHN et al., 1988) ^a	
	δ ¹ H mult. (J Hz)	δ ¹³ C	δ ¹ H mult. (J Hz)	δ ¹³ C
1	-	104,6	-	104,8
2	2,80 <i>d</i> (4,2)	44,5	2,87 <i>d</i> (4,0)	44,6
3a	2,62 <i>dd</i> (12,7; 4,2)	36,2	2,63 <i>dd</i> (12,2; 4,0)	36,5
3b	1,63 <i>d</i> (12,7)		1,67 <i>d</i> (12,2)	
4	-	83,3	-	83,0
5	4,90 <i>d</i> (5,4)	80,0	4,90 <i>d</i> (5,0)	80,3
6	4,36 <i>d</i> (5,4)	84,0	4,37 <i>d</i> (5,0)	84,2
7	-	50,4	-	50,8
8	4,84 <i>dd</i> (3,2; 2,8)	69,3	4,82 <i>t</i> (3,0)	70,0
9a	3,26 <i>dd</i> (16,8; 2,8)	30,4	3,30 <i>dd</i> (17,2; 3,0)	31,0
9b	2,09 <i>dd</i> (16,8; 3,2)		2,11 <i>dd</i> (17,2; 3,0)	
10	-	81,3	-	81,5
11	-	136,8	-	136,8
12	-	167,8	-	167,7
13a	6,46 <i>s</i>	125,5	6,47 <i>s</i>	125,5
13b	5,66 <i>s</i>		5,68 <i>s</i>	
14	1,66 <i>s</i>	19,1	1,67 <i>s</i>	22,6
15	1,32 <i>s</i>	22,0	1,32 <i>s</i>	21,9
OH-1	3,09 <i>sl</i>	-	-	-
1'	-	168,8	-	165,5
2'	1,99 <i>s</i>	20,6	-	136,4
3'a	-	-	6,07 <i>m</i>	126,0
3'b	-	-	5,63 <i>m</i>	
4'	-	-	1,92 <i>m</i>	18,3
1''	-	169,9	-	169,9
2''	2,17 <i>s</i>	20,8	2,17 <i>s</i>	19,3
1'''	-	169,6	-	169,9
2'''	2,08 <i>s</i>	22,7	1,98 <i>s</i>	20,7

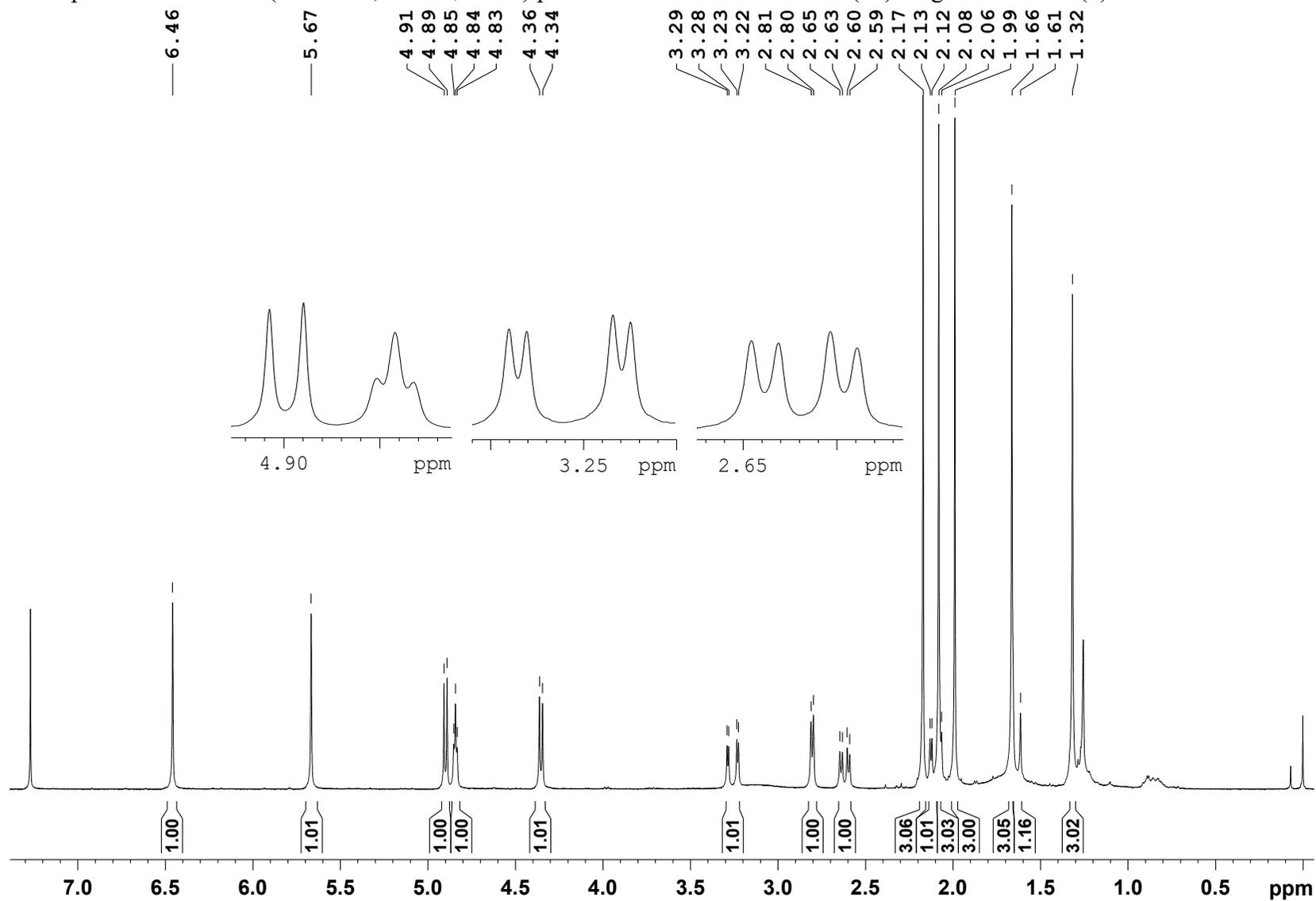
(300 MHz ¹H, 75 MHz ¹³C, CDCl₃, 295 K) (80 MHz ¹H, 20 MHz ¹³C, CDCl₃, temperatura não indicada)

^a, devido ao fato de não terem sido encontrados relatos na literatura para o derivado **14**, este foi comparado ao análogo C-8 metacrilóiloxi, cuja diferença na comparação com **14** se dá apenas pelo substituinte éster em C-8 (com um metacrilóiloxi em vez do acetoxi em **14**).

Em vez disso, os sinais dos hidrogênios acetílicos δ 2,08 *s* (3H, H-2''') e da carbonila em δ 169,6 (C-1''') indicaram o substituinte acetoxi ligado na posição C-10 (δ 81,3), bem como o hidrogênio δ 3,09 *sl* confirmou a presença da hidroxila em C-1 (δ 104,6), referente à função hemiacetálica nessa posição

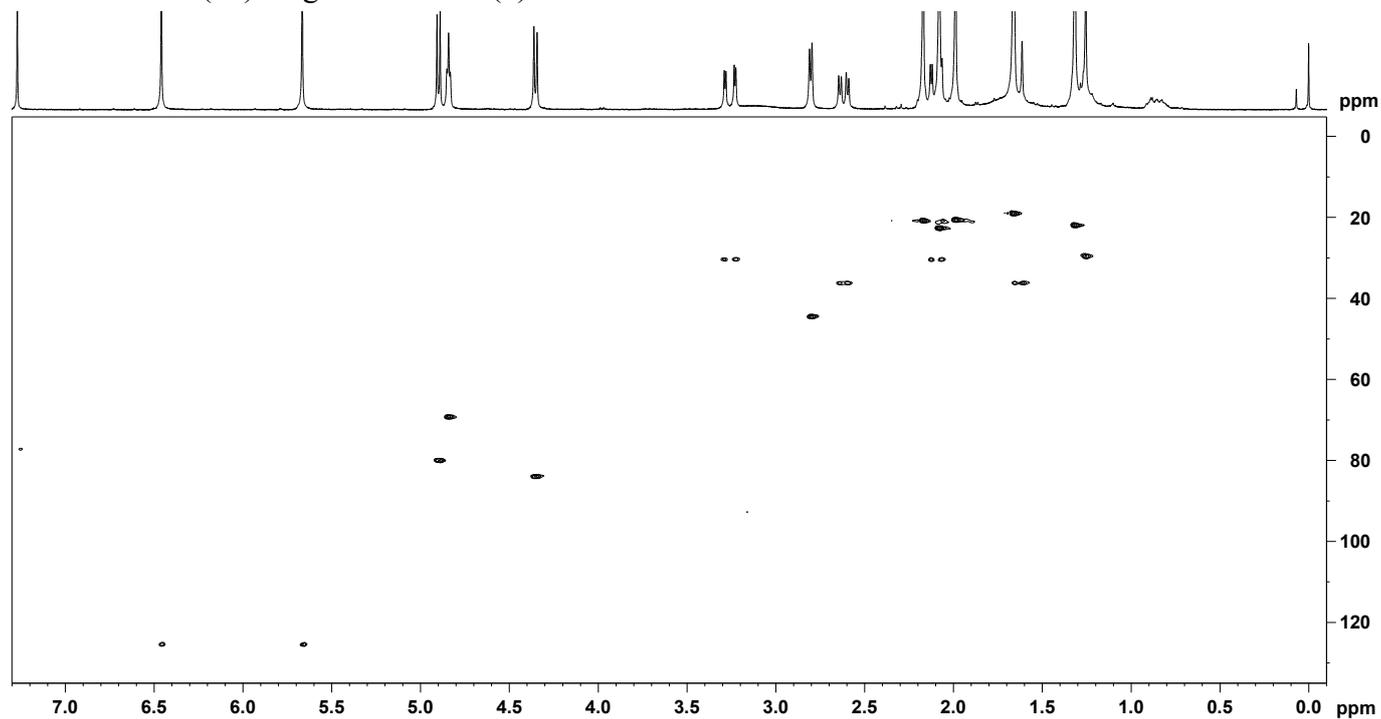
A análise de ESI-QToF EM confirmou a proposta estrutural para o derivado semissintético **14** pela presença no espectro de EM *full scan* (Figura 101) das espécies iônicas na forma de aduto com sódio *m/z* 461,1409 [C₂₁H₂₆O₁₀+Na]⁺ (calculado 461,1424) e na forma protonada com perda de água por ionização na fonte (perfil já abordado na caracterização de outras LS) *m/z* 421,1526 [C₂₁H₂₆O₁₀+H-H₂O]⁺ (calculado 421,1499).

Figura 98 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , 295 K) para o derivado semissintético (**14**) do glaucolídeo B (**4**).



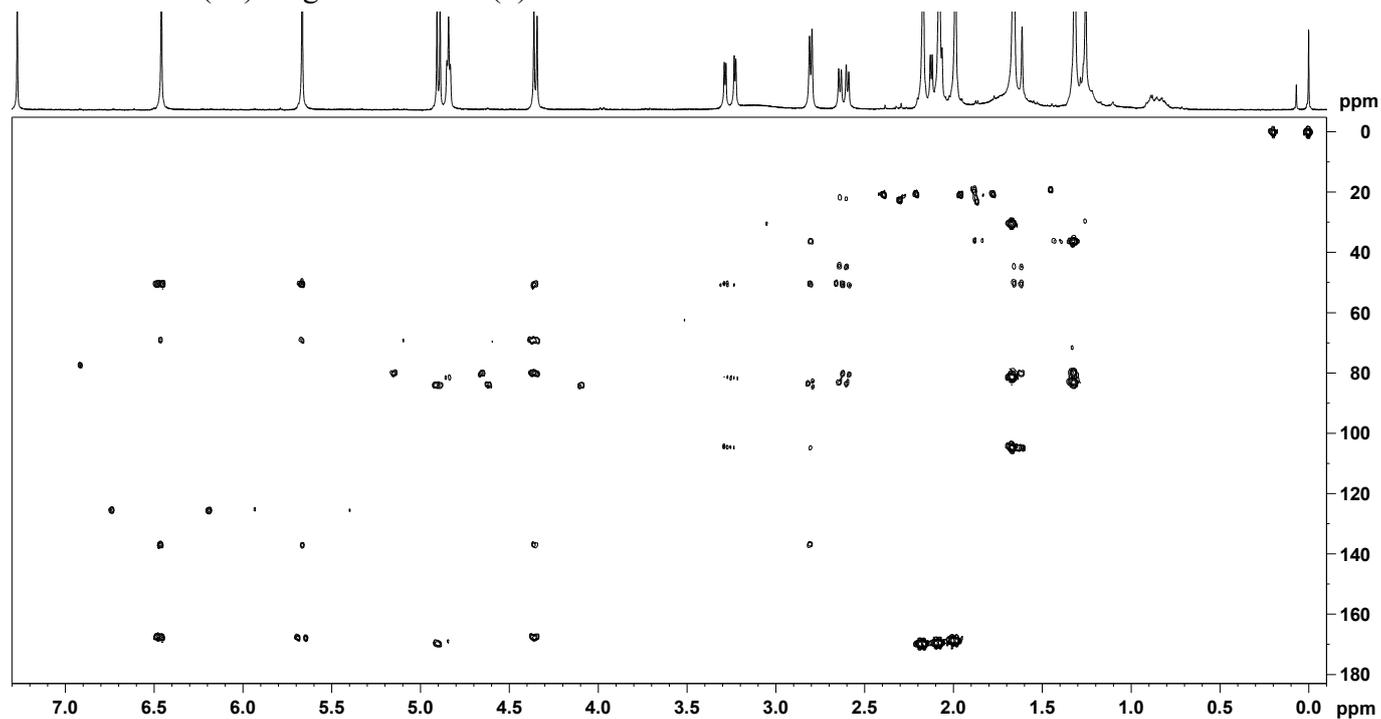
Eixo Y: intensidade; Eixo X: deslocamento químico, expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00).

Figura 99 – Mapa de correlação HSQC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 295 K) para o derivado semissintético (14) do glaucolídeo B (4).



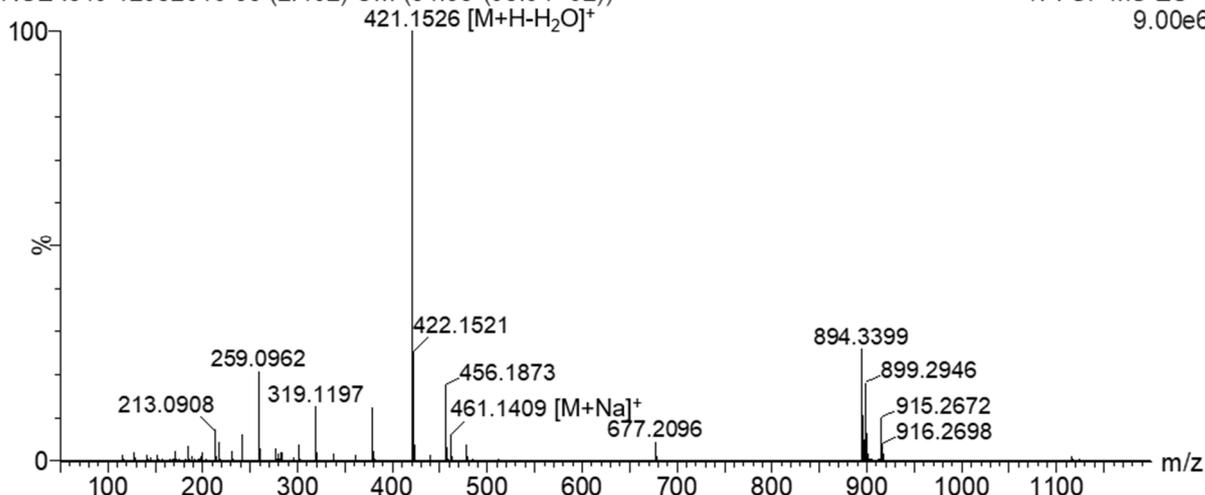
Eixo Y: projeção para ^{13}C , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00); Eixo X: deslocamento químico ^1H , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00).

Figura 100 – Mapa de correlação HMBC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 295 K) para o derivado semissintético (14) do glaucolídeo B (4).



Eixo Y: projeção para ^{13}C , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00); Eixo X: deslocamento químico ^1H , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00).

Figura 101 – Espectro ESI-QToF EM *full scan* (100-1200 Da) para o derivado semissintético **14**.
RSLA54J 12032019 65 (2.402) Cm (64:68-(93:94+92))

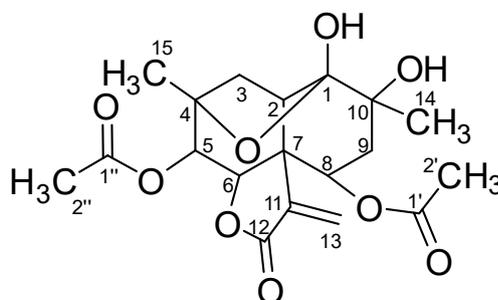


O derivado semissintético **14** correspondeu à LS vernomargolídeo 5,8,10-triacetoxi-2-epi-vernomargolídeo-1(4)-ciclohemiacetal (Figura 97), cuja fórmula molecular é $C_{21}H_{26}O_{10}$. Rodríguez-Hahn e colaboradores (1988) reportaram a obtenção de derivados vernomargolídeo hemiacetálicos, contendo diferentes substituintes éster, a partir de reações de ciclização transanular com LS do tipo glaucolídeo.

Em termos quimiotaxonômicos, essa subclasse de LS também já foi previamente obtida de espécies de Vernoniae (JAKUPOVIC et al., 1986a; ALARCON; LOPES; HERZ, 1990; LOPES, 1991). Entretanto, essa é a primeira vez que composto **14** está sendo descrito na literatura.

5.6.2.5 Derivado (**15**): 5,8-diacetoxi-2-epi-vernomargolídeo-1(4)-ciclohemiacetal

Figura 102 – Estrutura molecular do derivado semissintético (**15**) do glaucolídeo B (**4**).



Fonte: adaptado de Rodríguez-Hahn e colaboradores (1988).

A produção do derivado semissintético **15** se deu conforme descrito no Esquema 25, a partir da liberação de uma molécula de $Bi(OH)Cl_2$ do intermediário **14.2** (o qual foi obtido

como produto da desacetilação na posição C-10 do derivado **14**) durante o processo de tratamento da reação (*work up*) em presença de água (KERAMANE; BOYER; ROQUE, 2001; SALVADOR; SILVESTRE; PINTO, 2011).

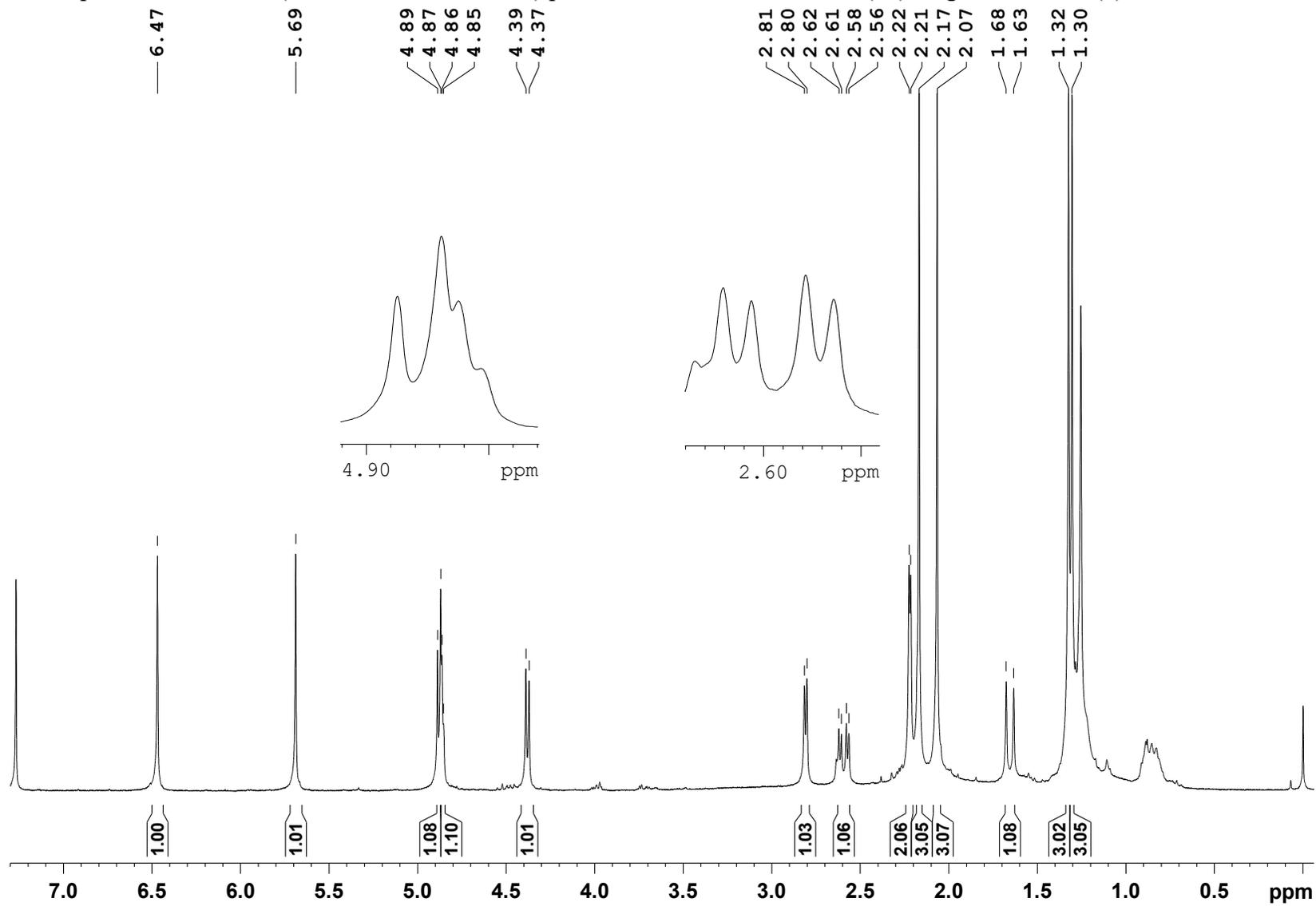
Assim como identificado para os derivados **13** e **14** (para maiores detalhes vide *itens 5.6.2.3 e 5.6.2.4*), os dados de RMN ^1H (Figura 103) e bidimensionais (HSQC e HMBC, Figuras 104 e 105) para o derivado **15** comprovou a formação do núcleo vernomargolídeo hemiacetálico. Os dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C observados para o derivado **15** foram comparados com dados da literatura e as informações estão apresentadas na Tabela 28.

Tabela 28 – Dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C para o derivado semissintético (**15**) do glaucolídeo B (**4**) e dados comparativos da literatura.

Posição	(15)		(RODRÍGUEZ-HAHN et al., 1988 ^a)	
	δ ^1H mult. (J Hz)	δ ^{13}C	δ ^1H mult. (J Hz)	δ ^{13}C
1	-	106,1	-	106,1
2	2,80 <i>d</i> (4,2)	43,8	2,83 <i>d</i> (4,0)	43,9
3a	2,59 <i>dd</i> (12,6; 4,2)	36,1	2,58 <i>dd</i> (12,2; 4,0)	36,4
3b	1,65 <i>d</i> (12,6)		1,65 <i>d</i> (12,2)	
4	-	83,2	-	82,7
5	4,88 <i>d</i> (5,4)	80,0	4,85 <i>d</i> (5,0)	80,5
6	4,38 <i>d</i> (5,4)	83,4	4,37 <i>d</i> (5,0)	83,8
7	-	50,5	-	50,9
8	4,87 <i>dd</i> (3,2; 2,8)	70,4	4,91 <i>t</i> (3,0)	70,3
9a	2,225 <i>d</i> (3,0)	35,0	2,24 <i>d</i> (3,0)	35,3
9b	2,220 <i>d</i> (2,8)		2,24 <i>d</i> (3,0)	
10	-	71,4	-	70,5
11	-	136,8	-	137,1
12	-	167,6	-	168,1
13a	6,47 <i>s</i>	125,5	6,41 <i>s</i>	125,6
13b	5,68 <i>s</i>		5,61 <i>s</i>	
14	1,33 <i>s</i>	22,7	1,30 <i>s</i>	23,7
15	1,31 <i>s</i>	22,0	1,32 <i>s</i>	21,9
OH-1	3,20 <i>sl</i>	-	-	-
OH-10	1,60 <i>sl</i>	-	-	-
1'	-	168,6	-	165,8
2'	2,07 <i>s</i>	20,9	-	136,1
3'a	-	-	6,07 <i>m</i>	126,1
3'b	-	-	5,63 <i>m</i>	
4'	-	-	1,93 <i>m</i>	18,2
1''	-	169,7	-	169,9
2''	2,17 <i>s</i>	20,8	2,16 <i>s</i>	20,7
	(300 MHz ^1H , 75 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 295 K)		(80 MHz ^1H , 20 MHz ^{13}C , CDCl_3 , temperatura não indicada)	

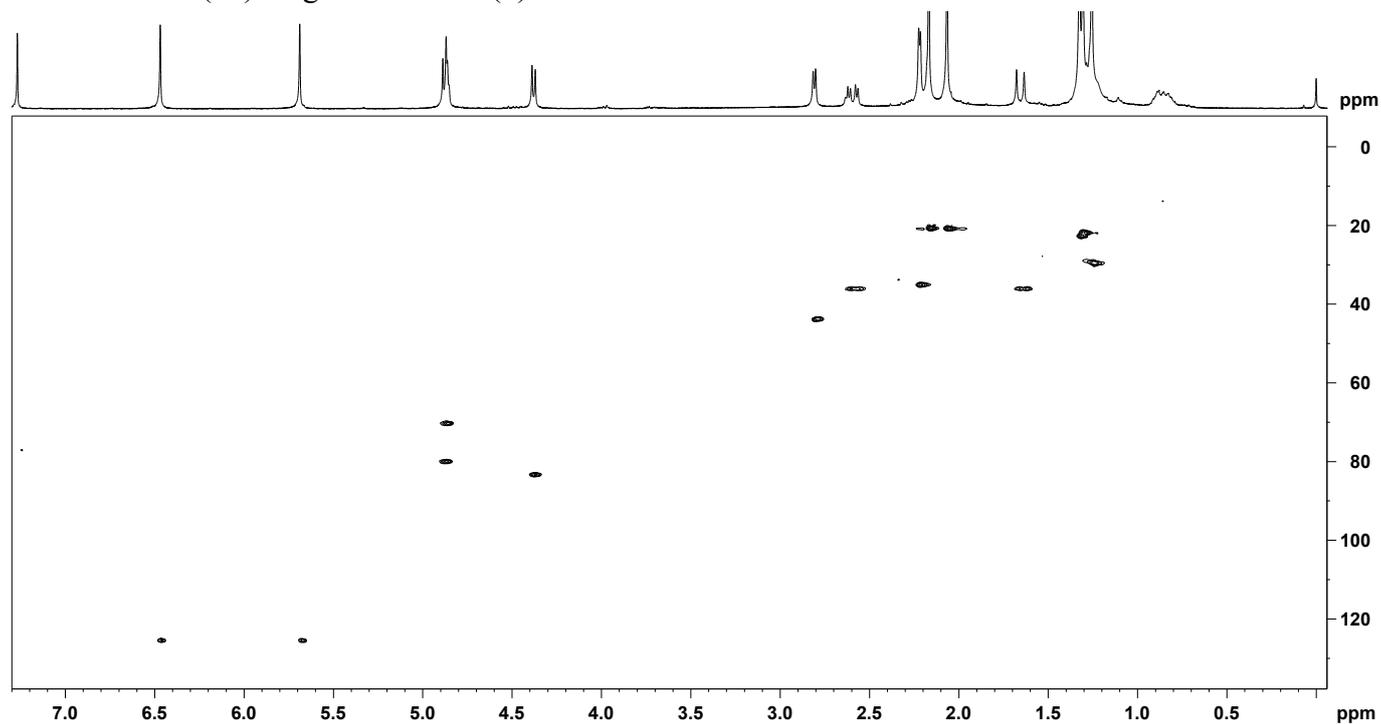
^a, devido ao fato de não terem sido encontrados relatos na literatura para o derivado **15**, este foi comparado ao análogo C-8 metacrilóiloxi, cuja diferença na comparação com **15** se dá apenas pelo substituinte éster em C-8 (com um metacrilóiloxi em vez do acetoxi em **15**).

Figura 103 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , 295 K) para o derivado semissintético (15) do glaucolídeo B (4).



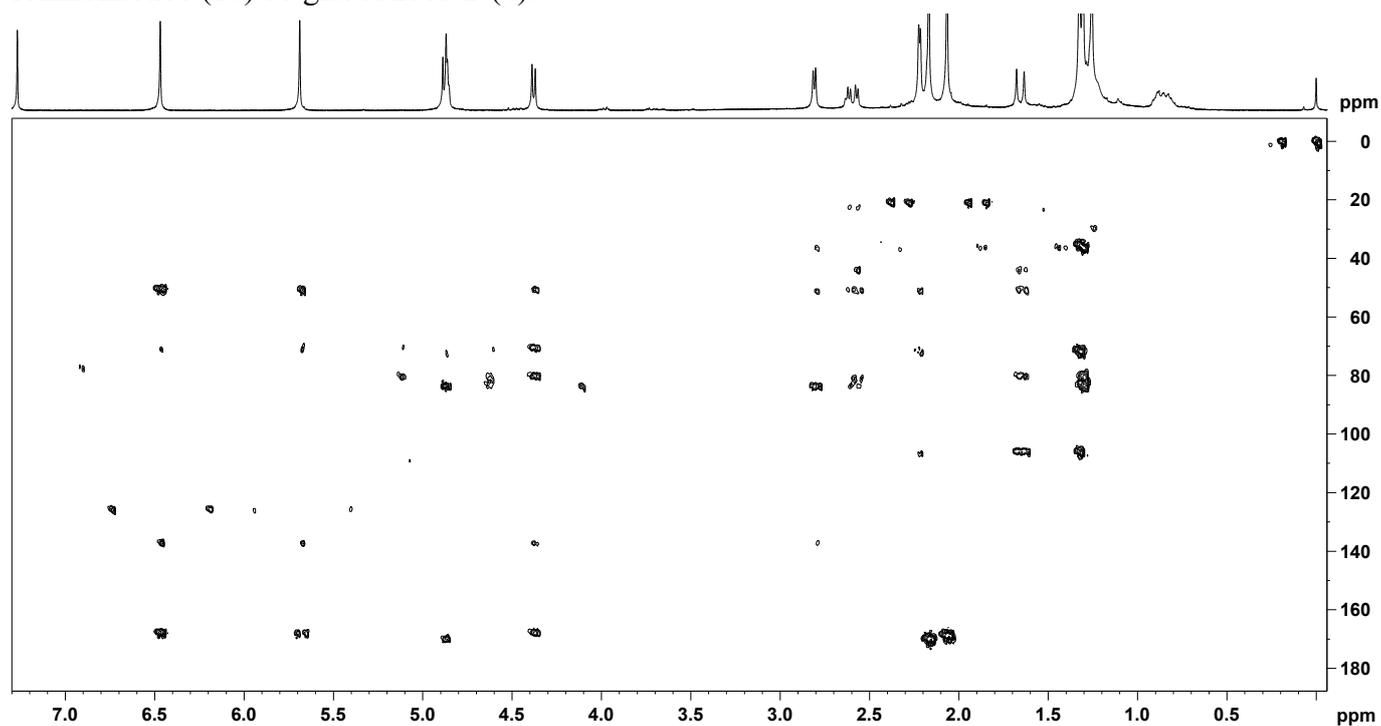
Eixo Y: intensidade; Eixo X: deslocamento químico, expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00).

Figura 104 – Mapa de correlação HSQC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 295 K) para o derivado semissintético (15) do glaucolídeo B (4).



Eixo Y: projeção para ^{13}C , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00); Eixo X: deslocamento químico ^1H , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00).

Figura 105 – Mapa de correlação HMBC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 295 K) para o derivado semissintético (15) do glaucolídeo B (4).

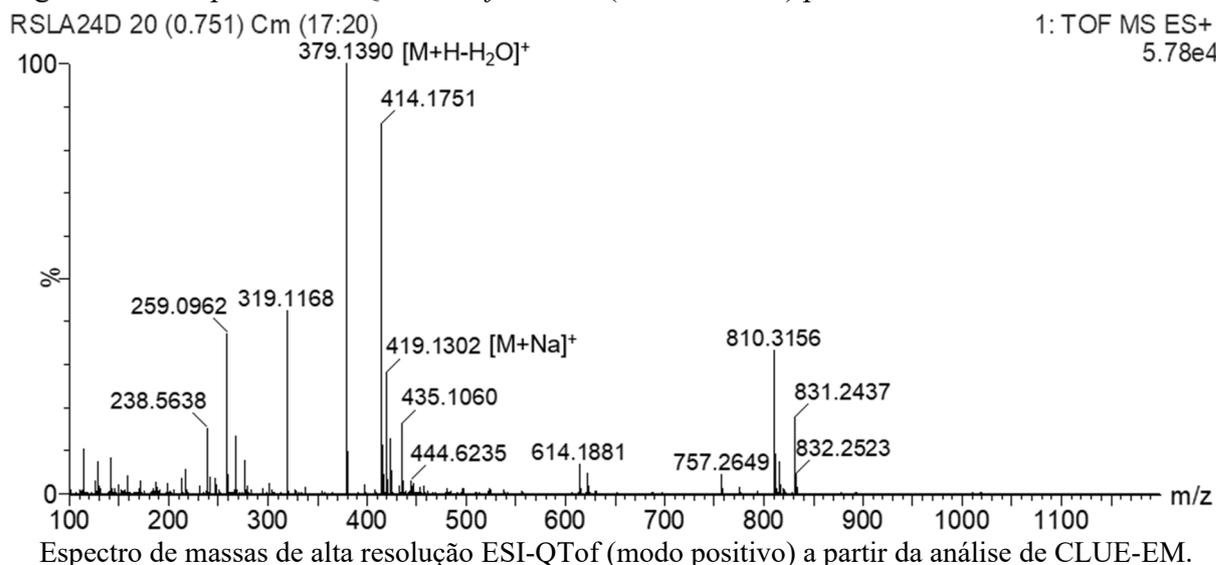


Eixo Y: projeção para ^{13}C , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00); Eixo X: deslocamento químico ^1H , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00).

Apesar das coincidências estruturais entre o derivado **15** e seu análogo **14**, a comparação dos dados de RMN de ambos os derivados evidenciou uma única diferença entre os mesmos, correspondendo à ausência do grupo acetoxi na posição C-10 do derivado **15**. Em vez disso, além do sinal de hidrogênio (δ 3,20 *sl*) da hidroxila acetálica em C-1, foi identificada também a presença de uma hidroxila na posição C-10, a qual foi caracterizada pelo sinal de hidrogênio na forma de simpleto largo em δ 1,60 (OH-10) em correlação com o carbono oximetínico em δ 71,4 (C-10).

A análise de ESI-QToF EM confirmou a proposta estrutural para o derivado semissintético **15** pela presença no espectro de EM *full scan* (Figura 106) das espécies iônicas na forma de aduto com sódio m/z 419,1302 [$C_{19}H_{24}O_9+Na$]⁺ (calculado 419,1318) e na forma protonada com perda de água por ionização na fonte m/z 379,1390 [$C_{19}H_{24}O_9+H-H_2O$]⁺ (calculado 379,1393).

Figura 106 – Espectro ESI-QToF EM *full scan* (100-1200 Da) para o derivado semissintético **15**.

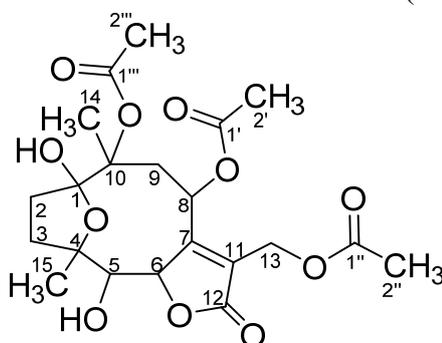


O derivado semissintético **15** correspondeu a LS vernomargolídeo 5,8-diacetoxi-2-epi-vernomargolídeo-1(4)-ciclohemiacetal (Figura 102), cuja fórmula molecular é $C_{19}H_{24}O_9$. Assim como para os derivados **13** e **14**, a base referencial que suporta a hipótese da estrutura proposta para este derivado semissintético está relacionada à produção de derivados vernomargolídeo hemiacetálicos a partir da semissíntese de LS (RODRÍGUEZ-HAHN et al., 1988), bem como o isolamento a partir de espécies de Vernoniae (JAKUPOVIC et al., 1986a; ALARCON; LOPES; HERZ, 1990; LOPES, 1991).

Da mesma forma, o composto **15** está sendo reportado pela primeira vez na literatura.

5.6.2.6 Derivado (**16**): 8,10,13-triacetoxi-1(4)-epoxi-1,5-dihidroxi-germacr-7(11)-en-6(12)-olídeo

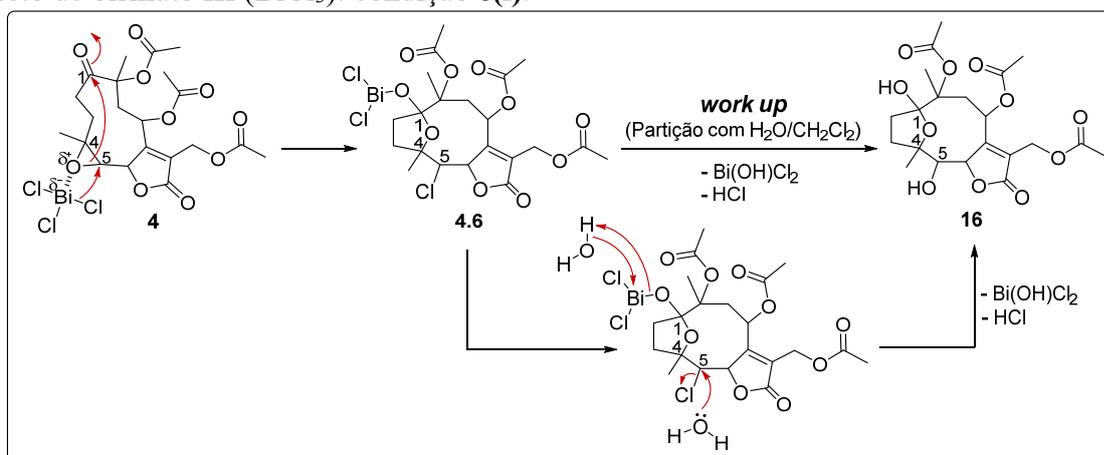
Figura 107 – Estrutura molecular do derivado semissintético (**16**) do glaucolídeo B (**4**).



Fonte: adaptado de Jimenez e colaboradores (1995).

A obtenção do derivado semissintético **16** a partir do glaucolídeo B (**4**) em presença somente de BiCl_3 também foi dependente da abertura do anel epóxido em C-4/C-5, conforme ilustrado no Esquema 26. Para tanto, mediada pela acidez do cloreto de bismuto (ácido de Lewis) em relação ao epóxido, o BiCl_3 interagiu com o oxigênio do grupo oxirano para formar um complexo ativado "O- BiCl_3 ", também em acordo com mecanismo similar ao proposto para a adição ao epóxido com BiCl_3 , levando à abertura do oxirano (SALVADOR; SILVESTRE; PINTO, 2011; ALAM; PARK, 2017). Neste mecanismo, um dos átomos de cloro do complexo "O- BiCl_3 " ataca o carbono menos substituído do epóxido (C-5), via adição nucleofílica.

Esquema 26 – Mecanismo de reação proposto para produção do derivado semissintético **16** com cloreto de bismuto III (BiCl_3): condição **c(i)**.



Condição reacional: (c) (i) BiCl_3 , DCM, Ar, rt, 3 h.

A abertura promoveu a formação de um intermediário (**4.6**) clorado em C-5 e o consequente rearranjo a partir da adição nucleofílica à carbonila em C-1. Essa etapa também

permitiu a formação de um anel oxolano em C-1/C-4 carregando uma função acetálica em C-1, o qual foi estabilizado pela espécie de bismuto remanescente da etapa de abertura do epóxido ("O-BiCl₂"). O intermediário **4.6** obtido, quando exposto à água durante o processo de tratamento da reação (*work up*), gerou em C-1 um hemiacetal com liberação de uma molécula de Bi(OH)Cl₂ (KERAMANE; BOYER; ROQUE, 2001; SALVADOR; SILVESTRE; PINTO, 2011). Da mesma maneira, o meio aquoso e acidificado também propiciou a formação de uma hidroxila em C-5 via substituição nucleofílica do halogênio e a formação do produto 5-hidroxi-hirsutinolídeo (**16**). A ausência do Ac₂O nessa condição reacional obviamente conferiu um pH pouco ácido à reação em comparação com a condição reacional precedente (condição **b**). Em consequência, o produto de adição com BiCl₃ foi obtido via um processo cinético.

Os dados de RMN ¹H e RMN ¹³C observados para o derivado **16** foram comparados com os dados descritos na literatura, e as informações estão apresentadas na Tabela 29.

Tabela 29 – Dados de RMN ¹H e RMN ¹³C para o derivado semissintético (**16**) do glaucolídeo B (**4**) e dados comparativos da literatura.

Posição	(16)		(JIMENEZ et al., 1995)	
	δ ¹ H mult. (J Hz)	δ ¹³ C	δ ¹ H mult. (J Hz)	δ ¹³ C
1	-	108,8	-	108,7
2a	2,08-2,18 <i>m</i>	33,9	2,11 <i>m</i>	34,6
2b	1,78-1,88 <i>m</i>		2,15 <i>m</i>	
3a	2,09-2,23 <i>m</i>	34,5	2,11 <i>m</i>	33,9
3b	2,09-2,23 <i>m</i>		1,81 <i>m</i>	
4	-	86,5	-	86,6
5	3,57 <i>d</i> (9,1)	75,9	3,52 <i>d</i> (9)	76,1
6	5,11 <i>d</i> (9,1)	82,0	5,08 <i>d</i> (9)	81,7
7	-	168,6	-	168,4
8	5,90 <i>dd</i> (3,5; 3,4)	68,4	5,87 <i>t</i> (3)	68,4
9a	2,58 <i>dd</i> (15,6; 3,5)	41,8	2,57 <i>dd</i> (12,3)	42,1
9b	2,15 <i>d</i> (15,6)		2,57 <i>dd</i> (12,3)	
10	-	87,0	-	87,0
11	-	123,1	-	123,2
12	-	171,2	-	170,7
13a	4,91 <i>d</i> (12,6)	55,7	4,89 <i>d</i> (16)	55,8
13b	4,74 <i>d</i> (12,6)		4,72 <i>d</i> (16)	
14	1,62 <i>s</i>	17,5	1,60 <i>s</i>	17,4
15	1,50 <i>s</i>	21,9	1,48 <i>s</i>	22,0
OH-1	4,30 <i>sl</i>	-	-	-
OH-5	3,27 <i>sl</i>	-	-	-
1'	-	169,7	-	169,7
2'	2,06 <i>s</i>	20,6	2,05 <i>s</i>	20,6
1''	-	170,3	-	170,3
2''	2,09 <i>s</i>	20,9	2,08 <i>s</i>	21,9
1'''	-	171,7	-	171,4
2'''	2,04 <i>s</i>	22,2	2,02 <i>s</i>	22,2
	(300 MHz ¹ H, 75 MHz ¹³ C, CDCl ₃ , 295 K)		(300 MHz ¹ H, 75 MHz ¹³ C, CDCl ₃ temperatura não indicada)	

A comparação entre os dados espectroscópicos de RMN ^1H (Figura 108) e bidimensionais (HSQC e HMBC, Figuras 109 e 110) do derivado **16** com o material de partida (**4**) (para maiores detalhes vide *item 5.6.1.4*), revelou a conversão do esqueleto carbocíclico, cujos sinais se mostraram muito similares aos observados para as LS do tipo hirsutinolídeo **1** e **3** abordadas anteriormente (para maiores detalhes vide *itens 5.6.1.1 e 5.6.1.3*).

Além dos sinais indicativos da presença do anel γ -lactona em C-6/C-7 contendo o substituinte acetoxi na posição C-13, identificou-se também o anel tetrahydrofurano em C-1/C-4 formado pelos carbonos oxigenados δ 86,5 (C-4) e δ 108,8 (C-1), corroborando com o núcleo hirsutinolídeo (KOTOWICZ et al., 1998).

A partir da análise de HMBC do derivado **16** foi possível corrigir as atribuições para os carbonos do anel tetrahydrofurano nas posições C-2 e C-3, definidas de forma inversa por Jimenez e colaboradores (1995).

Apesar das semelhanças, a comparação entre o derivado **16** e seu análogo hirsutinolídeo diacetilpiptocarfol (**3**) revelou a ausência da função olefínica em C-5/C-6 para o derivado **16**. Em seu lugar, foram observadas as presenças dos hidrogênios oximetínicos δ 3,57 *d* (1H, $J=9,1$ Hz, H-5) e δ 5,11 *d* (1H, $J=9,1$ Hz, H-6) nos respectivos carbonos C-5 (δ 75,9) e C-6 (δ 82,0), além de uma hidroxila na posição C-5, cujo hidrogênio ressonando em δ 3,27 *sl* (1H, H-5).

Ainda, foram mantidos os grupos acetoxi (δ 2,06 *s*, δ 2,04 *s* e δ 2,09 *s*) nas posições C-8 (δ 68,4), C-10 (δ 87,0) e C-13 (δ 55,7), cuja definição da disposição das acetila se deu pela correlação entre os respectivos hidrogênios oximetínicos em δ 5,90 e δ 4,75/ δ 4,92 das posições C-8 e C-13 com as carbonilas dos substituintes acetoxi correspondentes.

A análise de ESI-QToF EM confirmou a proposta estrutural para o derivado semissintético **16** pela presença no espectro de EM *full scan* (Figura 111) do íon molecular protonado m/z 457,1686 [$\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{O}_{11}+\text{H}$] $^+$ (calculado 457,1710), em acordo com o reportado na literatura para o deriva **16** (FLORES-GUZMÁN et al., 2019). Além disso, observou-se a presença do pico base na forma protonada com perda de água por ionização na fonte em m/z 439,1578 [$\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{O}_{11}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}$] $^+$ (calculado 439,1604), seguindo comportamento correspondente às LS do tipo hirsutinolídeo quando em presença de fase móvel aquosa acidificada, como abordado previamente.

O derivado semissintético **16** correspondeu à LS análogo hirsutinolídeo 8,10,13-triacetoxi-1(4)-epoxi-1,5-dihidroxigermacr-7(11)-en-6(12)-olídeo (Figura 107), cuja fórmula molecular é $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{O}_{11}$.

Figura 108 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , 295 K) para o derivado semissintético (**16**) do glaucolídeo B (**4**).

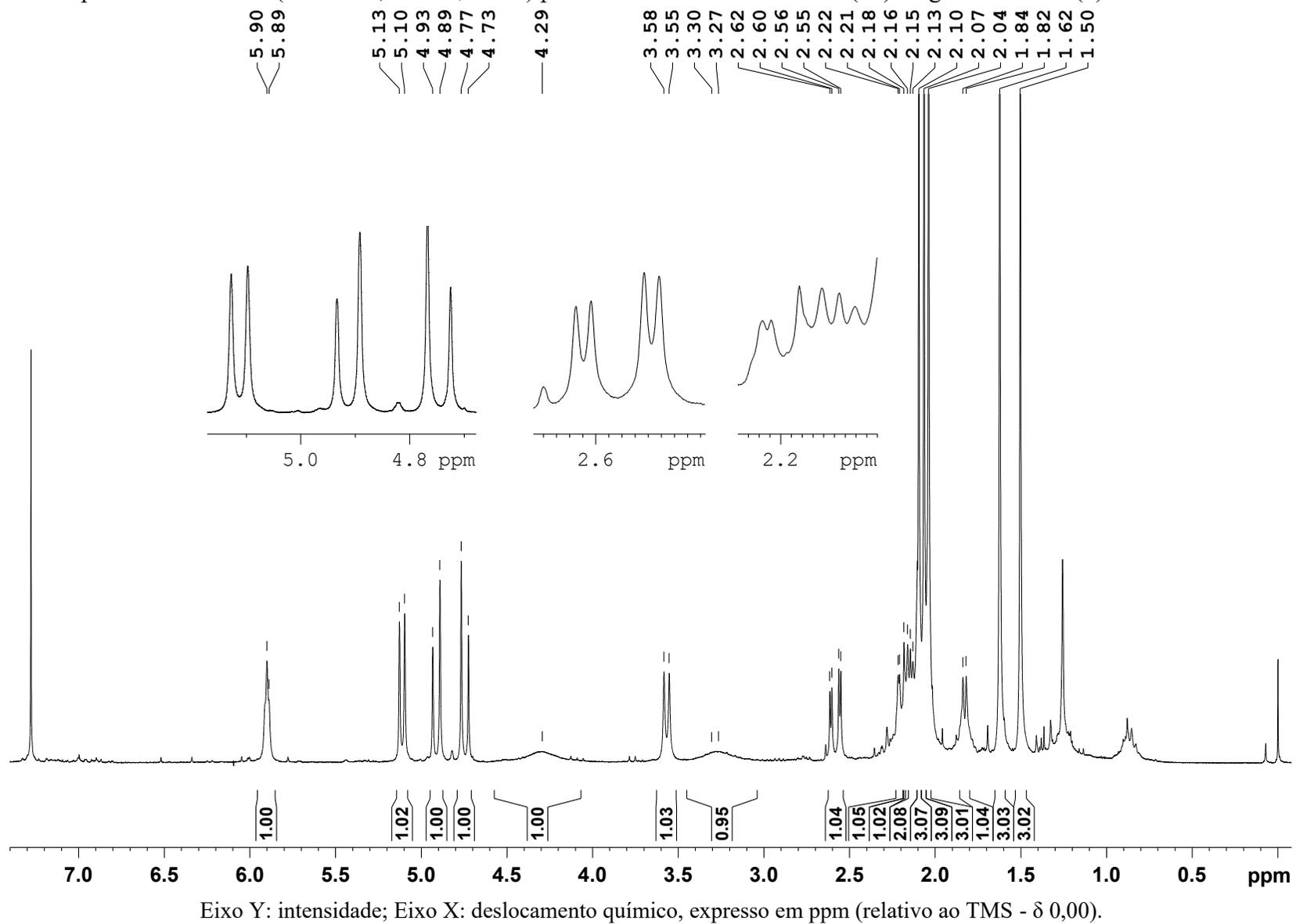
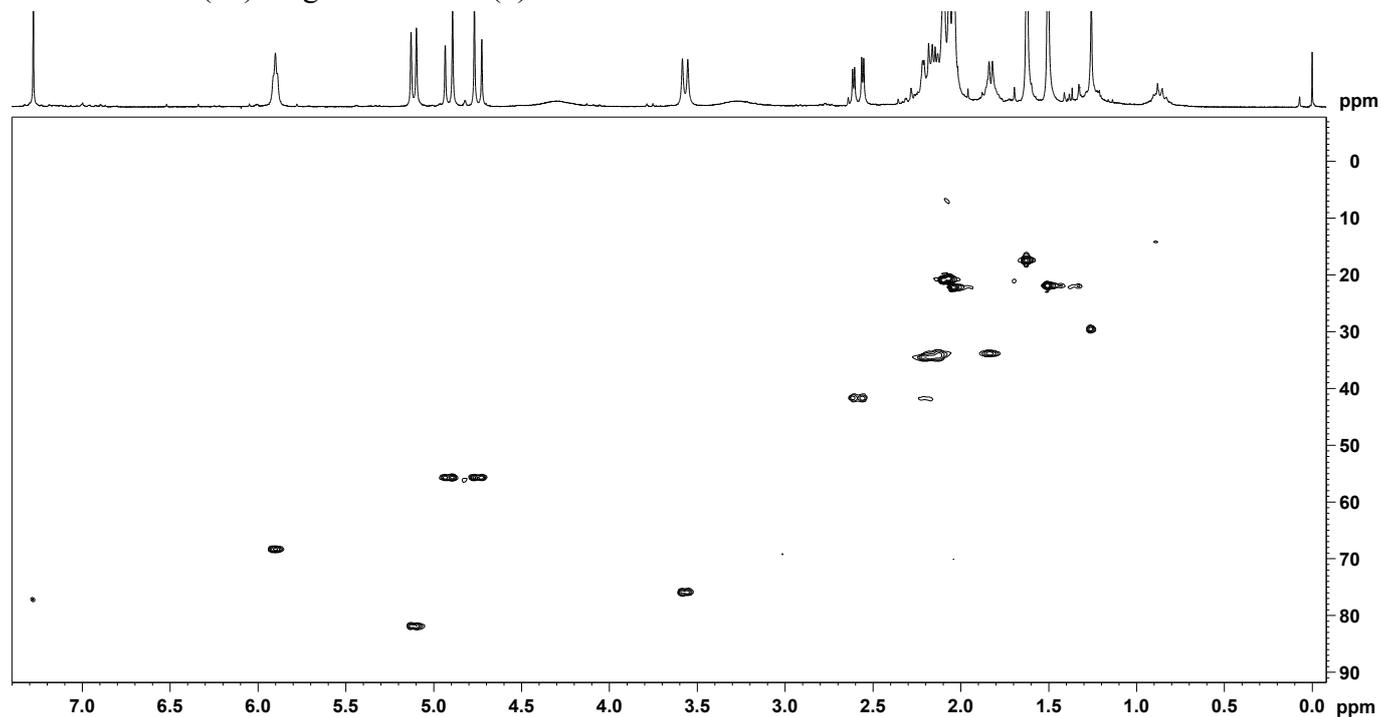
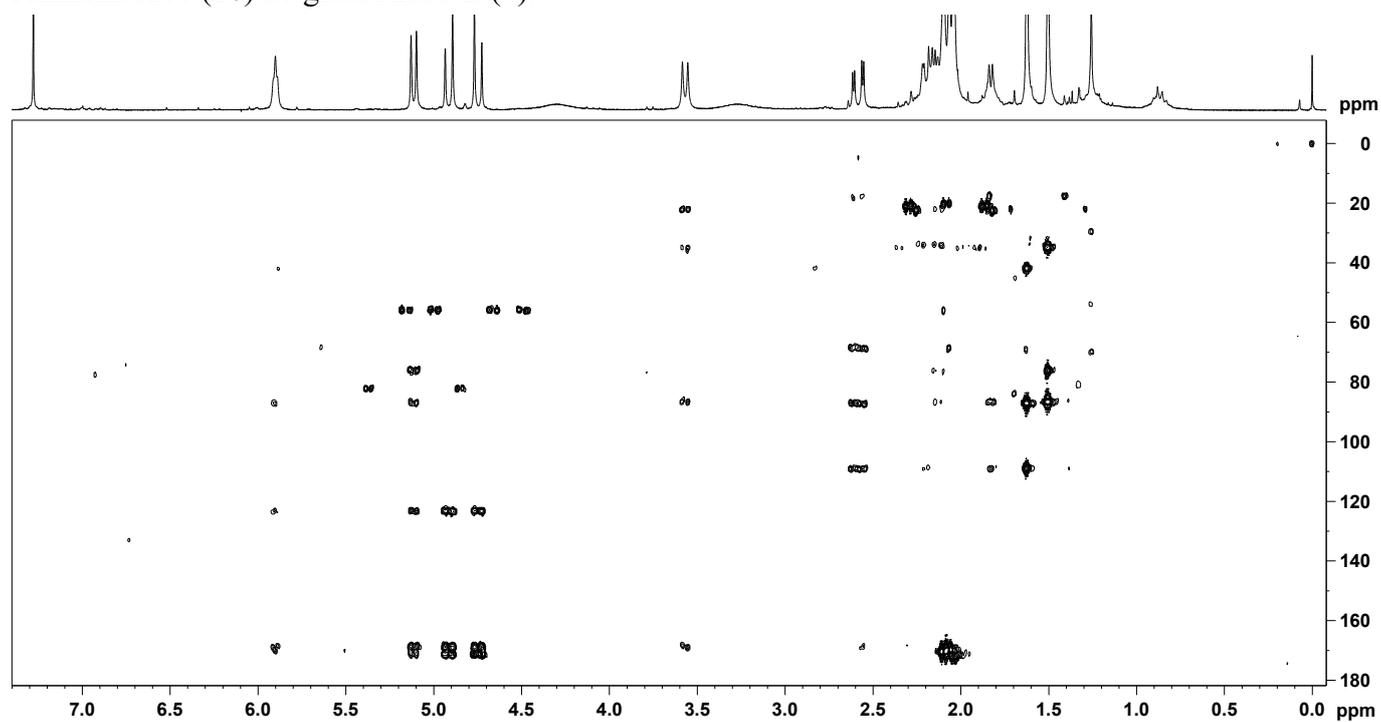


Figura 109 – Mapa de correlação HSQC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 295 K) para o derivado semissintético (**16**) do gaulcolídeo B (**4**).



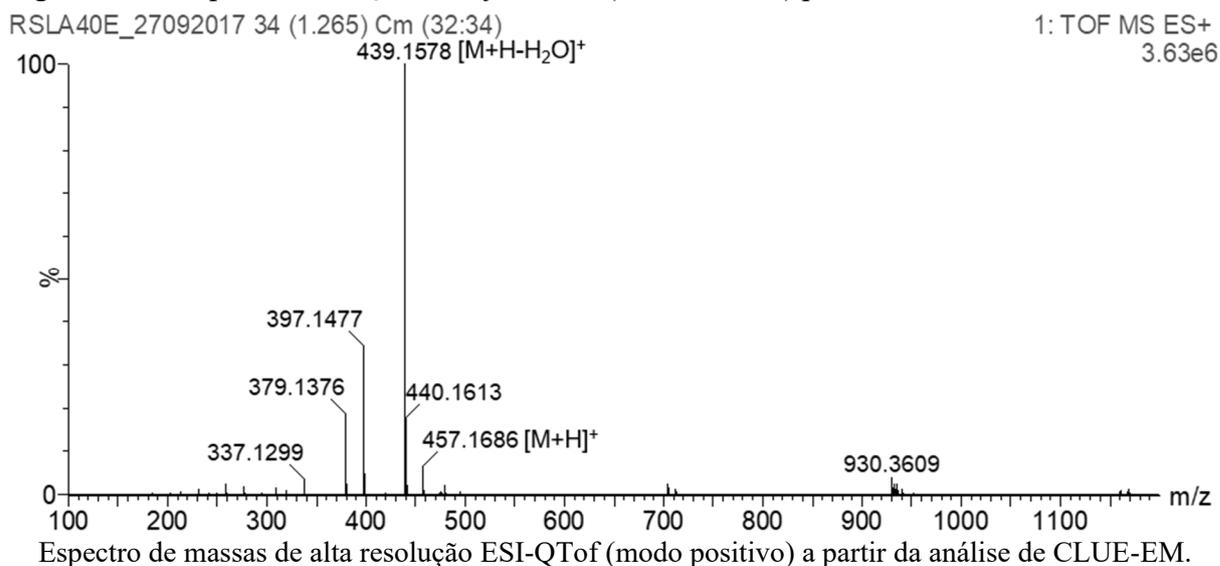
Eixo Y: projeção para ^{13}C , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00); Eixo X: deslocamento químico ^1H , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00).

Figura 110 – Mapa de correlação HMBC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 295 K) para o derivado semissintético (**16**) do gaulcolídeo B (**4**).



Eixo Y: projeção para ^{13}C , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00); Eixo X: deslocamento químico ^1H , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00).

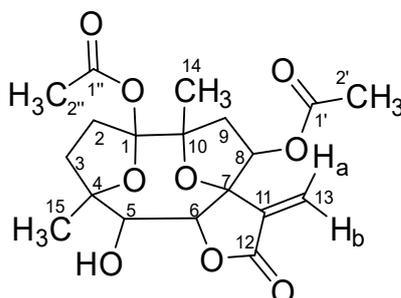
Figura 111 – Espectro ESI-QToF EM *full scan* (100-1200 Da) para o derivado semissintético **16**.



O composto **16** foi previamente obtido a partir transformação do glaucolídeo B (**4**) empregando terra bentonita (Tonsil) (JIMENEZ et al., 1995; FLORES-GUZMÁN et al., 2019). Nesse contexto, a obtenção de derivados hirsutinolídeos a partir da semissíntese de LS do tipo glaucolídeo também foi descrita na literatura por meio de reações ciclização transanular com sílica na presença de solventes próticos (MARTÍNEZ-VÁZQUEZ et al., 1992).

5.6.2.7 Derivado (**17**): 1,8-diacetoxi-1(4),7(10)-diepoxi-5-hidroxigermacr-11(13)-en-6(12)-olídeo

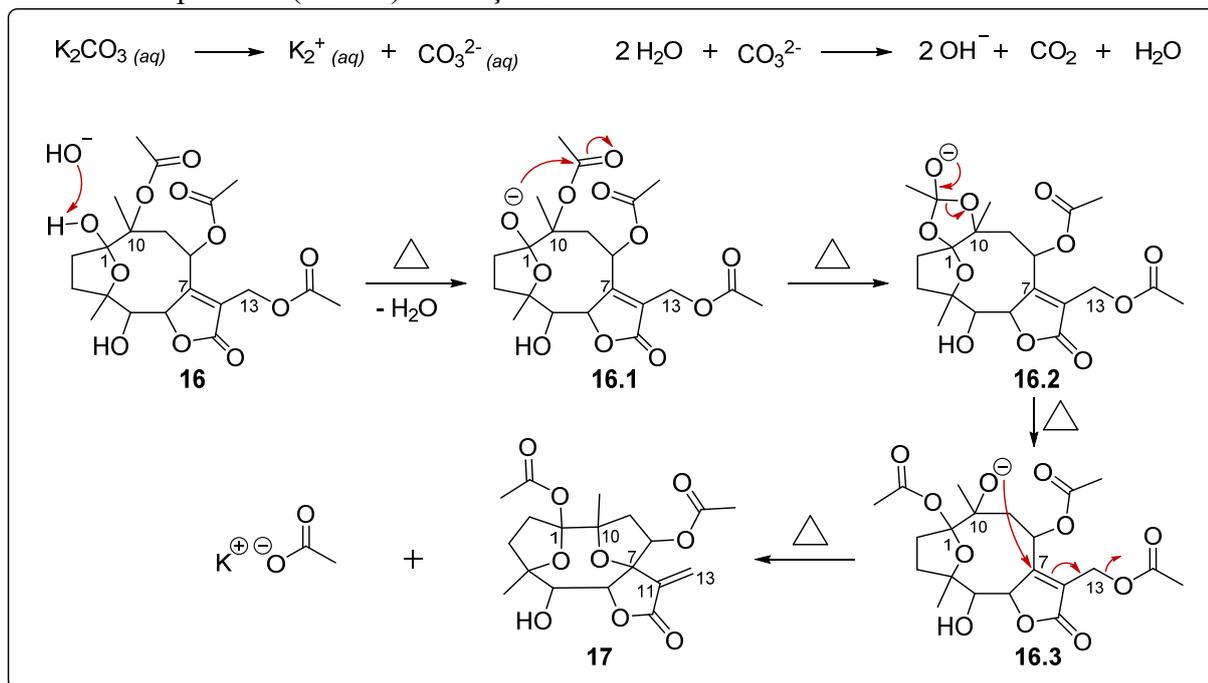
Figura 112 – Estrutura molecular do derivado semissintético **17**.



Fonte: adaptado de Jakupovic e colaboradores (1986b).

O Esquema 27 ilustra a proposta do mecanismo de reação para obtenção do derivado semissintético **17**, a partir do derivado **16** em condição alcalina, utilizando o carbonato de potássio em solução aquosa como catalisador sob refluxo a 45 °C.

Esquema 27 – Mecanismo de reação proposto para produção do derivado semissintético **17** com carbonato de potássio (K_2CO_3): condição **d**.



Condição reacional: (**d**) K_2CO_3 (aq.), THF, refluxo a 45 °C, 2 h.

Seguindo proposta similar à descrita por Jakupovic e colaboradores (1986b), baseada na formação de um produto de rearranjo estrutural, a etapa chave da reação para obtenção derivado semissintético **17** foi a subtração do átomo de hidrogênio da função OH acetálica na posição C-1 do derivado **16**, possível em função do pKa do K_2CO_3 aquoso (10,25) ser suficiente para essa condição. Essa etapa inicial, desempenhada pelo hidróxido gerado da presença do íon carbonato (oriundo do catalisador) em meio aquoso, permitiu a formação do ânion intermediário **16.1**, o qual sofreu um consequente rearranjo com o grupo acetil da função éster vicinal (**16.2**). Adicionalmente, o alcóxido originado na posição C-10 (**16.3**) desencadeou um ataque nucleofílico ao carbono olefínico em C-7, seguido do deslocamento da dupla ligação para a posição C-11/C-13 e a perda do grupo acetoxi ligado na posição alílica C-13, originando o derivado de LS (**17**) de interesse.

Os dados observados de RMN 1H e RMN ^{13}C para o derivado **17** foram comparados com dados da literatura, cujas informações estão apresentadas na Tabela 30.

A partir da comparação dos dados espectroscópicos de RMN 1H (Figura 113) e bidimensionais (HSQC e HMBC, Figuras 114 e 115) observados para o derivado **17** com relação aos dados do material de partida, o derivado **16** (para maiores detalhes vide *item* 5.6.2.6), foram caracterizados sinais indicativos da conversão do esqueleto carbocíclico e a formação de um tipo variado de núcleo germacranolídeo de LS.

Tabela 30 – Dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C para o derivado semissintético (**17**) e dados comparativos da literatura.

Posição	(17)	(JAKUPOVIC et al., 1986b) ^a	
	δ ^1H mult. (J Hz)	δ ^{13}C	δ ^1H mult. (J Hz)
1	-	112,1	-
2a	2,51-2,63 <i>m</i>	31,6	2,11 <i>m</i>
2b	2,17-2,27 <i>m</i>		2,11 <i>m</i>
3a	2,51-2,63 <i>m</i>	36,8	2,29 <i>m</i>
3b	1,97-2,15 <i>m</i>		2,01 <i>m</i>
4	-	89,,2	-
5	4,00 <i>d</i> (10,3)	73,2	5,42 <i>s</i>
6	4,68 <i>d</i> (10,3)	84,8	-
7	-	89,5	-
8	5,28 <i>dd</i> (8,5; 7,5)	82,8	5,52 <i>dd</i> (7,5; 4,5)
9a	3,02 <i>dd</i> (13,9; 8,5)	40,1	2,78 <i>dd</i> (14; 7,5)
9b	1,89 <i>dd</i> (13,9; 7,5)		2,01 <i>dd</i> (14;4,5)
10	-	85,7	-
11	-	136,9	-
12	-	167,7	-
13a	6,54 <i>s</i>	129,4	6,41 <i>s</i>
13b	5,78 <i>s</i>		5,85 <i>s</i>
14	1,38 <i>s</i>	22,8	1,57 <i>s</i>
15	1,44 <i>s</i>	19,4	1,55 <i>s</i>
1'	-	171,2	-
2'	1,96 <i>s</i>	21,1	2,00 <i>s</i>
1''	-	168,2	-
2''	2,04 <i>s</i>	22,3	-

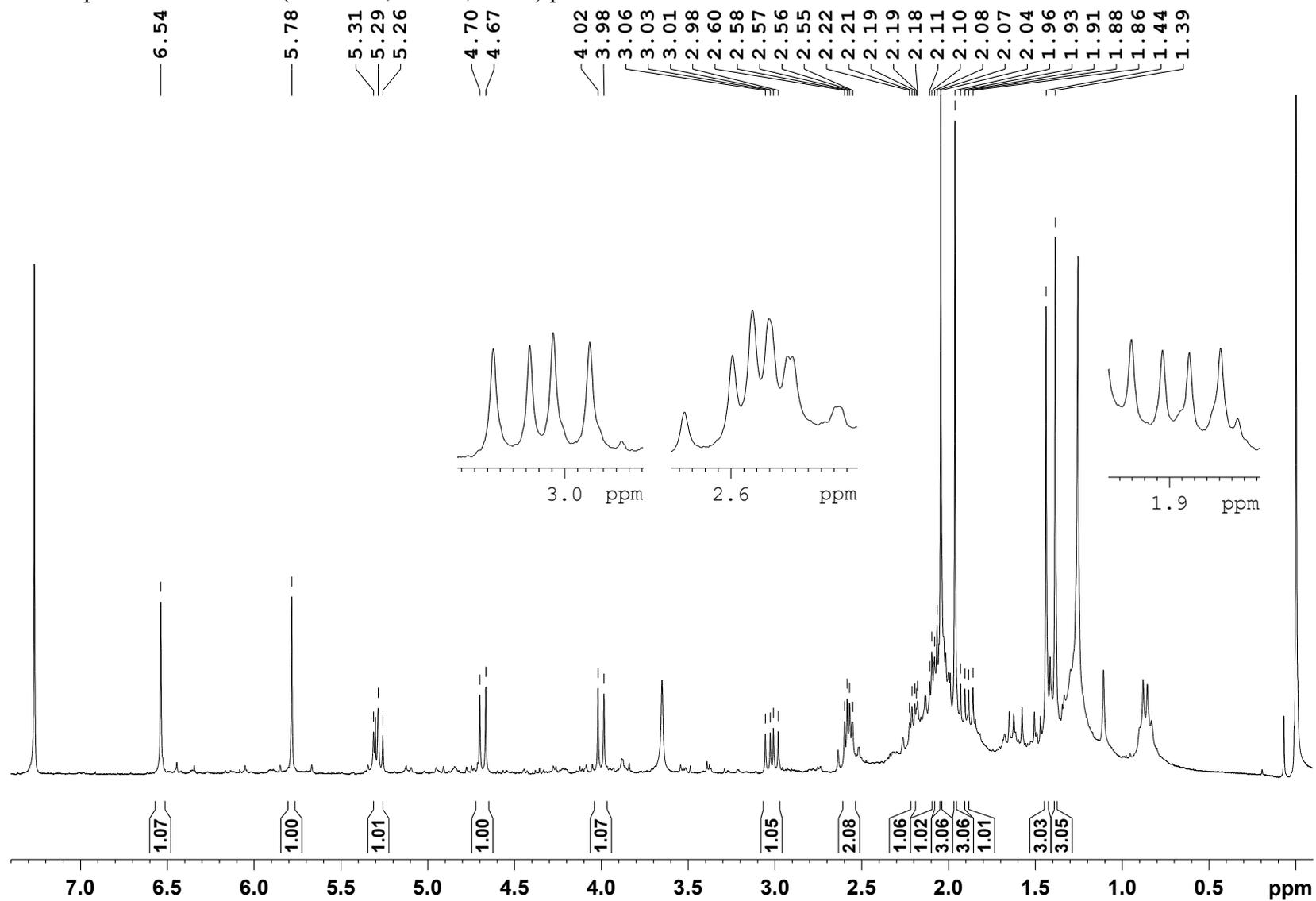
(300 MHz ^1H , 75 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 295 K) (400 MHz ^1H , CDCl_3 , temperatura não indicada)

^a, não foram encontrados relatos na literatura com a descrição dos dados de RMN para o composto **17**, sendo este comparado ao análogo saturado em C-5/C-6 e hidroxilado em C-1, cujas diferenças na comparação com **17** se dá apenas pela ausência do grupo acetila em C-1 e da hidroxila em C-5, além da presença da insaturação C-5/C-6. Da mesma forma, devido ausência de dados de RMN ^{13}C para o próprio análogo comparado, realizou-se a comparação apenas em relação aos dados de RMN ^1H .

A principal diferença em relação ao material de partida (derivado **16**) foi observada a partir das correlações entre os hidrogênios metilênicos simpletos δ 6,54 (1H, H-13a) e δ 5,78 (1H, H-13b) com os carbonos carbonílico em δ 167,7 (C-12) e olefínico em δ 136,9 (C-11), além do carbono oxigenado na posição C-7 (δ 89,5), que comprovou a presença do anel γ -lactônico em C-6/C-7 contendo uma α,β -insaturação exocíclica (C-11/C-13), com a consequente perda do substituinte acetoxi ligado à posição C-13 no derivado **16**.

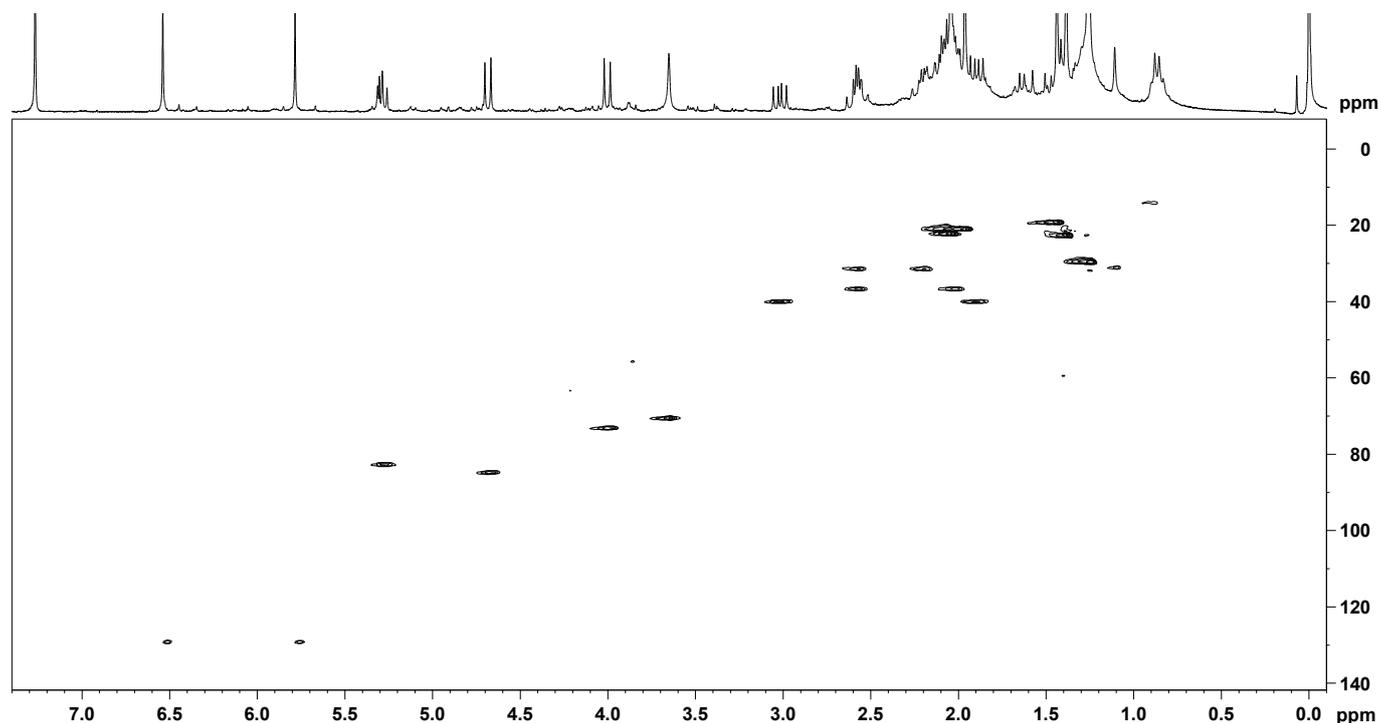
Ainda, a correlação entre os hidrogênios δ 3,02 *dd* (1H, $J=13,9$; 8,5 Hz, H-9a) e δ 1,89 *dd* (1H, $J=13,9$; 7,5 Hz, H-9b) do metileno na posição C-9 (δ 40,1) com o carbono oxigenado ressonando em δ 85,7 (C-10) e o β -carbono (C-7) do anel lactônico indicou a presença de um anel oxolano em C-7/C-10.

Figura 113 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , 295 K) para o derivado semissintético **17**.



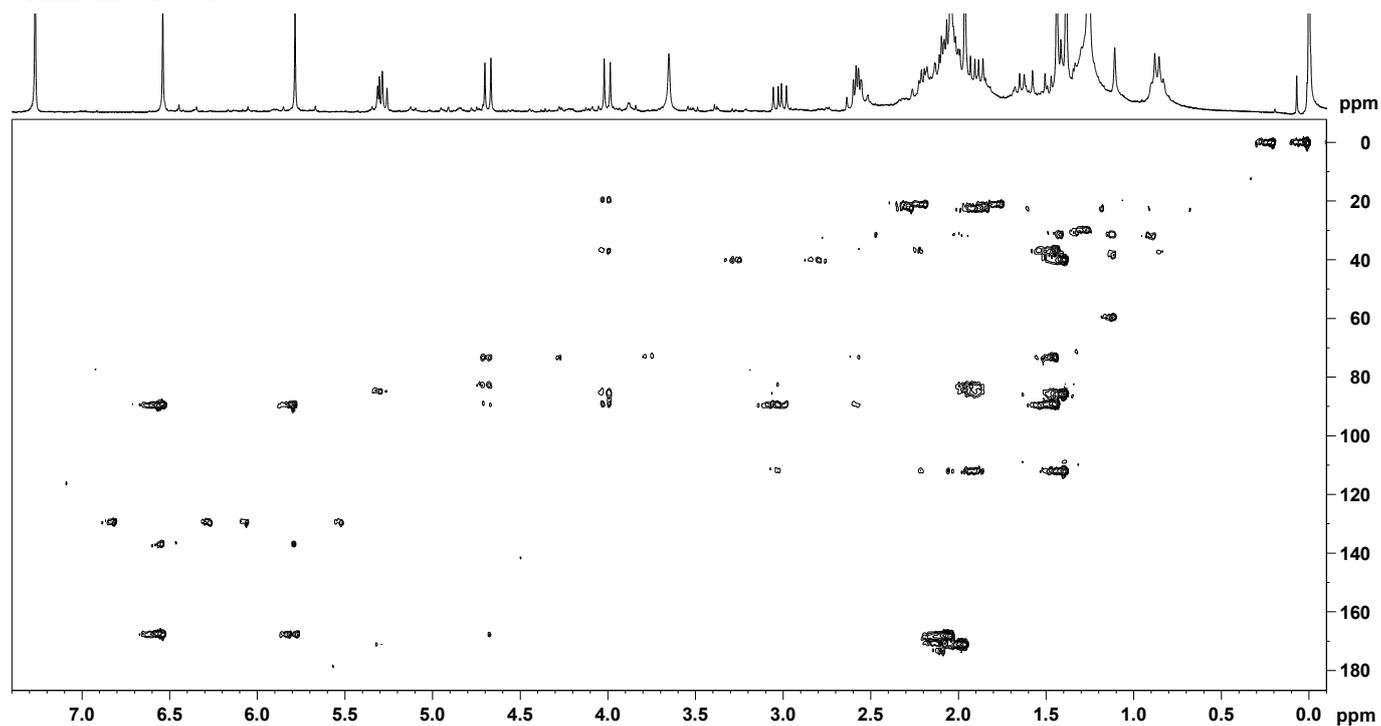
Eixo Y: intensidade; Eixo X: deslocamento químico, expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00).

Figura 114 – Mapa de correlação HSQC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 295 K) para o derivado semissintético **17**.



Eixo Y: projeção para ^{13}C , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00); Eixo X: deslocamento químico ^1H , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00).

Figura 115 – Mapa de correlação HMBC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 295 K) para o derivado semissintético **17**.



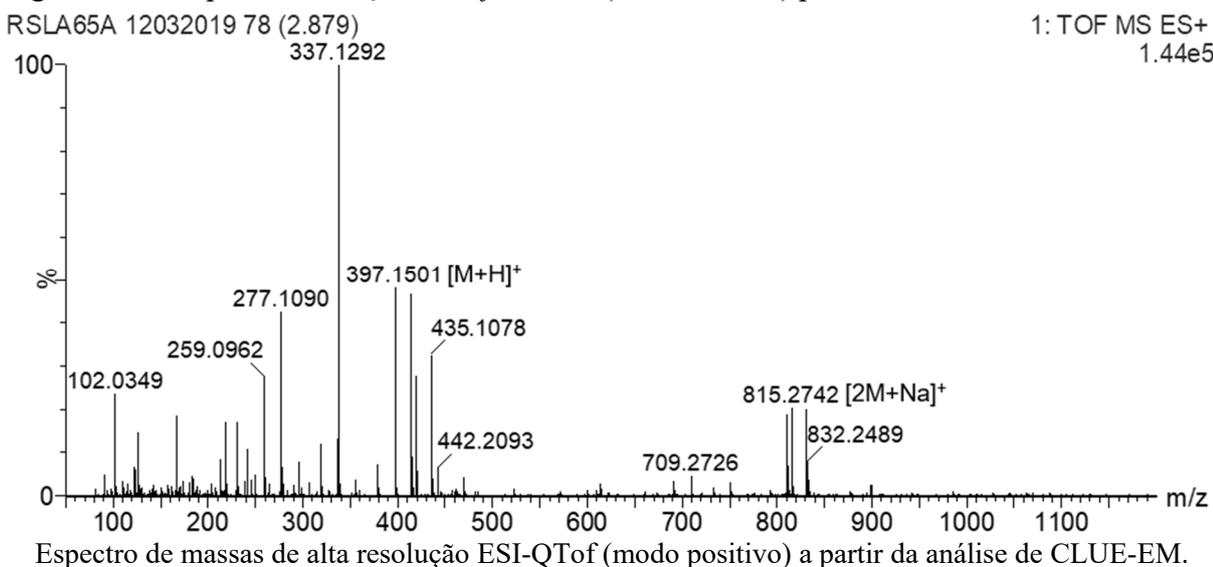
Eixo Y: projeção para ^{13}C , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00); Eixo X: deslocamento químico ^1H , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00).

Esses achados, complementados pela manutenção do anel tetrahydrofurano em C-1/C-4 já presente no material de partida, sugeriu a formação de uma LS contendo um núcleo diepoxigermacranolídeo (CATALÁN et al., 1988).

Ainda, foi possível observar a presença de um grupo acetoxi formado pelos sinais dos hidrogênios simpleto δ 2,04 (3H, H-2'') correlacionando com o carbono acetálico em C-1 (δ 112,1), além do substituinte acetoxi cujo sinal de hidrogênio δ 2,04 s (3H-H-2') correlacionou com o carbono oximetínico na posição C-8 (δ 82,8).

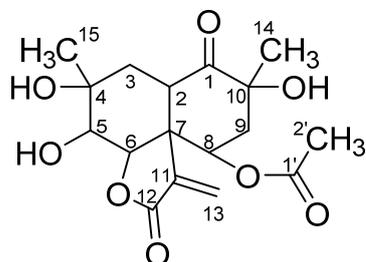
A análise de ESI-QToF EM confirmou a proposta estrutural para o derivado semissintético **17** pela presença no espectro de EM *full scan* (Figura 116) do íon molecular protonado m/z 397,1501 [$C_{19}H_{24}O_9+H$]⁺ (calculado 397,1499), além do dímero adutado com sódio m/z 815,2742 [$2M+Na$]⁺ (calculado 815,2738).

Figura 116 – Espectro ESI-QToF EM *full scan* (100-1200 Da) para o derivado semissintético **17**.



O derivado semissintético **17** correspondeu à LS 1,8-diacetoxi-1(4),7(10)-diepoxi-5-hidroxigermacr-11(13)-en-6(12)-olídeo (Figura 112), com fórmula molecular $C_{19}H_{24}O_9$.

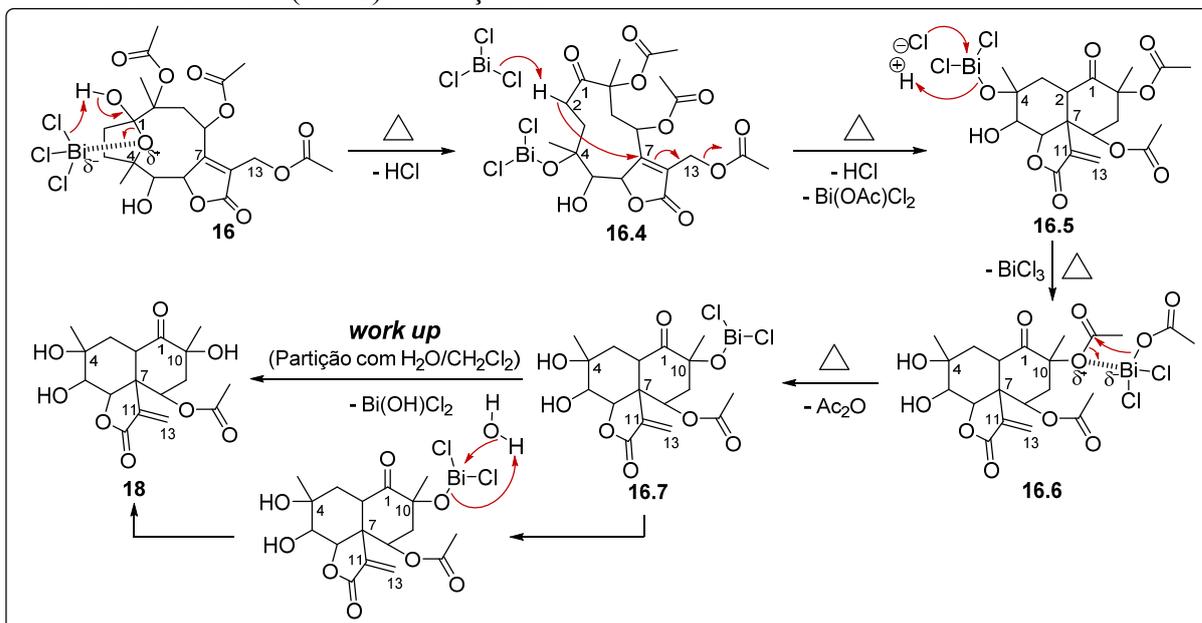
Apesar do análogo saturado em C-5/C-6 e de seu derivado hidroxilado em C-1 já terem sido obtidos a partir de reações com o glaucolídeo B (**4**) em condições similares às deste estudo (JAKUPOVIC et al., 1986b; CATALÁN et al., 1988), não foram encontrados relatos na literatura para o derivado **17**, indicando se tratar de um composto novo.

5.6.2.8 Derivado (**18**): 8-acetoxi-vernomargolídeoFigura 117 – Estrutura molecular do derivado semissintético **18**.

Fonte: adaptado de Jakupovic e colaboradores (1986a).

O derivado semissintético **18** foi produzido a partir derivado **16** empregando o BiCl_3 com catalisador sob refluxo a $50\text{ }^\circ\text{C}$ (condição e), conforme proposto em mecanismo descrito no Esquema 28.

Esquema 28 – Mecanismo de reação proposto para produção do derivado semissintético **18** com cloreto de bismuto III (BiCl_3): condição e.



Condição reacional: (e) BiCl_3 , DCM, refluxo a $50\text{ }^\circ\text{C}$, 15 h.

Nesse caso, a reação foi dependente da formação do complexo ativado "O- BiCl_3 " por parte do cloreto de bismuto com o oxigênio do anel tetrahydrofurano (C-1/C-4). Em seguida, um dos átomos de cloro atacou o hidrogênio da função hemiacetalica na posição C-1, promovendo a abertura do anel oxolano com consequente formação de um grupo "O- BiCl_2 " em C-4 e de uma função cetona em C-1 no intermediário **16.4**, além da perda de HCl. A desprotonação do hidrogênio metilênico na posição C-2 do intermediário **16.4** causada pelo

BiCl_3 promoveu, adicionalmente à perda de uma segunda molécula de HCl , a ciclização transanular do esqueleto carbocíclico a partir do ataque nucleofílico ao carbono olefínico em C-7, com o rearranjo da dupla ligação para a posição C-11/C-13 e a perda do grupo acetoxi em C-13 na forma de Bi(OAc)Cl_2 , originando um segundo tipo de esqueleto decalínico em C-2/C-7, correspondendo ao intermediário **16.5**.

Assim como observado na formação dos derivados **13-15** (vide *item 5.6.2.3*), o grupo "O- BiCl_2 " na posição C-4 do intermediário **16.5** sofreu o ataque do HCl oriundo do passo reacional anterior para a regeneração do BiCl_3 e formação do grupo hidroxila na mesma posição (**16.6**). Posteriormente, o intermediário **16.6** sofreu uma segunda desacetilação na posição C-10 exercida pelo Bi(OAc)Cl_2 (formado previamente na etapa de ciclização transanular) acarretando na perda de Ac_2O e na formação do intermediário **16.7**, contendo a porção "O- BiCl_2 " em C-10. Por fim, a presença de água no processo de tratamento da reação (*work up*) permitiu a liberação de Bi(OH)Cl_2 a partir do intermediário **16.7** e a consequente obtenção do derivado semissintético vernomargolídeo (**18**) de interesse.

A utilização de uma maior energia nas condições reacionais de semissíntese para o derivado **18** (em função do refluxo a $50\text{ }^\circ\text{C}$) é um dos fatores que pode explicar o favorecimento da abertura do anel tetrahydrofurano com a formação de um núcleo decalínico contendo uma função cetona em C-1 na produção do derivado vernomargolídeo **18**, diferentemente do observado para os derivados **13-15** em que as reações foram desenvolvidas em temperatura ambiente com a manutenção do ciclo tetrahydrofurano, permitindo a obtenção de esqueletos vernomargolídeo hemiacetálicos. O aquecimento da reação (condição **e**) mostrou-se um parâmetro determinante, justificando o processo termodinâmico da formação da decalina do vernomargolídeo **18**.

Os dados observados de RMN ^1H e RMN ^{13}C derivado **18** foram comparados com dados da literatura e as informações estão apresentadas na Tabela 31. Quando comparado ao material de partida (derivado **16**) (para maiores detalhes vide *item 5.6.2.6*), os dados de RMN ^1H (Figura 118) e bidimensionais (HSQC e HMBC, Figuras 119 e 120) do derivado **18** mostraram a conversão do esqueleto carbocíclico, comprovado pelo sinal indicativo de hidrogênio metínico δ 3,37 *d* (1H; $J=4,4$ Hz; H-2) na posição C-2 (δ 53,4) que correlacionou com os carbonos oximetínicos em C-4 (δ 84,4) e C-6 (δ 87,4) e com os carbonos quaternário em C-7 (δ 56,7) e cetônico em C-1 (δ 209,4). Esse conjunto de sinais sugeriram a formação de um anel decalínico em C-2/C-7, e que combinado com a presença da função cetona em C-1 confirmaram na identificação de uma LS com núcleo vernomargolídeo (JAKUPOVIC et al., 1986a).

Somado a isso, a correlação entre os hidrogênios metilênicos δ 6,48 *s* (1H, H-13a) e δ 5,87 (1H, H-13b) com os carbonos em C-12 (δ 168,6), C-11 (δ 134,4) e C-7 (δ 56,7) auxiliaram na confirmação do anel γ -lactônico em C-6/C-7 contendo uma α,β -insaturação exocíclica (C-11/C-13).

Tabela 31 – Dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C para o derivado semissintético (**18**) e dados comparativos da literatura.

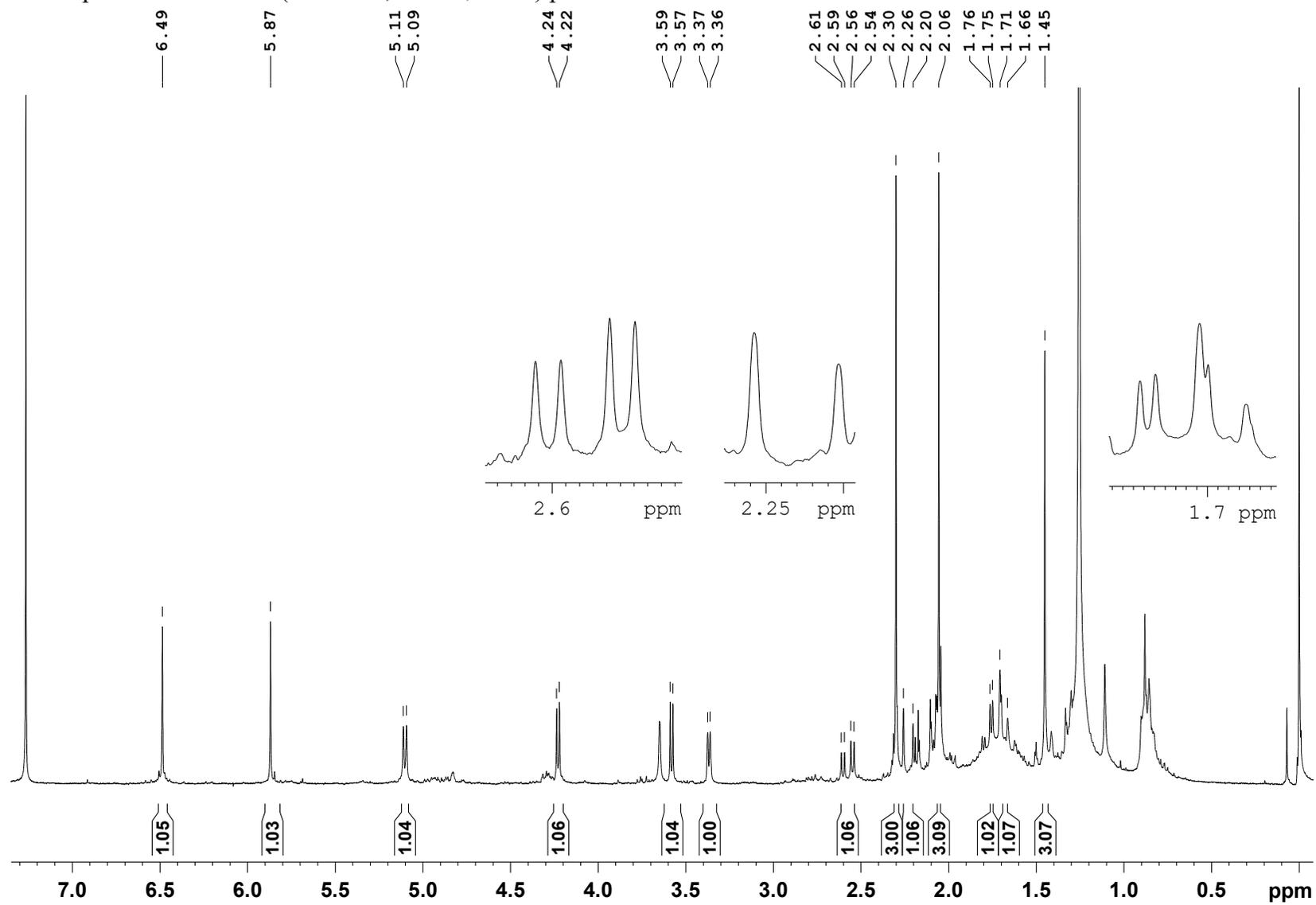
Posição	(18)		(JAKUPOVIC et al., 1986a) ^a	
	δ ^1H mult. (J Hz)	δ ^{13}C	δ ^1H mult. (J Hz)	δ ^{13}C
1	-	209,4	-	211,8
2	3,37 <i>d</i> (4,4)	53,4	3,51 <i>dd</i> (12; 3)	53,8
3a	1,78 <i>dd</i> (13,4; 4,4)	35,9	1,99 <i>dd</i> (14,5; 12)	31,1
3b	1,68 <i>d</i> (13,4)		1,65 <i>dd</i> (14,5; 3)	
4	-	84,4	-	73,4
5	3,58 <i>d</i> (4,6)	79,1	3,06 <i>d</i> (7,5)	78,6
6	4,23 <i>d</i> (4,6)	87,4	4,62 <i>d</i> (7,5)	74,9
7	-	56,7	-	40,6
8	5,10 <i>d</i> (5,5)	79,6	5,68 <i>dd</i> (8; 3)	70,5
9a	2,58 <i>dd</i> (16,3; 5,5)	43,2	2,27 <i>dd</i> (16; 8)	39,9
9b	2,23 <i>d</i> (16,3)		2,05 <i>dd</i> (16; 3)	
10	-	96,5	-	85,5
11	-	134,4	-	133,6
12	-	168,6	-	169,3
13a	6,48 <i>s</i>	126,7	6,48 <i>s</i>	125,4
13b	5,87 <i>s</i>		5,32 <i>s</i>	
14	2,30 <i>s</i>	26,5	1,55 <i>s</i>	27,9
15	1,45 <i>s</i>	21,2	1,19 <i>s</i>	26,3
1'	-	169,6	-	166,8
2'	2,06 <i>s</i>	20,9	-	127,5
3'	-	-	6,79 <i>ql</i> (7)	139,9
4'	-	-	1,79 <i>dl</i> (1)	11,9
5'	-	-	1,78 <i>sl</i>	14,7
	(300 MHz ^1H , 75 MHz ^{13}C , CDCl ₃ , 295 K)		(400 MHz ^1H , 100 MHz ^{13}C , CDCl ₃ , temperatura não indicada)	

^a, devido ao fato de não terem sido encontrados relatos na literatura para o derivado **18**, este foi comparado ao análogo C-8 tigloiloxi, cuja diferença na comparação com **18** se dá em função do substituinte éster em C-8 (com um tigloiloxi em vez do acetoxi em **18**).

Em paralelo, a detecção de apenas um sinal indicativo de um grupo acetoxi a partir da correlação dos hidrogênios simpleto δ 2,16 (3H, H-2') com o carbono oximetínico em C-8 (δ 79,6), inferiu que os demais carbonos oxigenados nas posições C-4, C-5 e C-10 corresponderam à carbonos hidroxilados.

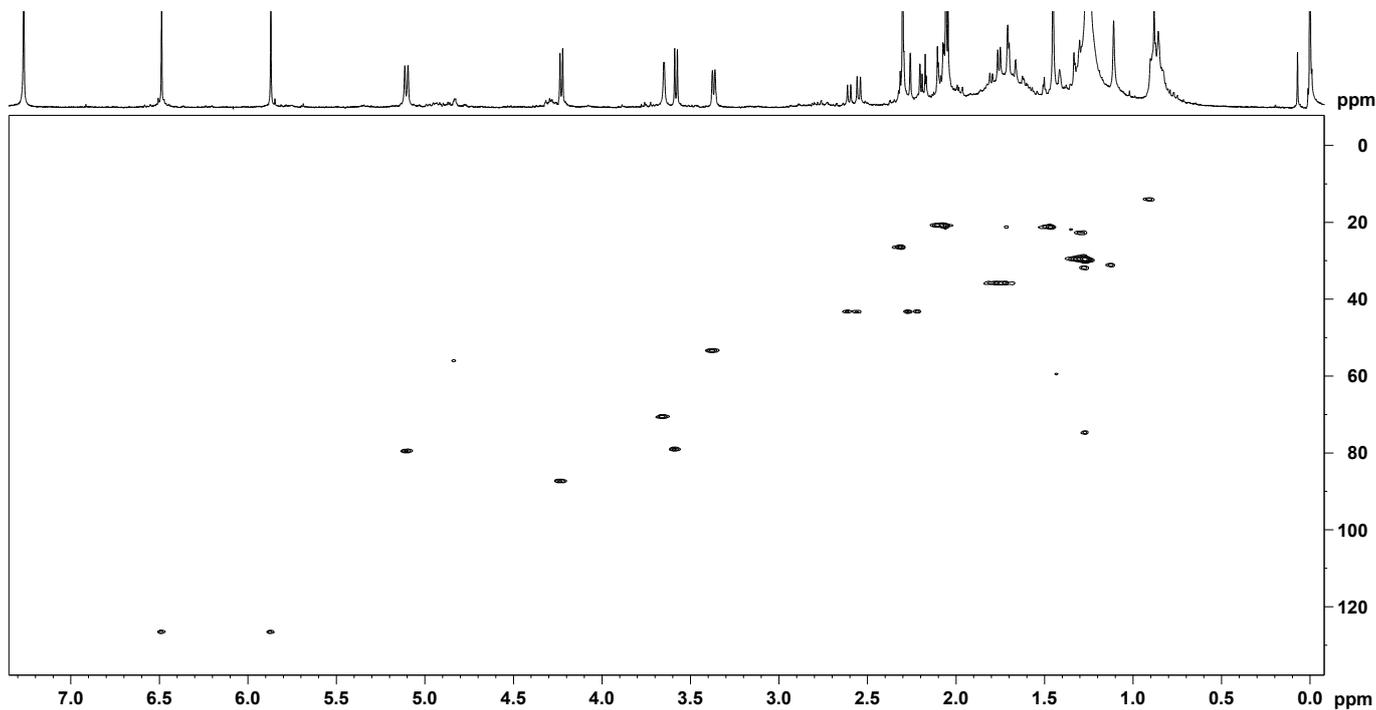
A análise de ESI-QToF EM confirmou a proposta estrutural para o derivado semissintético **18** pela presença no espectro de EM *full scan* (Figura 121) do íon molecular protonado m/z 355,1396 [C₁₇H₂₂O₈+H]⁺ (calculado 355,1393). O derivado semissintético **18** correspondeu à LS 8-acetoxi-vernomargolídeo (Figura 117), com fórmula molecular C₁₇H₂₂O₈.

Figura 118 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , 295 K) para o derivado semissintético **18**.



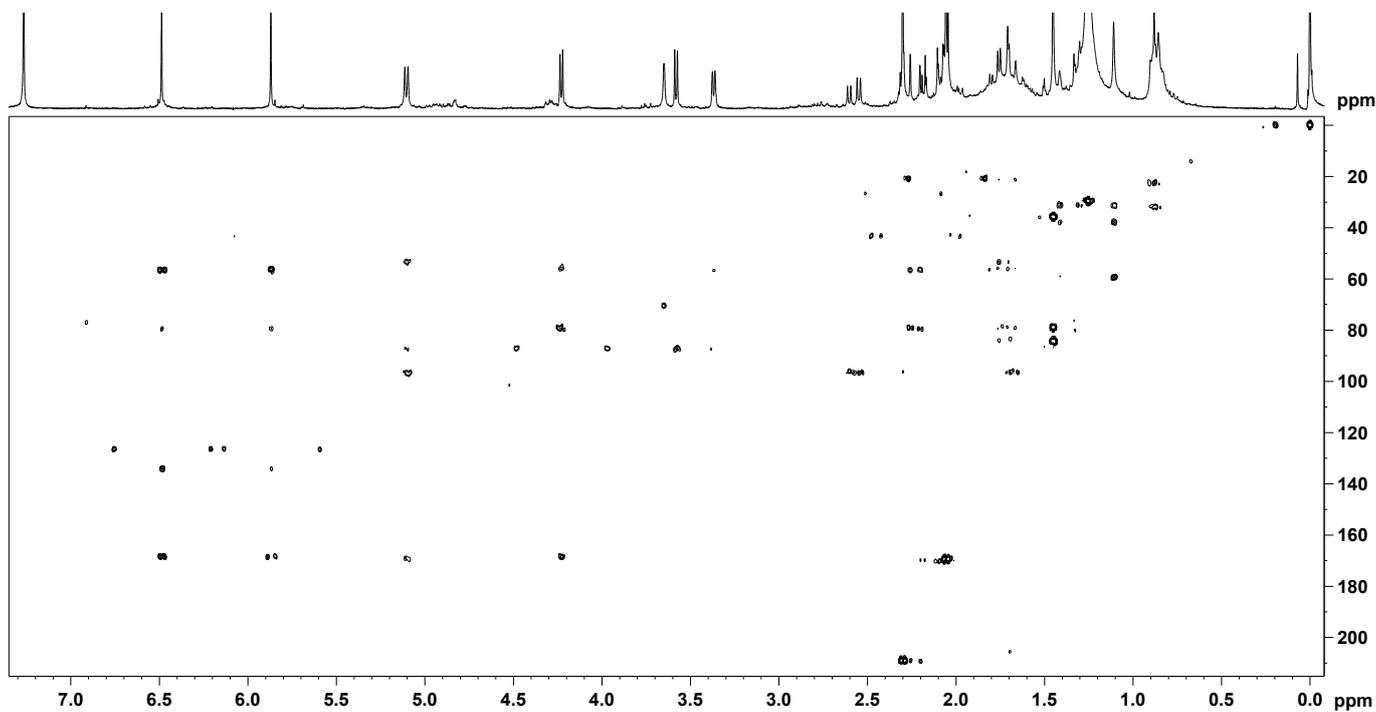
Eixo Y: intensidade; Eixo X: deslocamento químico, expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00).

Figura 119 – Mapa de correlação HSQC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 295 K) para o derivado semissintético **18**.



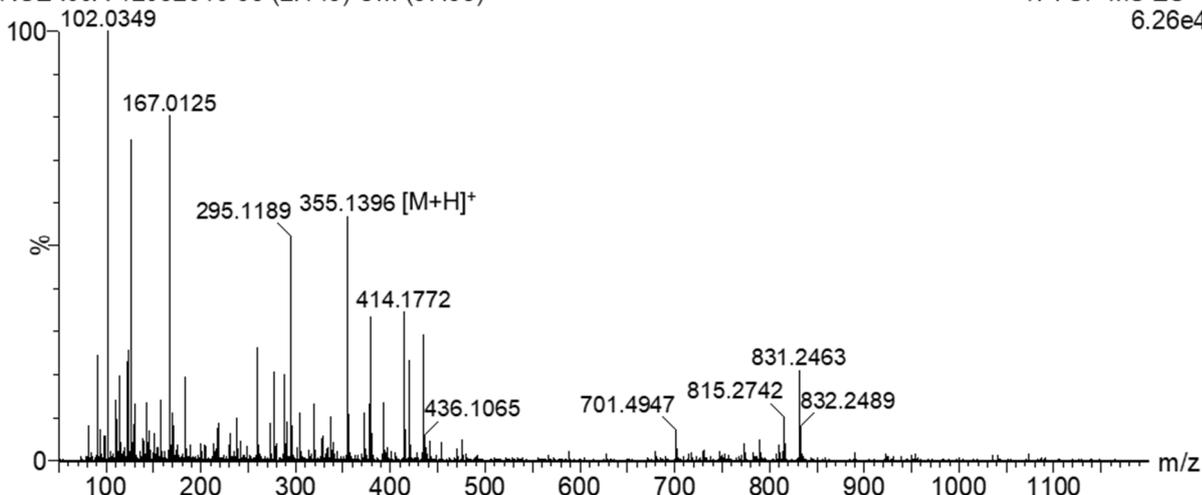
Eixo Y: projeção para ^{13}C , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00); Eixo X: deslocamento químico ^1H , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00).

Figura 120 – Mapa de correlação HMBC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 295 K) para o derivado semissintético **18**.



Eixo Y: projeção para ^{13}C , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00); Eixo X: deslocamento químico ^1H , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00).

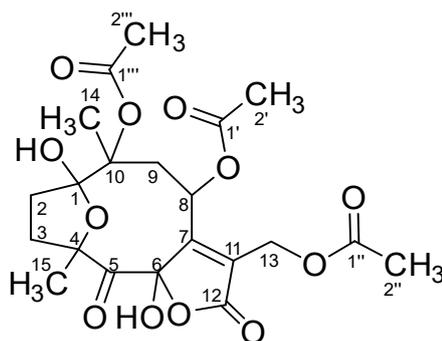
Figura 121 – Espectro ESI-QToF EM *full scan* (100-1200 Da) para o derivado semissintético **18**.
 RSLA90A 12032019 58 (2.145) Cm (57:58) 1: TOF MS ES+ 6.26e4



Embora o análogo 8-tigloxi-vernomargolídeo já tenha sido descrito na literatura, obtido de espécies de Vernoniae (JAKUPOVIC et al., 1986a; BORKOSKY et al., 1997), não foram encontrados relatos para o derivado **18**, indicando se tratar de um composto novo.

5.6.2.9 Derivado (**19**): 8,10,13-triacetoxi-1(4)-epoxi-6-hidroxi-5-ceto-germacr-7(11)-en-6(12)-olídeo

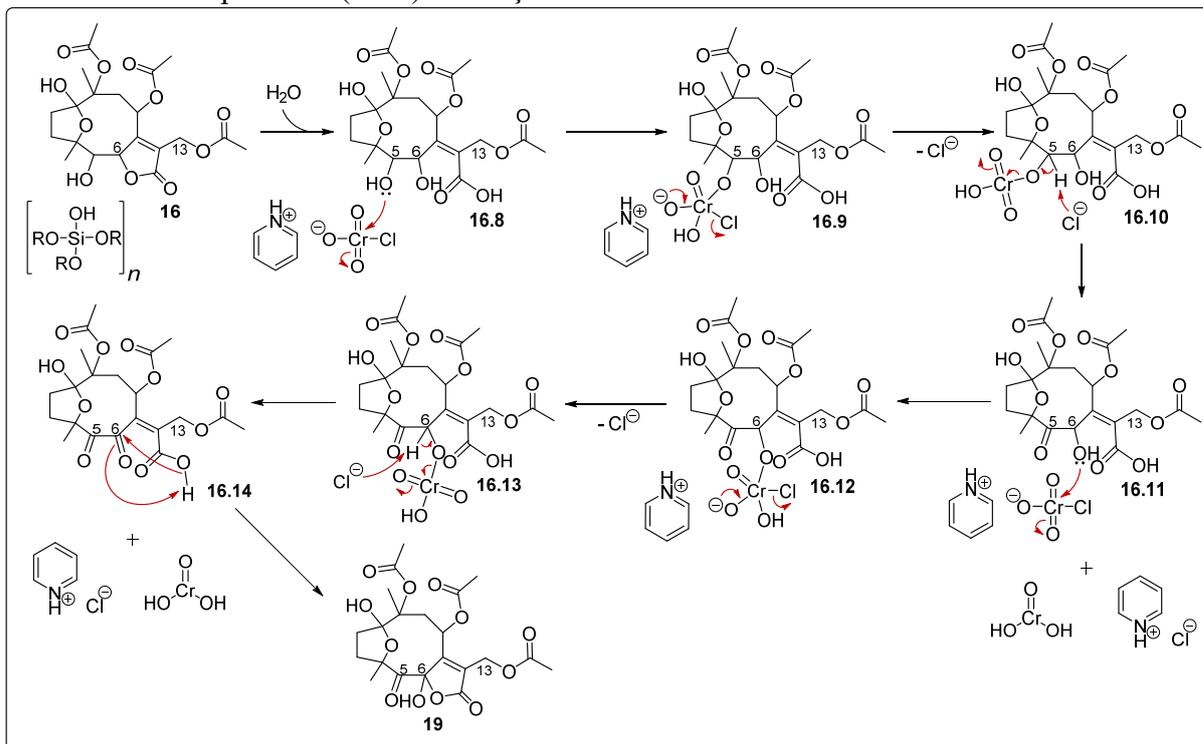
Figura 122 – Estrutura molecular do derivado semissintético **19**.



Fonte: adaptado de Jimenez e colaboradores (1995).

O derivado semissintético **19** foi produzido a partir do derivado **16** em reação de oxidação com PCC, conforme ilustrado no Esquema 29 em mecanismo similar ao descrito por Banerji (1978). O PCC vem sendo empregado na síntese orgânica principalmente para a oxidação seletiva de álcoois para a formação de compostos carbonílicos, e sua utilização associado à sílica gel visa minimizar de produtos colaterais de reações e favorecer a purificação do produto de interesse (LUZZIO et al., 1999; HERAVI; FAZELI; FAGHIHI, 2016).

Esquema 29 – Mecanismo de reação proposto para produção do derivado semissintético **19** com clorocromato de piridínio (PCC): condição **f**.



Condição reacional: (**f**) PCC/SiO₂ (1:1), DCM, Ar, rt, 48 h.

A presença da sílica gel no meio reacional parece estar envolvida na hidrólise e com consequente abertura do anel lactônico no derivado de partida **16**, gerando a formação de uma função hidroxila adicional na posição C-6 e de um ácido carboxílico em C-11, correspondendo ao intermediário **16.8**.

Em seguida, as hidroxilas nas posições C-5 e C-6 do intermediário **16.8** foram oxidadas por PCC resultando na formação de um derivado 5,6-dicetona (**16.14**). Este intermediário, por sua vez, sofreu uma adição-1,2 para restituição do anel γ -lactônico e formação de um hemiacetal em C-6, correspondendo ao derivado semissintético **19**.

Estudos mais aprofundados de mecanística reacional são necessários para confirma essa proposta de produção do derivado **19**, e para melhor compreensão da influência da sílica gel e do próprio PCC na abertura do anel lactônico – etapa que pode ter ocorrido após a primeira oxidação da hidroxila na posição C-5.

A Tabela 32 apresenta as dados espectroscópicos de RMN ¹H e RMN ¹³C (a partir de análises desenvolvidas em temperatura reduzida a 278 K [4,8 °C]) para o derivado **19** em comparação com dados do material de partida – derivado **16**.

Tabela 32 – Dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C para o derivado semissintético (**19**) e dados comparativos com material de partida (**16**).

Posição	(19)		(16)^a	
	δ $^1\text{H mult. (J Hz)}$	δ ^{13}C	δ $^1\text{H mult. (J Hz)}$	δ ^{13}C
1	-	111,1	-	108,8
2a	2,42-2,54 <i>m</i>	34,9	2,08-2,18 <i>m</i>	33,9
2b	1,86-2,01 <i>m</i>		1,78-1,88 <i>m</i>	
3a	2,56-2,69 <i>m</i>	36,9	2,09-2,23 <i>m</i>	34,5
3b	1,99-2,12 <i>m</i>		2,09-2,23 <i>m</i>	
4	-	87,2	-	86,5
5	-	200,9	3,57 <i>d</i> (9,1)	75,9
6	-	107,6	5,11 <i>d</i> (9,1)	82,0
7	-	162,7	-	168,6
8	6,36 <i>dd</i> (11,7; 6,4)	68,2	5,90 <i>dd</i> (3,5; 3,4)	68,4
9a	3,32 <i>dd</i> (14,3; 11,7)		2,58 <i>dd</i> (15,6; 3,5)	
9b	2,60 <i>dd</i> (14,3; 6,4)	35,1	2,15 <i>d</i> (15,6)	41,8
10	-	86,5	-	87,0
11	-	127,9	-	123,1
12	-	167,6	-	171,2
13a	4,84 <i>d</i> (12,7)	55,0	4,91 <i>d</i> (12,6)	55,7
13b	4,71 <i>d</i> (12,7)		4,74 <i>d</i> (12,6)	
14	1,61 <i>s</i>	21,7	1,62 <i>s</i>	17,5
15	1,75 <i>s</i>	28,3	1,50 <i>s</i>	21,9
OH-6	6,81 <i>s</i>	-	-	-
1'	-	173,0	-	169,7
2'	2,090 <i>s</i>	20,8	2,06 <i>s</i>	20,6
1''	-	170,0	-	170,3
2''	2,094 <i>s</i>	20,8	2,09 <i>s</i>	20,9
1'''	-	169,4	-	171,7
2'''	2,04 <i>s</i>	21,0	2,04 <i>s</i>	22,2
	(300 MHz ^1H , 75 MHz ^{13}C , CDCl ₃ , 278 K)		(300 MHz ^1H , 75 MHz ^{13}C , CDCl ₃ , 295 K)	

^a, devido ao fato de não terem sido encontrados relatos na literatura para o derivado **19**, este foi comparado ao análogo C-5 hidroxilado correspondente ao material de partida (derivado **16**) da reação de produção do derivado **19**.

A comparação dos dados espectroscópicos de RMN ^1H (Figura 123) e bidimensionais (HSQC e HMBC, Figuras 124 e 125) do derivado **19** com o material de partida derivado **16** (para maiores detalhes vide *item 5.6.2.6*) permitiu confirmar que a oxidação da função álcool na posição C-5 aconteceu como pretendido.

As correlações entre os hidrogênios da metila δ 2,14 *s* (3H, H-4) na posição C-4 (δ 87,2) e os hidrogênios metilênicos δ 2,56-2,69 *m* (1H, H-3a) e δ 1,99-2,12 *m* (1H, H-3b) em C-3 (δ 36,9) com o carbono carbonílico δ 200,9 (C-5) corroboraram com a formação da função cetona a partir do álcool secundário na mesma posição.

Figura 123 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , 278 K) para o derivado semissintético **19**.

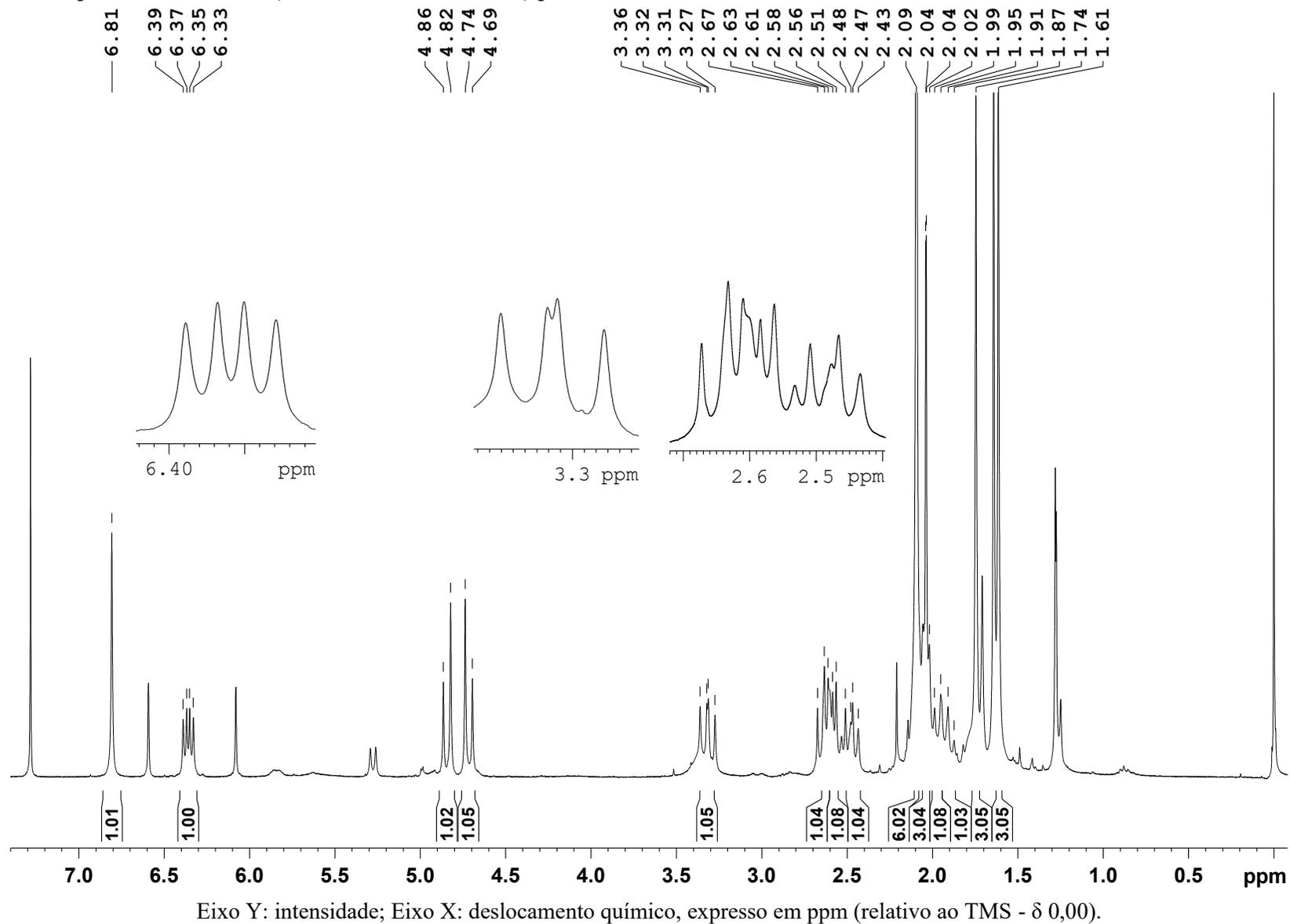
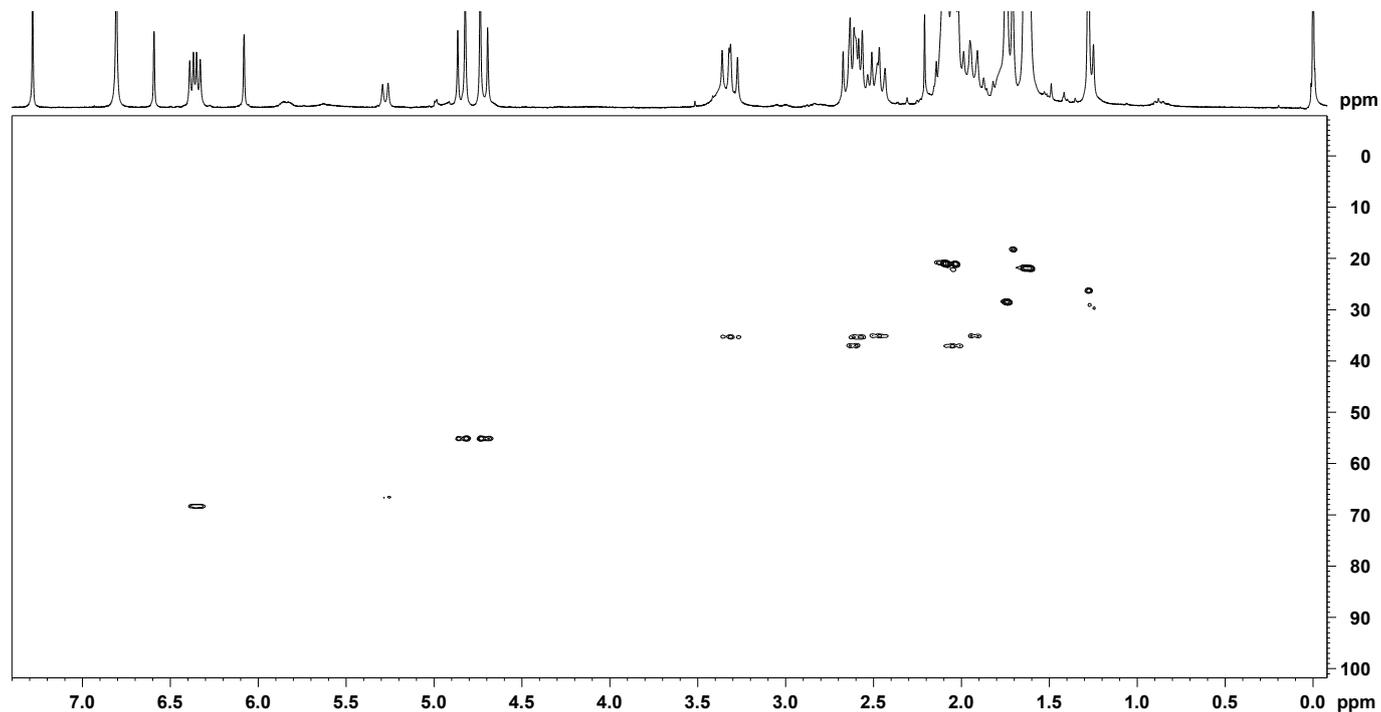
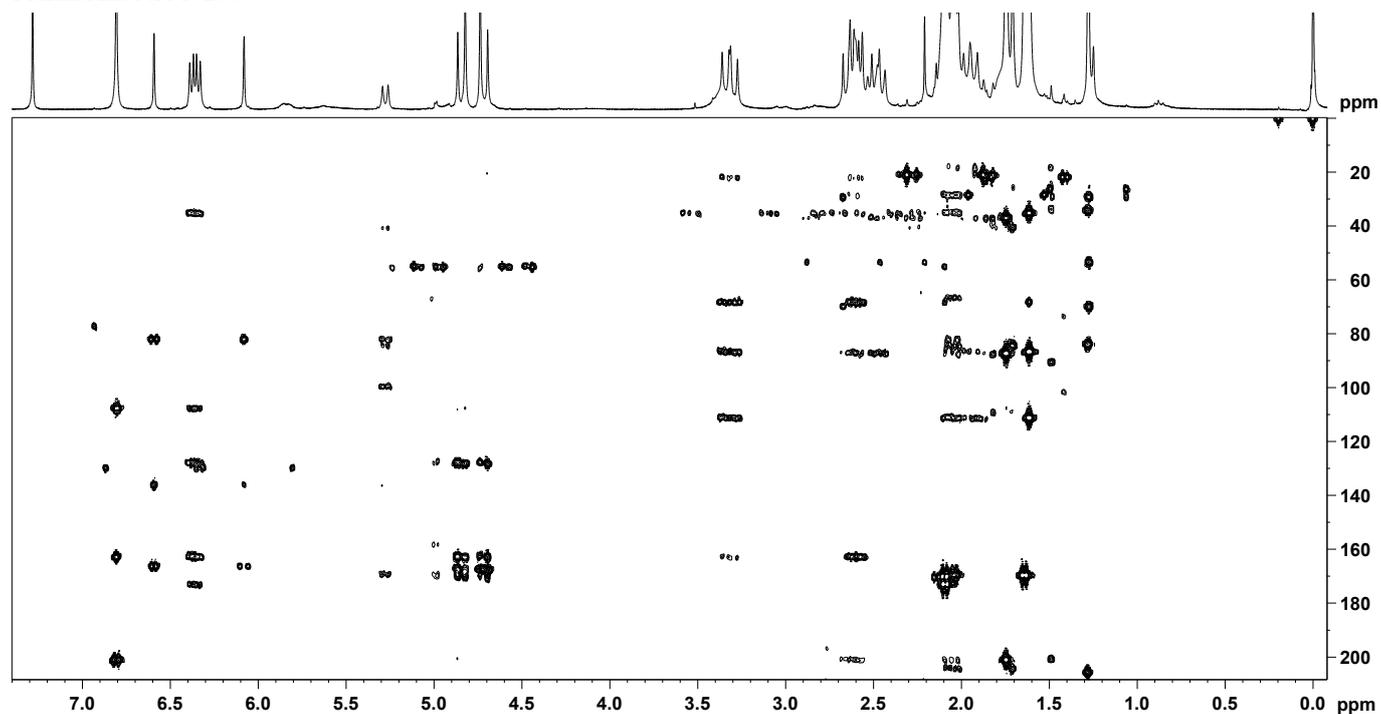


Figura 124 – Mapa de correlação HSQC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 278 K) para o derivado semissintético **19**.



Eixo Y: projeção para ^{13}C , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00); Eixo X: deslocamento químico ^1H , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00).

Figura 125 – Mapa de correlação HMBC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 278 K) para o derivado semissintético **19**.

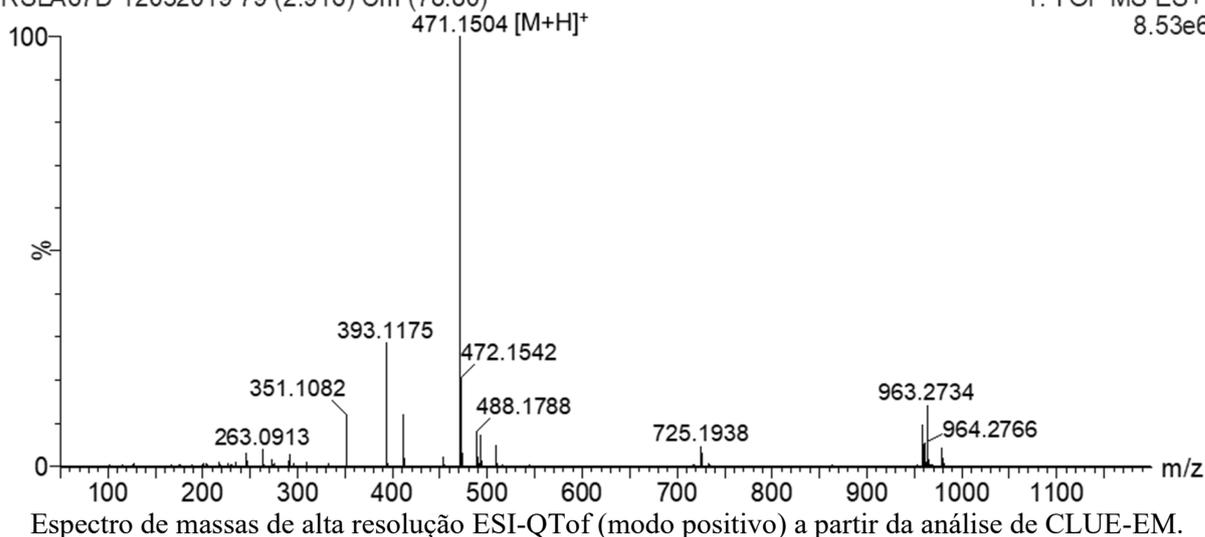


Eixo Y: projeção para ^{13}C , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00); Eixo X: deslocamento químico ^1H , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00).

Adicionalmente à oxidação da posição C-5, a segunda maior diferença identificada no derivado **19** em relação ao material de partida (derivado **16**) foi evidenciada pelo sinal de hidrogênio simpleto δ 6,81 s (1H, OH-6) correlacionando com os carbonos da já referida função cetona em C-5 e da olefina em C-7 (δ 162,7), bem como o carbono oxigenado δ 107,6 na posição C-6, que sugeriu a presença de uma hidroxila ligada ao γ -carbono (C-6) do anel lactônico, constituindo um grupo hemiacetal na mesma posição.

A análise de ESI-QToF EM confirmou a proposta estrutural para o derivado semissintético **19** pela presença no espectro de EM *full scan* (Figura 126) do íon molecular protonado m/z 471,1504 [$C_{21}H_{26}O_{12}+H$]⁺ (calculado 471,1503).

Figura 126 – Espectro ESI-QToF EM *full scan* (100-1200 Da) para o derivado semissintético **19**.
RSLA67D 12032019 79 (2.916) Cm (78:80)



Em função dos dados espectroscópicos e espectrométricos, o derivado semissintético **19** correspondeu à LS 8,10,13-triacetoxi-1(4)-epoxi-6-hidroxi-5-ceto-germacr-7(11)-en-6(12)-olídeo (Figura 122), com fórmula molecular $C_{21}H_{26}O_{12}$.

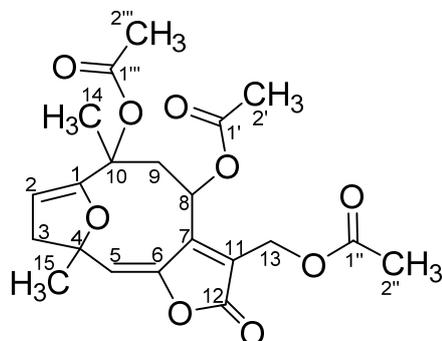
Ressalta-se que não foram encontrados relatos na literatura para do derivado semissintético **19**, indicando se tratar de um composto novo.

5.6.2.10 Derivado (**20**): 8,10,13-triacetoxi-1(4)-epoxi-germacra-1(2),5(6),7(11)-trien-6(12)-olídeo

O derivado semissintético **20** foi produzido a partir da desidroalogenação do derivado **16** em presença de $SOCl_2$ e piridina sob refluxo a 60 °C (condição **g**), por meio de reações de

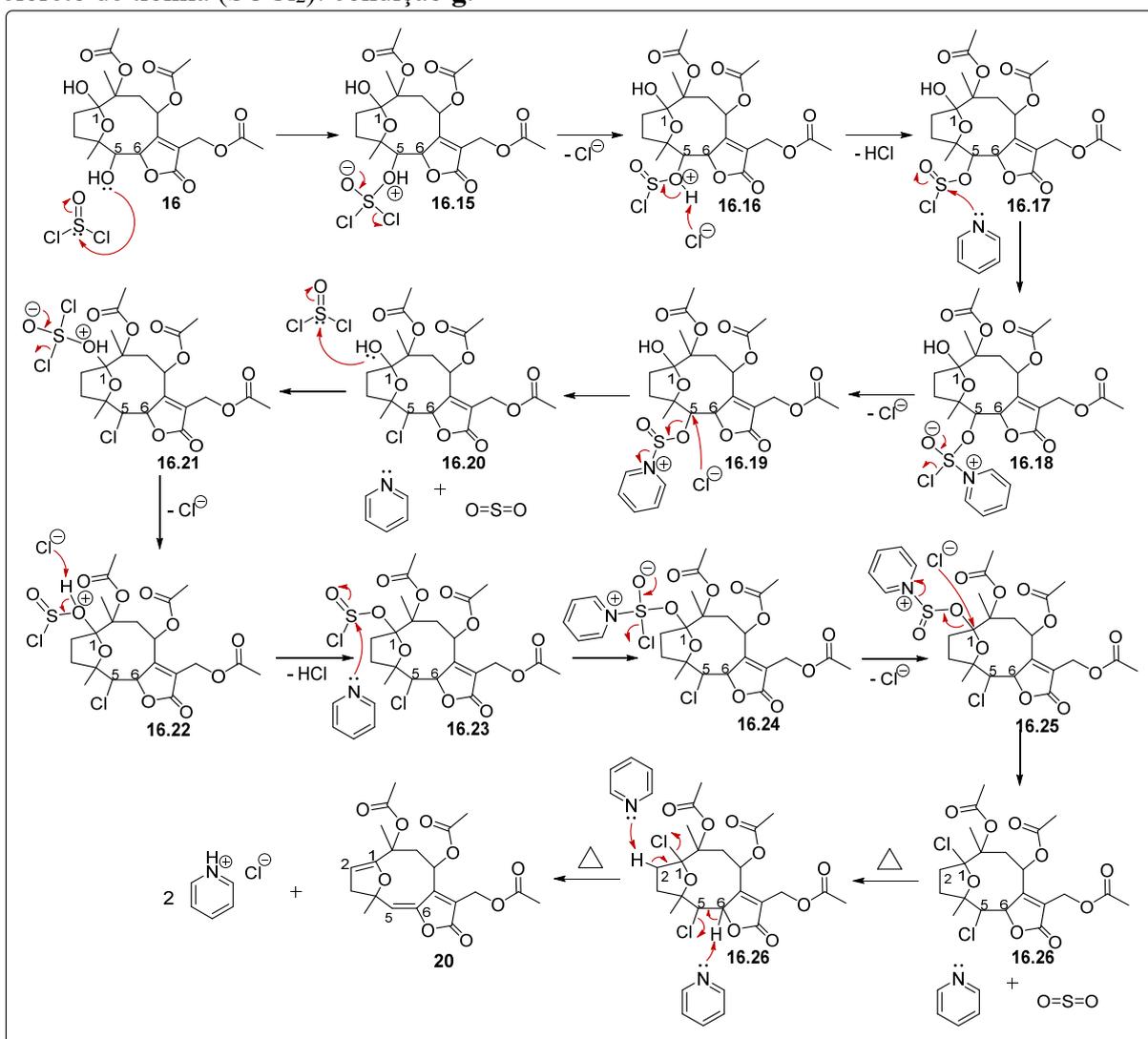
halogenação por substituição nucleofílica S_N2 seguida de eliminação E_2 , em mecanismo ilustrado no Esquema 30.

Figura 127 – Estrutura molecular do derivado semissintético **20**.



Fonte: adaptado de Bohlmann e colaboradores (1979).

Esquema 30 – Mecanismo de reação proposto para produção do derivado semissintético **20** com cloreto de tionila ($SOCl_2$): condição **g**.



Condição reacional: (**g**) $SOCl_2$, piridina, Ar, DCM, $-10\text{ }^\circ\text{C}$ (0,5 h) seguido por refluxo a $60\text{ }^\circ\text{C}$ (3,5 h).

Para tanto, a reação iniciou-se pelo ataque nucleofílico ao enxofre do SOCl_2 por parte da hidroxila na posição C-5 do intermediário de partida (**16**), com a formação de um complexo carregado (**16.15**). Em seguida, o reestabelecimento da ligação π entre S=O promoveu a eliminação de um cloro e a formação do intermediário "clorosulfito protonado" (**16.16**), o qual sofreu o ataque sobre o próton a partir do próprio cloreto gerado anteriormente, para a obtenção do intermediário **16.17**.

Posteriormente, o ataque da piridina ao clorosulfito **16.17** desencadeou a perda do segundo átomo de cloro e a formação de um novo intermediário carregado ("piridíniosulfito", **16.19**). O íon cloreto promoveu uma $\text{S}_{\text{N}}2$ na posição C-5. Essa etapa resultou na formação do intermediário halogenado em C-5 (**16.20**), em acordo com a reação de halogenação de Darzens (DARZENS, 1911).

Devido ao excesso de SOCl_2 , ocorreu um segundo ataque nucleofílico ao enxofre de outra molécula de cloreto de tionila, agora por parte da hidroxila do hemiacetal em C-1 do intermediário halogenado **16.20**. Essa etapa promoveu a halogenação também da posição C-1, seguido mesmo processo já descrito anteriormente, com a formação do intermediário dihalogenado **16.26**.

Em função da presença de piridina e de aquecimento (refluxo a $60\text{ }^\circ\text{C}$), o intermediário **16.26** sofreu uma dupla reação de eliminação dos halogênios das posições C-1 e C-5, em mecanismo do tipo E_2 (OUELLETTE; RAWN, 2014).

Nesse caso, a piridina promoveu o ataque aos hidrogênios vicinais em C-2 e C-6, respectivamente, com consequente formação de duplas ligações nas posições C-1/C-2 e C-5/C-6, para a obtenção do derivado semissintético **20**, além de duas unidades de cloridrato de piridínio.

A formação do derivado **20** duplamente insaturado em C-1/C-2 e C-5/C-6 foi comprovada a partir dos dados espectroscópicos de RMN ^1H (Figura 128) e bidimensionais (HSQC e HMBC, Figuras 129 e 130, respectivamente) para este, cujos valores observados de RMN ^1H e RMN ^{13}C estão apresentados na Tabela 33 juntamente com os dados comparativos descritos na literatura.

Quando comparados os dados de RMN do derivado **20** com o material de partida derivado **16** (para maiores detalhes vide *item 5.6.2.6*) foi possível observar a ausência dos sinais indicativos do grupo metilênico em C-2, dos hidrogênio oximetínicos em C-5 e C-6 e das hidroxilas nas posições C-1 e C-5.

Tabela 33 – Dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C para o derivado semissintético (**20**) e dados comparativos da literatura.

Posição	(20)	(BOHLMANN et al., 1979) ^a	
	δ ^1H <i>mult.</i> (J Hz)	δ ^{13}C	δ ^1H <i>mult.</i> (J Hz)
1	-	157,8	-
2	4,82 <i>dd</i> (3,2; 1,3)	94,1	5,07 <i>dd</i> (3; 2)
3a	2,78 <i>dd</i> (15,4; 1,3)	42,4	3,02 <i>dd</i> (3)
3b	2,49 <i>dd</i> (15,4; 3,2)		2,91 <i>dd</i> (2)
4	-	85,8	-
5	5,70 <i>s</i>	123,2	6,01 <i>s</i>
6	-	144,8	-
7	-	153,6	-
8	6,83 <i>d</i> (8,3)	66,2	5,98 <i>dd</i> (5; 2,5)
9a	3,08 <i>d</i> (14,2)	49,3	2,70 <i>dd</i> (15; 5)
9b	2,33 <i>dd</i> (14,2; 8,3)		2,40 <i>dd</i> (15; 2,5)
10	-	77,9	-
11	-	127,2	-
12	-	167,2	-
13a	5,12 <i>d</i> (12,9)	56,4	5,07 <i>d</i> (13,5)
13b	4,87 <i>d</i> (12,9)		4,85 <i>d</i> (13,5)
14	1,81 <i>s</i>	21,1	1,64 <i>s</i>
15	1,72 <i>s</i>	25,2	1,62 <i>s</i>
1'	-	169,20	-
2'	2,09 <i>s</i>	20,8	2,12 <i>s</i>
1''	-	170,2	-
2''	2,08 <i>s</i>	20,9	2,07 <i>s</i>
1'''	-	169,25	-
2'''	2,04 <i>s</i>	22,1	2,02 <i>s</i>

(300 MHz ^1H , 75 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 295 K) (270 MHz ^1H , CDCl_3 , temperatura não indicada)

^a, não foram encontrados relatos na literatura com a descrição dos dados de RMN ^{13}C para o composto **20**, por isso realizou-se a comparação apenas em relação aos dados de RMN ^1H .

Em vez disso, foram detectados os sinais dos hidrogênios olefínicos em δ 4,82 *dd* (1H, $J=3,2; 1,3$; H-2) e em δ 5,70 *s* (1H, H-5) ligados respectivamente aos carbonos em C-2 (δ 94,1) e em C-5 (δ 123,2).

A partir do mapa de correlação a longa distância HMBC foram confirmadas as posições das insaturações em C-1/C-2 e C-5/C-6, considerando-se por exemplo, as correlações entre o hidrogênio em C-2 com os carbonos olefínico oxigenado em δ 157,8 (C-1) e metilênico em C-3 (δ 42,4), bem como as correlações do hidrogênio em C-5 com os carbono oxigenado em C-4 (δ 85,8) e o γ -carbono do anel lactônico em δ 144,8 (C-6).

Esse achados comprovaram a formação do derivado **20** a partir da desidroalogenação do derivado **16**.

Figura 128 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , 295 K) para o derivado semissintético **20**.

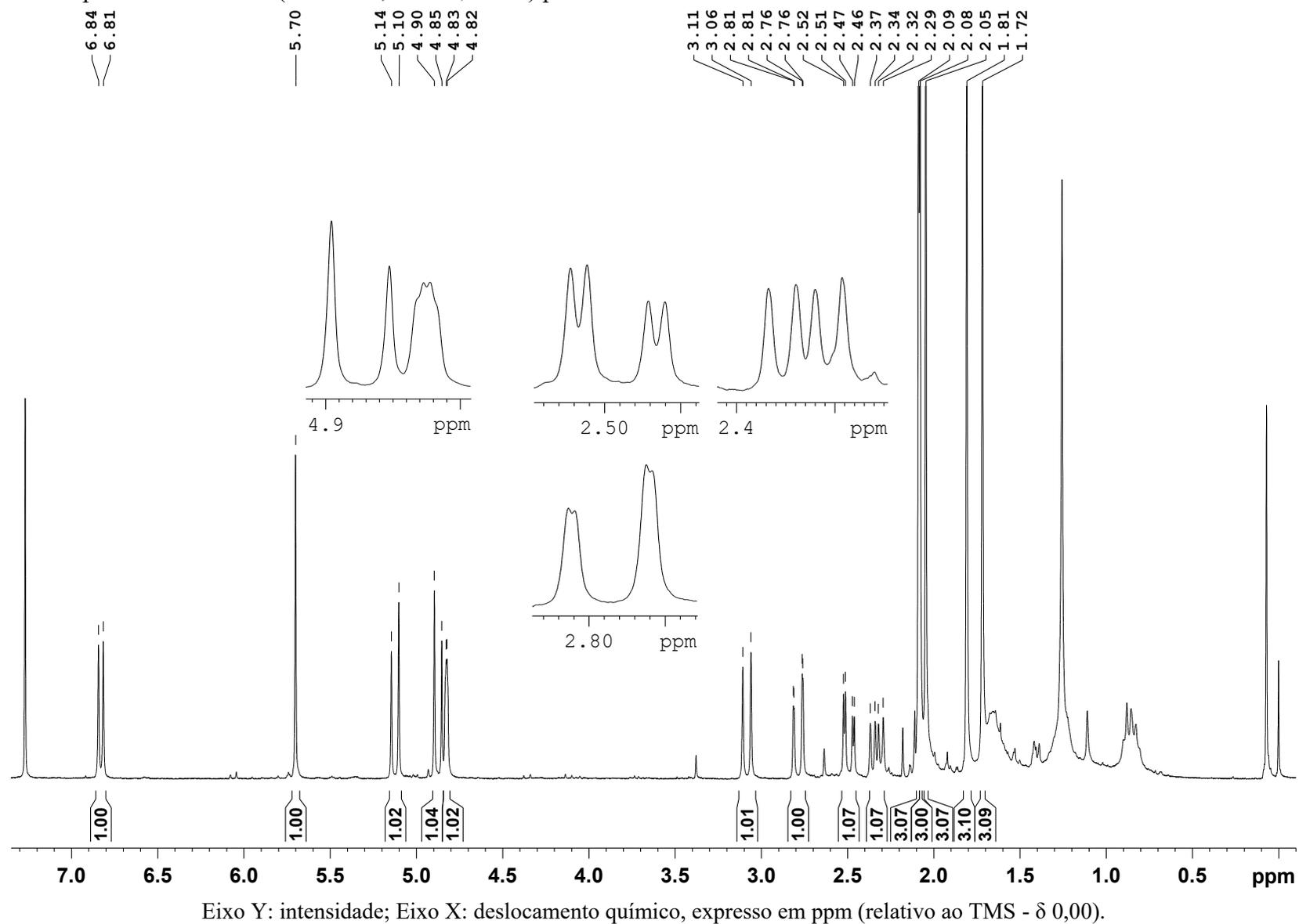
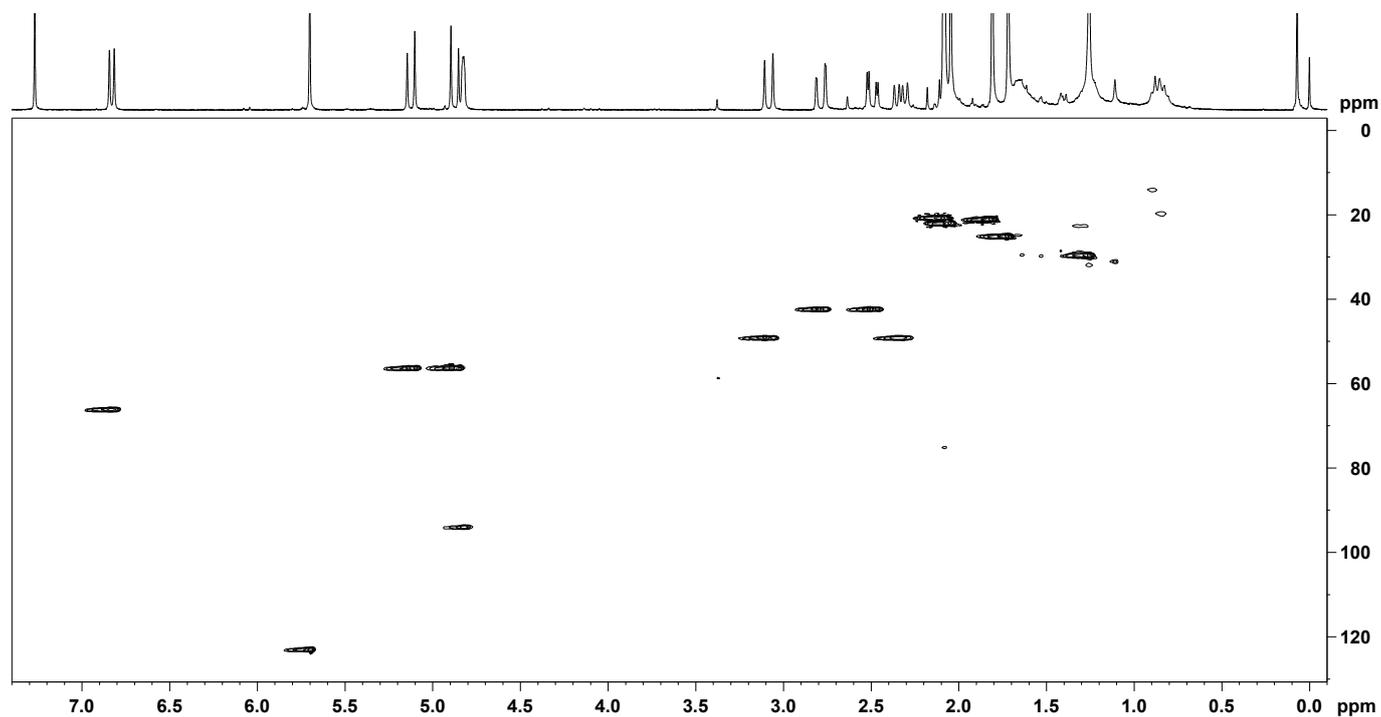
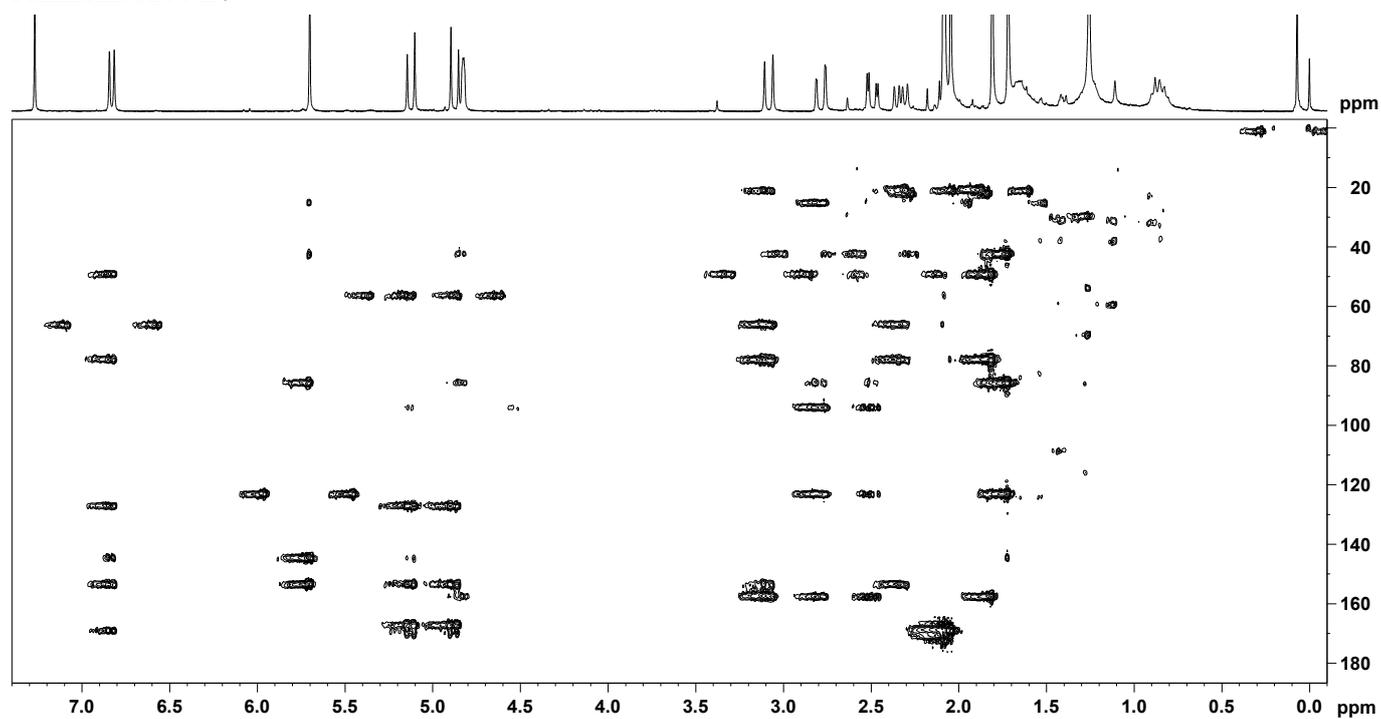


Figura 129 – Mapa de correlação HSQC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 295 K) para o derivado semissintético **20**.



Eixo Y: projeção para ^{13}C , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00); Eixo X: deslocamento químico ^1H , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00).

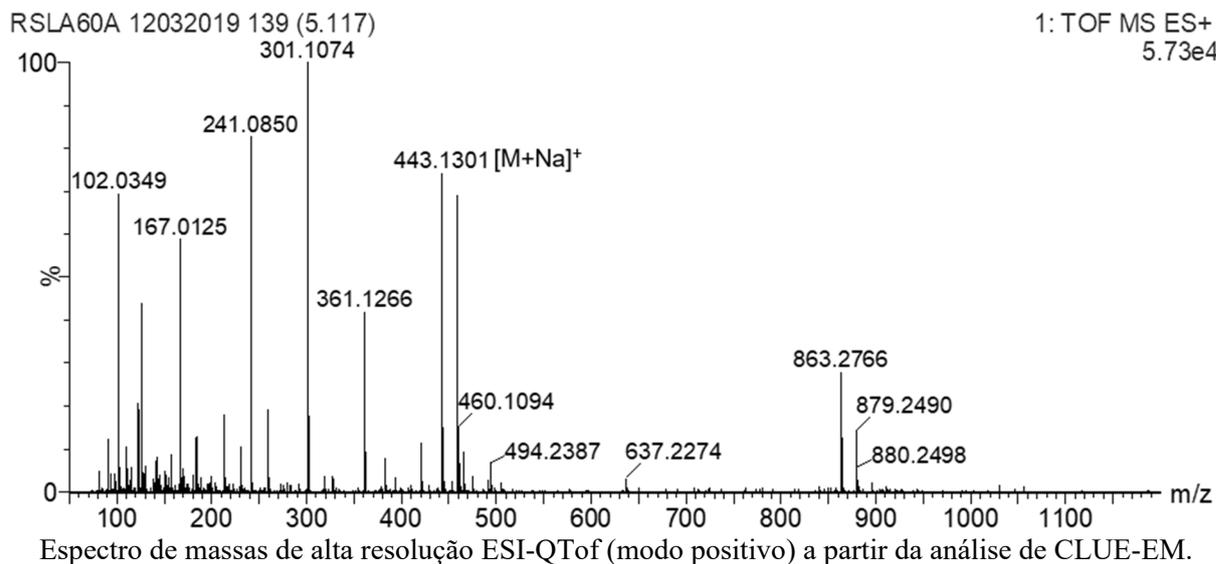
Figura 130 – Mapa de correlação HMBC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 295 K) para o derivado semissintético **20**.



Eixo Y: projeção para ^{13}C , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00); Eixo X: deslocamento químico ^1H , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00).

A análise de ESI-QToF EM confirmou a proposta estrutural para o derivado semissintético **20** pela presença no espectro de EM *full scan* (Figura 131) do íon molecular adutado com sódio m/z 443,1301 $[C_{21}H_{24}O_9+Na]^+$ (calculado 443,1318).

Figura 131 – Espectro ESI-QToF EM *full scan* (100-1200 Da) para o derivado semissintético **20**.



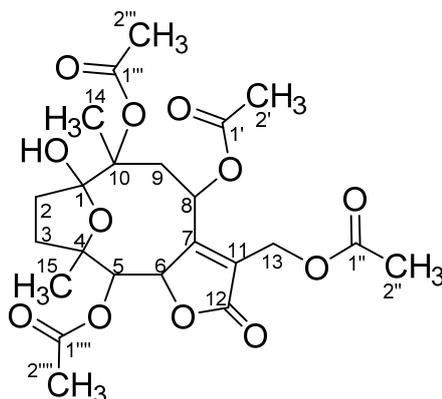
O derivado semissintético **20** correspondeu à LS 8,10,13-triacetoxi-1(4)-epoxi-germacra-1(2),5(6),7(11)-trien-6(12)-olídeo (Figura 127), cuja fórmula molecular é $C_{21}H_{24}O_9$. Este composto já foi obtido a partir de reação de semissíntese com a acetilação de hirsutinolídeos (BOHLMANN; MAHANTA; DUTTA, 1979; BOHLMANN et al., 1979), ainda que empregando estratégias reacionais diferentes à utilizada neste estudo.

Da mesma forma, os análogos 8-metacrilóiloxi (BOHLMANN et al., 1983) e 10-hidroxi (BOHLMANN et al., 1981) também já foram obtidos de reação de semissíntese de hirsutinolídeos.

Apesar disso, é importante ressaltar que não foram encontrados relatos da investigação do potencial biológico do derivado semissintético **20**.

5.6.2.11 Derivado (**21**): 5,8,10,13-tetraacetoxi-1(4)-epoxi-1-hidroxigermacr-7(11)-en-6(12)-olídeo

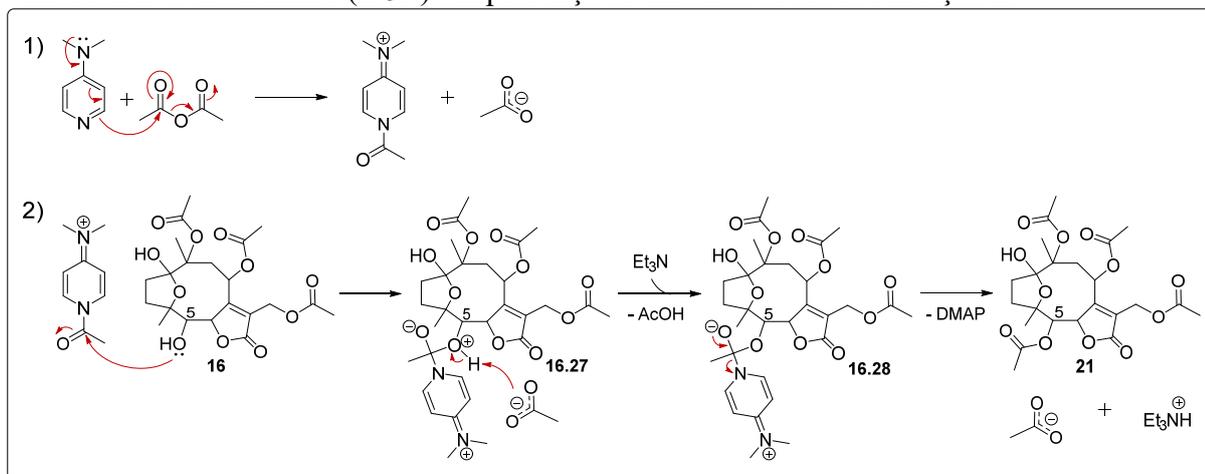
O derivado semissintético **21** foi produzido a partir da reação de acetilação do derivado **16** em presença de Ac_2O e catalisado por DMAP (condição **h**), conforme demonstrado no Esquema 31 em acordo com mecanismo descrito da literatura (XU et al., 2005; MANDAI et al., 2016).

Figura 132 – Estrutura molecular do derivado semissintético **21**.

Fonte: adaptado de Jimenez e colaboradores (1995).

DMAP tem sido empregado com agente catalítico em reações envolvendo o Ac_2O na acetilação de produtos naturais, incluindo as LS (CHEN et al., 2017; CHOODEJ; PUDHOM; MITSUNAGA, 2018).

Esquema 31 – Mecanismo de reação proposto para acetilação do derivado semissintético **21** com DMAP e trietilamina (Et_3N) em presença de anidrido acético: condição **h**.



Condição reacional: (**h**) 1) DMAP, Et_3N , Ac_2O , DCM, $-10\text{ }^\circ\text{C}$, 0,5 h, 2) derivado **16**, DCM, rt, 0,5 h.

O passo chave para essa reação foi dependente do ataque nucleofílico inicial do DMAP sobre o agente acetilante Ac_2O , em que uma das carbonilas do anidrido foi atacada pelo tautômero de DMAP promovendo a formação do intermediário catalítico acilpiridínio e de um ânion acetato. Em seguida, o próprio cátion acilpiridínio sofreu o ataque nucleofílico do grupo hidroxila na posição C-5 do derivado de partida **16**, para a formar do derivado carregado **16.27**.

O intermediário **16.27**, por sua vez, foi desprotonado pelo ânion acetato que atuou como uma base de Brönsted aumentando a reatividade da hidroxila, obtendo-se o intermediário **16.28**. Por fim, o deslocamento da carga negativa do oxianion (**16.28**) com conseqüente rompimento

da ligação da porção acetila do cátion piridínio permitiu a formação do derivado semissintético acetilado na posição C-5 (**21**). Além deste, houve também a liberação de um sal de piridínio, o qual foi neutralizado pela base auxiliar Et₃N resultado na regeneração do catalisador DMAP.

A Tabela 34 apresenta as dados espectroscópicos de RMN ¹H e RMN ¹³C para o derivado **21** em comparação com dados do material de partida – nesse caso o derivado **16**, afim de se confirmar se a reação foi bem sucedida.

Tabela 34 – Dados de RMN ¹H e RMN ¹³C para o derivado semissintético (**21**) e dados comparativos com material de partida (**16**).

Posição	(21)		(16) ^a	
	δ ¹ H <i>mult.</i> (J Hz)	δ ¹³ C	δ ¹ H <i>mult.</i> (J Hz)	δ ¹³ C
1	-	109,5	-	108,8
2a	2,17-2,33 <i>m</i>	33,6	2,08-2,18 <i>m</i>	33,9
2b	1,77-1,88 <i>m</i>		1,78-1,88 <i>m</i>	
3a	1,98-2,13 <i>m</i>	34,3	2,09-2,23 <i>m</i>	34,5
3b	1,82-1,93 <i>m</i>		2,09-2,23 <i>m</i>	
4	-	85,0	-	86,5
5	4,88-4,96 <i>m</i>	73,4	3,57 <i>d</i> (9,1)	75,9
6	5,10 <i>d</i> (9,5)	79,4	5,11 <i>d</i> (9,1)	82,0
7	-	166,5	-	168,6
8	5,92 <i>dd</i> (3,7; 3,5)	68,3	5,90 <i>dd</i> (3,5; 3,4)	68,4
9a	2,58 <i>dd</i> (15,5; 3,7)	41,2	2,58 <i>dd</i> (15,6; 3,5)	41,8
9b	2,04-2,09 <i>m</i>		2,15 <i>d</i> (15,6)	
10	-	86,7	-	87,0
11	-	124,0	-	123,1
12	-	170,2	-	171,2
13a	4,92 <i>d</i> (12,7)	55,7	4,91 <i>d</i> (12,6)	55,7
13b	4,74 <i>d</i> (12,7)		4,74 <i>d</i> (12,6)	
14	1,62 <i>s</i>	17,6	1,62 <i>s</i>	17,5
15	1,56 <i>s</i>	22,4	1,50 <i>s</i>	21,9
1'	-	169,5	-	169,7
2'	2,05 <i>s</i>	20,5	2,06 <i>s</i>	20,6
1''	-	170,1	-	170,3
2''	2,09 <i>s</i>	20,8	2,09 <i>s</i>	20,9
1'''	-	171,4	-	171,7
2'''	2,04 <i>s</i>	22,1	2,04 <i>s</i>	22,2
1''''	-	170,2	-	-
2''''	2,14 <i>s</i>	20,6	-	-

^a, devido ao fato de não terem sido encontrados relatos na literatura para o derivado **21**, este foi comparado ao análogo C-5 hidroxilado correspondente ao material de partida (derivado **16**) da reação de produção do derivado **21**.

Os experimentos de RMN para o derivado **21** foram desenvolvido em temperatura elevada, a 308 K (34,5 °C) a fim de se favorecer a melhor resolução dos sinais e a observação das correlações nas análises bidimensionais.

Figura 133 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , 308 K) para o derivado semissintético **21**.

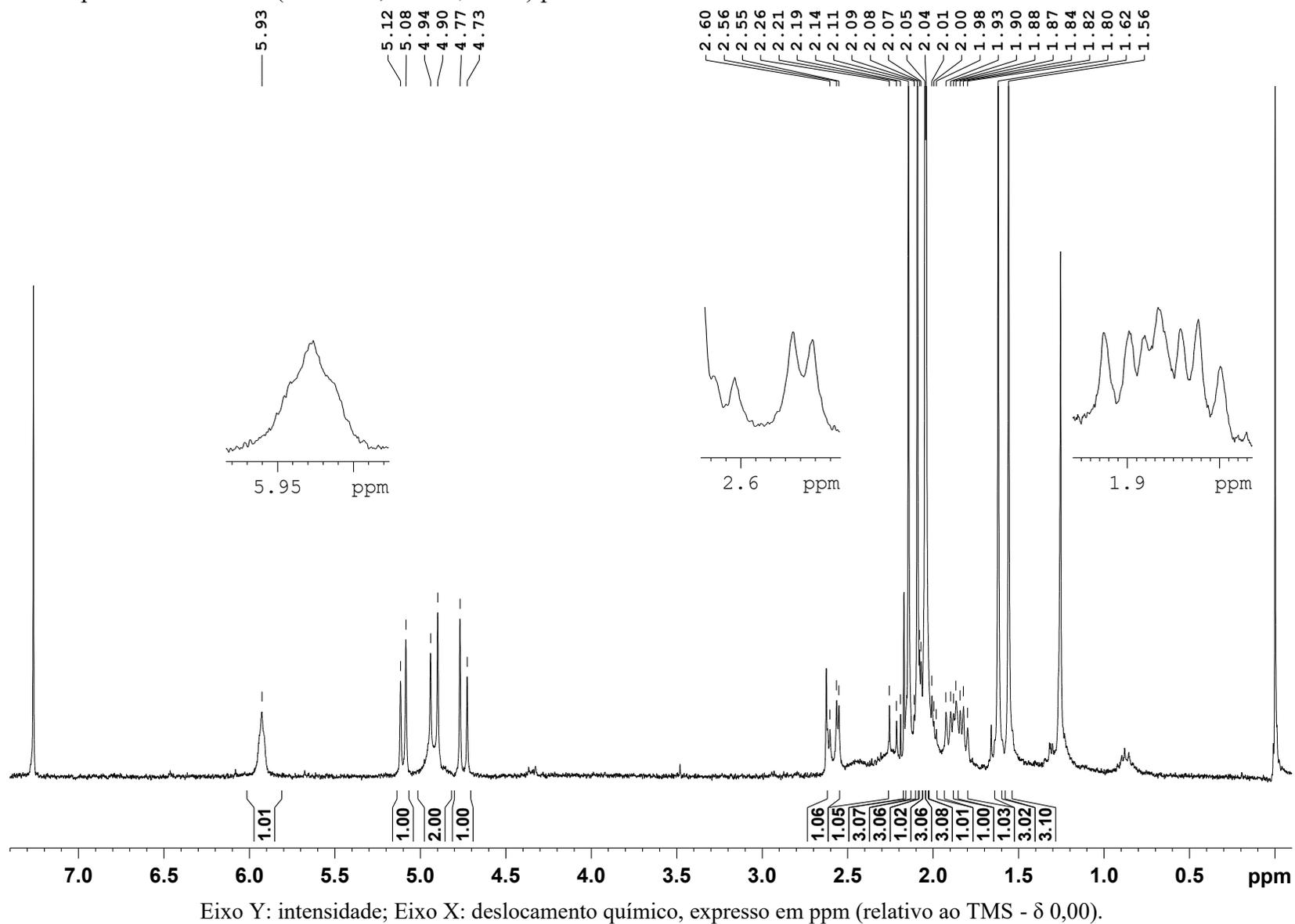
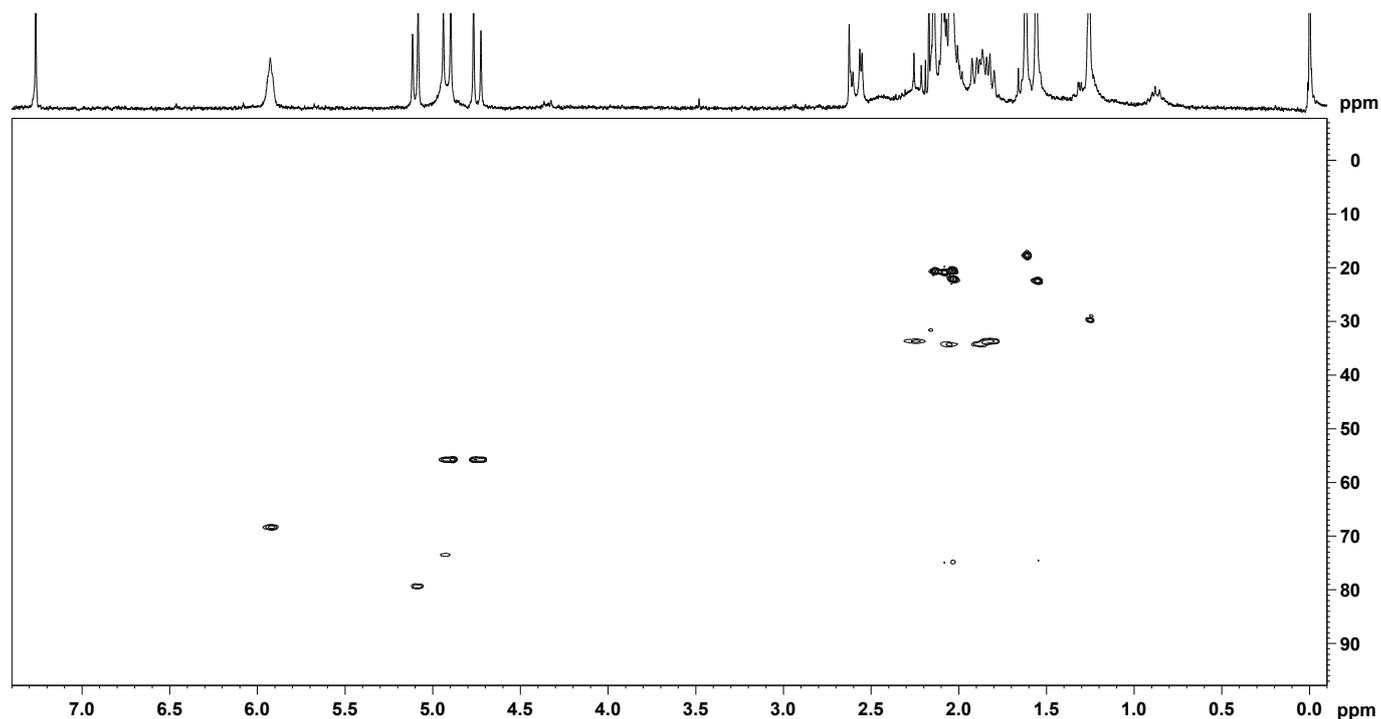
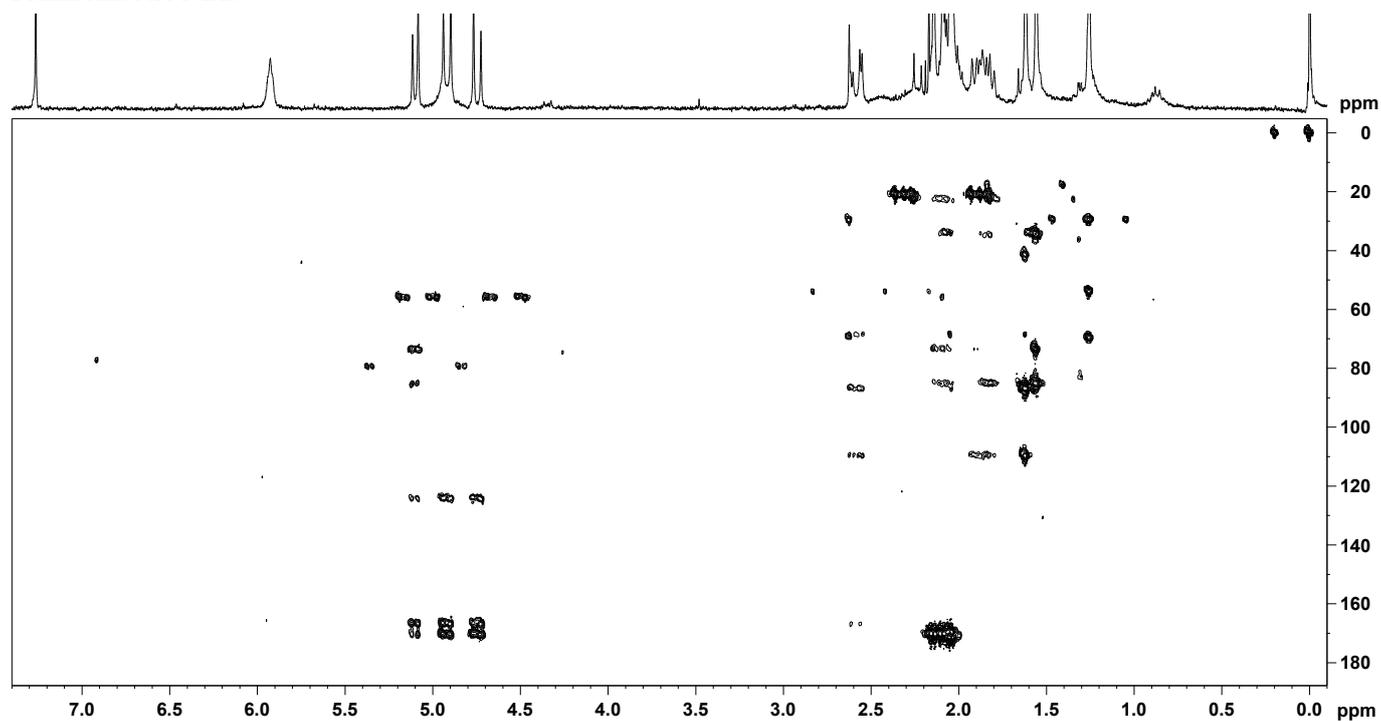


Figura 134 – Mapa de correlação HSQC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 308 K) para o derivado semissintético **21**.



Eixo Y: projeção para ^{13}C , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00); Eixo X: deslocamento químico ^1H , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00).

Figura 135 – Mapa de correlação HMBC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 308 K) para o derivado semissintético **21**.



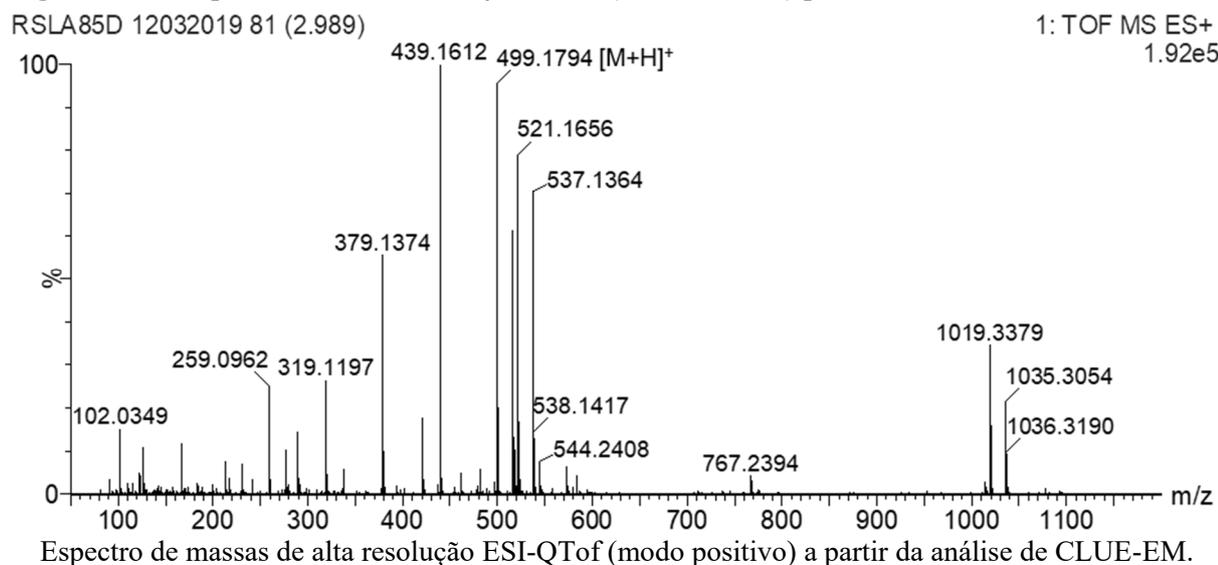
Eixo Y: projeção para ^{13}C , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00); Eixo X: deslocamento químico ^1H , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00).

Os dados espectroscópicos de RMN ^1H (Figura 133) e bidimensionais (HSQC e HMBC, Figuras 134 e 135) do derivado **21** em comparação com o material de partida derivado **16** (para maiores detalhes vide *item 5.6.2.6*) evidenciou que a acetilação da posição C-5 foi bem sucedida.

Esta hipótese foi confirmada a partir dos sinais dos hidrogênios acetílicos na forma de simpleto em δ 2,14 (3H, H-2''') e do carbono carbonílico ressonando em δ 170,1 (C-1''') observados para **21**, e pela correlação entre o hidrogênio oximetínico em δ 5,92 *dd* (1H, $J=3,7$; 3,5 Hz; H-5) em C-5 (δ 68,3) com a carbonila em C-1''' (δ 170,1) do respectivo substituinte acetoxi.

A análise de ESI-QToF EM confirmou a proposta estrutural para o derivado semissintético **21** pela presença no espectro de EM *full scan* (Figura 136) do íon molecular protonado m/z 499,1794 [$\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{O}_{12}+\text{H}$] $^+$ (calculado 499,1816).

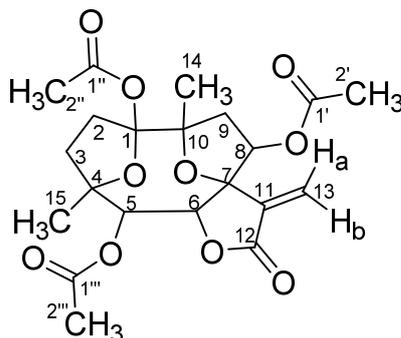
Figura 136 – Espectro ESI-QToF EM *full scan* (100-1200 Da) para o derivado semissintético **21**.



O derivado semissintético **21** correspondeu à LS 5,8,10,13-tetraacetoxi-1(4)-epoxi-1-hidroxigermacr-7(11)-en-6(12)-olídeo (Figura 132), cuja fórmula molecular é $\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{O}_{12}$. Embora o análogo 8,10,13-triacetoxi-hirsutinolídeo hidroxilado em C-5, já tenha sido reportado na literatura (FLORES-GUZMÁN et al., 2019), não foram encontrados relatos para o derivado tetra-acetilado **21**, indicando se tratar de um composto novo.

5.6.2.12 Derivado (**22**): 1,5,8-triacetoxi-1(4),7(10)-diepoxi-germacr-11(13)-en-6(12)-olídeo

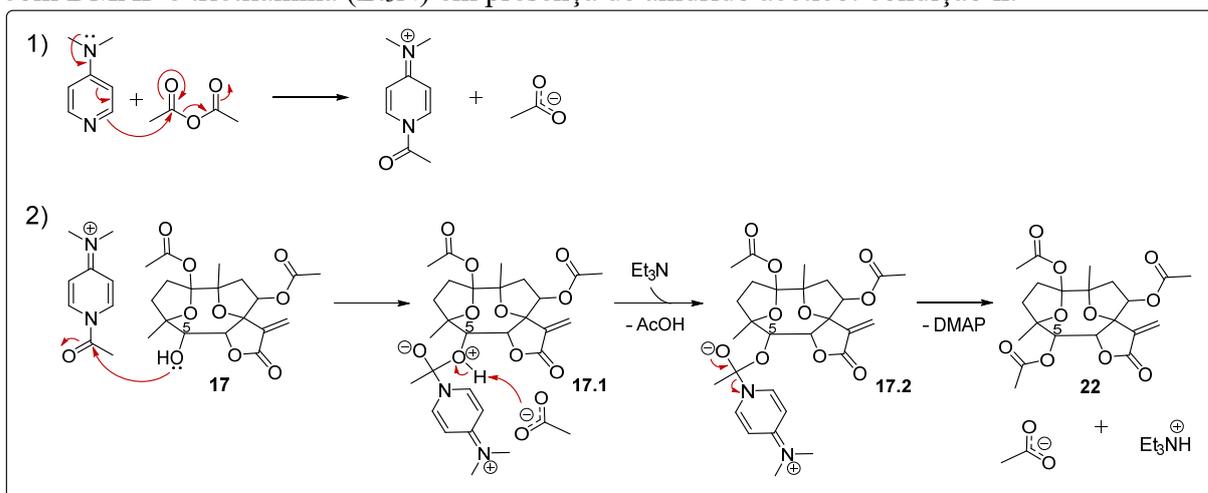
Figura 137 – Estrutura molecular do derivado semissintético **22**.



Fonte: adaptado de Jakupovic e colaboradores (1986b).

A produção do derivado semissintético **22** a partir do derivado **17** foi também baseada na reação acetilação com Ac₂O mediada pelo catalisador DMAP (condição **h**), seguindo mecanismo demonstrado no Esquema 32, conforme descrito anteriormente (vide *item 5.6.2.11*).

Esquema 32 – Mecanismo de reação proposto para acetilação do derivado semissintético **22** com DMAP e trietilamina (Et₃N) em presença de anidrido acético: condição **h**.



Condição reacional: (**h**) 1) DMAP, Et₃N, Ac₂O, DCM, -10 °C, 0,5 h, 2) derivado **17**, DCM, rt, 0,5 h.

A Tabela 35 apresenta as dados espectroscópicos de RMN ¹H e RMN ¹³C para o derivado **22** em comparação com dados do material de partida – nesse caso o derivado **17**, afim de se confirmar se a reação foi bem sucedida.

Os dados espectroscópicos de RMN ¹H (Figura 138) e bidimensionais (HSQC e HMBC, Figuras 139 e 140, respectivamente) do derivado **22** em comparação com o material de partida derivado **17** (para maiores detalhes vide *item 5.6.2.7*) revelou uma eficiente acetilação da função álcool na posição C-5.

Tabela 35 – Dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C para o derivado semissintético (**22**) e dados comparativos com material de partida (**17**).

Posição	(22)		(17) ^a	
	δ ^1H <i>mult.</i> (J Hz)	δ ^{13}C	δ ^1H <i>mult.</i> (J Hz)	δ ^{13}C
1	-	112,0	-	112,1
2a	2,62-2,76 <i>m</i>	31,2	2,51-2,63 <i>m</i>	31,6
2b	2,17-2,27 <i>m</i>		2,17-2,27 <i>m</i>	
3a	2,46-2,58 <i>m</i>	36,5	2,51-2,63 <i>m</i>	36,8
3b	1,87-1,94 <i>m</i>		1,97-2,15 <i>m</i>	
4	-	87,2	-	89,,2
5	5,33 <i>d</i> (10,4)	71,9	4,00 <i>d</i> (10,3)	73,2
6	4,67 <i>d</i> (10,4)	81,4	4,68 <i>d</i> (10,3)	84,8
7	-	89,7	-	89,5
8	5,28 <i>dd</i> (8,3; 6,2)	81,8	5,28 <i>dd</i> (8,5; 7,5)	82,8
9a	3,02 <i>dd</i> (14,2; 8,3)	39,6	3,02 <i>dd</i> (13,9; 8,5)	40,1
9b	1,91 <i>dd</i> (14,2; 6,2)		1,89 <i>dd</i> (13,9; 7,5)	
10	-	85,5	-	85,7
11	-	135,8	-	136,9
12	-	167,2	-	167,7
13a	6,51 <i>s</i>	128,7	6,54 <i>s</i>	129,4
13b	5,79 <i>s</i>		5,78 <i>s</i>	
14	1,41 <i>s</i>	22,6	1,38 <i>s</i>	22,8
15	1,45 <i>s</i>	20,0	1,44 <i>s</i>	19,4
1'	-	170,6	-	171,2
2'	1,96 <i>s</i>	20,8	1,96 <i>s</i>	21,1
1''	-	168,0	-	168,2
2''	2,04 <i>s</i>	22,0	2,04 <i>s</i>	22,3
1'''	-	170,0	-	-
2'''	2,11 <i>s</i>	20,6	-	-
	(300 MHz ^1H , 75 MHz ^{13}C , CDCl ₃ , 295 K)		(300 MHz ^1H , 75 MHz ^{13}C , CDCl ₃ , 295 K)	

^a, uma vez que não foram encontrados relatos na literatura com a descrição dos dados de RMN para o composto **22**, este foi comparado ao análogo C-5 hidroxilado correspondente ao material de partida (derivado **17**) da reação de produção do derivado **22**.

A existência dos sinais dos hidrogênios simpleto em δ 2,11 (3H, H-2''') e do carbono carbonílico ressonando em δ 170,0 (C-1''') do substituinte acetoxi, este último tendo correlação com o hidrogênio oximetínico em δ 5,33 *d* (1H, $J=10,4$ Hz; H-5) na posição C-5 (δ 71,9), auxiliaram para confirmar a obtenção do derivado acetila **22**.

A análise de ESI-QToF EM confirmou a proposta estrutural para o derivado semissintético **22** pela presença no espectro de EM *full scan* (Figura 141) do íon molecular protonado m/z 439,1612 [C₂₁H₂₆O₁₀+H]⁺ (calculado 439,1604). O derivado semissintético **22** correspondeu à LS 1,5,8-triacetoxi-1(4),7(10)-diepoxi-germacr-11(13)-en-6(12)-olídeo (Figura 137), cuja fórmula molecular é C₂₁H₂₆O₁₀. Assim como observado para seu precursor, o derivado **17**, esta é a primeira vez que o derivado semissintético **22** está sendo reportado na literatura, indicando também se tratar de um composto novo.

Figura 138 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , 295 K) para o derivado semissintético **22**.

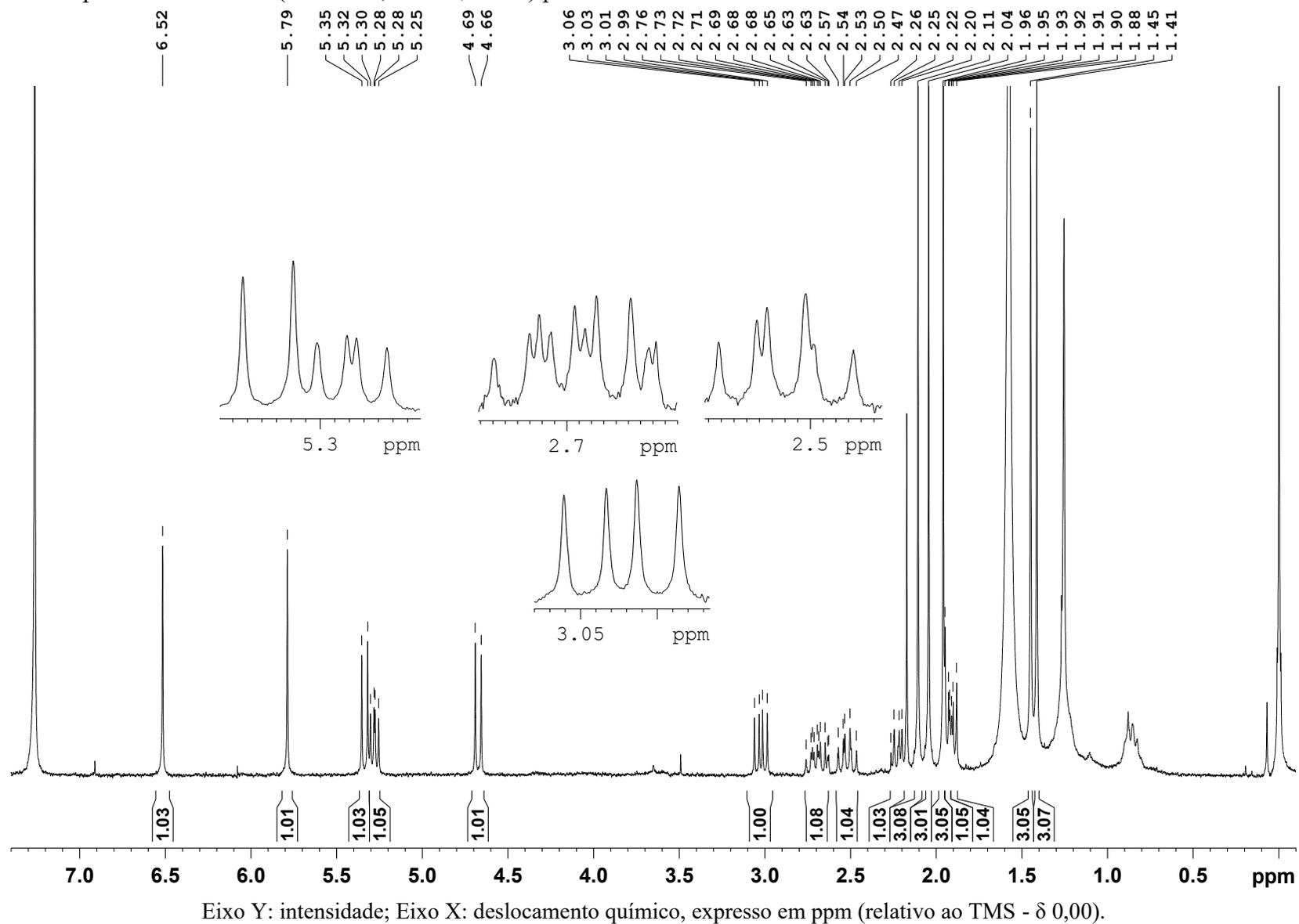
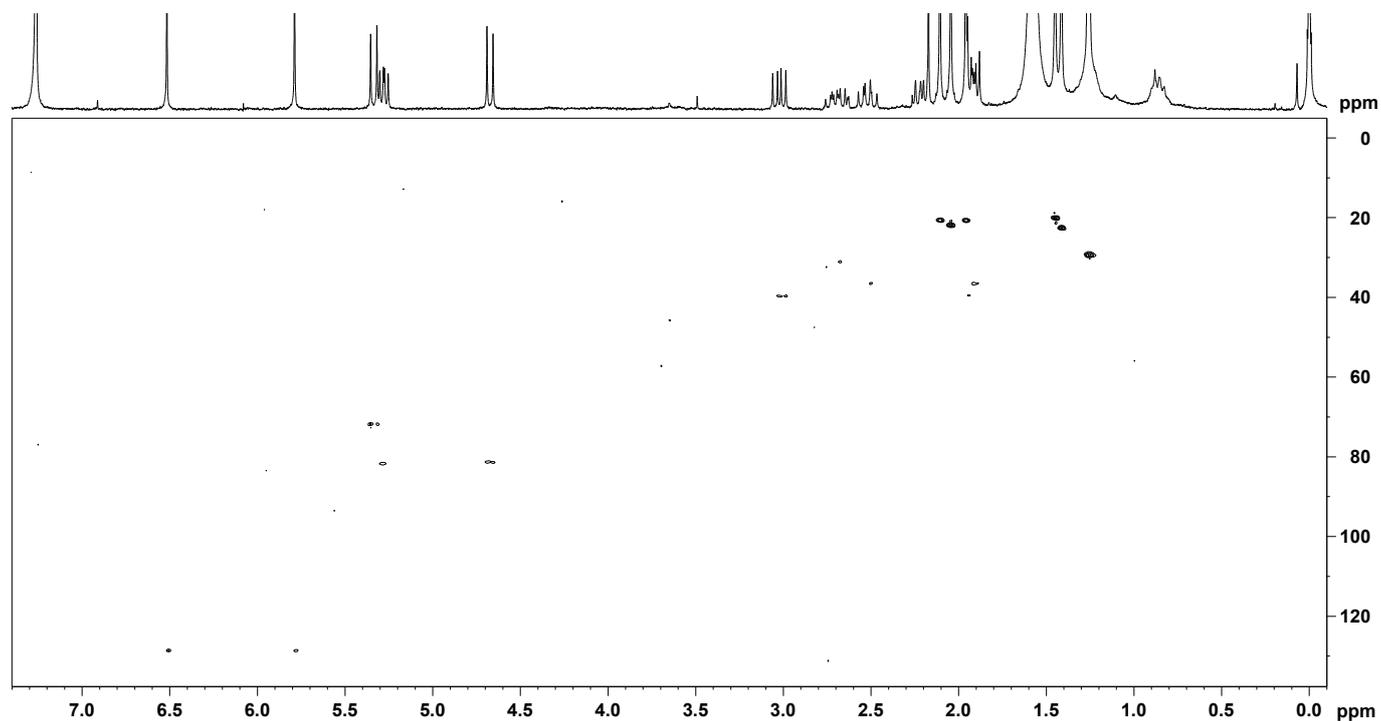
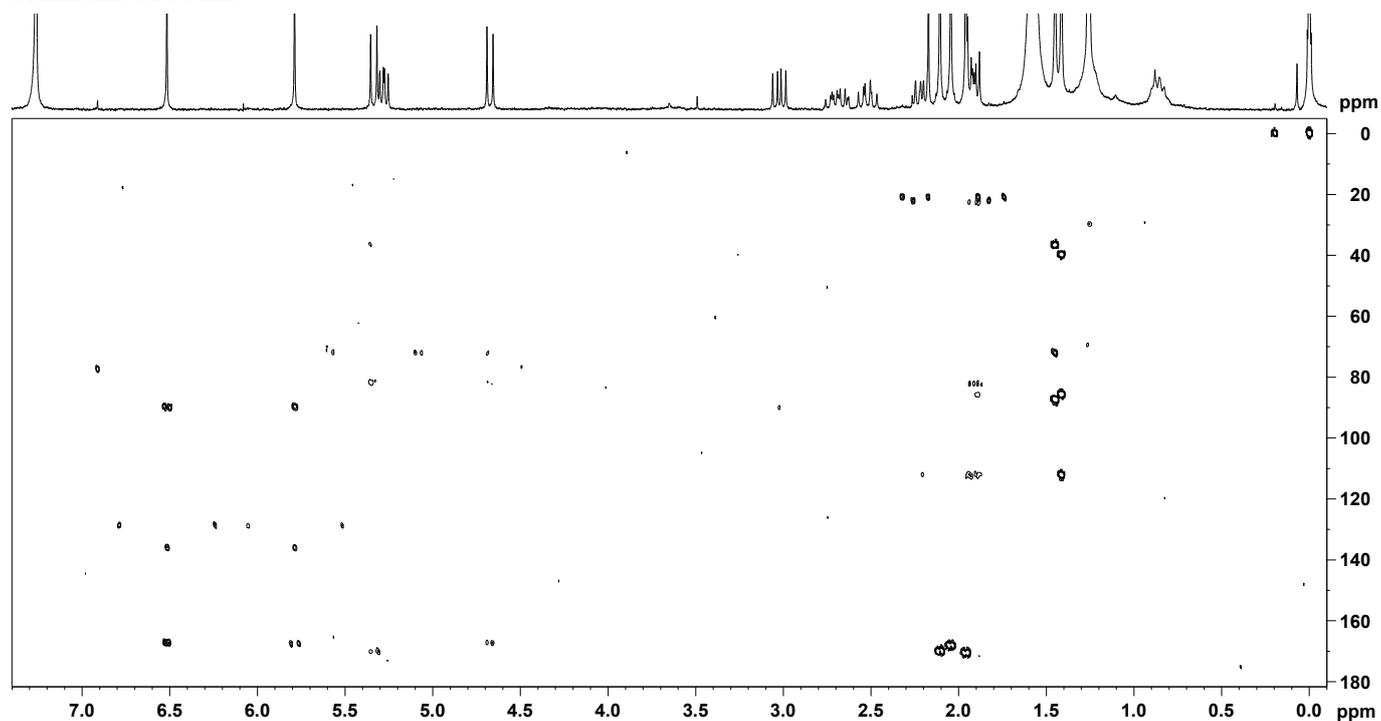


Figura 139 – Mapa de correlação HSQC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 295 K) para o derivado semissintético **22**.



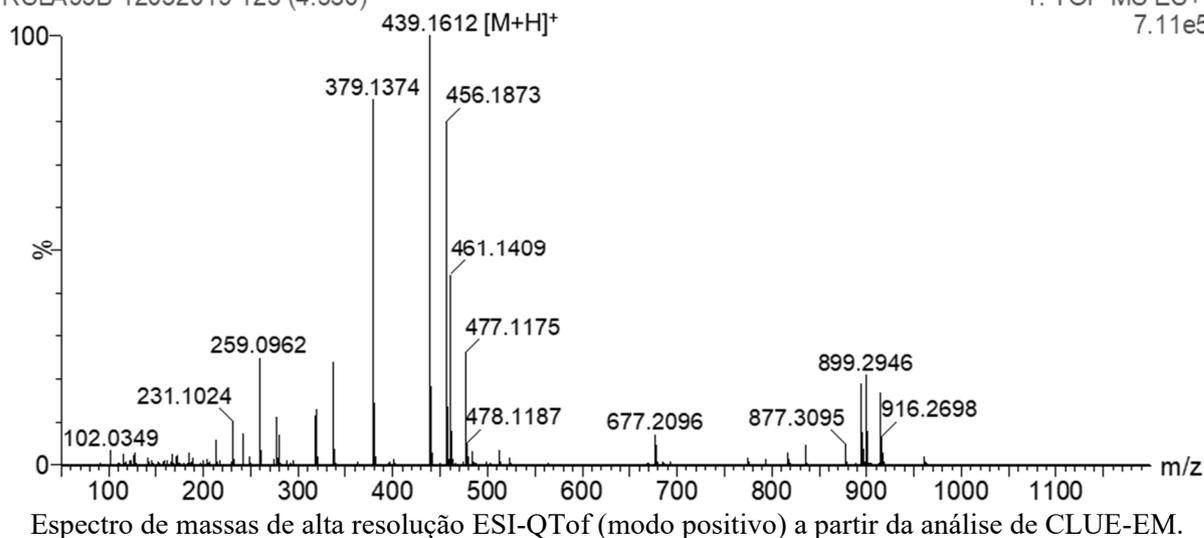
Eixo Y: projeção para ^{13}C , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00); Eixo X: deslocamento químico ^1H , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00).

Figura 140 – Mapa de correlação HMBC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 295 K) para o derivado semissintético **22**.



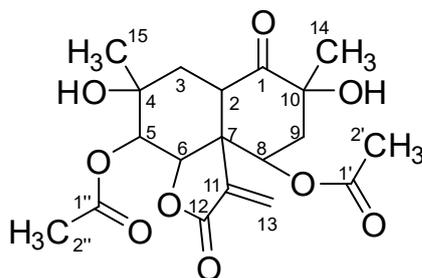
Eixo Y: projeção para ^{13}C , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00); Eixo X: deslocamento químico ^1H , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00).

Figura 141 – Espectro ESI-QToF EM *full scan* (100-1200 Da) para o derivado semissintético **22**.
RSLA95B 12032019 123 (4.530)



5.6.2.13 Derivado (**23**): 5,8-diacetoxi-vernomargolídeo

Figura 142 – Estrutura molecular do derivado semissintético **23**.



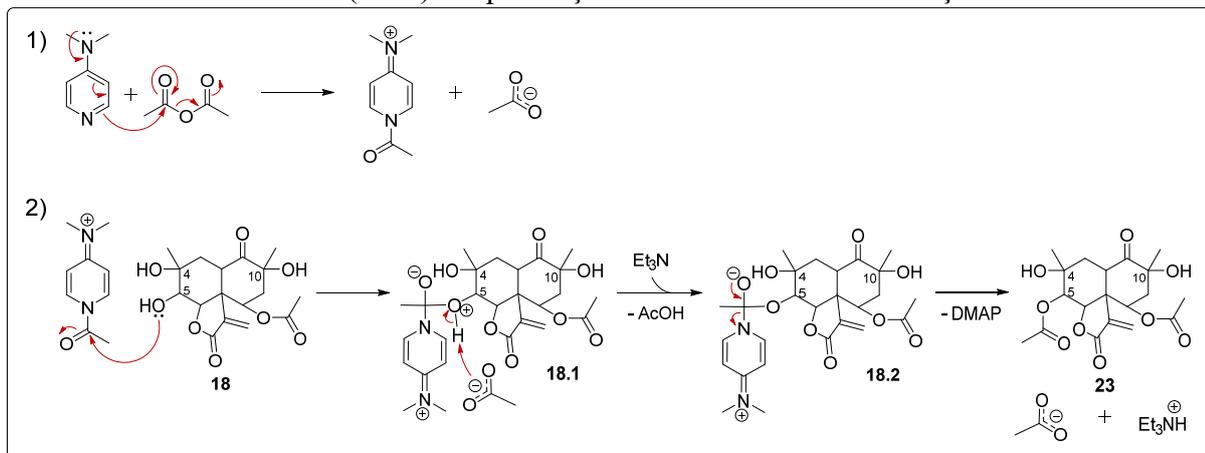
Fonte: adaptado de Jakupovic e colaboradores (1986a).

A reação acetilação catalisada pelo DMAP empregando o agente acetilante Ac₂O (condição **h**) também foi utilizada para a produção do derivado semissintético **23** a partir do derivado **18**, conforme mecanismo discutido anteriormente (vide *item 5.6.2.11*), ilustrado no Esquema 33.

É importante ressaltar que a tentativa inicial de acetilação em todas as posições hidroxilas C-4, C-5 e C-10 não aconteceu. A ineficiência da reação para acetilação nas posições C-4 e C-10 pode ser explicada pelo impedimento estérico causado pelos grupos metila geminais de ambas as posições (FISCHER; XU; ZIPSE, 2006).

A confirmação da acetilação da função álcool na posição C-5 do derivado **18** se deu a partir da comparação dos dados de RMN ¹H (Figura 143) e bidimensionais (HSQC e HMBC, Figuras 144 e 145) do derivado **23** com o material de partida (derivado **18** – para maiores detalhes vide *item 5.6.2.8*).

Esquema 33 – Mecanismo de reação proposto para acetilação do derivado semissintético **23** com DMAP e trietilamina (Et_3N) em presença de anidrido acético: condição **h**.



Condição reacional: (**h**) 1) DMAP, Et_3N , Ac_2O , DCM, $-10\text{ }^\circ\text{C}$, 0,5 h, 2) derivado **18**, DCM, rt, 0,5 h.

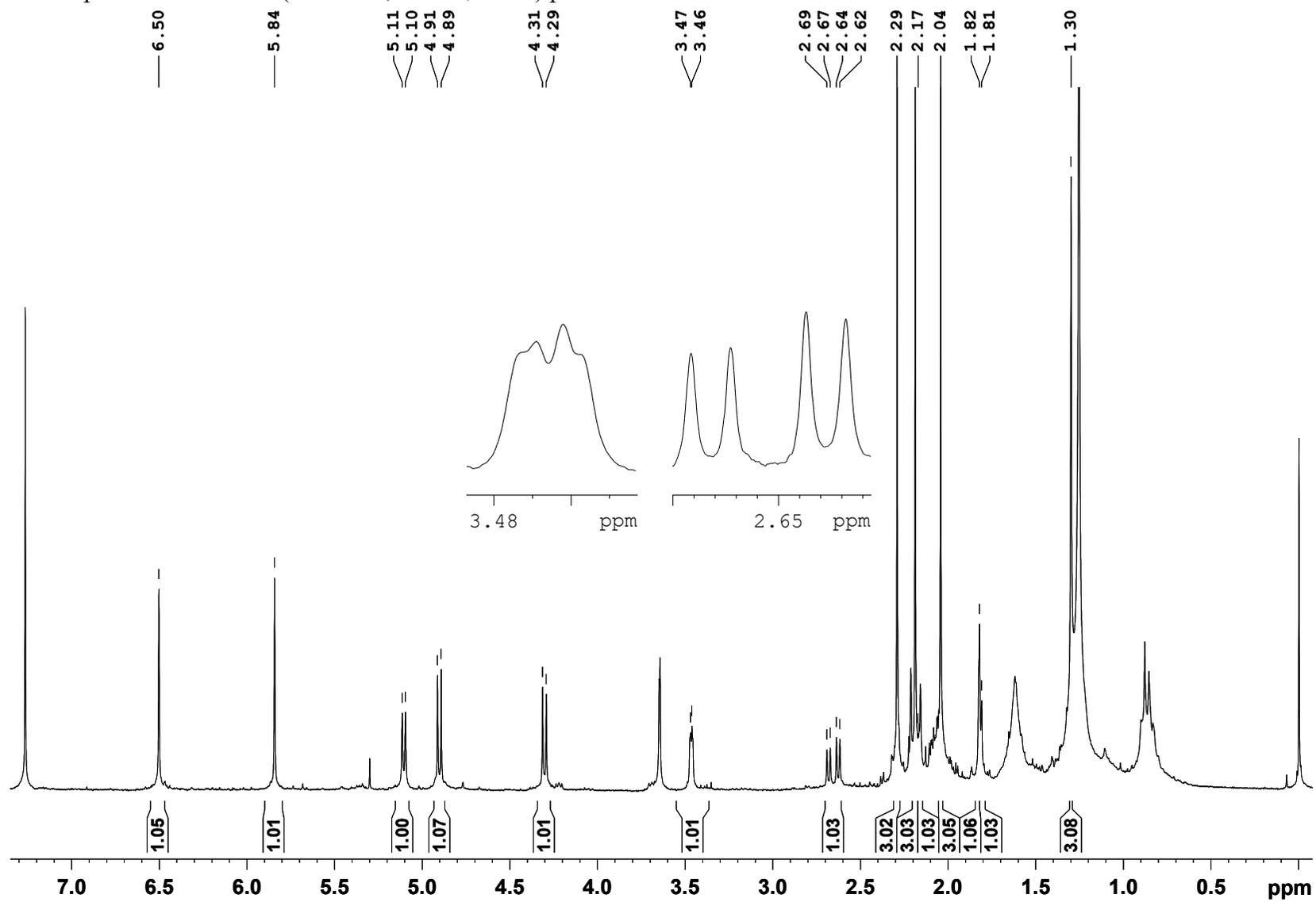
A Tabela 36 apresenta os dados espectroscópicos de RMN ^1H e RMN ^{13}C para o derivado **23** em comparação com dados do material de partida – nesse caso o derivado **18**.

Tabela 36 – Dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C para o derivado semissintético (**23**) e dados comparativos com material de partida (**18**).

Posição	(23)		(18)^a	
	$\delta\text{ }^1\text{H mult. (J Hz)}$	$\delta\text{ }^{13}\text{C}$	$\delta\text{ }^1\text{H mult. (J Hz)}$	$\delta\text{ }^{13}\text{C}$
1	-	208,8	-	209,4
2	3,46 <i>dd</i> (3,5; 1,4)	52,0	3,37 <i>d</i> (4,4)	53,4
3a	1,82 <i>d</i> (1,4)	36,2	1,78 <i>dd</i> (13,4; 4,4)	35,9
3b	1,81 <i>d</i> (3,5)		1,68 <i>d</i> (13,4)	
4	-	83,7	-	84,4
5	4,90 <i>d</i> (6,2)	79,3	3,58 <i>d</i> (4,6)	79,1
6	4,30 <i>d</i> (6,2)	83,7	4,23 <i>d</i> (4,6)	87,4
7	-	56,4	-	56,7
8	5,10 <i>d</i> (5,6)	78,8	5,10 <i>d</i> (5,5)	79,6
9a	2,65 <i>dd</i> (16,4; 5,6)	42,5	2,58 <i>dd</i> (16,3; 5,5)	43,2
9b	2,18 <i>d</i> (16,4)		2,23 <i>d</i> (16,3)	
10	-	96,6	-	96,5
11	-	133,3	-	134,4
12	-	167,8	-	168,6
13a	6,50 <i>s</i>	126,3	6,48 <i>s</i>	126,7
13b	5,84 <i>s</i>		5,87 <i>s</i>	
14	2,29 <i>s</i>	26,2	2,30 <i>s</i>	26,5
15	1,30 <i>s</i>	20,6	1,45 <i>s</i>	21,2
1'	-	169,3	-	169,6
2'	2,04 <i>s</i>	20,6	2,06 <i>s</i>	20,9
1''	-	169,5	-	-
2''	2,19 <i>s</i>	20,5	-	-
	(300 MHz ^1H , 75 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 295 K)		(300 MHz ^1H , 75 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 295 K)	

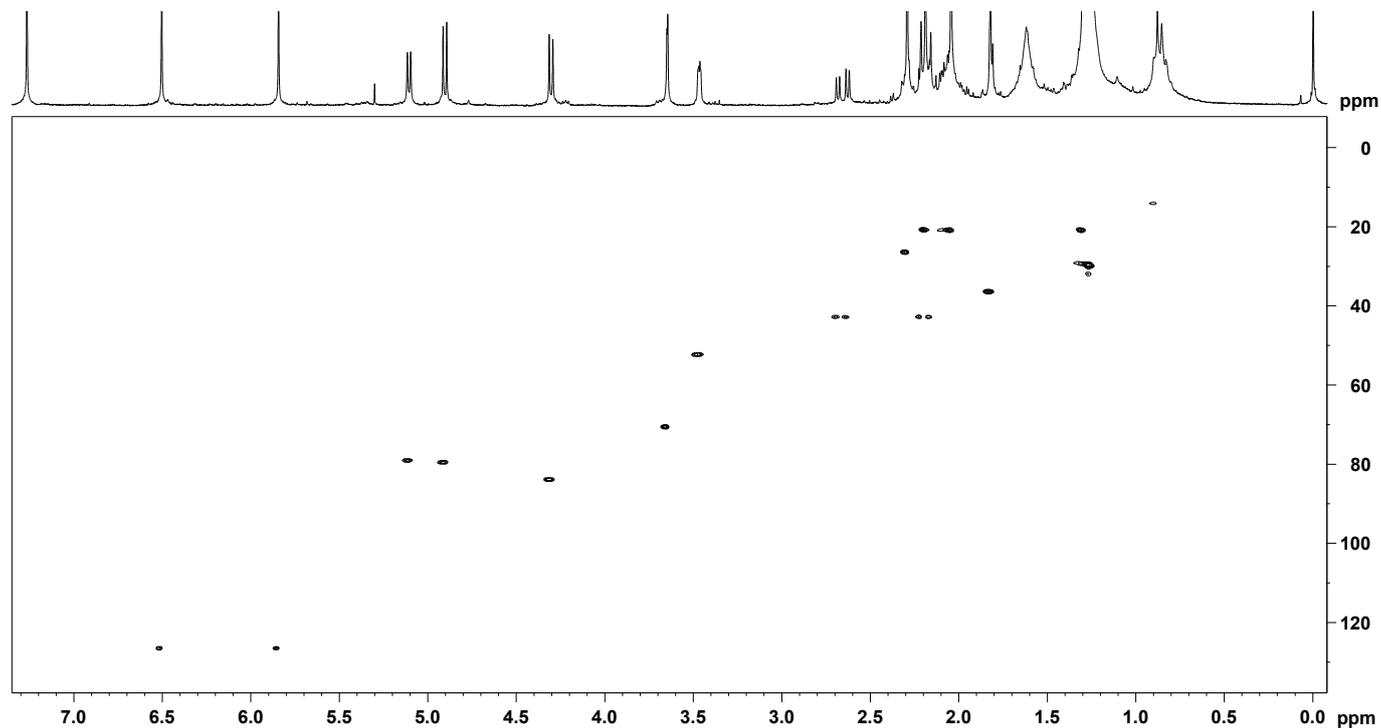
^a, uma vez que não foram encontrados relatos na literatura com a descrição dos dados de RMN para o composto **23**, este foi comparado ao análogo C-5 hidroxilado correspondente ao material de partida (derivado **18**) da reação de produção do derivado **23**.

Figura 143 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , 295 K) para o derivado semissintético **23**.



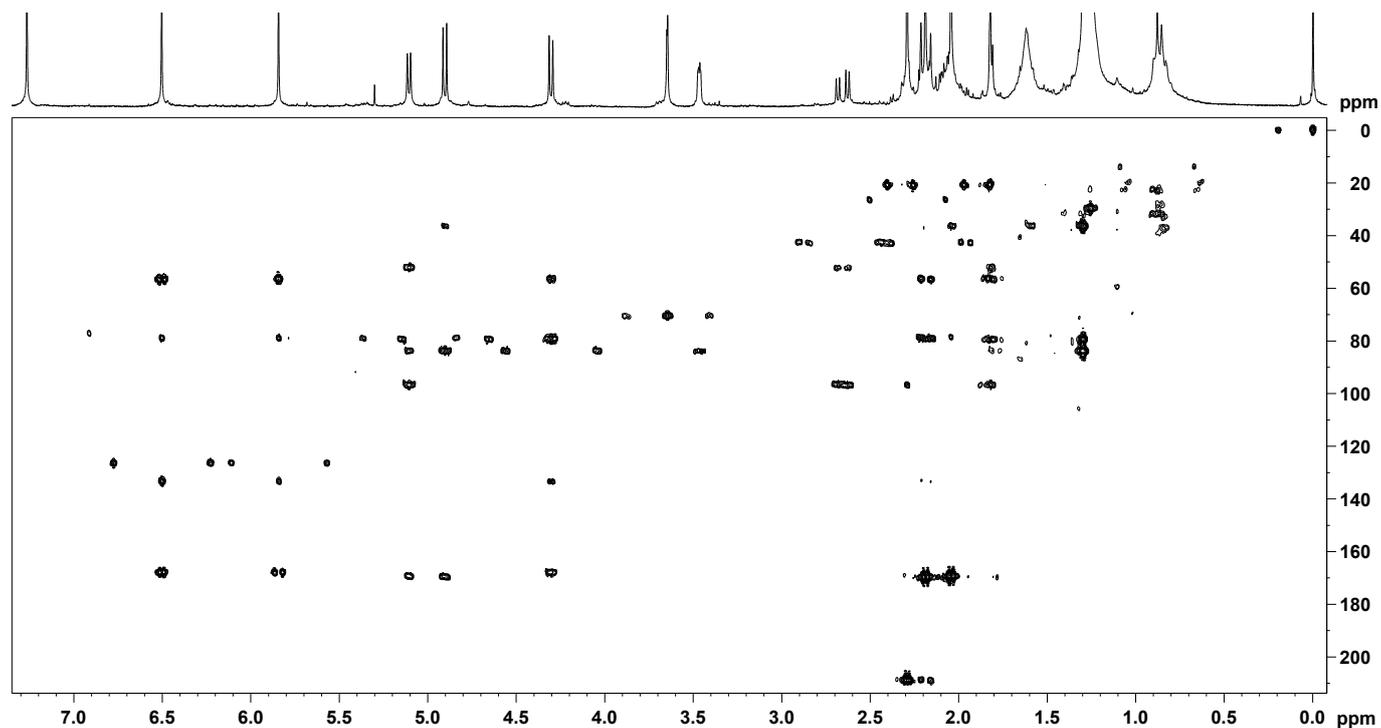
Eixo Y: intensidade; Eixo X: deslocamento químico, expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00).

Figura 144 – Mapa de correlação HSQC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 295 K) para o derivado semissintético **23**.



Eixo Y: projeção para ^{13}C , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00); Eixo X: deslocamento químico ^1H , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00).

Figura 145 – Mapa de correlação HMBC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 295 K) para o derivado semissintético **23**.

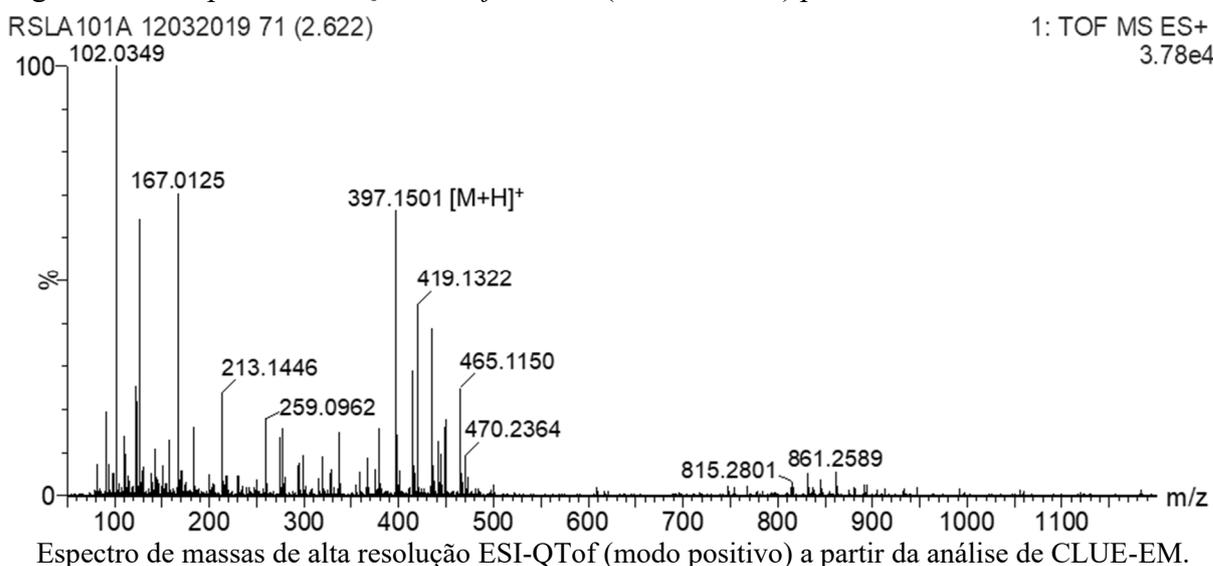


Eixo Y: projeção para ^{13}C , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00); Eixo X: deslocamento químico ^1H , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00).

A correlação entre o hidrogênio oximetínico em δ 4,90 *d* (1H, $J=6,2$ Hz; H-5) na posição C-5 com a carbonila em C-1" (δ 169,5) do novo substituinte acetoxi, assim como a correlação entre os hidrogênios acetílicos em δ 2,19 *s* (3H, H-2") com o carbono em C-5 (δ 79,3) corroboraram com a proposta de um grupo acetoxi em C-5 do derivado **23**.

A análise de ESI-QToF EM confirmou a proposta estrutural para o derivado semissintético **23** pela presença no espectro de EM *full scan* (Figura 146) do íon molecular protonado m/z 397,1501 [$C_{19}H_{24}O_9+H$]⁺ (calculado 397,1499).

Figura 146 – Espectro ESI-QToF EM *full scan* (100-1200 Da) para o derivado semissintético **23**.

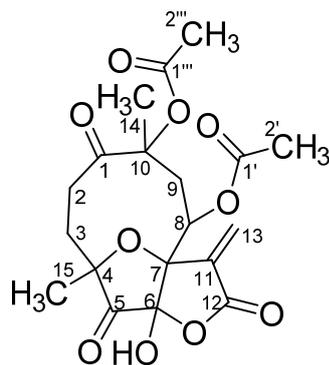


O derivado semissintético **23** correspondeu à LS 5,8-diacetoxi-vernomargolídeo (Figura 142), com fórmula molecular $C_{19}H_{24}O_9$.

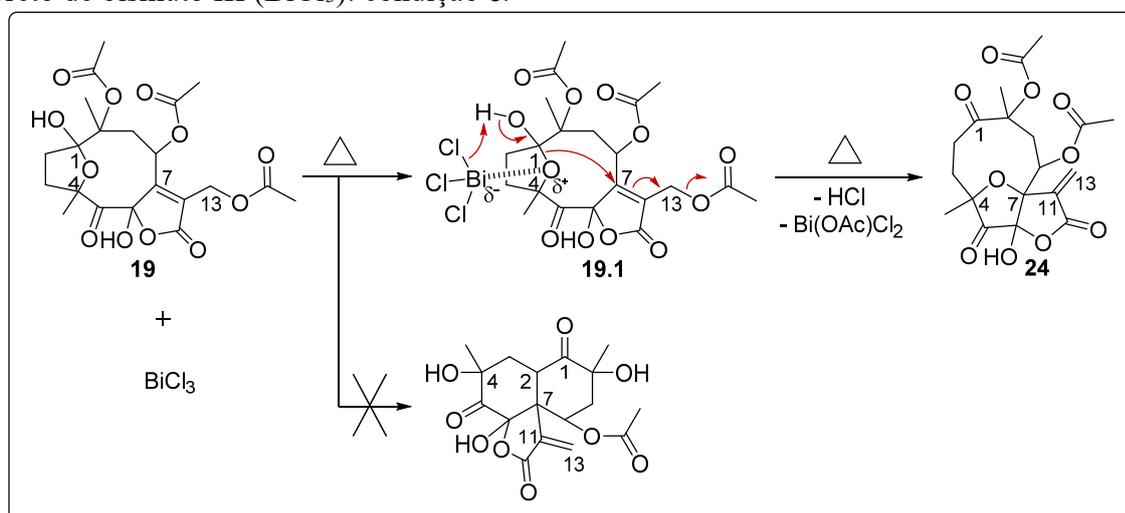
Destaca-se que não foram encontrados relatos na literatura para o derivado semissintético **23**, da mesma forma que para o seu derivado **18** de partida, sugerindo se tratar também de um composto novo.

5.6.2.14 Derivado (**24**): 8,10-diacetoxi-4(7)-epoxi-6-hidroxi-1,5-diceto-germacr-11(13)-en-6(12)-olídeo

O derivado semissintético **24** foi produzido a partir derivado oxidado **19** empregando o $BiCl_3$ com catalisador sob refluxo a 50 °C (condição *e*), em mecanismo descrito no Esquema 34.

Figura 147 – Estrutura molecular do derivado semissintético **24**.

Fonte: autor.

Esquema 34 – Mecanismo de reação proposto para produção do derivado semissintético **24** com cloreto de bismuto III (BiCl_3): condição e.Condição reacional: (e) BiCl_3 , DCM, refluxo a $50\text{ }^\circ\text{C}$, 15 h.

O mecanismo de reação para produção do derivado **24** também foi iniciado pela formação do complexo ativado "O- BiCl_3 " a partir da interação do BiCl_3 com o oxigênio do anel tetrahydrofurano (C-1/C-4), originando o intermediário **19.1**. O ataque ao hidrogênio da função hemiacetalica na posição C-1 por parte de um dos átomos de cloro do catalisador resultou na abertura do anel oxolano e na formação de uma função cetona em C-1. Contudo, a esperada formação de um intermediário glaucolídeo (contendo um grupo "O- BiCl_2 " em C-4 além da cetona em C-1), o qual sofreria a desprotonação na posição C-2, seguida da ciclização transanular para a produção do derivado decalínico C-2/C-7 de interesse, não ocorreu.

Em vez disso, a abertura do anel oxolano desencadeou concomitantemente a ciclização a partir do ataque nucleofílico ao carbono olefínico em C-7, seguido do rearranjo da dupla ligação para a posição C-11/C-13 e a perda do grupo acetoxi em C-13 na forma de Bi(OAc)Cl_2 , originando o derivado semissintético **24** contendo um anel tetrahydrofurano em C-4/C-7.

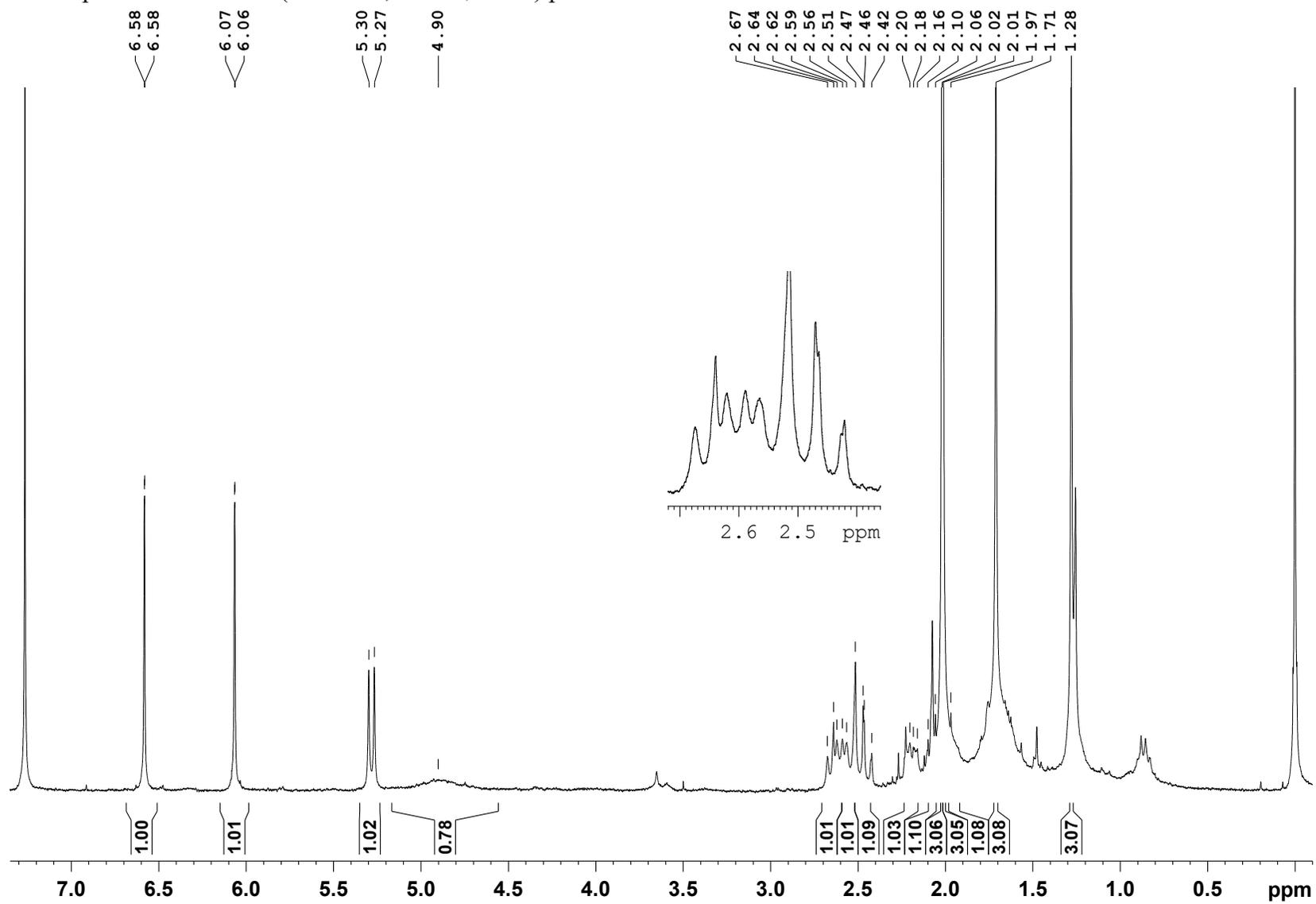
A formação do composto **24** pode ser resultante de um processo cinético, e a não formação do derivado decalínico de interesse pode ser explicada pelo fato de que as condições reacionais não permitiram alcançar a energia de ativação necessária para que a reação acontecesse. Além disso, a presença da função cetona na posição C-5 do derivado de partida **19** pode ter conferido à estrutura carbocíclica uma exigência de torção angular entre C-5 e C-6 que foi limitante para atingir a energia de ativação requerida. Em contra partida, essa característica pode ter favorecido o rearranjo entre C-4/C-7 para formação de anel tetrahydrofurano durante a produção do derivado **24**, não ocorrido na produção do derivado **18** (vide *item 5.6.2.8*). Todavia, estudos mais aprofundados de mecanística de reação são necessários para melhor compreender a etapas da formação do produto **24**.

A Tabela 37 apresenta as dados espectroscópicos de RMN ^1H e RMN ^{13}C para o derivado **24** em comparação com dados do material de partida – nesse caso o derivado **19**.

Tabela 37 – Dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C para o derivado semissintético (**24**) e dados comparativos com material de partida (**19**).

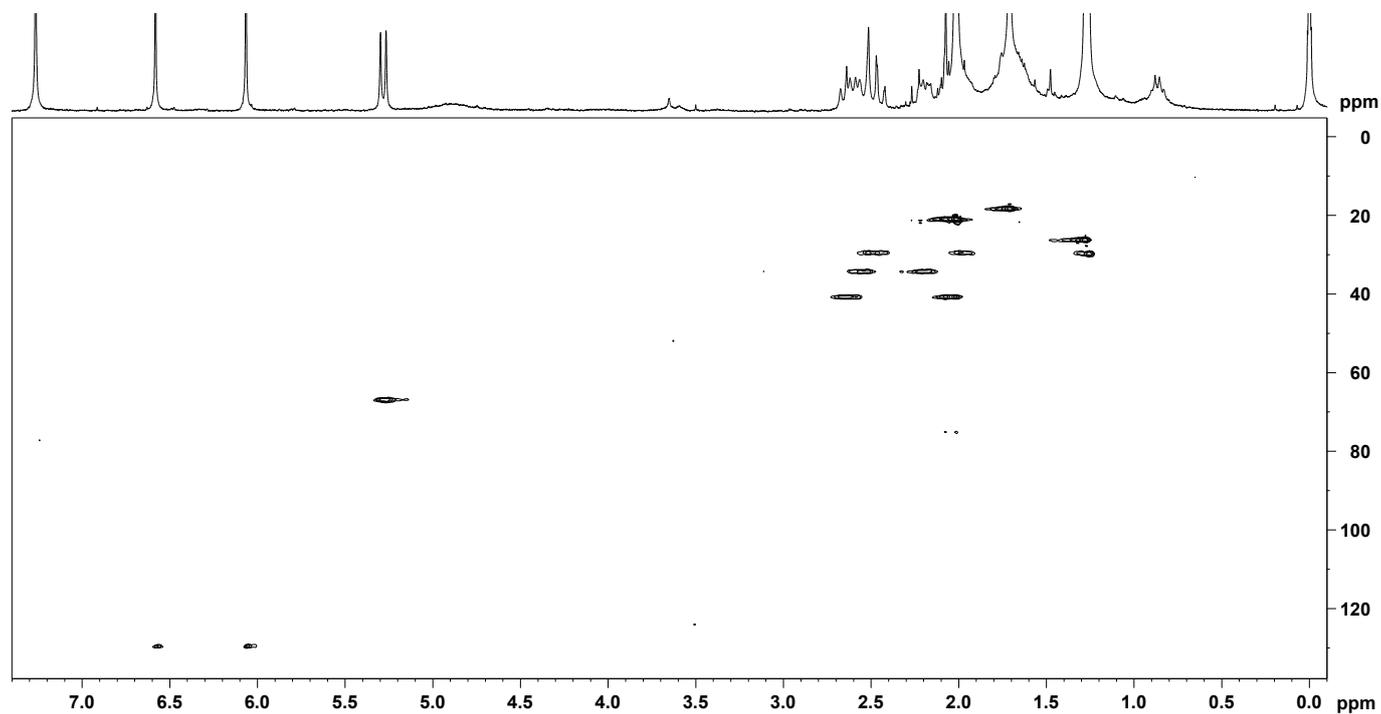
Posição	(24)		(19) ^a	
	δ ^1H <i>mult.</i> (J Hz)	δ ^{13}C	δ ^1H <i>mult.</i> (J Hz)	δ ^{13}C
1	-	203,9	-	111,1
2a	2,41-2,54 <i>m</i>	29,5	2,42-2,54 <i>m</i>	34,9
2b	1,93-2,03 <i>m</i>		1,86-2,01 <i>m</i>	
3a	2,49-2,62 <i>m</i>		2,56-2,69 <i>m</i>	
3b	2,14-2,26 <i>m</i>	34,3	1,99-2,12 <i>m</i>	36,9
4	-	83,9	-	87,2
5	-	205,6	-	200,9
6	-	99,3	-	107,6
7	-	82,2	-	162,7
8	5,28 <i>d</i> (9,5)	66,9	6,36 <i>dd</i> (11,7; 6,4)	68,2
9a	2,63 <i>dd</i> (16,0; 9,5)	40,7	3,32 <i>dd</i> (14,3; 11,7)	35,1
9b	2,05 <i>d</i> (16,0)		2,60 <i>dd</i> (14,3; 6,4)	
10	-	84,5	-	86,5
11	-	136,4	-	127,9
12	-	166,0	-	167,6
13a	6,58 <i>d</i> (0,7)	129,7	4,84 <i>d</i> (12,7)	55,0
13b	6,06 <i>d</i> (0,7)		4,71 <i>d</i> (12,7)	
14	1,71 <i>s</i>	18,3	1,61 <i>s</i>	21,7
15	1,28 <i>s</i>	26,2	1,75 <i>s</i>	28,3
OH-6	4,90 <i>sl</i>	-	6,81 <i>s</i>	-
1'	-	169,1	-	173,0
2'	2,02 <i>s</i>	20,9	2,090 <i>s</i>	20,8
1''	-	-	-	170,0
2''	-	-	2,094 <i>s</i>	20,8
1'''	-	169,5	-	169,4
2'''	2,01 <i>s</i>	21,1	2,04 <i>s</i>	21,0
	(300 MHz ^1H , 75 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 295 K)		(300 MHz ^1H , 75 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 278 K)	

^a, devido ao fato de não terem sido encontrados relatos na literatura para o derivado **24**, este foi comparado ao material de partida (derivado **19**) da reação de produção do derivado **24**.

Figura 148 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , 295 K) para o derivado semissintético **24**.

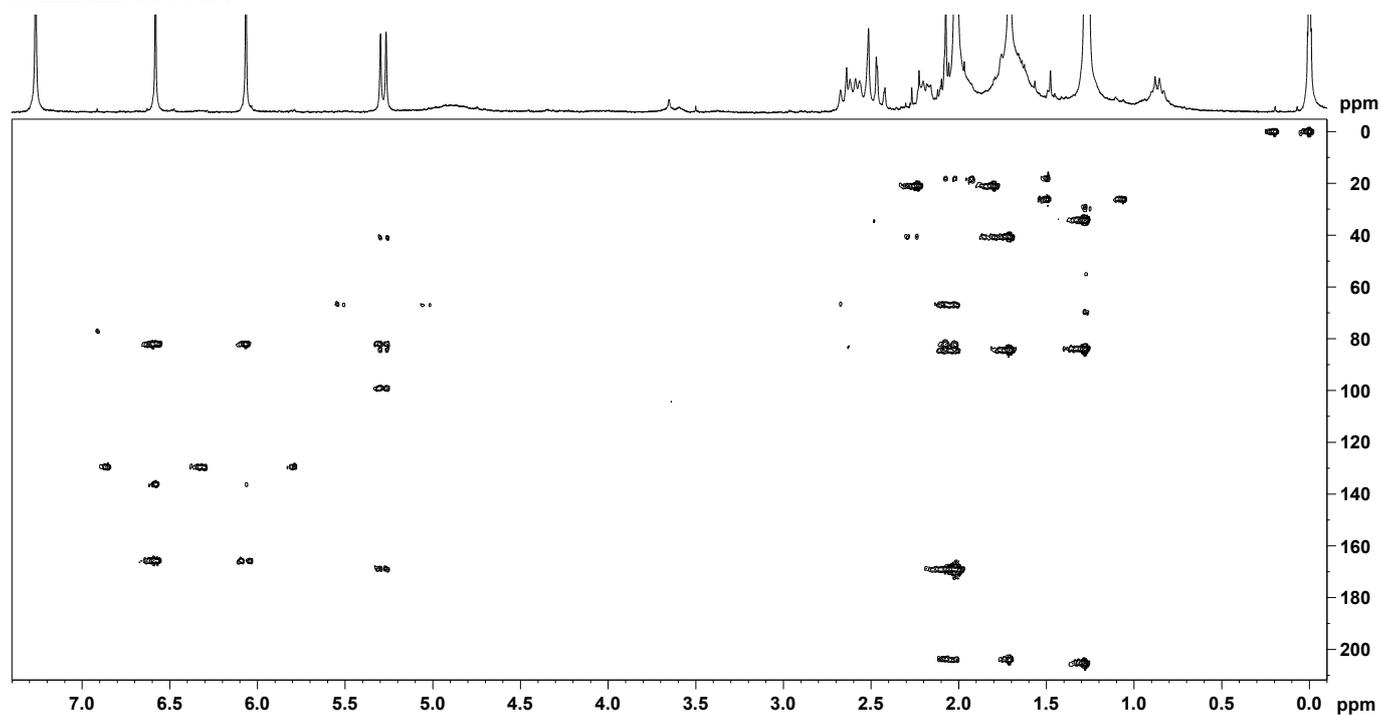
Eixo Y: intensidade; Eixo X: deslocamento químico, expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00).

Figura 149 – Mapa de correlação HSQC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 295 K) para o derivado semissintético **24**.



Eixo Y: projeção para ^{13}C , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00); Eixo X: deslocamento químico ^1H , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00).

Figura 150 – Mapa de correlação HMBC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , CDCl_3 , 295 K) para o derivado semissintético **24**.



Eixo Y: projeção para ^{13}C , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00); Eixo X: deslocamento químico ^1H , expresso em ppm (relativo ao TMS - δ 0,00).

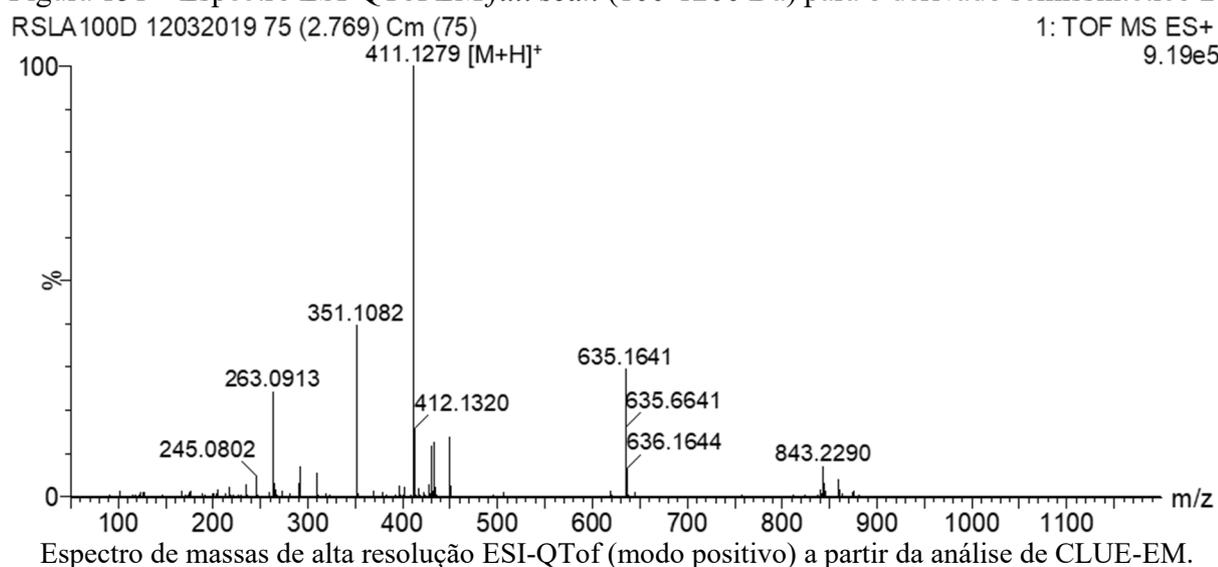
A comparação dos dados espectroscópicos de RMN ^1H (Figura 148) e bidimensionais (HSQC e HMBC, Figuras 149 e 150) do derivado **24** com o material de partida derivado **19** (para maiores detalhes vide *item 5.6.2.9*) revelou sinais indicativos da formação de esqueleto carbocíclico germacranolídeo diferentemente ao esperado núcleo vernomargolídeo (pretendido para essa condição reacional – condição e).

Ainda que se tenha observado a presença do sinal da carbonila cetônica na posição C-1 (δ 203,9) – confirmado pela correlação a partir do hidrogênio de metila δ 1,71 s (3H, H-14), além do anel γ -lactônico em C-6/C-7 com a α,β -insaturação exocíclica (C-11/C-13), comprovado pela correlação entre os hidrogênios metilênicos δ 6,58 d (1H; $J=0,7$ Hz; H-13a) e δ 6,06 d (1H; $J=0,7$ Hz; H-13b) com os carbonos em δ 166,0 (C-12), δ 136,4 (C-11) e em δ 82,2 (C-7), não foram identificados sinais sugestivos na presença do núcleo decalínico.

No entanto, a abertura do anel tetrahydrofurano presente em C-1/C-4 do material de partida **19** desencadeou como rearranjo a formação de uma ponte éter entre as posições C-4/C-7, evidenciada pela detecção dos sinais de carbonos oxigenados em δ 82,2 (C-7) e δ 83,9 (C-4), este último comprovado em função da correlação a partir dos hidrogênios da metila δ 1,28 s (3H, H-15) localizada na própria posição C-4.

A análise de ESI-QToF EM confirmou a proposta estrutural para o derivado semissintético **24** pela presença no espectro de EM *full scan* (Figura 151) do íon molecular protonado m/z 411,1279 [$\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_{10}+\text{H}$] $^+$ (calculado 411,1291).

Figura 151 – Espectro ESI-QToF EM *full scan* (100-1200 Da) para o derivado semissintético **24**.



O derivado semissintético **24** correspondeu à LS 8,10-diacetoxi-4(7)-epoxi-6-hidroxi-1,5-diceto-germacr-11(13)-en-6(12)-olídeo (Figura 147), com fórmula molecular $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$.

Não foram encontrados relatos para o núcleo carbocíclico do derivado **24**, indicando se tratar de um composto novo.

É importante ressaltar que embora alguns dos derivados preparados já tenham sido obtidos por outras vias, são escassas as informações quanto a avaliação de suas propriedades biológicas, incluindo-se as atividades anti-inflamatória e citotóxica, demonstrando a relevância deste trabalho na busca por compostos/protótipos para o desenvolvimento de alternativas terapêuticas para o tratamento de doenças inflamatórias e câncer.

Destaca-se também que assim como para as dez LS isoladas a partir de espécies de Vernoniae (**1-10**), nenhum dos 14 derivados semissintéticos (**11-24**) de LS produzidos ativou alertas de PAINS – relativos à compostos capazes de interferir com vários tipos de ensaios (BAELL; NISSINK, 2017; DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017), sustentando a proposta de investigação do potencial biológico destes compostos.

5.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA *in vitro*

Os compostos investigados quanto ao potencial biológico *in vitro* apresentaram pureza superior a 80%. A LS **1-5** foram investigadas quanto às propriedades antiparasitárias. Já os compostos **1-24** foram avaliadas quanto ao perfil de citotoxicidade contra diferentes linhagens de células tumorais (para maiores detalhes vide *item 4.8.3*). Adicionalmente, a LS **4** foi analisada frente à atividade anti-inflamatória.

5.7.1 Avaliação das atividades leishmanicida e tripanocida

As LS **1-5** foram avaliadas (50 μM) quanto às atividades leishmanicida e tripanocida, frente às formas amastigotas intracelulares de *Leishmania amazonensis* e *Trypanosoma cruzi*, respectivamente.

Os valores de IC_{50} e CC_{50} de cada composto para as atividades leishmanicida e tripanocida estão apresentados na Tabela 38 e 39, respectivamente.

As LS piptocarфина A (**1**), diacetilpiptocarfol (**3**) e vernodalina (**5**) apresentaram moderadas atividades leishmanicida (IC_{50} =18,83 a 26,58 μM) e tripanocida (IC_{50} =10,62 a 20,57 μM), testadas frente às formas amastigotas intracelulares dos parasitos, consideradas as formas de maior relevância clínica e ideais na investigação de protótipos a novos fármacos (CRUZ et al., 2009; JONES et al., 2013).

Tabela 38 – Valores de IC₅₀ e CC₅₀ para as LS (1-5) purificadas a partir das espécies Vernoniae avaliadas quanto à atividade leishmanicida frente à *Leishmania amazonensis*.

Composto	IC ₅₀ (µM) ^a	CC ₅₀ (µM) ^a	Índice de seletividade
Piptocarfina A (1)	18,83 (± 2,16)	<15,60	<0,83
Glaucolídeo A (2)	s.a.	-	-
Diacetilpiptocarfol (3)	26,58 (± 5,71)	<15,60	<0,58
Glaucolídeo B (4)	s.a.	-	-
Vernodalina (5)	24,02 (± 3,17)	<15,60	0,65
Anfotericina B ^b	0,14 (± 0,02)	27,86 (± 0,98)	199

^a, resultados expressos como média (± desvio padrão) (n=3); ^b, controle positivo (2 µM); s.a., sem atividade.

Tabela 39 – Valores de IC₅₀ e CC₅₀ para as LS (1-5) purificadas a partir das espécies Vernoniae avaliadas quanto à atividade tripanocida frente à *Trypanosoma cruzi*.

Composto	IC ₅₀ (µM) ^a	CC ₅₀ (µM) ^a	Índice de seletividade
Piptocarfina A (1)	10,62 (± 0,72)	<15,60	<1,47
Glaucolídeo A (2)	45,43 (± 0,88)	18,38 (± 0,73)	0,40
Diacetilpiptocarfol (3)	20,57 (± 1,96)	<15,60	<0,76
Glaucolídeo B (4)	s.a.	-	-
Vernodalina (5)	20,54 (± 2,64)	<15,60	<0,76
Benznidazol ^b	10,18 (± 0,30)	>500	>49,11

^a, resultados expressos como média (± desvio padrão) (n=3); ^b, controle positivo (20 µM); s.a., sem atividade.

Diferentes tipos de LS vem sendo investigadas quanto ao seu potencial leishmanicida e tripanocida *in vitro* (AKENDENGUE et al., 2002; SÜLSEN et al., 2008; KARIOTI et al., 2009; SCHMIDT et al., 2009; JULIANTI et al., 2011; OTOGURO et al., 2011).

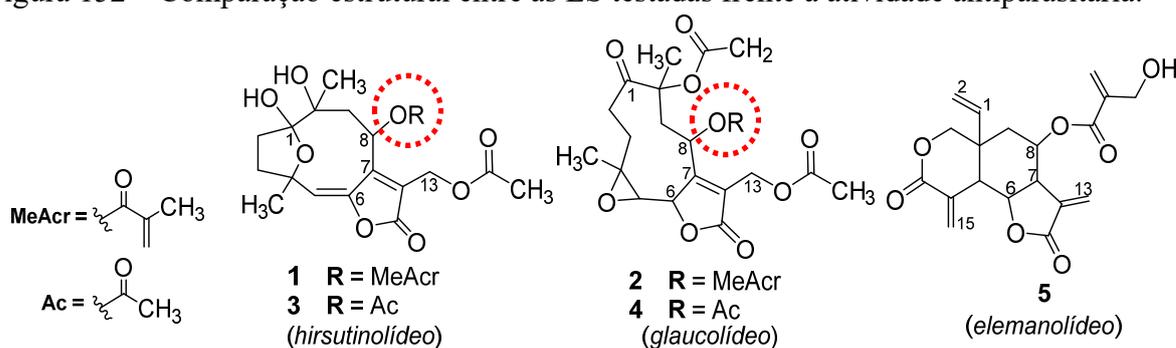
Girardi e colaboradores (2015) também demonstraram a atividade leishmanicida para a piptocarfina A e o diacetilpiptocarfol, porém contra as formas promastigotas (IC₅₀=9,5 µM; IS=0,09 e IC₅₀=24,1 µM; IS=0,06, respectivamente) e amastigotas axênicas (IC₅₀=2,0 µM; IS=0,09 e IC₅₀=4,7 µM; IS=0,06, respectivamente) de *Leishmania infantum*. Da mesma forma Sosa e colaboradores (2016) recentemente demonstraram a atividade leishmanicida para o glaucolídeo A e glaucolídeo B contra formas promastigotas de *L. amazonensis* (IC₅₀=35,1 µM e IC₅₀=46,1, respectivamente) e de *L. braziliensis* (IC₅₀=23,4 µM e IC₅₀=27,9, respectivamente). Por sua vez, Kimani e colaboradores (2017) demonstraram a atividade tripanocida da mistura da vernodalina e seu derivado 11,13-dihidrovernodalina (IC₅₀=0,069 µg/mL; IS=7,70), todavia contra formas tripomastigotas de *Trypanosoma brucei rhodesiense*. Zimmermann e colaboradores (2014) também demonstraram atividade tripanocida *in vitro* para a vernodalina contra *T. brucei rhodesiense* (cepa STIB 900) com IC₅₀=0,2 µM.

Embora investigadas frente às formas promastigotas de *L. infantum*, a avaliação da toxicidade frente à células VERO (epitélio renal de macaco verde africano) mostrou que as LS ptiptocarфина A e o diacetilptiptocarfol foram tóxicas também para as células não tumorais (GIRARDI et al., 2015), com valores IS=0,09 e 0,06, respectivamente, corroborando com a seletividade baixa observada para os compostos **1** e **3**.

Esses achados vêm ao encontro dos resultados obtidos no presente trabalho de doutorado, em que se observou a baixa seletividade dos compostos ativos **1,3** e **5**, indicando que a efeito antiparasitário pode estar relacionado na verdade com as propriedades citotóxicas das LS. Segundo Schmidt e colaboradores (2009), a atividade antiprotozoária das LS está significativamente correlacionadas à sua citotoxicidade, tendo como fator determinante para a atividade a presença dos elementos estruturais α,β -insaturados, os quais também são relacionados às demais atividades biológicas dessa classe de compostos. A alquilação de grupos sulfidrilas das proteínas do parasita pelas carbonilas α,β -insaturadas das LS (aceptores de Michael), somada à interrupção da bomba de cálcio no retículo endoplasmático e o aumento da geração de radicais livres, causam danos oxidativos irreversíveis ao DNA, lipídios e proteínas, que levam à morte do parasita via apoptose, necrose e/ou autofagia (SAEIDNIA; GOHARI; HADDADI, 2013; JIMENEZ et al., 2014).

Em termos estruturais, a análise dos dados da investigação antiparasitária obtidos neste estudo, apoiados pelos dados descritos na literatura para os mesmos compostos indicou que as LS do tipo glaucolídeo (**2** e **4**) tem uma menor atividade em relação aos hirsutinolídeos (**1** e **3**), sugerindo que a conversão estrutural (anteriormente abordada) parece ser benéfica para a atividade. Ainda, a comparação entre os dois hirsutinolídeo (Figura 152) testados mostrou que a presença de um substituinte éster mais volumoso na posição C-8, nesse caso um metacrililoíloxi para **1** em relação a um acetoxi para **3** promoveu o aumento da atividade e uma pequena melhora na seletividade em relação à células THP-1.

Figura 152 – Comparação estrutural entre as LS testadas frente à atividade antiparasitária.



Por outro lado, o elemanolídeo (**5**) diferindo-se dos outros dois subtipos de LS testadas pode ter sua atividade explicada pelo número de elementos estruturais relacionados com a atividade antiprotozoária de LS, tais com as carbonilas α,β -insaturadas e um grupo éster volumoso (hidroximetacrilóiloxi) em C-8.

O índice de seletividade (IS) consiste na razão entre a concentração citotóxica 50% (CC_{50}) para as células não infectadas (nesse caso, macrófagos THP-1) e o IC_{50} frente aos protozoários, e permite avaliar se a substância é mais citotóxica (seletiva) para as células acometidas em comparação às células normais, determinante quando se considera sua atividade biológica. Devido à semelhança nas concentrações de CC_{50} e IC_{50} observados para as LS testadas não foi possível determinar os valores precisos para o IS, embora os resultados indiquem que são valores baixos de IS (próximos a 1). Considera-se que uma substância é ativamente promissora como agente leishmanicida e tripanocida quando apresenta $IC_{50} \leq 10 \mu M$ e $IS \geq 10$ (ROLÓN et al., 2019).

Embora alguns dos compostos testado tenham apresentado uma moderada atividade antiparasitária, a baixa seletividade observada associada à uma quantidade restrita dos derivados semissintéticos de LS (**11-24**) produzidos, fez com que se optasse momentaneamente por não dar continuidade à investigação antiparasitária destes composto, de modo a direcionar o estudo com os derivados de LS para atividades mais promissoras.

5.7.2 Avaliação da atividade citotóxica

As LS piptocarfina A (**1**) e glaucolídeo A (**2**) foram avaliadas de forma preliminar quanto à atividade citotóxica frente à diferentes linhagens de células tumorais, cujos valores de CC_{50} para as LS e os controles positivos estão apresentados na Tabela 40.

Tabela 40 – Valores de CC_{50} para as LS **1** e **2** quanto à avaliação da atividade citotóxica.

Compostos	Linhagens celulares ($CC_{50}=\mu M$) ^a								
	Nalm-6	K-562	HL-60	REH	JURKAT	PC3	OVCAR	NCI-1299	HOS
Piptocarfina A (1)	2,8±0,4	3,0±0,1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Glaucolídeo A (2)	n.d.	13,4±1,4	11,9±0,4	11,0±0,6	8,5±1,0	27,2±2,2	20,6±9,3	13,4±1,3	15,1±1,1
Doxorrubicina ^b	21,0±7,0	28,1±3,0	n.d.	n.d.	n.d.	24,5±3,7	2,4±0,5	11,9±1,2	5,9±0,9
Vincristina ^b	n.d.	n.d.	0,03±0,0	0,003±0,0	0,0001±0,0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

^a, resultados expressos como média \pm desvio padrão (n=3); ^b, controle positivo; **n.d.**, não determinado. Linhagens celulares de leucemias linfóide B (**Nalm-6**), mieloide aguda (**K-562**), pró-mielocítica (**HL-60**), linfocítica aguda (**REH**) e linfóide T (**JURKAT**), e de células tumorais de adenocarcinoma de próstata (**PC3**), carcinoma de ovário (**OVCAR**), carcinoma de pulmão (**NCI-H1299**) e osteosarcoma (**HOS**).

A piptocarfina A (**1**) demonstrou uma promissora atividade citotóxica *in vitro* frente às linhagens de células leucêmicas Nalm-6 e K-562, cujos valores de CC_{50} foram respectivamente 2,8 μM e 3,0 μM . Já o glaucolídeo A (**2**) apresentou uma atividade moderada frente às linhagens de células leucêmicas K-562, HL-60, REH e JURKAT, e tumorais PC3, OVCAR, NCI-1299 e HOS (CC_{50} =8,5 a 27,2 μM).

A capacidade citotóxica e antiproliferativa das LS está associada à α,β -insaturação, endo ou exocíclica, conjugada a carbonila no anel γ -lactônico. Essa porção confere um forte poder de alquilação às LS que podem atuar sobre fatores de transcrição e enzimas no corpo humano e afetam sua capacidade funcional. A alquilação das LS por meio da adição de Michael com tióis celulares (especialmente grupos mercaptil de resíduos de cisteína e a glutathione intracelular livre) interrompe os principais processos biológicos, resultando na morte celular controlada por apoptose. Além da α,β -insaturação, outros elementos podem estar envolvidos na atividade das LS, como grupos epóxi, aldeídos, peróxidos e radicais ésteres, como por exemplo, metacrilato e tiglato (CHEN, 1980; SCHMIDT, 2006; GACH; DŁUGOSZ; JANECKA, 2015).

A atividade citotóxica *in vitro* da piptocarfina A (IC_{50} =0,24 μM) também já foi demonstrada frente à células leucêmicas HL-60 (promielócito leucêmico humano) (LIAO et al., 2012). Segundo Huo e colaboradores (2008) a piptocarfina A apresentou atividade *in vitro* contra células P388 (neoplasma linfóide de camundongo) cujo valor de IC_{50} =0,77 μM , mas sem atividade frente a células A549 (carcinoma de pulmão humano). Em testes *in vivo* contra leucemia linfóide P388, observou-se toxicidade dosagem-dependente e ligeira atividade para piptocarfina A (atividade antitumoral [T/C máximo]=122 em 4,6 mg/kg) (COWALL et al., 1981).

Apesar dos diferentes relatos de atividade citotóxica de LS (GHANTOUS et al., 2010; CHEN; LIU; WANG, 2011; ITO et al., 2016) ainda são necessários mais estudos para a descoberta de compostos protótipos para um futuro desenvolvimento de uma alternativa terapêutica no tratamento do câncer.

Neste sentido, diante dos resultados bastante promissores apresentados pela piptocarfina A (**1**) frente às linhagens de células leucêmicas Nalm-6 e K-562 (IC_{50} =2,8 μM e IC_{50} =3,0 μM , respectivamente), um estudo paralelo *in vivo* com **1**, realizado também em parceria o Dr. Gilberto C. Franchi Jr, ainda está em desenvolvimento. As observações iniciais deste teste pré-clínico *in vivo* em modelo de leucemia linfocítica RS4 (leucemia prolinfocítica B com translocação cromossômica t4;11) realizado com camundongo NodScid imunossuprimidos, indicam que a associação da piptocarfina A (**1**) ao tratamento quimioterápico convencional (com vincristina, dexametasona e L-asparagina) conseguiu manter a sobrevivência do animal até o

fim do período do teste e sem perda de peso, além de reduzir estatisticamente os clones leucêmicos na medula óssea quando comparado ao tratamento convencional só com quimioterápico. Todavia, os resultados ainda serão compilados e os dados devidamente tratados.

Adicionalmente, diante dos resultados obtidos para o glaucolídeo A (2) frente à linhagens de células tumorais (CC_{50} =13,4 a 27,2 μ M), especialmente quando comparado com os controles positivos (mostrando-se bastante similar), percebeu-se a necessidade de se aprofundar a investigação para as LS perante esse tipo de linhagem celular.

Nesse sentido, as diferentes LS isoladas das espécies de Vernoniaceae (1-10), bem como os derivados semissintéticos de LS produzidos (11-24), todos foram testados frente a três outras linhagens de células tumorais, cujos valores de porcentagem de viabilidade celular, CC_{50} e IS (definidos para alguns compostos) estão apresentados na Tabela 41.

Tabela 41 – Valores de viabilidade, CC_{50} e IS para as LS 1-10 de Vernoniaceae e derivados semissintéticos 11-24 quanto à avaliação da atividade citotóxica.

Compostos	Linhagens celulares							
	SK-MEL-28			HUVEC	NCI-H460		SF295	
	Viabilidade (%) ^a	CC_{50} (μ M)	IS	CC_{50} (μ M)	Viabilidade (%) ^a	CC_{50} (μ M)	Viabilidade (%) ^a	CC_{50} (μ M)
Piptocarfina A (1)	23,1±4,2	6,7	1,9	12,5	104,8±1,6	n.d.	93,2±3,2	n.d.
Glaucolídeo A (2)	56,3±1,4	14,6	1,4	20,4	95,1±4,6	n.d.	91,8±3,3	n.d.
Diacetilpiptocarfol (3)	9,0±0,5	3,8	3,3	12,6	63,8±6,9	n.d.	80,4±3,3	n.d.
Glaucolídeo B (4)	82,6±4,1	n.d.	-	n.d.	85,1±4,6	n.d.	88,0±4,8	n.d.
Vernodalina (5)	6,5±0,2	2,6	4,6	11,9	68,7±5,1	n.d.	77,9±6,0	n.d.
Tetrahydrovernalida (6)	70,2±2,1	n.d.	-	n.d.	87,3±5,1	n.d.	87,1±0,2	n.d.
Dihydrovernalida (7)	61,1±1,4	n.d.	-	n.d.	90,3±5,6	n.d.	87,3±4,0	n.d.
Vernolida (8)	58,7±0,7	n.d.	-	n.d.	87,8±2,3	n.d.	93,2±2,9	n.d.
Hidroxidihydrovernalida (9)	91,2±4,5	n.d.	-	n.d.	96,6±3,1	n.d.	94,6±0,9	n.d.
Hidroxivernalida (10)	86,9±4,3	n.d.	-	n.d.	96,7±6,1	n.d.	89,4±3,0	n.d.
Derivado cadinanolídeo (11)	87,1±2,6	n.d.	-	n.d.	91,8±3,6	n.d.	86,8±6,3	n.d.
Derivado cadinanolídeo (12)	91,1±1,7	n.d.	-	n.d.	88,4±3,4	n.d.	86,1±2,3	n.d.
Derivado vernomargolídeo (13)	85,9±4,0	n.d.	-	n.d.	90,4±1,5	n.d.	90,4±3,7	n.d.
Derivado vernomargolídeo (14)	95,3±4,1	n.d.	-	n.d.	100,3±5,5	n.d.	95,6±3,9	n.d.
Derivado vernomargolídeo (15)	96,4±6,9	n.d.	-	n.d.	100,2±2,7	n.d.	94,7±1,1	n.d.
Derivado hirsutinolídeo (16)	76,2±7,5	n.d.	-	n.d.	89,1±3,9	n.d.	86,7±3,8	n.d.
Derivado germacranolídeo (17)	66,9±3,5	n.d.	-	n.d.	87,3±1,6	n.d.	82,0±4,7	n.d.
Derivado vernomargolídeo (18)	74,5±4,9	n.d.	-	n.d.	84,9±0,4	n.d.	85,2±2,8	n.d.
Derivado hirsutinolídeo (19)	79,2±6,4	n.d.	-	n.d.	85,7±1,6	n.d.	88,6±4,8	n.d.
Derivado hirsutinolídeo (20)	16,0±2,6	11,2	2,5	27,8	73,2±1,0	n.d.	83,3±1,2	n.d.
Derivado hirsutinolídeo (21)	17,1±3,3	5,0	3,0	12,7	74,6±1,3	n.d.	86,9±4,3	n.d.
Derivado germacranolídeo (22)	5,3±0,3	3,1	3,0	9,0	53,1±0,0	n.d.	67,3±4,0	n.d.
Derivado vernomargolídeo (23)	73,8±3,1	n.d.	-	n.d.	84,8±0,9	n.d.	85,9±5,0	n.d.
Derivado germacranolídeo (24)	77,3±0,3	n.d.	-	n.d.	88,7±6,7	n.d.	87,0±4,7	n.d.

^a, resultados expressos como média±desvio padrão (n=3), dose dos compostos 50 μ M; **n.d.**, não determinado. Linhagens de células tumorais humanas de carcinoma de pulmão (NCI-H460) glioblastoma (SF295) e melanoma (SK-MEL-28); linhagem não tumoral de células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC).

Assim como indicado no teste preliminar envolvendo as linhagens de células leucêmicas, as LS do tipo hirsutinolídeo, piptocarfina A (**1**) e diacetilpiptocarfol (**3**), apresentaram uma ótima e seletiva atividade citotóxica frente à linhagem de células tumorais de melanoma humano (SK-MEL-28), apresentando respectivamente $CC_{50}=6,7 \mu\text{M}$ ($IS=1,9$) e $CC_{50}=3,8 \mu\text{M}$ ($IS=3,3$). Além destes, o elemanolídeo vernodalina (**5**) se mostrou a LS com o mais potente e mais seletivo efeito citotóxico frente às células de SK-MEL-28, com valores de $CC_{50}=2,6 \mu\text{M}$ e $IS=4,6$. Corroborando com o potencial citotóxico observado para a vernodalina, Jisaka (1993) e colaboradores também demonstraram seu efeito frente às linhagens de leucemia linfóide de camundongos P-388 ($CC_{50}=0,11 \mu\text{g/mL}$) e L-1210 ($CC_{50}=0,17 \mu\text{g/mL}$).

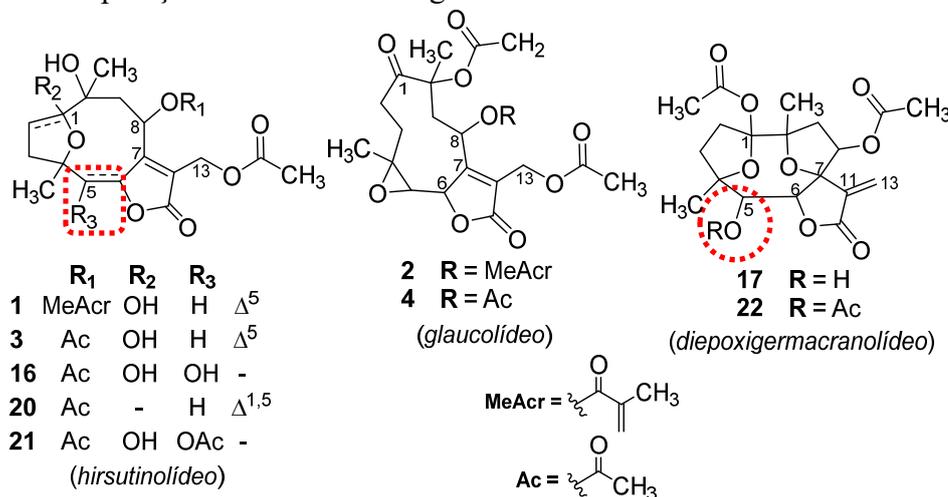
Em relação aos derivados semissintéticos de LS (**11-24**), os derivados análogos hirsutinolídeos **20** e **21**, e o análogo diepoxigermacranolídeo **22** apresentaram excelentes atividade citotóxica e seletividade diante, também, das células SK-MEL-28 de melanoma humano, respectivamente com valores de CC_{50} de $11,2 \mu\text{M}$ ($IS=2,5$); $5,0 \mu\text{M}$ ($IS=3,0$) e $3,1 \mu\text{M}$ ($IS=3,0$). Por outro lado, apesar de nenhum dos compostos testados ter sido efetivamente ativo contra as linhagens celulares NCI-H460 e SF295, o derivado semissintético **22** foi o composto que apresentou os menores valores de porcentagem de viabilidade celular para ambas as células (respectivamente, $53,1\pm 0,0$ e $67,3\pm 4,0\%$).

Na busca por novos agentes quimioterápicos, a seletividade do composto para células tumorais é um fator fundamental a ser considerado visando o desenvolvimento uma opção terapêutica clinicamente útil, uma vez que indica que a molécula pode apresentar menor toxicidade sistêmica quando usada em pacientes (LÓPEZ-LÁZARO, 2015). O índice de seletividade (IS) reflete o quão seletivo é o efeito de um composto contra as células tumorais. Valores de IS superiores a 2,0 sugerem uma toxicidade seletiva contra células tumorais (em sobreposição à citotoxicidade em células não tumorais), ao passo que valores de $IS < 2,0$ indicam que a substância pode apresentar toxicidade geral com efeito também em células normais. Ainda, entende-se que valores de IS superiores a 3,0 implicam em uma alta seletividade do composto frente às células cancerígenas (PRAYONG; BARUSRUX; WEERAPREEYAKUL, 2008; BADISA et al., 2009; LAVORGNA et al., 2019).

É importante ressaltar que os resultados observados para **20-22** revelam que os três derivados foram mais ativos que seus respectivos produtos de partida (sendo os compostos **20** e **21** produzidos a partir do derivado **16**, e o composto **22** a partir do derivado **17**) (Figura 153). Embora uma investigação da relação estrutura atividade seja dificultada em função do número reduzido de compostos ativos, uma breve avaliação em termos estruturais permitiu constatar que os derivados semissintéticos de LS mais ativos, compostos **21** e **22**, tratam-se de produtos

da reação de acetilação, indicando que a incorporação de um substituinte acetoxi na posição C-5 influencia positivamente na atividade desses compostos em relação ao material de partida contendo um grupo hidroxila na mesma posição.

Figura 153 – Comparação estrutural entre algumas das LS testadas frente à atividade citotóxica.



A reação de acetilação (ou esterificação) de LS com a produção de derivados mais ativos que o material de partida já vem sendo reportada na literatura, em que a presença de um substituinte acetoxi em relação ao grupo hidroxila está relacionada ao aumento da lipofilicidade do composto e com isso, facilitando a sua absorção nas células para desempenhar o efeito biológico (SAROGLOU et al., 2005; MALDONADO et al., 2014; NAKAGAWA-GOTO et al., 2016; CHEN et al., 2017).

Adicionalmente, apesar da fraca atividade apresentada para os demais derivados semissintéticos de LS frente à linhagem de células SK-MEL-28, a análise comparativa da porcentagem de viabilidade celular indicou que os derivados dos tipos cadinanolídeo (**11-12**) e vernomargolídeo hemiacetalico (**13-15**), com porcentagens de viabilidade variando entre 85,9±4,0 e 96,4±6,9%, foram menos ativos que o produto de partida glaucolídeo B (**4**, com 82,6±4,1% de viabilidade celular). Por outro lado, os derivados dos tipos hirsutinolídeo (**16**, **19**), germacranolídeo (**17**, **24**) e vernomargolídeo (**18**, **23**) foram mais ativos que componente de partida (**4**), com valores de porcentagem de viabilidade variando entre 66,9±3,6 e 79,2±6,4%.

Ainda que o derivado 5-hidroxi-5,6-dihidrohirsutinolido **16** não tenha se mostrado ativo em relação à célula SK-MEL-28, a partir da atividade apresentada pelos compostos isolados de Vernoniae **1** e **3** em associação com os resultado dos derivados **21** e **22**, pode-se dizer que o núcleo carbocíclico de LS do tipo hirsutinolídeo foi o mais ativo entre os compostos testados.

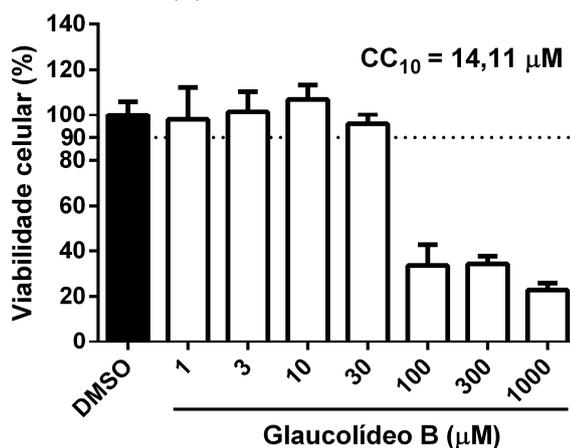
Apesar de não se ter observado a atividade citotóxica do derivado **16** frente às linhagens tumorais avaliadas, Flores-Guzmán e colaboradores (2019) reportaram o efeito antiproliferativo dose-dependente do 5-hidroxi-5,6-dihidroirsutinolídeo frente às células CaSki de câncer cervical (15 $\mu\text{g/mL}$), MDA-MB-231 de câncer de mama (18 $\mu\text{g/mL}$) e células SK-LU-1 de câncer de pulmão (30 $\mu\text{g/mL}$).

Diante dos resultados promissores observados para a LS vernodalina (**5**) e para o derivado diepoxigermacranolídeo (**22**), experimentos adicionais já estão em curso para a investigação do tipo de morte e ciclo celular das células de melanoma humano SK-MET-28 expostas à estes composto. Uma vez que os experimentos ainda estão sendo desenvolvidos os dados ainda serão devidamente tratados, e os resultados compilados em manuscritos que serão submetidos à apreciação de revistas científicas da área.

5.7.3 Avaliação da atividade anti-inflamatória

O glaucolídeo B (**1**) apresentou baixa citotoxicidade em macrófagos RAW 264.7 com valor de CC_{10} de 14,11 μM (Figura 154). Considerando que a viabilidade das células RAW 264.7 não foi significativamente afetada em doses abaixo de 14,11 μM , é importante ressaltar que todos os experimentos foram conduzidos respeitando esta concentração não tóxica.

Figura 154 – Efeito do glaucolídeo B (**4**) sobre a citotoxicidade em macrófagos RAW 264.7.



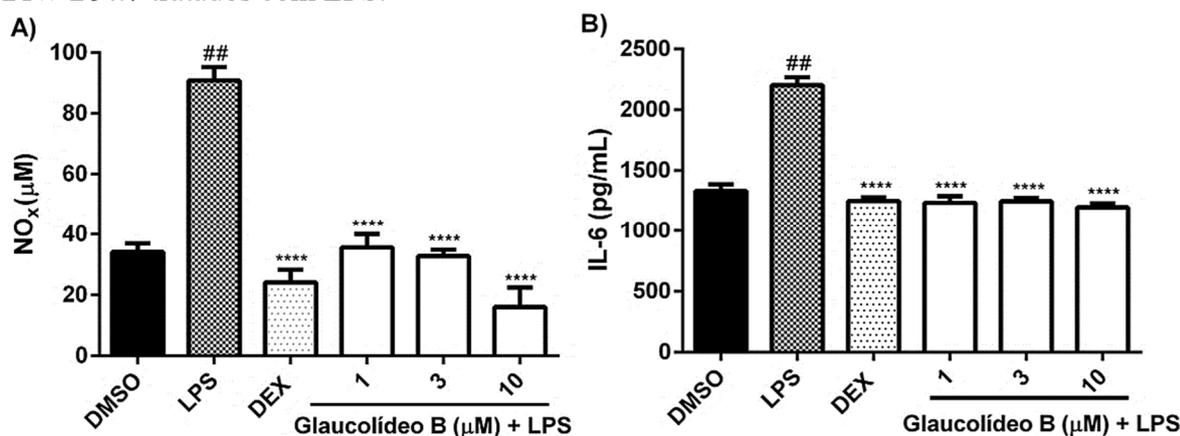
Cada valor foi expresso como média \pm desvio padrão ($n=3$). **DMSO**, células tratadas apenas com dimetilsulfóxido estéril; CC_{10} , concentração citotóxica a 10% do máximo (90% de viabilidade celular).

Em um estudo anterior, o glaucolídeo B mostrou efeitos citotóxicos e clastogênicos *in vitro* em linfócitos humanos a 8 $\mu\text{g/mL}$, aumentando a frequência de aberrações cromossômicas. No entanto, o mesmo efeito não foi observado *in vivo* nas células da medula

óssea de camundongos BALB/c tratados com este composto em concentrações de até 640 mg/kg (BURIM et al., 1999), sugerindo a ausência de toxicidade *in vivo* para a glaucolídeo B.

A secreção de NO (Figura 155A) e IL-6 (Figura 155B) em macrófagos tratados com LPS foi significativamente inibida pelo tratamento com glaucolídeo B (4) nas doses de 1, 3 e 10 μM ($p < 0,0001$). Além disso, foi observada uma inibição dose-dependente de secreção de NO, cujos valores de NO foram $35,6 \pm 4,4$, $32,8 \pm 2,1$ e $16,0 \pm 6,4$ μM , respectivamente para doses de 1, 3 e 10 μM de 1. Como esperado, o controle anti-inflamatório dexametasona (DEX) a 7 μM também reduziu os níveis desses mediadores pró-inflamatórios liberados dos macrófagos RAW 264.7 ($p < 0,0001$). De forma interessante, o efeito inibitório sobre o NO e IL-6 apresentado pelo glaucolídeo B (4) foi muito semelhante ao observado para o composto de referência dexametasona (valores de p entre 0,0648 e 0,2605 e entre 0,6245 a $>0,9999$, respectivamente para NO e IL-6 em comparação ao controle).

Figura 155 – Efeitos do glaucolídeo B (4) sobre os níveis de NO (A) e IL-6 (B) em macrófagos RAW 264.7 tratados com LPS.



Os resultados foram expressos como média±desvio padrão (n=3); **** $p < 0,0001$ vs grupo LPS; ## $p < 0,01$ vs grupo BLK (células não inflamadas – células pré-tratadas com veículo); DMSO, células tratadas apenas com dimetilsulfóxido estéril; LPS, células tratadas apenas com lipopolissacarídeo (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$); DEX, células pré-tratadas com dexametasona (7 μM) antes da administração de LPS.

Do modo similar, outra LS do tipo glaucolídeo, nomeadamente o glaucolídeo A (2) (diferindo do glaucolídeo B pela presença de uma porção metacrililoíloxi em C-8 em vez de um grupo acetoxi) também foi capaz de inibir a síntese de NO dependente da enzima NO sintase induzível (iNOS) (IC_{50} de 36,8 μM) nos mesmos macrófagos RAW 264.7 tratados com LPS em estudos anteriores, embora não tenha mostrado efeito significativo na inibição da ativação do NF- κB (DIRSCH et al., 2000). Esses achados sugerem um possível mecanismo alternativo para a redução da síntese de NO do que pela inibição do NF- κB .

O mecanismo proposto pelo qual as LS exercem a atividade anti-inflamatória é baseado em seu efeito sobre a secreção de citocinas pró-inflamatórias e da diminuição da atividade do NF- κ B, afetando a atividade enzimática da ciclooxigenase (COX) e da iNOS (KREUGER et al., 2012b; HOHMANN et al., 2016). Acredita-se que a capacidade das LS em prevenir a ativação de NF- κ B está relacionada a uma reação do tipo adição de Michael aos grupos sulfidríla de cisteína nucleofílica (Cys-38 e Cys-120) do complexo NF- κ B (subunidades p50/p65), a partir das carbonilas α,β - ou α,β,γ -insaturadas das LS (RÜNGELER et al., 1999; GARCÍA-PIÑERES et al., 2001; CHO, 2006). Além disso, a redução da ativação do NF- κ B também pode estar associada à indução da degradação dos inibidores κ B alfa (I κ B- α) e beta (I κ B- β), interferindo no balanço do complexo IKK (NF- κ B/I κ B quinase) (HEHNER et al., 1998; CHO, 2006; RAUH et al., 2011a).

Embora a presença de uma butirolactona contendo uma α,β -insaturação exocíclica pareça ser crucial para a atividade da LS (DIRSCH et al., 2000; CHO, 2006), os resultados para o glaucolídeo B (**4**) demonstram um efeito anti-inflamatório promissor para essa LS contendo uma α,β -insaturação endocíclica no anel γ -lactônico. Nesse contexto, outros grupos funcionais potencialmente reativos, como os grupos epóxido e carbonila cetônica, também podem estar envolvidos na atividade observada para o composto **4** (DIRSCH et al., 2000; CHO, 2006).

Esta é a primeira vez que a avaliação do efeito anti-inflamatório do glaucolídeo B (**4**) está sendo relatada e esses dados podem ajudar a estabelecer o perfil imunomodulatório para esse composto. No entanto, mais estudos *in vitro* e *in vivo* são necessários para entender melhor as propriedades anti-inflamatórias e o exato mecanismo de ação do glaucolídeo B.

Considerado os resultados promissores observados para a LS glaucolídeo B (**4**), os demais compostos obtidos com o desenvolvimento da presente tese de doutorado, as LS isoladas de *Vernonieae* (**1-10**) e os derivados semissintéticos de LS (**11-24**) foram também encaminhados para a investigação do seu potencial anti-inflamatório (em parceria). Entretanto, devido ao fato de os ensaios ainda estarem sendo realizados, os dados ainda serão tratados e os resultados compilados em manuscritos a serem submetidos para apreciação por revistas científicas da área.

6 CONCLUSÕES

- A técnica de extração por lavagem foliar nas condições ótimas estabelecidas, empregando como líquido extrator a acetona durante dez minutos de extração e de maneira semiautomatizada, mostrou-se um método seletivo e eficaz para a extração de lactona sesquiterpênica (LS) a partir das espécies selecionadas de Vernonieae, haja visto o perfil cromatográfico por CCD e CLUE-EM dos extratos obtidos.
- A partir da caracterização das LS do tipo hirsutinolídeo e glaucolídeo (**1-4**) por ESI-QToF-EM e EM/EM foi possível estabelecer uma estratégia de diferenciação entre esses dois subtipos de LS, baseando-se nas diferenças entre seus respectivos perfis de ionização, formação de adutos e fragmentação.
- Identificou-se o conjunto dos íons em m/z 277, m/z 259, m/z 241 e m/z 231 como íons diagnóstico para as LS do tipo hirsutinolídeo e glaucolídeo, a serem empregados em futuras investigações e caracterização desses subtipos de LS.
- O mecanismo de fragmentação para as LS do tipo glaucolídeo está sendo pela primeira vez detalhadamente discutido/elucidado.
- A estratégia de diferenciação entre os subtipos de LS hirsutinolídeo e glaucolídeo foi utilizada com sucesso para estabelecer o perfil químico do extrato de lavagem foliar (ELF) de *V. tweediana*, empregando-se um método qualitativo de eficiente separação por CLUE-EM na desreplicação de 14 compostos, dos quais sete flavonoides e sete LS, sendo um décimo quinto composto parcialmente caracterizado e atribuído a uma LS desconhecida.
- A técnica de cromatografia de partição centrífuga (CPC) provou ser um método de fracionamento simples e eficiente para o isolamento de LS, em única etapa e com ótimos rendimentos, e permitiu a purificação de 1,04 g de glaucolídeo B (**4**, 50% da fração de partida) a partir de ELF de *L. chamissonis*, a purificação de 0,98 g de glaucolídeo B (**4**, 38% da fração de partida) a partir de ELF de *C. scorpioides*, e a purificação de 693 mg de vernodalina (**5**, 43% da fração de partida) a partir de ELF de *V. condensata*.

- Esta é a primeira vez que o glaucolídeo B (**4**) está sendo descrito para as espécies *L. chamissonis* e *C. scorpioides*.
- Ainda, a técnica de CPC foi novamente eficiente na purificação de análogos estruturais de LS a partir de duas frações secundárias oriundas do fracionamento do ELF de *V. condensata*, permitindo o isolamento de cinco LS (**6-10**) apenas com a adição de uma segunda etapa, sendo a primeira vez em que o composto 11,13,16,17-tetrahidrovernolida (**6**) é descrito para a espécie *V. condensata*.
- A estratégia reacional de ciclização transanular se mostrou um abordagem eficiente para a produção de derivados semissintéticos de LS, e que associada à condições reacionais complementares possibilitou a produção de quatorze (**11-24**) derivados, dos quais dez compostos (**13-15, 17-19, 21-24**) estão sendo descritos pela primeira vez, enquanto que **12** está sendo obtido pela primeira vez por semissíntese.
- A piptocarфина A (**1**), diacetilpiptocarfol (**3**) e vernodalina (**5**) apresentaram moderada a fraca atividade leishmanicida ($IC_{50}=18,83$ a $26,58 \mu M$) frente à *Leishmania amazonensis*, e moderada atividade tripanocida ($IC_{50}=10,62$ a $20,57 \mu M$) frente à *Trypanosoma cruzi*, enquanto que as LS glaucolídeo A (**2**) e glaucolídeo B (**4**) não foram ativas para ambos os parasitas.
- A piptocarфина A (**1**) apresentou promissora atividade citotóxica *in vitro* frente às linhagens de células leucêmicas Nalm-6 e K-562 ($CC_{50}=2,8 \mu M$ e $CC_{50}=3,0 \mu M$, respectivamente), enquanto que o glaucolídeo A (**2**) mostrou moderada atividade frente às linhagens de células leucêmicas K-562, HL-60, REH e JURKAT, e tumorais PC3, OVCAR, NCI-1299 e HOS ($CC_{50}=8,5$ a $27,2 \mu M$).
- Ainda, a piptocarфина A (**1**), diacetilpiptocarfol (**3**) e vernodalina (**5**) apresentaram uma ótima e seletiva atividade citotóxica ($CC_{50}=6,7 \mu M/IS=1,9$, $CC_{50}=3,8 \mu M/IS=3,3$ e $CC_{50}=2,6 \mu M/IS=4,6$, respectivamente) frente à linhagem de células tumorais de melanoma humano (SK-MEL-28).
- Os derivados semissintéticos análogos hirsutinolídeos **20** e **21**, e o análogo diepoxigermacranolídeo **22** apresentaram excelentes atividade citotóxica e seletividade ($CC_{50}=11,2 \mu M/IS=2,5$, $CC_{50}=5,0 \mu M/IS=3,0$ e $CC_{50}=3,1 \mu M/IS=3,0$, respectivamente) frente

à linhagem de células tumorais de melanoma humano (SK-MEL-28), indicando que a proposta de produção de derivados de LS com atividade e seletividade melhoradas em relação ao material de partida foi bem sucedida.

- Nenhum dos compostos testados (**1-24**) foi ativo contra as linhagens celulares tumorais de carcinoma de pulmão (NCI-H460) e de glioblastoma (SF295).
- O glaucolídeo B (**4**) apresentou promissora atividade anti-inflamatória com inibição da produção de metabólitos nitrito/nitrato (NO_x) e da secreção de interleucina 6 pró-inflamatória em células RAW 264.7 estimuladas por lipopolissacarídeos.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

O presente trabalho cumpriu com o seu objetivo principal, o qual foi fundamentado na modificação estrutural por semissíntese de lactonas sesquiterpênicas (LS) isoladas de espécies de Vernoniae (Asteraceae) visando à otimização de suas propriedades biológicas, neste caso, demonstrada em função da atividade citotóxica frente à células de melanoma humano SK-MET-28 (*in vitro*).

Ainda assim, para melhor compreensão do mecanismo de ação dos compostos ativos, experimentos complementares relativos à investigação do tipo de morte e ciclo celular das células de melanoma humano SK-MET-28 expostas ao derivado **22** e ao composto isolado **5** mais ativos, ainda estão sendo finalizados e os resultados obtidos serão compilados em manuscritos a serem submetidos à apreciação de revistas científicas da área.

Ainda em relação a avaliação do potencial biológico das LS, considerando a reconhecida atividade anti-inflamatória apresentada por essa classe de compostos (HOHMANN et al., 2016; WANG et al., 2017), e tendo por base os resultados anti-inflamatórios promissores observados para a LS glaucolídeo B (**4**), as demais LS isoladas de Vernoniae (**1-10**) bem como os derivados semissintéticos de LS (**11-24**) foram encaminhados para a investigação da atividade anti-inflamatória (em parceria). Contudo, em função de os ensaios ainda estarem sendo realizados, os dados ainda serão tratados e os resultados compilados na forma de manuscrito para submissão à revista científica da área.

Os dados derivados da avaliação citotóxica das LS piptocarфина A (**1**) frente à linhagens de células leucêmicas *in vitro* motivaram a realização de um estudo paralelo para a avaliação antitumoral (*in vivo*), o qual está em vias de conclusão e os resultados também serão reunidos em um manuscrito a ser submetido à revista científica na área.

Uma vez obtida em boa quantidade a partir do fracionamento por cromatografia de partição centrífuga (CPC) do ELF da espécie *Vernonanthura condensata*, e considerando os promissores resultados de citotoxicidade seletiva observados frente às células de melanoma humano (SK-MET-28), a LS vernodalina (**5**) será sujeita à reações de modificação molecular, por exemplo, explorando a porção do metileno exocíclico em reações de adição de Michael com aminas (primárias e secundárias) (WANG et al., 2015) e/ou em reação de arilação de Heck (VADAPARTHI et al., 2015) visando a produção de derivados semissintético com propriedades biológicas melhoradas.

Por fim, duas publicações foram produzidas respectivamente a partir dos resultados provenientes da purificação do glaucolídeo B (**4**) por CPC a partir do extratos de lavagem foliar

(ELF) da espécie *Lepidaploa chamissonis* e da avaliação de suas propriedades anti-inflamatórias (DA SILVA et al., 2019a), assim como a partir dos dados de caracterização das LS do tipo hirsutinolídeo e glaucolídeo por CLUE-EM e a investigação do perfil fitoquímico do ELF da espécie *Vernonanthura tweedieana* (DA SILVA et al., 2019b).

REFERÊNCIAS

- ABDEL-BASET, Z.H.; SOUTHWICK, L.; PADOLINA, W.G.; YOSHIOKA, H.; MABRY, T.J.; JONES, S.B. Sesquiterpene lactones: a survey of 21 United States taxa from the genus *Vernonia* (Compositae). **Phytochemistry**, v. 10, n. 9, p. 2201-2204, 1971.
- ABDEL-SATTAR, E.; MOSSA, J.; EL-ASKARY, H.I. Hirsutinolides from *Vernonia cinerascens*. **Die Pharmazie**, v. 55, n. 2, p. 144-145, 2000.
- ABEGAZ, B.M.; KEIGE, A.W.; DIAZ, J.D.; HERZ, W. Sesquiterpene lactones and other constituents of *Vernonia* species from Ethiopia. **Phytochemistry**, v. 37, n. 1, p. 191-196, 1994.
- ABRAHAM, M.J.; MURTOLA, T.; SCHULZ, R.; PÁLL, S.; SMITH, J.C.; HESS, B.; LINDAHL, E. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. **SoftwareX**, v. 1-2, n., p. 19-25, 2015.
- ABRANKÓ, L.; GARCÍA-REYES, J.F.; MOLINA-DÍAZ, A. In-source fragmentation and accurate mass analysis of multiclass flavonoid conjugates by electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. **J. Mass Spectrom.**, v. 46, n. 5, p. 478-488, 2011.
- ACHIKA, J.I.; ARTHUR, D.E.; GERALD, I.; ADEDAYO, A. A review on the phytoconstituents and related medicinal properties of plants in the Asteraceae family. **Journal of Applied Chemistry**, v. 7, n. 8, p. 1-8, 2014.
- ADEKENOVA, A.S.; SAKENOVA, P.Y.; IVASENKO, S.A.; KHABAROV, I.A.; ADEKENOV, S.M.; BERTHOD, A. Gram-scale purification of two sesquiterpene lactones from *Chartolepsis intermedia* Boiss. **Chromatographia**, v. 79, n. 1-2, p. 37-43, 2016.
- AFONSO, S.; MATOS, A.C.D.; MARENGO, V.A.; MOREIRA, E.G.; SOARES, D.X.; KOOLEN, H.H.F.; SCARMINIO, I.S. Seasonal effects on HPLC-DAD-UV and UPLC-ESI-MS fingerprints and analgesic activities of *Vernonia condensata* Baker extracts. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 2, p. 350-358, 2015.
- AGUIAR, P.F.; RODRIGUES, R.K. Leishmaniose visceral no Brasil: artigo de revisão. **Unimontes Científica**, v. 19, n. 1, p. 191-204, 2017.
- AHLRICH, R.; MAY, K. Contracted all-electron Gaussian basis sets for atoms Rb to Xe. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v. 2, n. 5, p. 943-945, 2000.
- AKENDENGUE, B.; ROBLOT, F.; LOISEAU, P.M.; BORIES, C.; NGOU-MILAMA, E.; LAURENS, A.; HOCQUEMILLER, R. Klaivanolide, an antiprotozoal lactone from *Uvaria klaineana*. **Phytochemistry**, v. 59, n. 8, p. 885-888, 2002.
- ALAM, M.; PARK, S. Regioselective formation of chlorohydrins from ring-opening of steroidal epoxides using silica-supported BiCl₃: a spectral and X-ray crystallographic study. **Tetrahedron Letters**, v. 58, n. 29, p. 2872-2876, 2017.
- ALARCON, M.C.B.V.; LOPES, J.L.C.; HERZ, W. Glaucolide B, a molluscicidal sesquiterpene lactone, and other constituents of *Vernonia eremophila*. **Planta Medica**, v. 56, n. 03, p. 271-273, 1990.

ALVARENGA, S.A.V.; FERREIRA, M.J.P.; EMERENCIANO, V.P.; CABROL-BASS, D. Chemosystematic studies of natural compounds isolated from Asteraceae: characterization of tribes by principal component analysis. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 56, n. 1, p. 27-37, 2001.

ÁLVAREZ-CALERO, J.M.A.; RUIZ, E.; LÓPEZ-PÉREZ, J.L.; JARAÍZ, M.N.; RUBIO, J.E.; JORGE, Z.A.D.; SUÁREZ, M.; MASSANET, G.M. 15-hydroxygermacranolides as sources of structural diversity: synthesis of sesquiterpene lactones by cyclization and rearrangement reactions. Experimental and DFT study. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 83, n. 10, p. 5480-5495, 2018.

ALVES, J.C.F. A review on the chemistry of eremanthine: a sesquiterpene lactone with relevant biological activity. **Organic Chemistry International**, v. 2011, n. Article ID 170196, p. 1-35, 2011.

AMBRÓSIO, S.R.; OKI, Y.; HELENO, V.C.G.; CHAVES, J.S.; NASCIMENTO, P.G.B.D.; LICHSTON, J.E.; CONSTANTINO, M.G.; VARANDA, E.M.; DA COSTA, F.B. Constituents of glandular trichomes of *Tithonia diversifolia*: relationships to herbivory and antifeedant activity. **Phytochemistry**, v. 69, n. 10, p. 2052-2060, 2008.

AMORIM, M.H.R.; GIL DA COSTA, R.M.; LOPES, C.; BASTOS, M.M.S.M. Sesquiterpene lactones: adverse health effects and toxicity mechanisms. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 43, n. 7, p. 559-579, 2013.

APPEZZATO-DA-GLORIA, B.; DA COSTA, F.B.; DA SILVA, V.C.; GOBBO-NETO, L.; REHDER, V.L.G.; HAYASHI, A.H. Glandular trichomes on aerial and underground organs in *Chrysolaena* species (Vernonieae - Asteraceae): structure, ultrastructure and chemical composition. **Flora**, v. 207, n. 12, p. 878-887, 2012.

ARAKAWA, N.S.; SCHORR, K.; AMBROSIO, S.R.; MERFORT, I.; DA COSTA, F.B. Further sesquiterpene lactones from *Viguiera robusta* and the potential anti-inflammatory activity of a heliangolide: inhibition of human neutrophil elastase release. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 63, n. 7-8, p. 533-538, 2008.

ARHA, D.; RAMAKRISHNA, E.; GUPTA, A.P.; RAI, A.K.; SHARMA, A.; AHMAD, I.; RIYAZUDDIN, M.; GAYEN, J.R.; MAURYA, R.; TAMRAKAR, A.K. Isoalantolactone derivative promotes glucose utilization in skeletal muscle cells and increases energy expenditure in db/db mice via activating AMPK-dependent signaling. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 460, n., p. 134-151, 2018.

ASSUNÇÃO, L.S.; KRETZER, I.F.; RESTREPO, J.A.S.; DE MELLO JUNIOR, L.J.; SILVA, A.H.; DE MEDEIROS OLIVEIRA, E.; FERREIRA, M.; SÁ, M.M.; CRECZYNSKI-PASA, T.B. Antitumor activity of methyl (*Z*)-2-(isothioureidomethyl)-2-pentenoate hydrobromide against leukemia cell lines via mitotic arrest and apoptotic pathways. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1863, n., p. 1332-1342, 2019.

ATANASOV, A.G.; WALTENBERGER, B.; PFERSCHY-WENZIG, E.-M.; LINDER, T.; WAWROSCHE, C.; UHRIN, P.; TEMML, V.; WANG, L.; SCHWAIGER, S.; HEISS, E.H. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: a review. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 8, p. 1582-1614, 2015.

BADISA, R.B.; DARLING-REED, S.F.; JOSEPH, P.; COOPERWOOD, J.S.; LATINWO, L.M.; GOODMAN, C.B. Selective cytotoxic activities of two novel synthetic drugs on human breast carcinoma MCF-7 cells. **Anticancer Research**, v. 29, n. 8, p. 2993-2996, 2009.

BAELL, J.B.; NISSINK, J.W.M. Seven Year Itch: pan-assay interference compounds (PAINS) in 2017 - Utility and limitations. **ACS Chemical Biology**, v. 13, n. 1, p. 36-44, 2017.

BANERJI, K.K. Kinetics and mechanism of the oxidation of alcohols by pyridinium chlorochromate. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 51, n. 9, p. 2732-2734, 1978.

BARANOWSKA, I.; HEJNIAK, J.; MAGIERA, S. LC-ESI-MS/MS method for the enantioseparation of six flavanones. **Anal. Methods**, v. 9, n. 6, p. 1018-1030, 2017.

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

BARBOSA, H.M.A.; DE MELO, M.M.R.; COIMBRA, M.A.; PASSOS, C.P.; SILVA, C.M. Optimization of the supercritical fluid coextraction of oil and diterpenes from spent coffee grounds using experimental design and response surface methodology. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 85, n., p. 165-172, 2014.

BARBOSA, L.C.D.A.; COSTA, A.V.; PILÓ-VELOSO, D.; LOPES, J.L.C.; HERNANDEZ-TERRONES, M.G.; KING-DIAZ, B.; LOTINA-HENNSEN, B. Phytogrowth-inhibitory lactones derivatives of glaucolide B. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 59, n. 11-12, p. 803-810, 2004.

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

BARDÓN, A.; MONTANARO, S.; CATALÁN, C.A.N.; DIAZ, J.G.; HERZ, W. Piptocarphols and other constituents of *Chrysolaena verbascifolia* and *Lessingianthus rubricaulis*. **Phytochemistry**, v. 34, n. 1, p. 253-259, 1993.

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

BAUTISTA, E.; CALZADA, F.; LÓPEZ-HUERTA, F.A.; YÉPEZ-MULIA, L.; ORTEGA, A. Antiprotozoal activity of 8-acyl and 8-alkyl incomptine A analogs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, n. 15, p. 3260-3262, 2014.

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

BECERRA, M.; BOUTEFNOUCHET, S.; CÓRDOBA, O.; VITORINO, G.P.; BREHU, L.; LAMOUR, I.; LAIMAY, F.; EFSTATHIOU, A.; SMIRLIS, D.; MICHEL, S.; KRITSANIDA, M.; FLORES, M.L.; GROUGNET, R. Antileishmanial activity of fucosterol recovered from *Lessonia vadosa* Searles (Lessoniaceae) by SFE, PSE and CPC. **Phytochemistry Letters**, v. 11, n., p. 418-423, 2015.

BECKE, A.D. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. **Phys. Rev. A**, v. 38, n. 6, p. 3098-3100, 1988.

BERENDSEN, H.J.C.; GRIGERA, J.R.; STRAATSMA, T.P. The missing term in effective pair potentials. **J. Phys. Chem.**, v. 91, n. 24, p. 6269-6271, 1987.

BERTHOD, A. Separation and purification with a liquid stationary phase. **Separations**, v. 4, n. 4, p. 30-35, 2017.

BERTHOD, A.; CARDA-BROCH, S. Determination of liquid-liquid partition coefficients by separation methods. **J. Chromatogr. A**, v. 1037, n. 1, p. 3-14, 2004.

BERTHOD, A.; HASSOUN, M.; RUIZ-ANGEL, M.J. Alkane effect in the Arizona liquid systems used in countercurrent chromatography. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 383, n. 2, p. 327-340, 2005.

BESSADA, S.M.F.; BARREIRA, J.C.M.; OLIVEIRA, M.B.P.P. Asteraceae species with most prominent bioactivity and their potential applications: a review. **Industrial Crops and Products**, v. 76, n., p. 604-615, 2015.

BOEING, T.; DA SILVA, L.M.; SOMENSI, L.B.; CURY, B.J.; COSTA, A.P.M.; PETREANU, M.; NIERO, R.; DE ANDRADE, S.F. Antiulcer mechanisms of *Vernonia condensata* Baker: a medicinal plant used in the treatment of gastritis and gastric ulcer. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 184, n., p. 196-207, 2016.

BOHLMANN, F.; BRINDÖPKE, G.; RASTOGI, R.C. A new type of germacranolide from *Vernonia* species. **Phytochemistry**, v. 17, n. 3, p. 475-482, 1978.

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

BOHLMANN, F.; MAHANTA, P.K.; DUTTA, L.N. Weitere hirsutinolide aus *Vernonia*-arten. **Phytochemistry**, v. 18, n. 2, p. 289-291, 1979.

BOHLMANN, F.; MÜLLER, L.; GUPTA, R.K.; KING, R.M.; ROBINSON, H. Hirsutinolides from *Vernonia* species. **Phytochemistry**, v. 20, n. 9, p. 2233-2237, 1981.

BOHLMANN, F.; ZDERO, C.; KING, R.M.; ROBINSON, H. Neue sesquiterpenlactone aus *Stokesia laevis*. **Phytochemistry**, v. 18, n. 6, p. 987-989, 1979.

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

BOHM, B.A.; STUESSY, T.F. Flavonoids of Vernonieae and Liabeae. in BOHM, B. A.; STUESSY, T. F. **Flavonoids of the Sunflower Family (Asteraceae)** Wien, Austria: Springer-Verlag Wien, p. 360-368, 2001.

BOJCZUK, M.; ŻYŻELEWICZ, D.; HODUREK, P. Centrifugal partition chromatography – a review of recent applications and some classic references. **J. Sep. Sci.**, v. 40, n. 7, p. 1429–1630, 2017.

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

BORKOSKY, S.; BARDÓN, A.; CATÁLAN, C.A.N.; GEDRIS, T.E.; HERZ, W. A piptocarphin and other constituents of *Lepidaploa myriocephala*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, n. 1, p. 107-109, 2003.

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

BORKOSKY, S.; VALDÉS, D.A.; BARDÓN, A.; DÍAZ, J.G.; HERZ, W. Sesquiterpene lactones and other constituents of *Eirmocephala megaphylla* and *Cyrtocymura cincta*. **Phytochemistry**, v. 42, n. 6, p. 1637-1639, 1996.

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

BRANQUINHO, R.T.; MOSQUEIRA, V.C.F.; DE OLIVEIRA-SILVA, J.C.V.; SIMÕES-SILVA, M.R.; DE LANA, M. Sesquiterpene lactone in nanostructured parenteral dosage form is efficacious in experimental Chagas disease. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 4, p. 2067-2075, 2014.

BRASIL. **Farmacopéia brasileira 5ª**, Brasília, Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa, 2010.

BRASIL. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil**, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), Ministério da Saúde, Coordenação de Prevenção e Vigilância, Rio de Janeiro/RJ, INCA, 2017.

BURIM, R.V.; CANALLE, R.; LOPES, J.L.C.; TAKAHASHI, C.S. Genotoxic action of the sesquiterpene lactone glaucolide B on mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. **Genet. Mol. Biol.**, v. 22, n. 3, p. 401-406, 1999.

BURIM, R.V.; CANALLE, R.; LOPES, J.L.C.; VICHNEWSKI, W.; TAKAHASHI, C.S. Genotoxic action of the sesquiterpene lactone centratherin on mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. **Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis**, v. 21, n. 6, p. 383-393, 2001.

BUSKUHL, H.; DE OLIVEIRA, F.L.; BLIND, L.Z.; DE FREITAS, R.A.; BARISON, A.; CAMPOS, F.R.; CORILO, Y.E.; EBERLIN, M.N.; CARAMORI, G.F.; BIAVATTI, M.W. Sesquiterpene lactones from *Vernonia scorpioides* and their *in vitro* cytotoxicity. **Phytochemistry**, v. 71, n. 13, p. 1539-1544, 2010.

CABRERA, A.L.; KLEIN, R.M. Fascículo Compostas: 3. Tribo Vernonieae, *Vernonia chamissonis* Lessing. *in* REITZ, R. **Flora Ilustrada Catarinense**, Itajaí/SC, Brasil: Herbário "Barbosa Rodrigues", p. 296-298, 1980a.

CABRERA, A.L.; KLEIN, R.M. Fascículo Compostas: 3. Tribo Vernonieae. *Vernonia scorpioides* (Lam.) Perssoon. *in* REITZ, R. **Flora Ilustrada Catarinense**, Itajaí/SC, Brasil: Herbário "Barbosa Rodrigues", p. 355-359, 1980b.

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

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

CANO-FLORES, A.; DELGADO, G. Transformations of some sesquiterpene lactones by filamentous fungi. Cytotoxic evaluations. **Chemistry & Biodiversity**, v. 14, n. e1700211, p. 1-8, 2017.

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

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

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

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

CECH, N.B.; ENKE, C.G. Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. **Mass Spectrom. Rev.**, v. 20, n. 6, p. 362-387, 2001.

CHADWICK, M.; TREWIN, H.; GAWTHROP, F.; WAGSTAFF, C. Sesquiterpenoids lactones: benefits to plants and people. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 14, n. 6, p. 12780-12805, 2013.

CHAGAS-PAULA, D.A.; DE OLIVEIRA, R.B.; DA SILVA, V.C.; GOBBO-NETO, L.; GASPAROTO, T.H.; CAMPANELLI, A.P.; FACCIOLI, L.H.; DA COSTA, F.B. Chlorogenic acids from *Tithonia diversifolia* demonstrate better anti-inflammatory effect than indomethacin and its sesquiterpene lactones. **J. Ethnopharmacol.**, v. 136, n. 2, p. 355-362, 2011.

CHAI, Y.; GAO, G.; SHEN, S.; LIU, X.; LU, C. Neutral losses of sodium benzoate and benzoic acid in the fragmentation of the $[M+Na]^+$ ions of methoxyfenozide and tebufenozide via intramolecular rearrangement in electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, v. 31, n. 3, p. 245-252, 2017.

CHATURVEDI, D. Sesquiterpene lactones: structural diversity and their biological activities. *in* TIWARI, V. K.; MISHRA, B. B. **Opportunity, Challenges and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry** Kerala, India: Research Signpost, p. 313-334, 2011a.

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

CHATURVEDI, D.; DWIVEDI, P.K.; MISHRA, M. Sesquiterpene lactones: a versatile class of structurally diverse natural products and their semisynthetic analogs as potential anticancer agents. *in* BRAHMACHARI, G. **Bioactive Natural Products: Chemistry and Biology**, Weinheim, Alemanha: Wiley-VCH, Verlag GmbH & Co. KGaA, p. 321-348, 2015.

- CHAZIN, E.D.L. Acetato de Etila (CAS No. 141-78-6). **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 6, p. 872-883, 2012.
- CHEN, J.; LI, W.; YAO, H.; XU, J. Insights into drug discovery from natural products through structural modification. **Fitoterapia**, v. 103, n., p. 231-241, 2015.
- CHEN, L. Uma breve introdução a carcinogênese química. **Química Nova**, v. 3, n. 4, p. 152-160, 1980.
- CHEN, L.; ZHANG, J.-P.; LIU, X.; TANG, J.-J.; XIANG, P.; MA, X.-M. Semisynthesis, an anti-inflammatory effect of derivatives of 1 β -hydroxy alantolactone from *Inula britannica*. **Molecules**, v. 22, n. 11, p. 1835-1842, 2017.
- CHEN, Q.-F.; LIU, Z.-P.; WANG, F.-P. Natural sesquiterpenoids as cytotoxic anticancer agents. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 13, p. 1153-1164, 2011.
- CHO, J.Y. Sesquiterpene lactones as a potent class of NF- κ B activation inhibitors. **Curr. Enzym. Inhib.**, v. 2, n. 4, p. 329-341, 2006.
- CHOODEJ, S.; PUDHOM, K.; MITSUNAGA, T. Inhibition of TNF- α -induced inflammation by sesquiterpene lactones from *Saussurea lappa* and semi-synthetic analogues. **Planta Medica**, v. 84, n. 5, p. 329-335, 2018.
- CHUKWUJEKWU, J.C.; LATEGAN, C.A.; SMITH, P.J.; VAN HEERDEN, F.R.; VAN STADEN, J. Antiplasmodial and cytotoxic activity of isolated sesquiterpene lactones from the acetone leaf extract of *Vernonia colorata*. **South African Journal of Botany**, v. 75, n. 1, p. 176-179, 2009.
- CLARKE, P.A.; REEDER, A.T.; WINN, J. Transannulation reactions in the synthesis of natural products. **Synthesis**, v. 2009, n. 5, p. 691-709, 2009.
- COSTA, A.V.; BARBOSA, L.C.D.A.; LOPES, J.L.C.; PILÓ-VELOSO, D. Complete ¹H and ¹³C NMR signal assignments of glaucolide B. **Magn. Reson. Chem.**, v. 38, n. 8, p. 675-679, 2000.
- COUSSENS, L.M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 860-, 2002.
- COWALL, P.; CASSADY, J.M.; CHANG, C.-J.; KOZLOWSKI, J.F. Isolation and structure determination of piptocarphins A-F, cytotoxic germacranolide lactones from *Piptocarpha chontalensis*. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 46, n. 6, p. 1108-1114, 1981.
- CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.
- CRUSZ, S.M.; BALKWILL, F.R. Inflammation and cancer: advances and new agents. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 12, n. 10, p. 584-596, 2015.
- CRUZ, A.K.; DE TOLEDO, J.S.; FALADE, M.; TERRAO, M.C.; KAMCHONWONGPAISAN, S.; KYLE, D.E.; UTHAIPIBULL, C. Current treatment and drug discovery against *Leishmania* spp. and *Plasmodium* spp.: a review. **Current drug targets**, v. 10, n. 3, p. 178-192, 2009.
- DA COSTA, F.B.; TERFLOTH, L.; GASTEIGER, J. Sesquiterpene lactone-based classification of three Asteraceae tribes: a study based on self-organizing neural networks applied to chemosystematics. **Phytochemistry**, v. 66, n. 3, p. 345-353, 2005.

DA SILVA, J.B.; DE FREITAS MENDES, R.; TOMASCO, V.; PINTO, N.D.C.C.; DE OLIVEIRA, L.G.; RODRIGUES, M.N.; DE OLIVEIRA ARAGÃO, D.M.; DE AGUIAR, J.A.K.; ALVES, M.S.; CASTAÑON, M.C.N.M. New aspects on the hepatoprotective potential associated with the antioxidant, hypocholesterolemic and anti-inflammatory activities of *Vernonia condensata* Baker. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 198, n., p. 399-406, 2017.

DA SILVA, J.B.; TEMPONI, V.D.S.; FERNANDES, F.V.; ALVES, G.D.A.D.; MATOS, D.M.D.; GASPARETTO, C.M.; RIBEIRO, A.; DE PINHO, J.D.J.R.G.; ALVES, M.S.; DE SOUSA, O.V. New approaches to clarify antinociceptive and anti-inflammatory effects of the ethanol extract from *Vernonia condensata* leaves. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 12, p. 8993-9008, 2011.

DA SILVA, J.B.; TEMPONI, V.D.S.; GASPARETTO, C.M.; FABRI, R.L.; ARAGÃO, D.M.D.O.; PINTO, N.D.C.C.; RIBEIRO, A.; SCIO, E.; DEL-VECHIO-VIEIRA, G.; DE SOUSA, O.V. *Vernonia condensata* Baker (Asteraceae): A promising source of antioxidants. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2013, n. ID 698018, p. 1-9, 2013.

DA SILVA, L.A.L. Investigação fitoquímica da espécie *Vernonanthura tweedieana* (Baker) H. Rob. **Dissertação de Mestrado**, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Florianópolis/SC, Brasil, 2015.

DA SILVA, L.A.L.; FAQUETI, L.G.; REGINATTO, F.H.; DOS SANTOS, A.D.C.; BARISON, A.; BIAVATTI, M.W. Phytochemical analysis of *Vernonanthura tweedieana* and a validated UPLC-PDA method for the quantification of eriodictyol. **Brazilian Journal of Pharmacognosy** v. 25, n. 4, p. 375-381, 2015.

DA SILVA, L.A.L.; SANDJO, L.P.; FRATONI, E.; MOON, Y.J.K.; DALMARCO, E.M.; BIAVATTI, M.W. A single-step isolation by centrifugal partition chromatography of the potential anti-inflammatory glaucolide B from *Lepidaploa chamissonis*. **Journal of Chromatography A**, v., n., p. 460362, DOI 460310.461016/j.chroma.462019.460362, 2019a.

DA SILVA, L.A.L.; SANDJO, L.P.; MISTURINI, A.; CARAMORI, G.F.; BIAVATTI, M.W. ESI-QToF-MS characterization of hirsutinolide and glaucolide sesquiterpene lactones: fragmentation mechanisms and differentiation based on Na⁺/H⁺ adducts interactions in complex mixture. **Journal of Mass Spectrometry**, v., n., p. DOI 10.1002/jms.4433, 2019b.

DAINA, A.; MICHELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, v. 7, n., p. 42717, 2017.

DALAZEN, P.; MOLON, A.; BIAVATTI, M.W.; KREUGER, M.R.O. Effects of the topical application of the extract of *Vernonia scorpioides* on excisional wounds in mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, p. 82-87, 2005.

DARZENS, G. Action du chlorure de thionyle en présence d'une base tertiaire sur quelques éthers d'acides alcools. **Comptes Rendus**, v. 152, n., p. 1601-1603, 1911.

DAUGEY, N.; DE RYCKE, N.; BROTON, T.; BUFFETEAU, T. Chiroptical properties of 2, 2'-bioxirane. **Chirality**, v. 30, n. 4, p. 342-350, 2018.

- DE ALMEIDA, L.M.S.; CARVALHO, L.S.A.D.; GAZOLLA, M.C.; SILVA PINTO, P.L.; SILVA, M.P.N.D.; DE MORAES, J.; DA SILVA FILHO, A.A. Flavonoids and sesquiterpene lactones from *Artemisia absinthium* and *Tanacetum parthenium* against *Schistosoma mansoni* worms. **Evid. Based. Complement. Alternat. Med.**, v. 2016, n. Article ID 9521349, p. 1-9, 2016.
- DE FOLTER, J.; SUTHERLAND, I.A. Universal counter-current chromatography modelling based on counter-current distribution. **J. Chromatogr. A**, v. 1216, n. 19, p. 4218-4224, 2009.
- DE MIERI, M.; KAISER, M.; BRUN, R.; THORMANN, U.; IMANIDIS, G.; HAMBURGER, M. Anti-trypansomal cadinanes synthesized by transannular cyclization of the natural sesquiterpene lactone nobilin. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 7, p. 1521-1529, 2015.
- DE MIERI, M.; MONTELEONE, G.; ISMAJLI, I.; KAISER, M.; HAMBURGER, M. Antiprotozoal activity-based profiling of a dichloromethane extract from *Anthemis nobilis* flowers. **J. Nat. Prod.**, v. 80, n. 2, p. 459-470, 2017a.
- DE MIERI, M.; SMIEŠKO, M.; ISMAJLI, I.; KAISER, M.; HAMBURGER, M. Acid-induced rearrangement of epoxygermacranolides: synthesis of furanoheliangolides and cadinanes from nobilin. **Molecules**, v. 22, n. 12, p. 2252-2268, 2017b.
- DE MORAIS, M.L.; CARACAS, T.C.C.; DE PRINCE, P.M.A.; RAMOS, D.M.B.; LACERDA, G.A. Estruturas foliares de *Vernonia polyanthes* Less.(Asteraceae) relacionadas com a prospecção de substâncias com potencial medicinal. **Revista Bionorte**, v. 4, n. 2, p. 31-39, 2015.
- DE TOLEDO, J.S.; AMBRÓSIO, S.R.; BORGES, C.H.; MANFRIM, V.; CERRI, D.G.; CRUZ, A.K.; DA COSTA, F.B. *In vitro* leishmanicidal activities of sesquiterpene lactones from *Tithonia diversifolia* against *Leishmania braziliensis* promastigotes and amastigotes. **Molecules**, v. 19, n. 5, p. 6070-6079, 2014.
- DE VIJLDER, T.; VALKENBORG, D.; LEMIÈRE, F.; ROMIJN, E.P.; LAUKENS, K.; CUYCKENS, F. A tutorial in small molecule identification via electrospray ionization-mass spectrometry: the practical art of structural elucidation. **Mass Spectrom. Rev.**, v., n., p., 2017.
- DEL CORRAL, S.; DIAZ-NAPAL, GEORGINA N. ; ZARAGOZA, M.; CARPINELLA, M.C.; RUIZ, G.; PALACIOS, S.M. Screening for extracts with insect antifeedant properties in native plants from central Argentina. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 13, n. 5, p. 498-505, 2014.
- DESTANDAU, E.; BOUKHRIS, M.A.; ZUBRZYCKI, S.; AKSSIRA, M.; EL RHAFFARI, L.; ELFAKIR, C. Centrifugal partition chromatography elution gradient for isolation of sesquiterpene lactones and flavonoids from *Anvillea radiata*. **J. Chromatogr. B**, v. 985, n., p. 29-37, 2015.
- DIAS, H.J.; DE MELO, N.I.; CROTTI, A.E.M. Electrospray ionization tandem mass spectrometry as a tool for the structural elucidation and dereplication of natural products: an overview. *in* PRASAIN, J. K. **Tandem Mass Spectrometry - Applications and Principles**: InTech, p., 2012.
- DÍAZ, G.; NOGUEIRA, M.A.; OLGUÍN, C.F.A.; SOMENSI, A.; VIDOTTI, G.J. Estudo fitoquímico e biológico de *Vernonia tweediana* Baker (Asteraceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 1, p. 56, 2008.

- DIRSCH, V.M.; STUPPNER, H.; ELLMERER-MÜLLER, E.P.; VOLLMAR, A.M. Structural requirements of sesquiterpene lactones to inhibit LPS-induced nitric oxide synthesis in RAW 264.7 macrophages. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 8, n. 12, p. 2747-2753, 2000.
- DOAN, N.T.Q.; CRESTEY, F.O.; OLSEN, C.E.; CHRISTENSEN, S.B. Chemo-and regioselective functionalization of nortrilobolide: application for semisynthesis of the natural product 2-acetoxytrilobolide. **Journal of Natural Products**, v. 78, n. 6, p. 1406-1414, 2015.
- DOS SANTOS, E.O.; MEIRA, M.; DO VALE, A.E.; DAVID, J.M.; DE QUEIROZ, L.P.; DAVID, J.P. Isolation and characterization of new ceramides from aerial parts of *Lepidaploa cotoneaster*. **Natural Product Communications**, v. 7, n. 6, p. 781-783, 2012.
- DUARTE, M.R.; CHELLA, L. Caracteres anatômicos de folha de *Vernonanthura tweedieana* (Baker) H. Rob., Asteraceae. **Visão Acadêmica**, v. 15, n. 1, p. 5-14, 2014.
- DUTRA, R.C.; CAMPOS, M.M.; SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B. Medicinal plants in Brazil: pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, n., p. 4-29, 2016.
- EMERENCIANO, V.D.P. A evolução de lactonas sesquiterpênicas em angiospermas. **Dissertação de Mestrado**, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo/SP, Brasil, 1983.
- FALEIRO, D.P.V. Perfil metabólico, desreplicação de extratos de *Aldama la Llave* (Asteraceae) e inibição das enzimas cicloxigenase e lipoxigenase. **Dissertação de Mestrado**, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto/SP, Brasil, 2014.
- FARIAS, M.R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. in SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 6ª ed., Porto Alegre/Florianópolis, Brasil: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, p. 263-288, 2007.
- FAVI, F.; CANTRELL, C.L.; MEBRAHTU, T.; KRAEMER, M.E. Leaf peltate glandular trichomes of *Vernonia galamensis* ssp. *galamensis* var. *ethiopica* Gilbert: development, ultrastructure, and chemical composition. **International Journal of Plant Sciences**, v. 169, n. 5, p. 605-614, 2008.
- FEASEY, N.; WANSBROUGH-JONES, M.; MABEY, D.C.; SOLOMON, A.W. Neglected tropical diseases. **British Medical Bulletin**, v. 93, n. 1, p. 179-200, 2010.
- FIGUEIREDO, M.R.; FRUTUOSO, V.S. *Vernonia condensata* Baker. in AMARAL, A. C. F.; SIMÕES, E. V.; FERREIRA, J. L. P. **Coletânea científica de plantas de uso medicinal** Curitiba: Fiocruz, p. 186-195, 2005.
- FISCHEDICK, J.T.; PESIC, M.; PODOLSKI-RENIC, A.; BANKOVIC, J.; DE VOS, R.C.H.; PERIĆ, M.; TODORVIĆ, S.; TANIC, N. Cytotoxic activity of sesquiterpene lactones from *Inula britannica* on human cancer cell lines. **Phytochem. Lett.**, v. 6, n. 2, p. 246-252, 2013.
- FISCHEDICK, J.T.; STANDIFORD, M.; JOHNSON, D.A.; DE VOS, R.C.; TODORVIĆ, S.; BANJANAC, T.; VERPOORTE, R.; JOHNSON, J.A. Activation of antioxidant response element in mouse primary cortical cultures with sesquiterpene lactones isolated from *Tanacetum parthenium*. **Planta Med.**, v. 78, n. 16, p. 1725-1730, 2012.

FISCHER, C.B.; XU, S.; ZIPSE, H. Steric effects in the uncatalyzed and DMAP-catalyzed acylation of alcohols - quantifying the window of opportunity in kinetic resolution experiments. **Chemistry - A European Journal**, v. 12, n. 22, p. 5779-5784, 2006.

FLORES-GUZMÁN, F.; ALVARADO-SANSININEA, J.J.; LÓPEZ-MUÑOZ, H.; ESCOBAR, M.L.; ESPINOSA-TREJO, M.; TAVERA-HERNANDEZ, R.; JIMÉNEZ-ESTRADA, M.; SÁNCHEZ-SÁNCHEZ, L. Antiproliferative, cytotoxic and apoptotic activity of the bentonite transformation of sesquiterpene lactone glaucolide B to 5 β -hydroxy-hirsutinolide on tumor cell lines. **European Journal of Pharmacology**, v. 856, n., p. 172406, 2019.

FORMISANO, C.; SANNA, C.; BALLERO, M.; CHIANESE, G.; SIRIGNANO, C.; RIGANO, D.; MILLÁN, E.; MUÑOZ, E.; TAGLIALATELA-SCAFATI, O. Anti-inflammatory sesquiterpene lactones from *Onopordum illyricum* L.(Asteraceae), an Italian medicinal plant. **Fitoterapia**, v. 116, n., p. 61-65, 2017.

FRESHNEY, R.I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications**, Nova Iorque, Wiley-Blackwell, 1987.

FRONZA, A.; RICARDO, S.; CARRENHO, L.Z.B.; POLLO, L.; BRATTI, L.D.O.S.; MONTEIRO, F.B.F.; BIAVATTI, M.W.; KREUGER, M.R.O. Antitumoral activity of sesquiterpene lactone diacetylpiptocarphol in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 198, n., p. 262-267, 2017.

FUCHINO, H.; KOIDE, T.; TAKAHASHI, M.; SEKITA, S.; SATAKE, M. New sesquiterpene lactones from *Elephantopus mollis* and their leishmanicidal activities. **Planta Medica**, v. 67, n. 7, p. 647-653, 2001.

GACH, K.; DŁUGOSZ, A.; JANECKA, A. The role of oxidative stress in anticancer activity of sesquiterpene lactones. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 388, n. 5, p. 477-486, 2015.

GALLON, M.E.; JAIYESIMI, O.A.; GOBBO-NETO, L. LC-UV-HRMS dereplication of secondary metabolites from Brazilian Vernonieae (Asteraceae) species supported through *in-house* database. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 78, n., p. 5-16, 2018.

GALLON, M.E.; MONGE, M.; CASOTI, R.; DA COSTA, F.B.; SEMIR, J.; GOBBO-NETO, L. Metabolomic analysis applied to chemosystematics and evolution of megadiverse Brazilian Vernonieae (Asteraceae). **Phytochemistry**, v. 150, n., p. 93-105, 2018.

GARCÍA-PIÑERES, A.J.; CASTRO, V.; MORA, G.; SCHMIDT, T.J.; STRUNCK, E.; PAHL, H.L.; MERFORT, I. Cysteine 38 in p65/NF- κ B plays a crucial role in DNA binding inhibition by sesquiterpene lactones. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 43, p. 39713-39720, 2001.

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

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

GHANTOUS, A.; GALI-MUHTASIB, H.; VUORELA, H.; SALIBA, N.A.; DARWICHE, N. What made sesquiterpene lactones reach cancer clinical trials? **Drug Discov. Today**, v. 15, n. 15/16, p. 668-678, 2010.

GIRARDI, C.; FABRE, N.; PALOQUE, L.; RAMADANI, A.P.; BENOIT-VICAL, F.; GONZÁLEZ-ASPAJO, G.; HADDAD, M.; RENGIFO, E.; JULLIAN, V. Evaluation of antiplasmodial and antileishmanial activities of herbal medicine *Pseudelephantopus spiralis* (Less.) Cronquist and isolated hirsutinolide-type sesquiterpenoids. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 170, n., p. 167-174, 2015.

GIRARDI, C.; JULLIAN, V.; HADDAD, M.; VANSTEELANDT, M.; CABANILLAS, B.J.; KAPANDA, C.N.; HERENT, M.F.; QUETIN-LECLERCQ, J.; FABRE, N. Analysis and fragmentation mechanisms of hirsutinolide-type sesquiterpene lactones by ultra-high-performance liquid chromatography/electrospray ionization linear ion trap Orbitrap mass spectrometry. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, v. 30, n. 5, p. 569-580, 2016.

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

GRAZIOSE, R.; RATHINASABAPATHY, T.; LATEGAN, C.; POULEV, A.; SMITH, P.J.; GRACE, M.; LILA, M.A.; RASKIN, I. Antiplasmodial activity of aporphine alkaloids and sesquiterpene lactones from *Liriodendron tulipifera* L. **J. Ethnopharmacol.**, v. 133, n. 1, p. 26-30, 2011.

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. **Anal. Biochem.**, v. 126, n. 1, p. 131-138, 1982.

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

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

HANWELL, M.D.; CURTIS, D.E.; LONIE, D.C.; VANDERMEERSCH, T.; ZUREK, E.; HUTCHISON, G.R. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **J. Cheminform.**, v. 4, n. 1, p. 1-17, 2012.

HARVEY, A.L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R.J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 2, p. 111-130, 2015.

HATTORI, E.K.O.; NAKAJIMA, J.N. A família Asteraceae na estação de pesquisa e desenvolvimento ambiental Galheiro, Perdizes, Minas Gerais. **Rodriguésia**, v. 59, n. 4, p. 687-749, 2008.

HEHNER, S.P.; HEINRICH, M.; BORK, P.M.; VOGT, M.; RATTER, F.; LEHMANN, V.; SCHULZE-OSTHOFF, K.; DRÖGE, W.; SCHMITZ, M.L. Sesquiterpene lactones specifically inhibit activation of NF- κ B by preventing the degradation of I κ B- α and I κ B- β . **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 3, p. 1288-1297, 1998.

HEILING, S.; KHANAL, S.; BARSCH, A.; ZUREK, G.; BALDWIN, I.T.; GAQUEREL, E. Using the knowns to discover the unknowns: MS-based dereplication uncovers structural diversity in 17-hydroxygeranylinalool diterpene glycoside production in the Solanaceae. **Plant J.**, v. 85, n. 4, p. 561-577, 2016.

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

HERAVI, M.M.; FAZELI, A.; FAGHIHI, Z. Recent advances in application of pyridinium chlorochromate (PCC) in organic synthesis. **Current Organic Synthesis**, v. 13, n. 2, p. 220-254, 2016.

HERRERA-ACEVEDO, C.; SCOTTI, L.; SCOTTI, M.T. *In silico* studies designed to select sesquiterpene lactones with potential antichagasic activity from an in-house Asteraceae database. **ChemMedChem**, v., n., p., 2018.

HESS, B.; BEKKER, H.; BERENDSEN, H.J.C.; FRAAIJE, J.G.E.M. LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations. **J. Comput. Chem.**, v. 18, n. 12, p. 1463-1472, 1997.

HOHMANN, M.S.N.; LONGHI-BALBINOT, D.T.; GUAZELLI, C.F.S.; NAVARRO, S.A.; ZARPELON, A.C.; CASAGRANDE, R.; ARAKAWA, N.S.; VERRI JR, W.A. Sesquiterpene lactones: structural diversity and perspectives as anti-inflammatory molecules. *in* ATTA-UR-RAHMAN. **Studies in Natural Products Chemistry: Bioactive Natural Products (Part XII)**: Elsevier, 49, p. 243-264, 2016.

HOPMANN, E.; ARLT, W.; MINCEVA, M. Solvent system selection in counter-current chromatography using conductor-like screening model for real solvents. **J. Chromatogr. A**, v. 1218, n. 2, p. 242-250, 2011.

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

HU, R.; PAN, Y. Recent trends in counter-current chromatography. **Trends Analyt. Chem.**, v. 40, n., p. 15-27, 2012.

HUBERT, J.; NUZILLARD, J.-M.; RENAULT, J.-H. Dereplication strategies in natural product research: how many tools and methodologies behind the same concept? **Phytochem. Rev.**, v. 16, n. 1, p. 55-95, 2017.

HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD: visual molecular dynamics. **J. Mol. Graphics**, v. 14, n. 1, p. 33-38, 1996.

HUO, J.; YANG, S.-P.; XIE, B.-J.; LIAO, S.-G.; LIN, L.-P.; DING, J.; YUE, J.-M. Cytotoxic sesquiterpenoids from *Vernonia bockiana*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 10, n. 6, p. 571-575, 2008.

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

ISSAADI, H.M.; TSAI, Y.-C.; CHANG, F.-R.; HUNYADI, A. Centrifugal partition chromatography in the isolation of minor ecdysteroids from *Cyanotis arachnoidea*. **J. Chromatogr. B**, v. 1054, n., p. 44-49, 2017.

ITO, T.; AIMAITI, S.; WIN, N.N.; KODAMA, T.; MORITA, H. New sesquiterpene lactones, vernonilides A and B, from the seeds of *Vernonia anthelmintica* in Uyghur and their antiproliferative activities. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 26, n. 15, p. 3608-3611, 2016.

JAKUPOVIC, J.; GAGE, D.A.; BOHLMANN, F.; MABRY, T.J. Sesquiterpene lactones from *Vernonia marginata*. **Phytochemistry**, v. 25, n. 5, p. 1179-1183, 1986a.

JAKUPOVIC, J.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; SCHUSTER, A.; ZDERO, C.; BOHLMANN, F.; KING, R.M.; ROBINSON, H.; PICKARDT, J. Hirsutinolides, glaucolides and sesquiterpene lactone from *Vernonia* species. **Phytochemistry**, v. 25, n. 1, p. 145-158, 1986b.

JAKUPOVIC, J.; ZDERO, C.; BOEKER, R.; WARNING, U.; BOHLMANN, F.; JONES, S.B. Vernocistifolide und andere Sesquiterpenlactone aus *Vernonia* und verwandten Arten. **Liebigs Annalen der Chemie**, v. 1987, n. 2, p. 111-123, 1987.

JANA, S.; IRAM, S.; THOMAS, J.; LIEKENS, S.; DEHAEN, W. Synthesis and anticancer activity of novel aza-artemisinin derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 14, p. 3671-3676, 2017.

JANTAN, I.; BUKHARI, S.N.A.; MOHAMED, M.A.S.; WAI, L.K.; MESAİK, M.A. The evolving role of natural products from the tropical rainforests as a replenishable source of new drug leads. *in* VALLISUTA, O.; OLIMAT, S. **Drug discovery and development - From molecules to medicine**: InTech, p. 1-38, 2015.

JIMENEZ, M.; ORTEGA, A.; NAVARRO, A.; MALDONADO, E.; VAN CALSTEREN, M.R.; JANKOWSKI, C.K. Reaction of the molluscicide glaucolide B with bentonite. **Journal of Natural Products**, v. 58, n. 3, p. 424-427, 1995.

JIMENEZ, V.; KEMMERLING, U.; PAREDES, R.; MAYA, J.D.; SOSA, M.A.; GALANTI, N. Natural sesquiterpene lactones induce programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*: A new therapeutic target? **Phytomedicine**, v. 21, n. 11, p. 1411-1418, 2014.

JISAKA, M.; OHIGASHI, H.; TAKEGAWA, K.; HUFFMAN, M.A.; KOSHIMIZU, K. Antitumoral and antimicrobial activities of bitter sesquiterpene lactones of *Vernonia amygdalina*, a possible medicinal plant used by wild chimpanzees. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 57, n. 5, p. 833-834, 1993.

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

JULIANTI, T.; HATA, Y.; ZIMMERMANN, S.; KAISER, M.; HAMBURGER, M.; ADAMS, M. Antitrypanosomal sesquiterpene lactones from *Saussurea costus*. **Fitoterapia**, v. 82, n. 7, p. 955-959, 2011.

KARAMÉ, I.; ALAME, M.; KANJ, A.; BAYDOUN, G.N.; HAZIMEH, H.; EL MASRI, M.; CHRIST, L. Mild and efficient protection of diol and carbonyls as cyclic acetals catalysed by iron (III) chloride. **Comptes Rendus Chimie**, v. 14, n. 6, p. 525-529, 2011.

- KARIOTI, A.; SKAL TSA, H.; KAISER, M.; TASDEMIR, D. Trypanocidal, leishmanicidal and cytotoxic effects of anthecotulide-type linear sesquiterpene lactones from *Anthemis auriculata*. **Phytomedicine**, v. 16, n. 8, p. 783-787, 2009.
- KATZ, L.; BALTZ, R.H. Natural product discovery: past, present, and future. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 43, n. 2-3, p. 155-176, 2016.
- KEELEY, S.C.; ROBINSON, H. Vernoniaeae. in FUNK, V. A.; SUSANNA, A.; STUESSY, T. F.; BAYER, R. J. **Sistematics, evolution, and biogeography of Compositae**. Viena: IAPT, p. 439-470, 2009.
- KERAMANE, E.M.; BOYER, B.; ROQUE, J.-P. Reactivity of bismuth (III) halides towards alcohols. A tentative to mechanistic investigation. **Tetrahedron**, v. 57, n. 10, p. 1909-1916, 2001.
- KIMANI, N.M.; MATASYOH, J.C.; KAISER, M.; BRUN, R.; SCHMIDT, T.J. Anti-trypanosomatid elemanolide sesquiterpene lactones from *Vernonia lasiopus* O. Hoffm. **Molecules**, v. 22, n. 4, p. 597-606, 2017.
- KIMANI, N.M.; MATASYOH, J.C.; KAISER, M.; BRUN, R.; SCHMIDT, T.J. Sesquiterpene lactones from *Vernonia cinerascens* sch. Bip. and their *in vitro* antitrypanosomal activity. **Molecules**, v. 23, n. 2, p. 248*255, 2018.
- KIND, T.; TSUGAWA, H.; CAJKA, T.; MA, Y.; LAI, Z.; MEHTA, S.S.; WOHLGEMUTH, G.; BARUPAL, D.K.; SHOWALTER, M.R.; ARITA, M. Identification of small molecules using accurate mass MS/MS search. **Mass Spectrom. Rev.**, v., n., p., 2017.
- KINGSTON, D.G.I. Modern natural products drug discovery and its relevance to biodiversity conservation. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 3, p. 496-511, 2011.
- KOCH, A.; BASAR, S.; RICHTER, R. Secondary Metabolites - Isoprenoids. TLC of Mono- and Sesquiterpenes. in WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M.; SHERMA, J.; KOWALSKA, T. **Thin layer chromatography in phytochemistry**, Chromatographic Science Series, New York: CRC PressI Llc, 99, p. 451-480, 2008.
- KONOVALOV, D.A. Polyacetylene compounds of plants of the Asteraceae family. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 48, n. 9, p. 613-631, 2014.
- KOSTIAINEN, R.; KAUPPILA, T.J. Effect of eluent on the ionization process in liquid chromatography–mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, v. 1216, n. 4, p. 685-699, 2009.
- KOTOWICZ, C.; BARDÓN, A.; CATALÁN, C.A.N.; CERDA-GARCÍA-ROJAS, C.M.; JOSEPH-NATHAN, P. Glaucolides and hirsutinolides from *Vernonanthura squamulosa*. **Phytochemistry**, v. 47, n. 3, p. 425-428, 1998.
- KRAFT, C.; JENETT-SIEMS, K.; SIEMS, K.; JAKUPOVIC, J.; MAVI, S.; BIENZLE, U.; EICH, E. *In vitro* antiplasmodial evaluation of medicinal plants from Zimbabwe. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 2, p. 123-128, 2003.
- KREUGER, M.R.O.; BIAVATTI, M.W.; PACHECO, E.S.; JÚNIOR, A.; REINALDO, R.; BLIND, L.Z.; PEDRINI, R.D.A. Cytotoxic activity of the sub-fraction 2125 from *Vernonia scorpioides* against

Sarcoma 180 tumor cells in mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2A, p. 353-357, 2009.

KREUGER, M.R.O.; FARIAS, B.G.; MOREIRA, J.; BLIND, L.Z.; AMOAH, S.K.S.; LEITE, A.S.; BIAVATTI, M.W.; VAN HOOF, T.; D'HERDE, K.; CRUZ, A.B. Effects of the topical application of an ethyl acetate fraction from *Vernonia scorpioides* on excisional wounds infected with *Staphylococcus aureus* in rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 1, p. 123-130, 2012a.

KREUGER, M.R.O.; GROOTJANS, S.; BIAVATTI, M.W.; VANDENABEELE, P.; D'HERDE, K. Sesquiterpene lactones as drugs with multiple targets in cancer treatment: focus on parthenolide. **Anticancer Drugs**, v. 23, n. 9, p. 883-896, 2012b.

KRUVE, A.; KAUPMEES, K. Adduct formation in ESI/MS by mobile phase additives. **J. Am. Soc. Mass Spectrom.**, v. 28, n. 5, p. 887-894, 2017.

KRUVE, A.; KAUPMEES, K.; LIIGAND, J.; OSS, M.; LEITO, I. Sodium adduct formation efficiency in ESI source. **J. Mass Spectrom.**, v. 48, n. 6, p. 695-702, 2013.

KUMAR, G.M.; NEELAM, I.; AJITHA, A.; RAO, V.U.M. Centrifugal partition chromatography: an overview. **Int. J. Pharm. Res. Anal.**, v. 4, n. 6, p. 353-360, 2014.

KUO, L.-M.Y.; TSENG, P.-Y.; LIN, Y.-C.; LIAW, C.-C.; ZHANG, L.-J.; TSAI, K.-C.; LIN, Z.-H.; HO, H.-O.; KUO, Y.-H. New hirsutinolide-type sesquiterpenoids from *Vernonia cinerea* inhibit nitric oxide production in LPS-stimulated RAW 264. 7 cells. **Planta Med.**, v. 84, n. 18, p. 1348-1354, 2018.

KUPCHAN, S.M.; HEMINGWAY, R.J.; KARIM, A.; WERNER, D. Tumor inhibitors. XLVII. Vernodalin and vernomygdin, two new cytotoxic sesquiterpene lactones from *Vernonia amygdalina* Del. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 34, n. 12, p. 3908-3911, 1969.

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

LANG, K.L.; SILVA, I.T.; ZIMMERMANN, L.A.; LHULLIER, C.; MAÑALICH ARANA, M.V.; PALERMO, J.A.; FALKENBERG, M.; SIMÕES, C.M.; SCHENKEL, E.P.; DURÁN, F.J. Cytotoxic activity of semi-synthetic derivatives of elatol and isoobtusol. **Marine drugs**, v. 10, n. 10, p. 2254-2264, 2012.

LAVORGNA, M.; ORLO, E.; NUGNES, R.; PISCITELLI, C.; RUSSO, C.; ISIDORI, M. Capsaicin in hot chili peppers: *in vitro* evaluation of its antiradical, antiproliferative and apoptotic activities. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 74, n. 2, p. 164-170, 2019.

LE, P.M.; MCCOOEYE, M.; WINDUST, A. Application of UPLC-QTOF-MS in MS^E mode for the rapid and precise identification of alkaloids in goldenseal (*Hydrastis canadensis*). **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 406, n. 6, p. 1739-1749, 2014.

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

- LIAO, S.-G.; WANG, Z.; LI, J.; LIU, Y.; LI, Y.-T.; ZHANG, L.-J.; LONG, Q.-D.; WANG, Y.-L. Cytotoxic sesquiterpene lactones from *Vernonia bockiana*. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 10, n. 3, p. 230-233, 2012.
- LOEUILLE, B.; KEELEY, S.C.; PIRANI, J.R. Systematics and evolution of syncephaly in American Vernonieae (Asteraceae) with emphasis on the Brazilian subtribe Lychnophorinae. **Syst. Bot.**, v. 40, n. 1, p. 286-298, 2015.
- LOEUILLE, B.F.P. Towards a phylogenetic classification of Lychnophorinae (Asteraceae: Vernonieae). **Tese de doutorado**, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo/SP, Brasil, 2011.
- LOLIS, M.I.G.A.; MILANEZE-GUTIERRE, M.A. Morfo-anatomia das folhas de *Vernonia condensata* Baker (Asteraceae), o "figatil". **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, n. Supl. 1, p. 68-71, 2003.
- LOOI, C.Y.; ARYA, A.; CHEAH, F.K.; MUHARRAM, B.; LEONG, K.H.; MOHAMAD, K.; WONG, W.F.; RAI, N.; MUSTAFA, M.R. Induction of apoptosis in human breast cancer cells via caspase pathway by vernodalin isolated from *Centratherum anthelminticum* (L.) seeds. **PloS one**, v. 8, n. 2, p. e56643, 2013.
- LOPES, J.L.C. Sesquiterpene lactones from *Vernonia*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, n. Suppl. II, p. 227-230, 1991.
- LÓPEZ-LÁZARO, M. A simple and reliable approach for assessing anticancer activity *in vitro*. **Current Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 11, p. 1324-1334, 2015.
- LOQUETE, T.; SOMENSI, A.; HOSS, I.; BRAUN, G.; OLGUIN, C.D.F.A. **Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial da espécie *Vernonia tweediana* Baker (Assa-peixe)**. XVI Encontro de Química da Região Sul (16-SBQSul). Blumenau/SC. v., p., 2008.
- LOURENCO, A.M.; FERREIRA, L.M.; BRANCO, P.S. Molecules of natural origin, semi-synthesis and synthesis with anti-inflammatory and anticancer utilities. **Current Pharmaceutical Design**, v. 18, n. 26, p. 3979-4046, 2012.
- LUSA, M.G.; DA COSTA, F.B.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Histolocalization of chemotaxonomic markers in Brazilian Vernonieae (Asteraceae). **Bot. J. Linn. Soc.**, v. 182, n. 3, p. 581-593, 2016.
- LUSA, M.G.; MARTUCCI, M.E.P.; LOEUILLE, B.F.P.; GOBBO-NETO, L.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; DA COSTA, F.B. Characterization and evolution of secondary metabolites in Brazilian Vernonieae (Asteraceae) assessed by LC-MS fingerprinting. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 182, n. 3, p. 594-611, 2016.
- LUZZIO, F.A.; FITCH, R.W.; MOORE, W.J.; MUDD, K.J. A facile oxidation of alcohols using pyridinium chlorochromate/silica gel. **Journal of Chemical Education**, v. 76, n. 7, p. 974-975, 1999.
- MABRY, T.J.; ABDEL-BASET, Z.; PADOLINA, W.G.; JONES JR, S.B. Systematic implications of flavonoids and sesquiterpene lactones in species of *Vernonia*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 2, n. 3, p. 185-192, 1975a.

MABRY, T.J.; ABDEL-BASET, Z.; PADOLINA, W.G.; JONES, S.B. Systematic implications of flavonoids and sesquiterpene lactones in species of *Vernonia*. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 2, n. 3-4, p. 185-192, 1975b.

MACHADO, A.L.; ARAGÃO, F.M.; BANDEIRA, P.N.; SANTOS, H.S.D.; ALBUQUERQUE, M.R.J.R.; PESSOA, O.D.L.; SILVEIRA, E.R.; NUNES, E.P.; BRAZ-FILHO, R. Chemical constituents of *Vernonia scorpioides* (Lam) Pers.(Asteraceae). **Química Nova**, v. 36, n. 4, p. 540-543, 2013.

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

MALDE, A.K.; ZUO, L.; BREEZE, M.; STROET, M.; POGER, D.; NAIR, P.C.; OOSTENBRINK, C.; MARK, A.E. An automated force field topology builder (ATB) and repository: version 1.0. **J. Chem. Theory Comput.**, v. 7, n. 12, p. 4026-4037, 2011.

MALDONADO, E.; SVENSSON, D.; OREDSSON, S.; STERNER, O. Cytotoxic sesquiterpene lactones from *Kauna lasiophthalma* Griseb. **Scientia Pharmaceutica**, v. 82, n. 1, p. 147-160, 2014.

MANDAI, H.; FUJII, K.; YASUHARA, H.; ABE, K.; MITSUDO, K.; KORENAGA, T.; SUGA, S. Enantioselective acyl transfer catalysis by a combination of common catalytic motifs and electrostatic interactions. **Nature Communications**, v. 7, n., p. 11297-11307, 2016.

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

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

MARINHO, M.A.O.; SALES-MELO, M.R.C.; MELO DE OLIVEIRA, M.B.; MACIEL, V.E.D.O.; DE CARVALHO, R. Karyotype variation in 11 species of the Vernonieae Cass. tribe (Asteraceae Bercht. & J. Presl). **Plant Biosystems**, v. 151, n. 2, p. 291-303, 2016.

MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, M.; SEPÚLVEDA, S.; BELMONT, M.A.; RUBIO, M.; JOSEPH-NATHAN, P. The transformation of glaucolide A into cadinanolides and hirsutinolides. **Journal of Natural Products**, v. 55, n. 7, p. 884-898, 1992.

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

MATEJÍC, J.; ŠARAC, Z.; RANĐELOVIĆ, V. Pharmacological activity of sesquiterpene lactones. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 24, n. sup1, p. 95-100, 2010.

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

- MENDONÇA, C.B.F.; GONÇALVES-ESTEVEES, V.; ESTEVEES, R.L.; NUNES, A.D. Palynotaxonomy of *Vernonanthura* H. Rob.(Vernonieae, Asteraceae) species from southeast Brazil. **Brazilian Journal of Botany**, v. 32, n. 4, p. 647-662, 2009.
- MENG, Z.; FÜRSTNER, A. Total synthesis of (-)-sinulariadiolide. A transannular approach. **Journal of the American Chemical Society**, v. 141, n. 2, p. 805-809, 2019.
- MERFORT, I. Review of the analytical techniques for sesquiterpenes and sesquiterpene lactones. **J. Chromatogr. A**, v. 967, n. 1, p. 115-130, 2002.
- MERFORT, I. Perspectives on sesquiterpene lactones in inflammation and cancer. **Curr. Drug Targets**, v. 12, n. 11, p. 1560-1573, 2011.
- MICHALICK, M.S.M.; GENARO, O. Leishmaniose visceral americana. in NEVES, D. P.; MELO, A. L. D.; LINARD, P. M.; VITOR, R. W. A. **Parasitologia Humana** 11^a ed., São Paulo/SP, Brasil: Atheneu, p. 67-83, 2005.
- MICHEL, T.; DESTANDAU, E.; ELFAKIR, C. New advances in countercurrent chromatography and centrifugal partition chromatography: focus on coupling strategy. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 406, n. 4, p. 957-969, 2014.
- MIGLIATO, K.F.; CORRÊA, M.A.; SALGADO, H.R.N.; TOGNOLLI, J.O.; SACRAMENTO, L.V.S.; DE MELLO, J.C.P.; GIANNINI, M.J.S.M.; ALMEIDA, A.M.F.; PIZZOLITTO, A.C. Planejamento experimental na otimização da extração dos frutos de *Syzygium cumini* (L.) skeels. **Química Nova**, v. 34, n. 4, p. 695-699, 2011.
- MIKLOSSY, G.; YOUN, U.J.; YUE, P.; ZHANG, M.; CHEN, C.-H.; HILLIARD, T.S.; PALADINO, D.; LI, Y.; CHOI, J.; SARKARIA, J.N. Hirsutinolide series inhibit Stat3 activity, alter GCN1, MAP1B, Hsp105, G6PD, vimentin, TrxR1, and importin α -2 expression, and induce antitumor effects against human glioma. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n. 19, p. 7734-7748, 2015.
- MILAN, P.; HAYASHI, A.H.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Comparative leaf morphology and anatomy of three Asteraceae species. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 1, p. 135-144, 2006.
- MOHAMMADPOOR-BALTORK, I.; ALIYAN, H. Bismuth (III) chloride¹; an efficient and selective catalyst for deprotection of 1, 1-diacetates. **Synthetic Communications**, v. 29, n. 16, p. 2741-2746, 1999.
- MONTANHA, J.A.; MOELLERKE, P.; BORDIGNON, S.A.L.; SCHENKEL, E.P.; ROEHE, P.M. Antiviral activity of brazilian plant extracts. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 23, n. 2, p. 183-186, 2004.
- MONTEIRO, M.H.D.; GOMES-CARNEIRO, M.R.; FELZENSZWALB, I.; CHAHOUD, I.; PAUMGARTTEN, F.J.R. Toxicological evaluation of a tea from leaves of *Vernonia condensata*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, n. 2, p. 149-157, 2001.
- MORALES-ESCOBAR, L.; BRACA, A.; PIZZA, C.; DE TOMMASI, N. New phenolic derivatives from *Vernonia mapirensis* Gleason. **Arkivoc**, v. 7, n., p. 349-358, 2007.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

NAKAGAWA-GOTO, K.; CHEN, J.-Y.; CHENG, Y.-T.; LEE, W.-L.; TAKEYA, M.; SAITO, Y.; LEE, K.-H.; SHYUR, L.-F. Novel sesquiterpene lactone analogues as potent anti-breast cancer agents. **Molecular Oncology**, v. 10, n. 6, p. 921-937, 2016.

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

NEESE, F. The ORCA program system. **Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.**, v. 2, n. 1, p. 73-78, 2012.

NEUKIRCH, H.; GUERRIERO, A.; D'AMBROSIO, M. Transannular cyclization in cyclodecenes: the case study of melampolides. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2003, n. 20, p. 3969-3975, 2003.

NEWMAN, D.J. Developing natural product drugs: supply problems and how they have been overcome. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 162, n., p. 1-9, 2016.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Marine-sourced anti-cancer and cancer pain control agents in clinical and late preclinical development. **Marine Drugs**, v. 12, n. 1, p. 255-278, 2014.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Drugs and drug candidates from marine sources: an assessment of the current "state of play". **Planta Medica**, v. 82, n. 09/10, p. 775-789, 2016a.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016b.

NI LOO, C.S.; LAM, N.S.K.; YU, D.; SU, X.-z.; LU, F. Artemisinin and its derivatives in treating protozoan infections beyond malaria. **Pharmacol. Res.**, v. 117, n., p. 192-217, 2017.

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

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

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

OLIVEIRA, F.G.D.S.; DE LIMA-SARAIVA, S.R.G.; OLIVEIRA, A.P.; RABELO, S.V.; ROLIM, L.A.; DA SILVA ALMEIDA, J.R.G. Influence of the extractive method on the recovery of phenolic compounds in different parts of *Hymenaea martiana* Hayne. **Pharmacognosy Research**, v. 8, n. 4, p. 270-275, 2016.

OLIVEIRA, R.B.; CHAGAS-PAULA, D.A.; SECATTO, A.; GASPAROTO, T.H.; FACCIOLI, L.H.; CAMPANELLI, A.P.; DA COSTA, F.B. Topical anti-inflammatory activity of yacon leaf extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 3, p. 497-505, 2013a.

OLIVEIRA, R.B.; CHAGAS-PAULA, D.A.; SECATTO, A.; GASPAROTO, T.H.; FACCIOLI, L.H.; CAMPANELLI, A.P.; DA COSTA, F.B. Topical anti-inflammatory activity of yacon leaf extracts. **Braz. J. Pharmacog.**, v. 23, n. 3, p. 497-505, 2013b.

OLLIVIER, A.; GROUGNET, R.; CACHET, X.; MERIANE, D.; ARDISSON, J.; BOUTEFNOUCHET, S.; DEGUIN, B. Large scale purification of the SERCA inhibitor thapsigargin from *Thapsia garganica* L. roots using centrifugal partition chromatography. **J. Chromatogr. B**, v. 926, n., p. 16-20, 2013.

OTOGURO, K.; IWATSUKI, M.; ISHIYAMA, A.; NAMATAME, M.; NISHIHARA-TUKASHIMA, A.; KIYOHARA, H.; HASHIMOTO, T.; ASAKAWA, Y.; ŌMURA, S.; YAMADA, H. *In vitro* antitrypanosomal activity of plant terpenes against *Trypanosoma brucei*. **Phytochemistry**, v. 72, n. 16, p. 2024-2030, 2011.

OUELLETTE, R.J.; RAWN, J.D. Haloalkanes and alcohols: introduction to nucleophilic substitution and elimination reactions. *in* OUELLETTE, R. J.; RAWN, J. D. **Organic Chemistry**, Estados Unidos da América: Elsevier, p. 287-331, 2014.

PADILLA-GONZALEZ, G.F.; DOS SANTOS, F.A.; DA COSTA, F.B. Sesquiterpene lactones: more than protective plant compounds with high toxicity. **CRC Crit. Rev. Plant Sci.**, v. 35, n. 1, p. 18-37, 2016.

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

PAGNO, T.; BLIND, L.Z.; BIAVATTI, M.W.; KREUGER, M.R.O. Cytotoxic activity of the dichloromethane fraction from *Vernonia scorpioides* (Lam.) Pers.(Asteraceae) against Ehrlich's tumor cells in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, n. 11, p. 1483-1491, 2006.

PASSONI, F.D.; OLIVEIRA, R.B.; CHAGAS-PAULA, D.A.; GOBBO-NETO, L.; DA COSTA, F.B. Repeated-dose toxicological studies of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. gray and identification of the toxic compounds. **J. Ethnopharmacol.**, v. 147, n. 2, p. 389-394, 2013.

PAUK, V.; PLUHÁČEK, T.; HAVLÍČEK, V.; LEMR, K. Ultra-high performance supercritical fluid chromatography-mass spectrometry procedure for analysis of monosaccharides from plant gum binders. **Anal. Chim. Acta**, v. 989, n., p. 112-120, 2017.

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

PELLATI, F.; ORLANDINI, G.; PINETTI, D.; BENVENUTI, S. HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS/MS methods for metabolite profiling of propolis extracts. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 55, n. 5, p. 934-948, 2011.

PERDEW, J.P. Density-functional approximation for the correlation energy of the inhomogeneous electron gas. **Phys. Rev. B**, v. 33, n. 12, p. 8822-8824, 1986.

PEREIRA, D.M.; COGO, J.C.; ZAMUNER, S.R. Efeito antiedematogênico da planta *Vernonia scorpioides* frente ao veneno de *Bothrops fonsecai* e carragenina. **ConScientiae Saúde**, v. 11, n. 1, p. 46-52, 2012.

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

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

PILLAY, P.; VLEGGAR, R.; MAHARAJ, V.J.; SMITH, P.J.; LATEGAN, C.A.; CHOUTEAU, F.; CHIBALE, K. Antiplasmodial hirsutinolides from *Vernonia staehelinoides* and their utilization towards a simplified pharmacophore. **Phytochemistry**, v. 68, n. 8, p. 1200-1205, 2007.

PINEL, B.; AUDO, G.; MALLET, S.; LAVAUULT, M.; DE LA POYPE, F.; SÉRAPHIN, D.; RICHOMME, P. Multi-grams scale purification of xanthanolides from *Xanthium macrocarpum*: Centrifugal partition chromatography versus silica gel chromatography. **J. Chromatogr. A**, v. 1151, n. 1-2, p. 14-19, 2007.

PINTO, A.P.R.; DE ARAUJO, J.A.V.; TURATTI, I.C.C.; LOPES, N.P.; CORREA, W.R.; SALVADOR, M.J.; DO NASCIMENTO, A.M. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil from the leaves of *Cyrtocymura scorpioides*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 52, n. 4, p. 740-742, 2016.

POLLO, L.A.; BOSI, C.F.; LEITE, A.S.; RIGOTTO, C.; KRATZ, J.; SIMÕES, C.M.; FONSECA, D.E.; COIMBRA, D.; CARAMORI, G.; NEPEL, A. Polyacetylenes from the leaves of *Vernonia scorpioides* (Asteraceae) and their antiproliferative and antiherpetic activities. **Phytochemistry**, v. 95, n., p. 375-383, 2013.

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

PRAYONG, P.; BARUSRUX, S.; WEERAPREEYAKUL, N. Cytotoxic activity screening of some indigenous Thai plants. **Fitoterapia**, v. 79, n. 7-8, p. 598-601, 2008.

PRUSKI, J.F. Compositae of Central America – VIII. The genus *Lepidaploa* (Vernonieae). **Phytoneuron**, v. 50, n., p. 1-39, 2017.

QUINTANA, J.; ESTÉVEZ, F. Recent advances on cytotoxic sesquiterpene lactones. **Current Pharmaceutical Design**, v. 24, n. 36, p. 4355-4361, 2018.

RABE, T.; MULLHOLLAND, D.; VAN STADEN, J. Isolation and identification of antibacterial compounds from *Vernonia colorata* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 80, n. 1, p. 91-94, 2002.

RABUS, J.M.; ABUTOKAIKAH, M.T.; ROSS, R.T.; BYTHELL, B.J. Sodium-cationized carbohydrate gas-phase fragmentation chemistry: influence of glycosidic linkage position. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v. 19, n. 37, p. 25643-25652, 2017.

RAHIER, N.J.; MOLINIER, N.; LONG, C.; DESHMUKH, S.K.; KATE, A.S.; RANADIVE, P.; VEREKAR, S.A.; JIOTODE, M.; LAVHALE, R.R.; TOKDAR, P. Anticancer activity of koningic acid and semisynthetic derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 13, p. 3712–3721, 2015.

RAUH, L.K.; HORINOUCI, C.D.; LODDI, A.M.; PIETROVSKI, E.F.; NERIS, R.; SOUZA-FONSECA-GUIMARÃES, F.; BUCHI, D.F.; BIAVATTI, M.W.; OTUKI, M.F.; CABRINI, D.A. Effectiveness of *Vernonia scorpioides* ethanolic extract against skin inflammatory processes. **J. Ethnopharmacol.**, v. 138, n. 2, p. 390-397, 2011a.

RAUH, L.K.; HORINOUCI, C.D.S.; LODDI, A.M.V.; PIETROVSKI, E.F.; NERIS, R.; SOUZA-FONSECA-GUIMARÃES, F.; BUCHI, D.F.; BIAVATTI, M.W.; OTUKI, M.F.; CABRINI, D.A. Effectiveness of *Vernonia scorpioides* ethanolic extract against skin inflammatory processes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 138, n. 2, p. 390-397, 2011b.

REDONDA-MARTÍNEZ, R.; VILLASEÑOR, J.L. El género *Lepidaploa* (familia Asteraceae, tribu Vernonieae) en México. **Revista Mexicana de Biodiversidad**, v. 82, n. 3, p. 782-797, 2011.

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

REFLORA, Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (2019a). **Asteraceae**, Flora do Brasil 2020 em construção, Acessado em: 30/07/2019, 2019, disponível em: <http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB55>.

REFLORA, Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (2019b). **Cyrtocymura**, Flora do Brasil 2020 em construção, Acessado em: 30/07/2019, 2019, disponível em: <http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB27009>.

REFLORA, Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (2019c). **Cyrtocymura scorpioides** Flora do Brasil 2020 em construção, Acessado em: 30/07/2019, 2019, disponível em: <http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB27011>.

REFLORA, Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (2019d). **Lepidaploa**, Flora do Brasil 2020 em construção, Acessado em: 30/07/2019, 2019, disponível em: <http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB16164>.

REFLORA, Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (2019e). **Lepidaploa chamissonis**, Flora do Brasil 2020 em construção, Acessado em: 30/07/2019, 2019, disponível em: <http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB27135>.

REFLORA, Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (2019f). *Vernonanthura*, Flora do Brasil 2020 em construção, Acessado em: 30/07/2019, 2019, disponível em: <http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB22246>.

REFLORA, Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (2019g). *Vernonieae*, Flora do Brasil 2020 em construção, Acessado em: 30/07/2019, 2019, disponível em: <http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB101557>.

REN, Y.; YU, J.; KINGHORN, A.D. Development of anticancer agents from plant-derived sesquiterpene lactones. **Current Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 23, p. 2397-2420, 2016.

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

RITTER, B.; GRETEN, F.R. Modulating inflammation for cancer therapy. **Journal of Experimental Medicine**, v. 216, n. 6, p. 1234-1243, 2019.

ROBINSON, H. Studies in the *Lepidaploa* complex (Vernonieae: Asteraceae). III. Two new genera, *Cyrtocymura* and *Eirmocephala*. **Proceedings of the Biological Society of Washington**, v. 100, n. 4, p. 844-855, 1987.

ROBINSON, H. Studies in the *Lepidaploa* complex (Vernonieae, Asteraceae) .VII. The genus *Lepidaploa*. **Proceedings of the Biological Society of Washington**, v. 103, n. 2, p. 464-498, 1990.

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

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

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

RODRIGUES, F.R.; BISPO, D.A.A.S.; BRANDÃO, H.N.; SOARES, T.L.; DE ALMEIDA, W.A.B.; DE SANTANA, J.R.F. The impact of medium composition and photosynthetically active radiation level on the initial in vitro growth and production of flavonoids of *Vernonia condensata* Baker. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 18, n., p. 101063, 2019.

RODRÍGUEZ-HAHN, L.; CÁRDENAS, J.; MALDONADO, E.; ORTEGA, A.; MARTÍNEZ, M.; SORIANO GARCIA, M.; TOSCANO, A. Transannular cyclization of glaucolide A. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 53, n. 13, p. 2965-2968, 1988.

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

ROLÓN, M.; DE ABREU LIMA, A.P.; CORONEL, C.; VEGA, M.C.; PANDOLFI, E.; DE ARIAS, A.R. The efficacy of new 2, 5-dihydroxybenzyl derivatives against *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania*

infantum and *Leishmania braziliensis*. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 13, n. 6, p. 565-576, 2019.

RÜNGELER, P.; CASTRO, V.; MORA, G.; GÖREN, N.; VICHNEWSKI, W.; PAHL, H.L.; MERFORT, I.; SCHMIDT, T.J. Inhibition of transcription factor NF- κ B by sesquiterpene lactones: a proposed molecular mechanism of action. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 7, n. 11, p. 2343-2352, 1999.

SAEIDNIA, S.; GOHARI, A.R.; HADDADI, A. Biogenic trypanocidal sesquiterpenes: lead compounds to design future trypanocidal drugs - a mini review. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 21, n. 35, p. 1-9, 2013.

SALVADOR, J.A.; PINTO, R.; SILVESTRE, S.M. Recent advances of bismuth (III) salts in organic chemistry: application to the synthesis of heterocycles of pharmaceutical interest. **Current Organic Synthesis**, v. 6, n. 4, p. 426-470, 2009.

SALVADOR, J.A.; SILVESTRE, S.M.; PINTO, R. Bismuth (III) reagents in steroid and terpene chemistry. **Molecules**, v. 16, n. 4, p. 2884-2913, 2011.

SANTANA, A.; MOLINILLO, J.M.; MACIAS, F.A. Trends in the synthesis and functionalization of guaianolides. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2015, n. 10, p. 2093-2110, 2015.

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

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

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

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

SAROGLU, V.; KARIOTI, A.; DEMETZOS, C.; DIMAS, K.; SKAL TSA, H. Sesquiterpene Lactones from *Centaurea spinosa* and their antibacterial and cytotoxic activities. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 9, p. 1404-1407, 2005.

SARTORI, L.R.; VESSECCHI, R.; HUMPF, H.U.; DA COSTA, F.B.; LOPES, N.P. A systematic investigation of the fragmentation pattern of two furanoheliangolide C-8 stereoisomers using electrospray ionization mass spectrometry. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, v. 28, n. 7, p. 723-730, 2014.

SCHMID, N.; EICHENBERGER, A.P.; CHOUTKO, A.; RINIKER, S.; WINGER, M.; MARK, A.E.; VAN GUNSTEREN, W.F. Definition and testing of the GROMOS force-field versions 54A7 and 54B7. **Eur. Biophys. J.**, v. 40, n. 7, p. 843-856, 2011.

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

SCHMIDT, T.J.; DA COSTA, F.B.; LOPES, N.P.; KAISER, M.; BRUN, R. *In silico* prediction and experimental evaluation of furanoheliangolide sesquiterpene lactones as potent agents against *Trypanosoma brucei rhodesiense*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 1, p. 325-332, 2014.

SCHMIDT, T.J.; NOUR, A.M.M.; KHALID, S.A.; KAISER, M.; BRUN, R. Quantitative structure-antiprotozoal activity relationships of sesquiterpene lactones. **Molecules**, v. 14, n. 6, p. 2062-2076, 2009.

SCHORR, K.; GARCÍA-PIÑERES, A.J.; SIEDLE, B.; MERFORT, I.; DA COSTA, F.B. Guaianolides from *Viguiera gardneri* inhibit the transcription factor NF- κ B. **Phytochemistry**, v. 60, n. 7, p. 733-740, 2002.

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

SIEGEL, R.; MA, J.; ZOU, Z.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2014. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 64, n. 1, p. 9-29, 2014.

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

SINISI, A.; MILLÁN, E.; ABAY, S.M.; HABLUETZEL, A.; APPENDINO, G.; MUÑOZ, E.; TAGLIALATELA-SCAFATI, O. Poly-electrophilic sesquiterpene lactones from *Vernonia amygdalina*: new members and differences in their mechanism of thiol trapping and in bioactivity. **Journal of Natural Products**, v. 78, n. 7, p. 1618-1623, 2015.

SKALICKA-WOŹNIAK, K.; GARRARD, I. Counter-current chromatography for the separation of terpenoids: a comprehensive review with respect to the solvent systems employed. **Phytochem. Rev.**, v. 13, n. 2, p. 547-572, 2014.

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

SOBRINHO, A.C.N.; DE SOUZA, E.B.; DOS SANTOS FONTENELLE, R.O. A review on antimicrobial potential of species of the genus *Vernonia* (Asteraceae). **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 9, n. 31, p. 838-850, 2015.

SOLLADIÉ-CAVALLO, A.; CHOUCAIR, E.; BALAZ, M.; LUPATTELLI, P.; BONINI, C.; DI BLASIO, N. A mild stereo- and enantiospecific conversion of 2, 3-diaryl-substituted oxiranes into 2, 2-dimethyl-1, 3-dioxolanes by an acetone/amberlyst 15 system. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2006, n. 13, p. 3007-3011, 2006.

SOSA, A.M.; AMAYA, S.; SALAMANCA CAPUSIRI, E.; GILABERT, M.; BARDÓN, A.; GIMÉNEZ, A.; VERA, N.R.; BORKOSKY, S.A. Active sesquiterpene lactones against *Leishmania amazonensis* and *Leishmania braziliensis*. **Natural Product Research**, v. 30, n. 22, p. 2611-2615, 2016.

SOUZA, G.C.; FRANCHI JR, G.C.; NOWILL, A.E.; SANTOS, L.S.; ALVES, C.N.; BARATA, L.E.S.; ANDRADE, C.K.Z. Synthesis, characterization and *in vitro* anticancer activity of novel 8, 4'-oxyneolignan analogues. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 11, p. 2229-2243, 2017.

STEVENS, J.F.; WOLLENWEBER, E.; IVANCIC, M.; HSU, V.L.; SUNDBERG, S.; DEINZER, M.L. Leaf surface flavonoids of *Chrysothamnus*. **Phytochemistry**, v. 51, n. 6, p. 771-780, 1999.

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

SUGIMURA, N.; IGARASHI, Y.; AOYAMA, R.; SHIBUE, T. Energy decomposition analysis of the interactions in adduct ions of acetophenone and Na⁺, NH₄⁺ and H⁺ in the gas phase. **Chem. Phys Lett.**, v. 684, n., p. 20-23, 2017.

SÜLSEN, V.P.; FRANK, F.M.; CAZORLA, S.I.; ANESINI, C.A.; MALCHIODI, E.L.; FREIXA, B.; VILA, R.; MUSCHIETTI, L.V.; MARTINO, V.S. Trypanocidal and leishmanicidal activities of sesquiterpene lactones from *Ambrosia tenuifolia* Sprengel (Asteraceae). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 7, p. 2415-2419, 2008.

TANG, J.-J.; HE, Q.-R.; DONG, S.; GUO, X.; WANG, Y.-G.; LEI, B.-L.; TIAN, J.-M.; GAO, J.-M. Diversity modification and structure-activity relationships of two natural products 1β-hydroxy alantolactone and ivangustin as potent cytotoxic agents. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1722-1737, 2018.

TEAF, C.M. Properties and effects of organic solvents. *in* WILLIAMS, P. L.; JAMES, R. C.; ROBERTS, S. M. **Principles of Toxicology: Environmental and Industrial Applications, Second Edition** 2^a, New York: John Wiley & Sons, p. 367-408, 2000.

TELES, A.M.; SOBRAL, M.; NAKAJIMA, J.N. A new species of *Lepidaploa* (Vernonieae-Asteraceae) from southeastern Brazil. **Rodriguésia**, v. 61, n. 1, p. 101-103, 2010.

THOMAS, E.; GOPALAKRISHNAN, V.; SOMASAGARA, R.R.; CHOUDHARY, B.; RAGHAVAN, S.C. Extract of *Vernonia condensata*, inhibits tumor progression and improves survival of tumor-allograft bearing mouse. **Scientific Reports**, v. 6, n., p. 23255, 2016.

TODORIC, J.; ANTONUCCI, L.; KARIN, M. Targeting inflammation in cancer prevention and therapy. **Cancer Prevention Research**, v. 9, n. 12, p. 895-905, 2016.

TOIGO, L.; OLIVEIRA, R.F.; OLIVEIRA, F.; MARQUES, M.O.M. Caracterização farmacobotânica, estudo do óleo essencial e atividade antimicrobiana da erva de São Simão *Vernonia scorpioides* (Lam.) Pers. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 85, n. 2, p. 49-55, 2004.

TORRE, L.A.; BRAY, F.; SIEGEL, R.L.; FERLAY, J.; LORTET-TIEULENT, J.; JEMAL, A. Global cancer statistics, 2012. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 65, n. 2, p. 87-108, 2015.

TOUBIANA, M.R.; TOUBIANA, M.-J.; DAS, M.B.C. Structure du confertolide, nouveau germacranolide isole de *Vernonia conferta* (Composee). **Tetrahedron Letters**, v. 13, n. 3, p. 207-210, 1972.

TOUBIANA, R.; GAUDEMER, A. Structure du vernolide, nouvel ester sesquiterpenique isole de *Vernonia colorata*. **Tetrahedron Letters**, v. 8, n. 14, p. 1333-1336, 1967.

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

TOYANG, N.J.; WABO, H.K.; ATEH, E.N.; DAVIS, H.; TANE, P.; SONDEGAM, L.B.; BRYANT, J.; VERPOORTE, R. Cytotoxic sesquiterpene lactones from the leaves of *Vernonia guineensis* Benth.(Asteraceae). **J. Ethnopharmacol.**, v. 146, n. 2, p. 552-556, 2013.

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

TROPICOS.ORG, (2019a). **Nomenclatural and specimen database of the Missouri Botanical Garden**, *Cyrtocymura scorpioides* (Lam.) H. Rob., Acessado em: 30/07/2019, 2019, disponível em: <https://www.tropicos.org/Name/2735157>.

TROPICOS.ORG, (2019b). **Nomenclatural and specimen database of the Missouri Botanical Garden**, *Lepidaploa chamissonis* (Less.) H. Rob., Acessado em: 30/07/2019, 2019, disponível em: <https://www.tropicos.org/Name/2735832>.

TROPICOS.ORG, (2019c). **Nomenclatural and specimen database of the Missouri Botanical Garden**, *Vernonanthura condensata* (Baker) H. Rob., Acessado em: 30/07/2019, 2019, disponível em: <http://www.tropicos.org/Name/2739972>.

TROPICOS.ORG, (2019d). **Nomenclatural and specimen database of the Missouri Botanical Garden**, *Vernonanthura tweedieana*, Acessado em: 30/07/2019, 2019, disponível em: <http://www.tropicos.org/Name/2740084>.

TURCONI, J.L.; GRIOLET, F.D.R.; GUEVEL, R.; ODDON, G.; VILLA, R.; GEATTI, A.; HVALA, M.; ROSSEN, K.; GÖLLER, R.; BURGARD, A. Semisynthetic artemisinin, the chemical path to industrial production. **Organic Process Research & Development**, v. 18, n. 3, p. 417-422, 2014.

ULLOA, J.L.; SPINA, R.; CASASCO, A.; PETRAY, P.B.; MARTINO, V.; SOSA, M.A.; FRANK, F.M.; MUSCHIETTI, L.V. Germacranolide-type sesquiterpene lactones from *Smallanthus sonchifolius* with promising activity against *Leishmania mexicana* and *Trypanosoma cruzi*. **Parasite Vector.**, v. 10, n. 1, p. 567-576, 2017.

VADAPARTHI, P.R.; KUMAR, C.P.; KUMAR, K.; VENKANNA, A.; NAYAK, V.L.; RAMAKRISHNA, S.; BABU, K.S. Synthesis of costunolide derivatives by Pd-catalyzed Heck arylation and evaluation of their cytotoxic activities. **Medicinal Chemistry Research**, v. 24, n. 7, p. 2871-2878, 2015.

- VALDÉS, D.A.; BARDÓN, A.; CATALÁN, C.A.N.; GEDRIS, T.E.; HERZ, W. Glaucolides, piptocarphins and cadinanolides from *Lepidaploa remotiflora*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 26, n. 6, p. 685-689, 1998.
- VALDÉS, D.Á.; ELÍAS, A.; BARDÓN, A. Allelopathic agents from *Cyrtocymura cincta*. **Natural Product Letters**, v. 15, n. 6, p. 445-450, 2001.
- VALVERDE, A.L.; CARDOSO, G.L.C.; PEREIRA, N.A.; SILVA, A.J.R.; KUSTER, R.M. Analgesic and antiinflammatory activities of vernonioside B2 from *Vernonia condensata*. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 3, p. 263-264, 2001.
- VARGHESE, R.S.; ZHOU, B.; RANJBAR, M.R.N.; ZHAO, Y.; RESSOM, H.W. Ion annotation-assisted analysis of LC-MS based metabolomic experiment. **Proteome Sci.**, v. 10, n. (Suppl1):S8, p. 1-9, 2012.
- VEGA, A.J.; DEMATTEIS, M. Cytotaxonomy of some species of *Vernonanthura* and *Vernonia* (Asteraceae, Vernonieae) from South America. **Caryologia**, v. 69, n. 1, p. 29-37, 2016.
- VEGA, Á.J.; DEMATTEIS, M. Nuevas combinaciones y tipificaciones en el género *Vernonanthura* (Vernonieae, Asteraceae). **Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica**, v. 46, n. 3-4, p. 369-374, 2011.
- VELLASCO JUNIOR, W.T. Acetona (CAS 67-64-1). **Revista Virtual de Química**, v. 3, n. 4, p. 339-343, 2011.
- VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V.D.S.; BARREIRO, E.J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.
- VILLAGOMEZ, R.; HATTI-KAUL, R.; STERNER, O.; ALMANZA, G.; LINARES-PASTÉN, J.A. Effect of natural and semisynthetic pseudoguanolides on the stability of NF- κ B: DNA complex studied by agarose gel electrophoresis. **PLoS ONE**, v. 10, n. 1, p. 1-18, 2015.
- VINEIS, P.; WILD, C.P. Global cancer patterns: causes and prevention. **The Lancet**, v. 383, n. 9916, p. 549-557, 2014.
- WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**, 2^a ed, Springer Verlag, 2001.
- WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M.; SHERMA, J.; KOWALSKA, T. **Thin layer chromatography in phytochemistry** Chromatographic Science Series, New York, CRC PressI Llc, 2008.
- WANG, F.; ZHONG, H.; FANG, S.; ZHENG, Y.; LI, C.; PENG, G.; SHEN, X. Potential anti-inflammatory sesquiterpene lactones from *Eupatorium lindleyanum*. **Planta medica**, v. 84, n. 2, p. 123-128, 2017.
- WANG, F.; ZHONG, H.; FANG, S.; ZHENG, Y.; LI, C.; PENG, G.; SHEN, X. Potential anti-inflammatory sesquiterpene lactones from *Eupatorium lindleyanum*. **Planta Med.**, v. 84, n. 2, p. 123-128, 2018.
- WANG, J.; SU, S.; ZHANG, S.; ZHAI, S.; SHENG, R.; WU, W.; GUO, R. Structure-activity relationship and synthetic methodologies of α -santonin derivatives with diverse bioactivities: a mini-review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 175, n., p. 215-233, 2019.

WANG, X.; ZHANG, X.; ZHENG, B.; HU, N.; XIE, W.; ROW, K. Synthesis of 13-amino telekin derivatives and their cytotoxic activity. **Natural Product Research**, v. 29, n. 8, p. 756-763, 2015.

WEI, L.; WANG, X.; ZHANG, P.; SUN, Y.; JIA, L.; ZHAO, J.; DONG, S.; SUN, L. An UPLC–MS/MS method for simultaneous quantitation of two coumarins and two flavonoids in rat plasma and its application to a pharmacokinetic study of *Wikstroemia indica* extract. **J. Chromatogr. B**, v. 1008, n., p. 139-145, 2016.

WEIGEND, F.; AHLRICHS, R. Balanced basis sets of split valence, triple zeta valence and quadruple zeta valence quality for H to Rn: Design and assessment of accuracy. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v. 7, n. 18, p. 3297-3305, 2005.

WHO. World Health Organization. **Global plan to combat neglected tropical diseases, 2008–2015**. 2007.

WHO, World Health Organization. (2015). **Neglected tropical diseases**, Acessado em: 09/01/2015, 2015, disponível em: http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/.

WOJAKOWSKA, A.; PERKOWSKI, J.; GÓRAL, T.; STOBIECKI, M. Structural characterization of flavonoid glycosides from leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.) using LC/MS/MS profiling of the target compounds. **J. Mass Spectrom.**, v. 48, n. 3, p. 329-339, 2013.

WU, Z.-N.; ZHANG, Y.-B.; CHEN, N.-H.; LI, M.-J.; LI, M.-M.; TANG, W.; ZHUANG, L.; LI, Y.-L.; WANG, G.-C. Sesquiterpene lactones from *Elephantopus mollis* and their anti-inflammatory activities. **Phytochemistry**, v. 137, n., p. 81-86, 2017.

WULSTEN, I.F.; COSTA-SILVA, T.A.; MESQUITA, J.T.; LIMA, M.L.; GALUPPO, M.K.; TANIWAKI, N.N.; BORBOREMA, S.E.T.; DA COSTA, F.B.; SCHMIDT, T.J.; TEMPONE, A.G. Investigation of the anti-leishmania (*Leishmania*) *infantum* activity of some natural sesquiterpene lactones. **Molecules**, v. 22, n. 5, p. 685, 2017.

XU, S.; HELD, I.; KEMPF, B.; MAYR, H.; STEGLICH, W.; ZIPSE, H. The DMAP-catalyzed acetylation of alcohols - a mechanistic study (DMAP= 4-(dimethylamino)pyridine). **Chemistry - A European Journal**, v. 11, n. 16, p. 4751-4757, 2005.

XU, Y.-F.; LU, W.; RABINOWITZ, J.D. Avoiding misannotation of in-source fragmentation products as cellular metabolites in liquid chromatography–mass spectrometry-based metabolomics. **Anal. Chem.**, v. 87, n. 4, p. 2273-2281, 2015.

YAMAGAKI, T.; MAKINO, Y. Fragmentation of oligosaccharides from sodium adduct molecules depends on the position of N-acetyl hexosamine residue in their sequences in mass spectrometry. **Mass Spectrom.**, v. 6, n. 3, p. S0073, 2017.

YANG, J.; XUE, H. Transannular cyclization in natural product total synthesis. *in* ANDRUSHKO, V.; ANDRUSHKO, N. **Stereoselective synthesis of drugs and natural products**: John Wiley & Sons, Inc., 2, p. 551-579, 2013.

YANG, W.; LI, Y.; KANG, C.; ZHAO, H.; XIANG, L.; LI, C.; WANG, Q. Sodiation-based in-source collision for profiling of pyranocoumarins in *Radix Peucedani* (Qianhu): utility of sodium adducts' stability with in-source collision. **J. Mass Spectrom.**, v. 52, n. 3, p. 152-164, 2017.

YANG, X.J.; QU, Y.; YUAN, Q.; WAN, P.; DU, Z.; CHEN, D.; WONG, C. Effect of ammonium on liquid-and gas-phase protonation and deprotonation in electrospray ionization mass spectrometry. **Analyst**, v. 138, n. 2, p. 659-665, 2013.

YOUN, U.J.; PARK, E.-J.; KONDRATYUK, T.P.; SIMMONS, C.J.; BORRIS, R.P.; TANAMATAYARAT, P.; WONGWIWATTHANANUKIT, S.; TOYAMA, O.; SONGSAK, T.; PEZZUTO, J.M. Anti-inflammatory sesquiterpene lactones from the flower of *Vernonia cinerea*. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 22, n. 17, p. 5559-5562, 2012.

ZAKI, M.; AKSSIRA, M.; BERTEINA-RABOIN, S. Modification of natural eudesmane scaffolds via Mizoroki-Heck reactions. **Molecules**, v. 22, n. 4, p. 652-668, 2017.

ZANDONAI, R.H.; COELHO, F.; FERREIRA, J.; MENDES, A.K.B.; BIAVATTI, M.W.; NIERO, R.; CECHINEL FILHO, V.; BUENO, E.C. Evaluation of the proliferative activity of methanol extracts from six medicinal plants in murine spleen cells. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 2, p. 323-333, 2010.

ZANON, R.B. Metabólitos secundários em *Vernonia tweediana* Baker. **Dissertação de Mestrado**, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria/RS, Brasil, 2006.

ZANON, R.B.; PEREIRA, D.F.; BOSCHETTI, T.K.; SANTOS, M.; ATHAYDE, M.L. Fitoconstituintes isolados da fração em diclorometano das folhas de *Vernonia tweediana* Baker. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 226-229, 2008.

ZHANG, A.; SUN, H.; WANG, X. Mass spectrometry-driven drug discovery for development of herbal medicine. **Mass Spectrom. Rev.**, v. n., p., 2016.

ZHANGABYLOV, N.S.; DEDERER, L.Y.; GORBACHEVA, L.B.; VASIL'eva, S.V.; TEREKHOV, A.S.; ADEKENOV, S.M. Sesquiterpene lactone arglabin influences DNA synthesis in P388 leukemia cells *in vivo*. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 38, n. 12, p. 651-653, 2004.

ZIMMERMANN, S.; FOUCHÉ, G.; DE MIERI, M.; YOSHIMOTO, Y.; USUKI, T.; NTHAMBELENI, R.; PARKINSON, C.J.; VAN DER WESTHUYZEN, C.; KAISER, M.; HAMBURGER, M. Structure-activity relationship study of sesquiterpene lactones and their semi-synthetic amino derivatives as potential antitrypanosomal products. **Molecules**, v. 19, n. 3, p. 3523-3538, 2014.