



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS
NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS



Estudo fitoquímico, avaliação da atividade larvicida e antioxidante de *Chresta pacourinoides*

EVANDRO FERREIRA DA SILVA

João Pessoa - PB

2018

EVANDRO FERREIRA DA SILVA

Estudo fitoquímico, avaliação da atividade larvicida e antioxidante de *Chresta pacourinoides*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do título de Doutor em Farmacoquímica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Farmacoquímica

João Pessoa - PB

2018

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S586e Silva, Evandro Ferreira da.

Estudo fitoquímico, avaliação da atividade larvicida e antioxidante de *Chresta pacourinoides* / Evandro Ferreira da Silva. - João Pessoa, 2018.
171 f. : il.

Orientação: Marcelo Sobral da Silva.
Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. *Chresta pacourinoides*, Cromatografia, Flavonoides.
I. da Silva, Marcelo Sobral. II. Título.

UFPB/BC

Egrafe

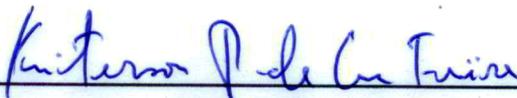
EVANDRO FERREIRA DA SILVA

Estudo fitoquímico, avaliação da atividade larvicida e antioxidante de *Chresta*

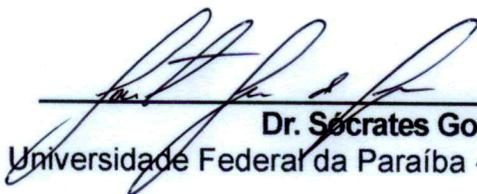
leito. Não sou o que deveria ser, *pacourinoides*. Deus, não sou o que era antes"
(Martin Luther King)

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Damião Pergentino de Sousa
Universidade Federal da Paraíba - Examinador Interno



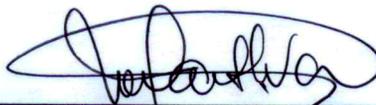
Prof. Dr. Kristerson Reinaldo de Luna Freire
Universidade Federal da Paraíba - Examinador Externo



Dr. Sócrates Golzio
Universidade Federal da Paraíba - Examinador Externo



Profa. Dra. Luciana Scotti
Universidade Federal da Paraíba - Examinadora Interna



Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva
Universidade Federal da Paraíba – Orientador

Epigrafe

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.
(Marthin Luther King)

Dedico este trabalho a Deus, sem Ele nada desse trabalho seria possível. Porque dele e por ele, e para ele, são todas as coisas; glória, pois, a ele eternamente. Amém

AGRADECIMENTOS

A Deus, porque Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas, glória pois a Ele eternamente. Se não fosse o Senhor em minha vida, não teria conseguido chegar até aqui, hoje posso dizer *Ebenezer*: até aqui nos ajudou o Senhor.

A minha esposa Adriana, obrigado minha linda por me dar forças quando quis desistir, pelas palavras de incentivo, pelas vezes que orou por mim para que Deus abrisse meu entendimento para que eu pudesse escrever. Obrigado pela compreensão do tempo em que não pude (e não foram poucas!!!) chegar cedo em casa para ficar um tempo com você e nossa filha.

A minha filha Suêva, parte da iniciativa de fazer e, perseverar neste doutorado, devo a ela. Ter a possibilidade de lhe dar um futuro melhor deu-me forças para continuar mais uma etapa na jornada. Algumas vezes ficava com o coração na mão por lhe deixar brincando e para ir ao laboratório enquanto você ficava pedindo “vamos brincar de massinha papai”. Quando tiveres mais velha poderás compreender tudo isso.

Aos meus pais, Raimundo e Nevinha, as palavras que posso lhes dizer é muito obrigado, por tudo: toda abnegação; o enorme tempo e todo o investimento financeiro empreendido em minha educação; as inúmeras vezes que tive que ir na casa de vocês só com tempo de comer e voltar para o laboratório; as incontáveis vezes em que oraram por mim. O mais importante de tudo o que vocês fizeram por mim, foi a benção do Senhor sobre minha vida, as diversas palavras benditas que me faziam lembrar que há um Deus que estava adiante. Que o nosso Deus retribua muitas vezes mais o que fizeram por mim. Amo vocês!

A minha sogra Teca, por orar continuamente para que Deus derramasse graça e iluminasse minha mente, a enorme ajuda para cuidar de minha esposa e filha enquanto eu voltava para minha “segunda casa”.

Obrigado a toda minha família que orou, torceu, vibrou, se preocupou comigo, aos meus irmãos Ewerton e sua esposa Vanessa e Fatinha com esposo Augusto, e meus sobrinhos: Eli, Levi e Asafe, meu eterno agradecimento.

Ao meu Orientador professor Marcelo Sobral, pelo apoio, pelas dúvidas tiradas, pelo enorme auxílio com os espectros de massas, obrigado pelo seu amor e dedicação pelo que faz. O senhor é um exemplo de pessoa que ama e vibra com cada estrutura elucidada, com cada espectro de massas. Essa alegria me contagia. Que Deus o abençoe.

Ao meu Coorientador e chefe imediato, professor Josean Fechine, obrigado pelo enorme auxílio, tempo empreendido em me direcionar para otimizar meu tempo, que era muito exíguo, pela apoio na elucidação das estruturas. Obrigado pela pessoa comprometida e justa que o senhor é. Agora, trabalhando no mesmo laboratório que o senhor espero contribuir para que outros possam ser ajudados assim como fez por mim. Que Deus ilumine sua vida.

Aos meus amigos do Departamento de engenharia Química-DEQ, Vanessa, Debora, Rafael, Andrea, Clediana e a Marcelinho obrigado pela amizade.

A Juliana, obrigado por todo o apoio durante as pesquisas de laboratórios, pelas diversas olhadas na minha coluna, pelas inúmeras conversas, pelos momentos de descontração e o mais importante, e isso agradeço a Deus, é ter me dado uma amiga, muito obrigado por tudo o que fizeste por mim.

A Sallett, minha amiga, filha adotiva, irmã em Cristo, obrigado pela sua companhia durante todos esses anos, finalmente conseguimos, vencemos mais uma etapa.

Ao meu amigo Yuri Mangureira, Seu Yuri, poderia agradecer por muitas coisas: pelas dicas, auxílio no HPLC, a mais importante durante esses anos foi, sua amizade. És uma pessoa com um coração muito bom, que Deus abençoe sua caminhada, quando precisar de algo pode contar com seu amigo.

Aos meus amigos do LMCA: Vicente, Sócrates, Alexsandro e Junior obrigado por todo o apoio e pela amizade.

A toda equipe Sobral, Fechine, Costa e Barbosa, por toda a ajuda para que esse trabalho chegasse até aqui. Meu muito obrigado aos meus amigos baianos Rafael e Lucas, os quais me ajudaram muito com o HPLC preparativo, "o Opala", que me permitiu isolar a maioria dos compostos aqui registrados.

A UFPB pelo espaço cedido e aos órgãos de fomento (CNPQ/CAPES/MEC) pelos recursos.

1. RESUMO

O gênero *Chresta* pertence à família Asteraceae, mas tem sido pouco estudado na literatura e é relativamente pequeno, sendo constituído por 15 espécies, das quais 14 são endêmicas do Brasil. A espécie *Chresta pacourinoides*, que pode ser encontrada na Paraíba, apresenta apenas um estudo realizado, fazendo-se necessário um estudo mais amplo, utilizando técnicas espectroscópicas com objetivo de disseminar mais informações sobre os constituintes químicos presentes na espécie bem como avaliar sua atividade antioxidante. Para isso, partes aéreas de *Chresta pacourinoides* (3 Kg) foram coletadas no município de Fagundes-PB. Uma amostra (30 g) do extrato etanólico bruto (EEB) foi submetido a uma partição, que gerou a fase hexânica e a metanólica (FM). Através de técnicas como cromatografia líquida de média pressão e cromatografia gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (EM), a fase hexânica foi analisada. Enquanto fase metanólica foi submetida a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) analítica e preparativa, para análise e isolamento dos constituintes presentes. Os compostos isolados foram identificados através de RMN de ^1H e ^{13}C , bem como por técnicas bidimensionais e espectrometria de massas por injeção direta. Também foi determinado o teor de fenólicos totais do EEB e da fase metanólica seguindo o método de Folin-Ciocalteu. Para a determinação da atividade antioxidante das mesmas amostras bem como da fração 14-17 (advinda da FM), foi utilizado o método do sequestro de radicais DPPH. Além disso, a atividade larvívora contra larvas de *Aedes aegypti* foi testada para a amostra do extrato, fase metanólica e uma das frações isoladas. Como resultados, foram identificados 15 substâncias, sendo da fração 14-17 isoladas nove substâncias, das quais, oito flavonoides: campferol; isoquercetrin; crisoeriol; apigenina; 3-ometilquercetina; luteolina; eriodictiol; stricnobilflavona e um ácido fenólico (ácido protocatecuico). Além disso, foi possível identificar 06 compostos por EM: ácido cafeico-*o*-hexose; ácido cafeoilquínico; ácido 3,4-dicafeoilquínico; luteolina-*o*-hexose; apigenina; quercetina-*o*-hexose. Como resultados para o teor de fenólicos totais, foi possível observar que o EEB apresentou $128 \pm 3,29$ EAG / g de amostra e a fase metanólica $98,5 \pm 5,4$ EAG / g de amostra. No que se refere a atividade antioxidante, o EEB apresentou $\text{CE}_{50} 288,83 \pm 9,47$ $\mu\text{g} / \text{mL}$, a fase metanólica $355,71 \pm 9,87$ $\mu\text{g} / \text{mL}$ e a fração 14-17 de $35,657 \pm 0,6893$ $\mu\text{g} / \text{mL}$, mostrando que a fração teve melhor atividade. No teste para atividade larvívora as amostras testadas não causaram mortalidade significativa. Diante dos resultados obtidos é possível concluir que o estudo fitoquímico de *Chresta pacourinoides* resultou no isolamento e identificação de 9 compostos provenientes da fração 14-17 da fase metanólica, onde 7 foram isolados pela primeira vez no gênero, bem como, a identificação de outras 6 substâncias por EM. Na fase hexânica, algumas frações foram analisadas por CG/EM. Com relação as atividades biológicas, a atividade larvívora das amostras testadas não se mostraram significantes, embora o extrato e a fase metanólica tenham apresentado boas concentrações de compostos fenólicos, suas atividades antioxidantes não foram satisfatórias pelo método de DPPH, já a fração 14-17, apresentou atividade antioxidante, necessitando de mais estudos para confirmá-la.

Palavras chave: *Chresta pacourinoides*, Cromatografia, Flavonoides.

2. ABSTRACT

The genus *Chresta* belongs to the Asteraceae family, but it has been little studied in the literature and it is relatively small, being composed of 15 species and 14 of them are endemic to Brazil. The species *Chresta pacourinoides*, which can be found in Paraíba, presents only a previous study found in the literature, requiring a broader study, that uses spectroscopic techniques to disseminate more information on the chemical constituents present in the species and evaluating its antioxidant activity. Thus, aerial parts of *Chresta Pacourinoides* (3 kg) were collected in the Fagundes-PB city. An aliquot (30g) of the crude ethanolic extract (CEE) was subjected to a partition, which generated the hexane and methanolic extracts (ME). Through techniques such as Medium Pressure Liquid Chromatography and Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (MS), the hexane extract was worked up. The methanolic extract was subjected to analytical and preparative High Performance Liquid Chromatography (HPLC), for analysis and isolation of the constituents present. The isolated compounds were identified by ^1H and ^{13}C NMR, as well as by two-dimensional techniques and mass spectrometry (MS) by direct injection. Also, the total phenolic content of CEE and the methanolic extract was determined following the Folin-Ciocalteu method. For the determination of the antioxidant activity of the same samples as well as fraction 14-17 (isolated from ME), DPPH radical sequestration method was used. In addition, the larvicidal activity against *Aedes aegypti* larvae was tested for the extract sample, methanolic phase and one of the isolated fractions. As a result, 14 substances were identified and from the fraction 14-17, 9 substances were isolated, of which eight flavonoids: kaempferol; isoquercetrin; chrysoeryol; apigenin; 3-o-methylquercetin; luteolin; eriodictiol; stricnoblodone, and a phenolic acid (protocatecuic acid). In addition, it was possible to identify 6 compounds by MS: cafeic acid O-hexose; cafeoilquinic Acid; 3,4-dideofeoilquinic acid; luteolin-O-hexose; apigenin; quercetin-O-Hexose. As results for the total phenolic content, it was possible to observe that the CEE presented 128 ± 3.29 EAG / g of sample and the methanolic extract 98.5 ± 5.4 EAG / g of sample. In the antioxidant activity assay, the CEE presented $EC 50 288.83 \pm 9.47$ $\mu\text{g} / \text{mL}$, the methanolic extract 355.71 ± 9.87 $\mu\text{g} / \text{mL}$ and the fraction 14-17 of $35,657 \pm 0,6893$ $\mu\text{g} / \text{mL}$, showing that the fraction had better activity. In the assay for larvicidal activity the samples tested did not cause significant mortality. Thereby, with the obtained results, it is possible to conclude that the phytochemical study of *Chresta pacourinoides* resulted in the isolation and identification of 9 compounds from fraction 14-17 isolated from methanolic extract, where 7 were isolated for the first time in the genus, as well as the identification of 7 other substances by MS. In the Hexanic extract, some fractions were analyzed by CG/MS. Regarding the biological activities, the larvicidal activity of the samples tested were not significant, in addition, although the extract and the methanolic extracts presented good concentrations of phenolic compounds, their antioxidant activities were not satisfactory by the DPPH method, however the fraction 14-17 presented antioxidant activity, requiring further studies to confirm it.

Key words: *Chresta pacourinoides*, Chromatography, Flavonoids

3. LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido Ascórbico
APT	<i>Attached Proton Test</i>
ca.	Cerca de
CC	Cromatografia em coluna
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CE50	Concentração Efetiva de 50%
CGEM	Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massas
CI50	Concentração inibitória de 50%
CLAE - DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector ultravioleta com arranjo de diodos
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
CV	Coeficiente de Variação
<i>d</i>	Dubleto
<i>dd</i>	Duplo dubleto
EAG	Equivalente de ácido gálico
EB	Extrato Bruto
EMB	Extrato Metanólico Bruto
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FH Cp	Fase hexânica de <i>Chresta pacourinoides</i> .
FM Cp	Fase metanólica de <i>C. pacourinoides</i>
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
IES-EM	Espectro de massas por ionização de electrospray
<i>J</i>	Constante de acoplamento
<i>M</i>	Multiplete
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
NUCAL	Núcleo de Caracterização e Análise
<i>Q</i>	Quarteto
<i>R_f</i>	Fator de Retenção
<i>RL</i>	Radicais Livres
RMN 13C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN 1H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
<i>S</i>	Singleto
<i>Sl</i>	Singleto largo
<i>T</i>	Tripleto
<i>TFT</i>	Teor de Fenólicos Totais
<i>UV</i>	Ultravioleta
Δ	Deslocamento químico em ppm

4. LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Obtenção e particionamento do extrato etanólico bruto das inflorescências de <i>Chresta pacourinoides</i> Mart.....	52
Esquema 2 - Obtenção e particionamento do extrato etanólico bruto das inflorescências de <i>Chresta pacourinoides</i> Mart.....	55
Esquema 3 - Fracionamento da FM1.....	56
Esquema 4 - Frações isoladas da reunião de frações 14-17 injetadas no CLAE preparativo.....	72
Esquema 5 - Fragmentações de Cp-9	126
Esquema 6 - Proposta de Fragmentação de Cp-10	134
Esquema 7 - Proposta de Fragmentação de Cp-11	136
Esquema 8 - Proposta de fragmentação de Cp-12	138
Esquema 9 - Proposta de fragmentação de Cp-13	141
Esquema 10 - Proposta de fragmentação de Cp-14	143
Esquema 11 - Proposta de fragmentação de Cp-15	145

5. LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa de distribuição da Família Asteraceae.....	32
Figura 2 - Variedade de espécies de Asteraceae.....	32
Figura 3 - Exemplos de metabólitos secundários isolados de espécies da família Asteraceae.....	33
Figura 4 - Exemplos de metabólitos secundários isolados de espécies da família Asteraceae.....	34
Figura 5 - Exemplos de metabólitos secundários isolados de espécies da família Asteraceae.....	35
Figura 6 - Distribuição do gênero <i>Chresta</i> pelos domínios vegetais brasileiros. Sua presença está representada em roxo.....	37
Figura 7 - (A) Inflorescências de <i>Chresta pacourinoides</i> (B) Ramos com inflorescências de <i>Chresta pacourinoides</i> Mart. Fonte: Carolina Moriani Siniscalchi, 2016.....	39
Figura 8 - <i>Chresta Pacourinoide</i> . Mart. ex DC., subtribo Chrestinae: A, hábito com inflorescências e folha inferior; B, cabeça única em antítese; C, cabeça em seção longa com acheno maduro; D, superfície de controle; E, floret com corola e aquênico; F, floret em seção longa mostrando estilo e inserção de anteras. (De Baker, 1873)	40
Figura 9 - Estrutura básica dos Flavonoides	41
Figura 10 - Divisão dos Antioxidantes	45
Figura 11 - Reação entre o radical DPPH (violeta) e um antioxidante, obtendo-se a molécula de DPPH neutralizada (laranja) e seus correspondentes espectros de UV / VIS.....	46
Figura 12 - Cromatógrafo Líquido.....	53
Figura 13 - Espectro de RMN ¹ H da fração 19.	64
Figura 14 - Cromatograma do método 1.	66
Figura 15 - Cromatograma do método 2.	67
Figura 16 - Cromatograma do método 3.	68
Figura 17 - Cromatograma do método 4.	69
Figura 18 - Cromatograma do método 5.	70
Figura 19 - Cromatograma geral CLAE preparativo.	72
Figura 20 - Cromatograma de Cp – Fr-14-17 em 280 nm	74

Figura 21 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) de Cp-1	75
Figura 22 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) de Cp-1	75
Figura 23 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO-d_6) de Cp-1.....	76
Figura 24 - Mapa de contorno HMBC (400 e 100 MHz, DMSO-d_6) de Cp-1	76
Figura 25 - Campferol	77
Figura 26 - Espectro de massas modo negativo de Cp-2.....	80
Figura 27 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) de Cp-2.....	81
Figura 28 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) de Cp-2 ...	81
Figura 29 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) de Cp-2 ...	82
Figura 30 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO-d_6) de Cp-2.....	82
Figura 31 - <i>Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO-d_6) de Cp-2 na região entre 180 -93.....</i>	83
Figura 32 - <i>Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO-d_6) de Cp-2 na região entre 84 -32.....</i>	83
Figura 33 - Estrutura da Flavona, 3,3',4',5,7-pentahidroxi-, 3- β -D-glicopiranosídeo (Isoquercetrina).....	84
Figura 34 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) de Cp-3.	86
Figura 35 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) de Cp-3. ...	87
Figura 36 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO-d_6) de Cp-3.....	87
Figura 37 - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO-d_6) de Cp-3..	88
Figura 38 - Mapa de contorno HSQC de Cp-3 (DMSO-d_6 , 400 e 100 MHz).	89
Figura 39 - Expansão do mapa de contorno HSQC de Cp-3 (DMSO-d_6 , 400 e 100 MHz) na região de (135-80 ppm) x (8,0-5,9 ppm).	90
Figura 40 - Mapa de contorno HMBC de Cp-3 (DMSO-d_6 , 400 e 100 MHz).....	90
Figura 41 - Expansão do mapa de contorno HMBC de Cp-3 (DMSO-d_6 , 400 e 100 MHz) na região de (190-80 ppm) x (8,0-3,5 ppm).	91
Figura 42 - Expansão do mapa de contorno HMBC de Cp-3 (DMSO-d_6 , 400 e 100 MHz) na região de (200-70 ppm) x (8,2-6,6 ppm).	91
Figura 43 - Estrutura do Crisoeriol	92
Figura 44 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) de Cp-4	95
Figura 45 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO-d_6) de Cp-4	95
Figura 46 - Mapa de contorno HSQC de Cp-4 (DMSO-d_6 , 400 e 100 MHz).	96
Figura 47 - Mapa de contorno HMBC de Cp-4 (DMSO-d_6 , 400 e 100 MHz).....	96

Figura 48 - Expansão do mapa de contorno HMBC de Cp-4 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 400 e 100 MHz) na região de (190-80 ppm) x (9,4-4,8 ppm).	97
Figura 49 - Estrutura do ácido 3,4-diidroxibenzóico (ácido protocatecuico).....	97
Figura 50 - Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) de Cp-5	99
Figura 51 - Expansão do espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) de Cp-5 .	100
Figura 52 - Espectro de RMN de ¹³ C -APT (100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) de Cp-5.....	101
Figura 53 - Estrutura da Apigenina.....	101
Figura 54 - Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, MeOD) de Cp-6.....	103
Figura 55 - Expansão do espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, MeOD) de Cp-6.....	103
Figura 56 - Espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz, MeOD) de Cp-6	104
Figura 57 - Expansão do espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz, MeOD) de Cp-6	105
Figura 58 - 3-Ometilquercetina.....	105
Figura 59 - Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) de Cp – 7	107
Figura 60 - Expansão do espectro de RMN ¹ H (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) de Cp – 7...	107
Figura 61 - Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) de Cp – 7	108
Figura 62 - Mapa de contorno HMBC (400 e 100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) de Cp-7	109
Figura 63 - Expansão do mapa de contorno HMBC de Cp-7 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 400 e 100 MHz) na região de (190-80 ppm) x (7,5-6,0 ppm).	110
Figura 64 - Expansão do mapa de contorno HMBC de Cp-7 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 400 e 100 MHz) na região de (190-80 ppm) x (7,5-6,0 ppm).	110
Figura 65 - Estrutura da Luteolina	111
Figura 66 - Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) de Cp – 8.....	112
Figura 67 - Expansão do espectro de RMN ¹ H (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) de Cp – 8...	113
Figura 68 - Expansão do espectro de RMN ¹ H (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) de Cp – 8...	113
Figura 69 - Espectro de RMN ¹³ C (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) de Cp – 8.....	114
Figura 70 - Mapa de contorno HMBC de Cp-8 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 400 e 100 MHz).	115
Figura 71 - Expansão do mapa de contorno HMBC de Cp-8 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 400 e 100 MHz) na região de (210-30 ppm) x (7,2-2,2 ppm).	115
Figura 72 - Expansão do mapa de contorno HMBC de Cp-8 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 400 e 100 MHz) na região de (210-30 ppm) x (7,2-2,2 ppm).	116
Figura 73 - Estrutura do Eriodictiol	116
Figura 74 - Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) de Cp – 9.....	119
Figura 75 - Expansão do espectro de RMN ¹ H (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) de Cp – 9...	119

Figura 76 - Espectro de RMN ¹³ C(100 MHz, DMSO-d ₆) de Cp – 9.....	120
Figura 77 - Espectro de RMN ¹³ C(100 MHz, DMSO-d ₆) de Cp – 9.....	120
Figura 78 - Mapa de contorno HSQC de Cp-9 (DMSO-d ₆ , 400 e 100 MHz).	121
Figura 79 - Expansão do mapa de contorno HSQC de Cp-8 (DMSO-d ₆ , 400 e 100 MHz) na região de (130-40 ppm) x (8,0-3,0 ppm).	121
Figura 80 - Mapa de contorno HMBC de Cp-9 (DMSO-d ₆ , 400 e 100 MHz).	122
Figura 81 - Expansão do mapa de contorno HMBC de Cp-9 (DMSO-d ₆ , 400 e 100 MHz) na região de (170-30 ppm) x (8,0-2,5 ppm).	122
Figura 82 - Expansão do mapa de contorno HMBC de Cp-9 (DMSO-d ₆ , 400 e 100 MHz) na região de (170-90 ppm) x (7,8-3,2 ppm).	123
Figura 83 - Espectro de ESI-MS de Cp-9	124
Figura 84 - Espectro de ESI-MS com fragmentações de Cp-9.....	125
Figura 85 - Estrutura do Stricnobilavona	129
Figura 86 - Espectro de MS - ESI- Fração 14-17	131
Figura 87 - Fragmentação de Cp-10	133
Figura 88 - Fragmentação de Cp-11	135
Figura 89 - Fragmentação de Cp-12	137
Figura 90 - Fragmentação de Cp-13	140
Figura 91 - Fragmentação de Cp-14	142
Figura 92 - Fragmentação de Cp-15	144

6. LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros cromatográficos do método desenvolvido	54
Tabela 2 - Parâmetros cromatográficos do método transposto	57
Tabela 3 – Descrição do método cromatográfico 1	66
Tabela 4 - Descrição do método cromatográfico 2	67
Tabela 5 - Descrição do método cromatográfico 3	68
Tabela 6 - Descrição do método cromatográfico 4	69
Tabela 7 - Descrição do método cromatográfico 5	70
Tabela 8 - Descrição do método cromatográfico 6	71
Tabela 9 - Deslocamentos químicos, tipos de sinal e constantes de acoplamento (J) para os átomos de hidrogênio (δ_H) e carbono (δ_C) de Cp-1, verificados nos espectros de RMN de 1H e ^{13}C (400 e 100 MHz, respectivamente, DMSO- d_6), bem como, aqueles apresentados por (MOURA; VILEGA; SANTOS, 2011).....	77
Tabela 10 - Deslocamentos químicos, tipos de sinal e constantes de acoplamento (J) para os átomos de hidrogênio (δ_H) e carbono (δ_C) de Cp-2, verificados nos espectros de RMN de 1H e ^{13}C (400 e 100 MHz, respectivamente, DMSO- d_6), bem como, aqueles apresentados por (PEREIRA et al., 2012).....	85
Tabela 11 - Deslocamentos químicos, tipos de sinal e constantes de acoplamento (J) para os átomos de hidrogênio (δ_H) e carbono (δ_C) de Cp-3, verificados nos espectros de RMN de 1H e ^{13}C (400 e 100 MHz, respectivamente, DMSO- d_6), bem como, aqueles apresentados por (PARK et al., 2007).....	93
Tabela 12 - Deslocamentos químicos, tipos de sinal e constantes de acoplamento (J) para os átomos de hidrogênio (δ_H) e carbono (δ_C) de Cp-4, verificados nos espectros de RMN de 1H e ^{13}C (400 e 100 MHz, respectivamente, DMSO- d_6), bem como, aqueles apresentados por (MOURA; VILEGA; SANTOS, 2011).....	98
Tabela 13 - Deslocamentos químicos, tipos de sinal e constantes de acoplamento (J) para os átomos de hidrogênio (δ_H) e carbono (δ_C) de Cp-5, verificados nos espectros de RMN de 1H e ^{13}C (400 e 100 MHz, respectivamente, DMSO- d_6), bem como, aqueles apresentados por (ALI A. ALWAHSH; KHAIRUDDEAN; KENG CHONG, 2015). ...	102
Tabela 14 - Deslocamentos químicos, tipos de sinal e constantes de acoplamento (J) para os átomos de hidrogênio (δ_H) e carbono (δ_C) de Cp-6, verificados nos espectros	

de RMN de ^1H e ^{13}C (400 e 100 MHz, respectivamente, DMSO- d_6), bem como, aqueles apresentados (WANG et al., 2010)	106
Tabela 15 - Deslocamentos químicos, tipos de sinal e constantes de acoplamento (J) para os átomos de hidrogênio (δ_{H}) e carbono (δ_{C}) de Cp-6, verificados nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (400 e 100 MHz, respectivamente, DMSO- d_6), bem como, aqueles apresentados (PARK et al., 2007).....	111
Tabela 16 - Deslocamentos químicos, tipos de sinal e constantes de acoplamento (J) para os átomos de hidrogênio (δ_{H}) e carbono (δ_{C}) de Cp-8, verificados nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (400 e 100 MHz, respectivamente, DMSO- d_6), bem como, aqueles apresentados (KAI et al., 2016) e (ENCARNACIÓN et al., 1999).....	117
Tabela 17 - Deslocamentos químicos, tipos de sinal e constantes de acoplamento (J) para os átomos de hidrogênio (δ_{H}) e carbono (δ_{C}) de Cp-9, verificados nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (400 e 100 MHz, respectivamente, DMSO- d_6), bem como, aqueles apresentados (LAGE et al., 2013)	127
Tabela 18 - Tabela de concentrações do bioensaio larvicida preliminar	145

7. LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Espécies reativas de oxigênio de interesse biológico.....	42
Quadro 2 - Média do teor de fenólicos totais das amostras em mg EAG/g de extrato por dia (n=3), na concentração de 1 mg/mL.....	146
Quadro 3 - Média da $CE_{50} \pm DP$ das amostras e do AA, analisados pelo método de DPPH em três dias de análise (n=3).	148

8. LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Curva padrão da quantificação de fenólicos totais empregando ácido gálico como substância de referência. $R^2= 0,9964$	146
Gráfico 2 - Teor de fenóis totais nas amostras (n = 9). Dados expressos como média \pm desvio padrão. Os dados foram analisados por ANOVA seguida de Tukey ($p>0,05$).	147
Gráfico 3 - Curva do Ácido Ascórbico, $r= 0,9976$	148
Gráfico 4 - Média geral das $CE_{50} \pm DP$ das amostras de ácido ascorbico (n=9)	149

9. SUMÁRIO

1.	RESUMO	9
2.	ABSTRACT	10
3.	LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	11
4.	LISTA DE ESQUEMAS	12
5.	LISTA DE FIGURAS	13
6.	LISTA DE TABELAS	17
7.	LISTA DE QUADROS	19
8.	LISTA DE GRÁFICOS.....	20
9.	SUMÁRIO	21
1.	INTRODUÇÃO	25
2.	OBJETIVOS.....	29
2.1.	Objetivo Geral	29
2.2.	Objetivos Específicos	29
3.	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	31
3.1.	Considerações sobre a família Asteraceae	31
3.2.	O Gênero <i>Chresta</i>	36
3.3.	<i>Chresta pacourinoides</i>	37
3.4.	Considerações sobre flavonoides.....	41
3.5.	Considerações sobre atividade antioxidante	42
3.5.1.	Radicais livres e atividade antioxidante.....	42
3.6.	Considerações sobre atividade Larvícida	47
3.7.	Considerações sobre cromatografia líquida de alta eficiência	48
4.	Material e Métodos.....	50
4.1.	Material vegetal.....	50
4.2.	Obtenção do extrato etanólico bruto das inflorescências de <i>Chresta pacourinoides</i> Mart.....	50

4.3.Obtenção das fases hexânica e metanólica de <i>Chresta pacourinoides</i> Mart.....	50
4.4.Fracionamento da fase metanólica (FM)	51
4.5.Ressonância Magnética Nuclear	51
4.6.Desenvolvimento de metodologia analítica para análise da fase metanólica.....	52
4.7.Fracionamento da fase metanólica 1 (FM1).	55
4.8.Cromatografia preparativa.....	57
4.9.Espectrometria de massas das frações obtidas da fase metanólica....	58
4.10. Fracionamento da fase hexânica (FH).	58
4.10.1. Cromatografia Líquida de Media Pressão (CLMP)	58
4.10.2. Cromatografia gasosa acoplado a espectrometria de massas (CG-EM) da fase hexânica	59
4.11. Teste larvicida.....	59
4.12. Determinação do teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante.....	60
4.12.1. Determinação do teor fenólicos.....	60
4.12.2. Atividade antioxidante <i>in vitro</i> : Método de sequestro de radicais (DPPH)	61
4.13. Análise estatística	62
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64
5.1.Desenvolvimento de metodologia analítica por CLAE	64
5.2.Transposição de método (CLAE) de escala analítica para preparativa.	71
5.3.Estudo Fitoquímico	73
5.3.1. Determinação estrutural de Cp-1	73
5.3.2. Determinação estrutural de Cp-2	78
5.3.3. Determinação estrutural de Cp-3	85

5.3.4.	Determinação estrutural de Cp-4	94
5.3.5.	Determinação estrutural de Cp-5	99
5.3.6.	Determinação estrutural de Cp-6	102
5.3.7.	Determinação estrutural de Cp-7	106
5.3.8.	Determinação estrutural de Cp-8	112
5.3.9.	Determinação estrutural de Cp-9	118
5.4.	Identificação de compostos por CG-EM	129
5.5.	Identificação por Espectrometria de Massas de Cp-14-17	130
5.5.1.	Identificação de Cp-10	132
5.5.2.	Identificação de Cp-11	134
5.5.3.	Identificação de Cp-12	136
5.5.4.	Identificação de Cp-13	138
5.5.5.	Identificação de Cp-14	141
5.5.6.	Identificação de Cp-15	143
5.6.	Teste larvicida	145
5.7.	Determinação do Fenólicos Totais	146
5.8.	Determinação da atividade antioxidante in vitro: método DPPH	148
6.	CONCLUSÕES	151
7.	REFERÊNCIAS.....	153

Introdução

1. INTRODUÇÃO

As plantas possuem uma característica de produzir dezenas de milhares de metabólitos secundários altamente complexos para ajudar a sua sobrevivência no ambiente a qual está inserida, possibilitando a adequação da planta a este local, (OLIVEIRA et al., 2017) protegendo, por exemplo, contra predadores. No entanto, o homem explorou esses compostos naturais como fonte de agentes medicinais, venenos, e poções através dos tempos (ANISZEWSKI, 2015).

O relato sobre o uso de plantas medicinais utilizados com fins terapêuticos tem seus primeiros registros no ano de 2500 a.C. na China (OLIVEIRA; LUCENA, 2015). Assim como a China, outras civilizações, como a indiana, egípcia e grega, possuem relatos sobre o uso de plantas medicinais no tratamento de várias doenças (ALVES, 2013).

Os metabólitos secundários produzidos pelas plantas são parte fundamental na área da farmacologia, isso devido aos efeitos biológicos, sendo alguns desses com atividade antioxidante (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) afirma que apesar dos avanços atingidos nos últimos 30 anos no que tange às políticas públicas, uma grande parcela da população carece de acesso regular a serviços de saúde pública convencionais e medicamentos essenciais principalmente em países considerados de menor desenvolvimento (SANTOS et al., 2011). O uso de plantas medicinais e seus derivados surgem como alternativa ao tratamento convencional, prática que as agências internacionais têm enviado esforços para garantir que seja segura e eficaz (CARVALHO et al., 2013).

O Brasil é reconhecido por sua diversidade vegetal, esse detém um dos maiores níveis de biodiversidade do mundo e uma enorme diversidade cultural (ARAÚJO; CASTRO; ALBUQUERQUE, 2007).

Em nosso país, a formação de uma medicina popular, a qual emprega o uso de plantas tem inspirações da cultura africana, indígena e europeia. Os índios faziam uso de várias espécies vegetais com fins terapêuticos e com a vinda dos europeus aconteceu essa exportação do conhecimento, que foi melhorado e transmitido para as demais gerações chegando até os dias atuais (LORENZI; MATOS, 2008).

Estudos sobre a utilização tradicional de plantas na região Nordeste do Brasil vem-se ampliando progressivamente durante os últimos anos (AGRA et al., 2007), com isso, faz-se necessário examinar essa vegetação, fundamentando-se na etnofarmacologia e etnobotânica (AGRA; FREITAS; BARBOSA-FILHO, 2007).

Propriedades terapêuticas são relatadas pela população e parte delas é confirmada pela comunidade científica. Essas propriedades favorecem ao desenvolvimento de diversos medicamentos, quer sejam obtidos por síntese erigindo do metabólito protótipo ou através de isolamento, algumas vezes biomonitorado (ALMEIDA et al., 2012).

A família Asteraceae é a maior família de plantas vasculares do mundo e se distribui em todos os continentes exceto Antártica. No Brasil, ela representa uma família de grande importância principalmente em relação a vegetação de campos rupestres, considerada por alguns botânicos como a mais diversa, apresentando vários gêneros diferentes e endêmicos, podendo ser citados *Acritopappus*, *Agrianthus*, *Catolesia*, *Chomolaena*, *Lasiolaena*, *Lychnophora* e *Semiria* (QUEIROZ; RAPINI; GIULIETTI, 2006). Importantes classes de metabolitos secundários encontrados nessa família são terpenos (RIOS et al., 2013) e polifenóis como: flavonoides (SILVA et al., 2015) e cumarinas (MEDEIROS-NEVES et al., 2015) entre outros.

Uma atividade importante desses polifenóis é a atividade antioxidante (GILABERTE; GONZÁLEZ, 2010), a qual se caracteriza pelo fato dos antioxidantes serem substâncias nas quais quando presentes em concentrações ótimas em relação aos substratos oxidantes, são capazes de diminuir sua oxidação, reagindo com os radicais livres obstruindo ou diminuindo o estresse oxidativo (AQUINO et al., 2017).

Entre os inúmeros gêneros pertencentes a família Asteraceae está o gênero *Chresta*, que em sua maioria apresenta espécies endêmicas do Brasil distribuídas em domínios vegetais como cerrado (campos rupestres) e Mata Atlântica (MORIANI SINISCALCHI; FRANCIS PATRICE LOEUILLE; PIRANI, 2016), porém, no que se diz respeito aos aspectos fitoquímicos e farmacológicos a literatura carece de informações (SCHINOR et al., 2007b; GOMES, 2011), tornando-se necessários estudos que promovam o aumento do conhecimento nessas áreas.

A espécie *Chresta pacourinoides* que pode ser encontrada na Paraíba apresenta poucos estudos na literatura, onde seu primeiro trabalho foi feito

anteriormente pela equipe do laboratório multiusuário de caracterização e análise da UFPB (LMCA) (GOMES, 2011). Nesse foram isolados três flavonoides e algumas outras substâncias da fase acetato. Assim, afim de se obter maiores informações sobre a composição química do extrato de *C. pacourinoides* através do estudo das outras fases (metanólica e hexânica), faz-se necessária a continuação desse estudo lançando mão de técnicas espectroscópicas e espectrométricas como cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massas, com objetivo de contribuir para o conhecimento da constituição química e do potencial terapêutico dessa espécie.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Realizar o estudo fitoquímico da família Asteraceae através de isolamento de compostos e avaliar o potencial da atividade antioxidante do gênero *Chresta*.

2.2. Objetivos Específicos

- Analisar fitoquimicamente as inflorescências da espécie *Chresta pacourinoides* Mart., através de métodos de extração, isolamento e purificação dos constituintes químicos, ampliando assim, o estudo do gênero;
- Desenvolver um método para isolar constituintes químicos dessa espécie através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector ultravioleta com arranjo de diodos– CLAE / DAD, e a sua posterior transposição para escala preparativa;
- Identificar e/ou elucidar a estrutura dos constituintes químicos desta espécie, através de técnicas de Infravermelho (IV), Ressonância Magnética Nuclear (RMN) (uni e bidimensionais), Cromatografia Gasosa acoplado a espectrometria de Massas e Espectrometria de Massas;
- Avaliar a atividade antioxidante e de fenólicos totais de extratos, fases e substâncias isoladas;
- Disponibilizar extrato, fases e substâncias isoladas para testes biológicos

Fundamentação Teórica

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. Considerações sobre a família Asteraceae

Asteraceae, também chamada de compositae (FORZZA et al., 2018), é a maior das famílias entre as Eucotiledôneas (PANERO; FUNK, 2008), ela possui 43 tribos com cerca de 1700 gêneros e 24.000 espécies e possui distribuição cosmopolita Figura 1 (ALVES; ROQUE, 2016), englobando cerca de 10% da flora mundial (FRIIS et al., 2005). Seus representantes encontram-se espalhados por todos os continentes, com exceção da Antártica, porém sua presença é mais percebida nas regiões temperadas e semiáridas dos trópicos e subtropicais. (ROQUE; BAUTISTA, 2008). É considerada uma das famílias botânicas mais bem adaptada, não apenas pela diversidade de formas de vida, as quais incluem ervas, subarbustos, árvores e epífitas (MAGENTA, 2006), mas também pelos diferentes métodos de propagação (CRONQUIST, 1981) e presença de metabólitos secundários bioativos (FRIIS et al., 2005).

No Brasil, a família é representada por 289 gêneros e 2098 espécies, sendo 1329 delas endêmicas distribuídas em diferentes formações vegetacionais do país (NAKAJIMA et al., 2015; ZAPPI et al., 2015). Na Paraíba são encontradas 74 espécies pertencentes a 55 gêneros (NAKAJIMA et al., 2015).

Botanicamente, a família Asteraceae possui características morfológicas que suportam seu monofiletismo, entre elas, a presença de um capítulo altamente modificado, ovário bicarpelar ínfero que se desenvolve em uma cipsela com óvulo basal e reto e anteras sinânteras (JANSEN; PALMER, 1987).

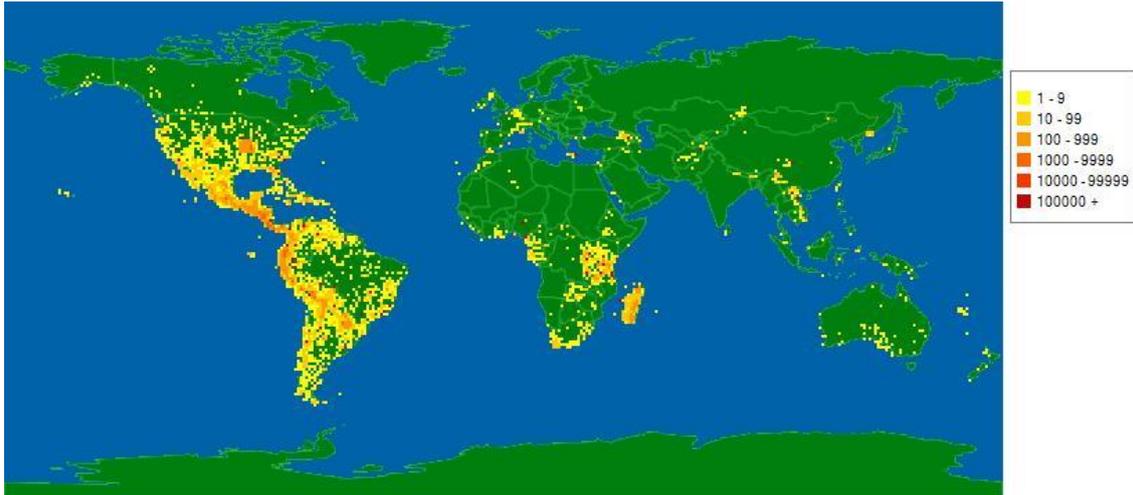


Figura 1 - Mapa de distribuição da Família Asteraceae.
 Fonte: <http://www.tropicos.org/Name/50307371?tab=maps>

A família Asteraceae demonstra uma grande importância econômica, essa é utilizada pela população como plantas ornamentais (dálías, margaridas, crisântemo), na culinária (girassol, alcachofra, almeirão, escarola e a alface) e na medicina (carqueja, camomila, calêndula e guaco) (SOUZA; LORENZI, 2005) ver Figura 2.



Figura 2 - Variedade de espécies de Asteraceae.
 Fonte: (BEN HASSINE et al., 2016)

Plantas da família têm sido estudadas de forma ampla em relação a sua composição química e biológica, algumas dessas têm propiciado o desenvolvimento de novos fármacos, inseticidas, entre outros (VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005). Quimicamente a família Asteraceae distingue-se por produzir, monoterpenóides, diterpenoides, triterpenoides, sesquiterpenoide, lactonas sesquiterpênicas (ver Figura 3) (OTUSANYA; ILORI, 2012; MIRANDA et al., 2015), poliacetilenos (SILVA et al., 2015), flavonoides (IGUAL et al., 2013), , lignoides, carotenoides (ZANON et al., 2008), ácidos fenólicos, como observado na Figura 4 e alcaloides pirrolizídínico (MROCZEK et al., 2004), benzofuranos, benzopiranos, cumarinas como mostra a Figura 5 e taninos (ABEYSIRI et al., 2013).

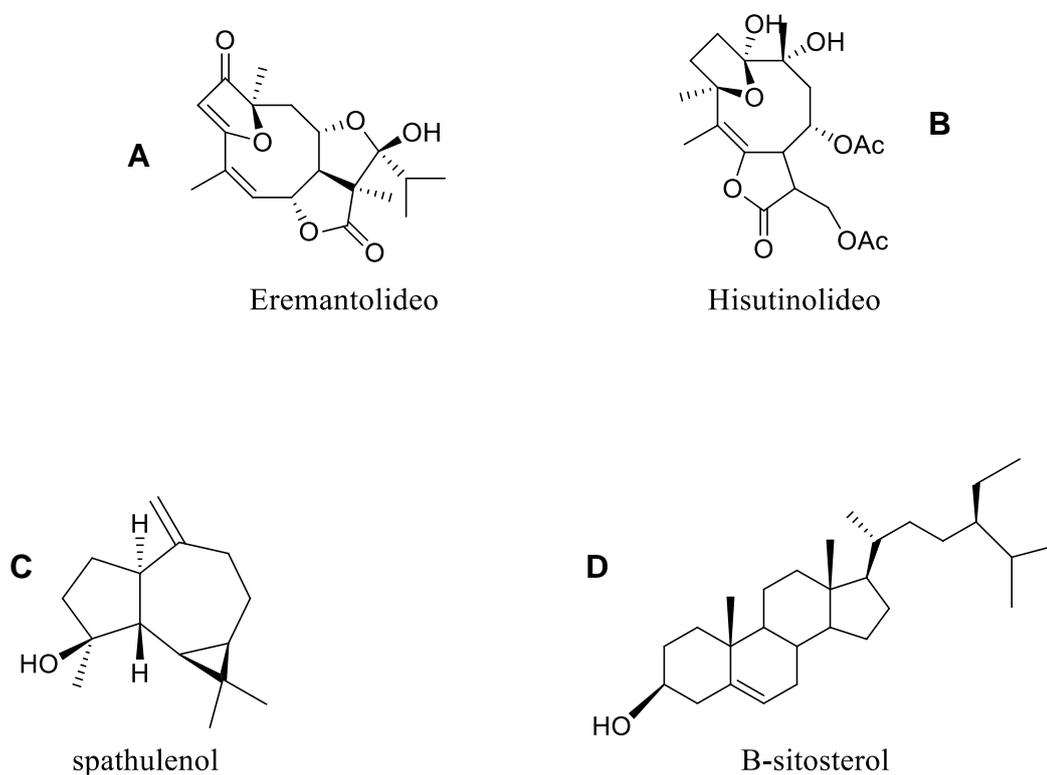


Figura 3 - Exemplos de metabólitos secundários isolados de espécies da família Asteraceae
 Fonte: A-B (CROTTI et al., 2005; DA COSTA et al., 2015), C-D ((RIOS et al., 2013)

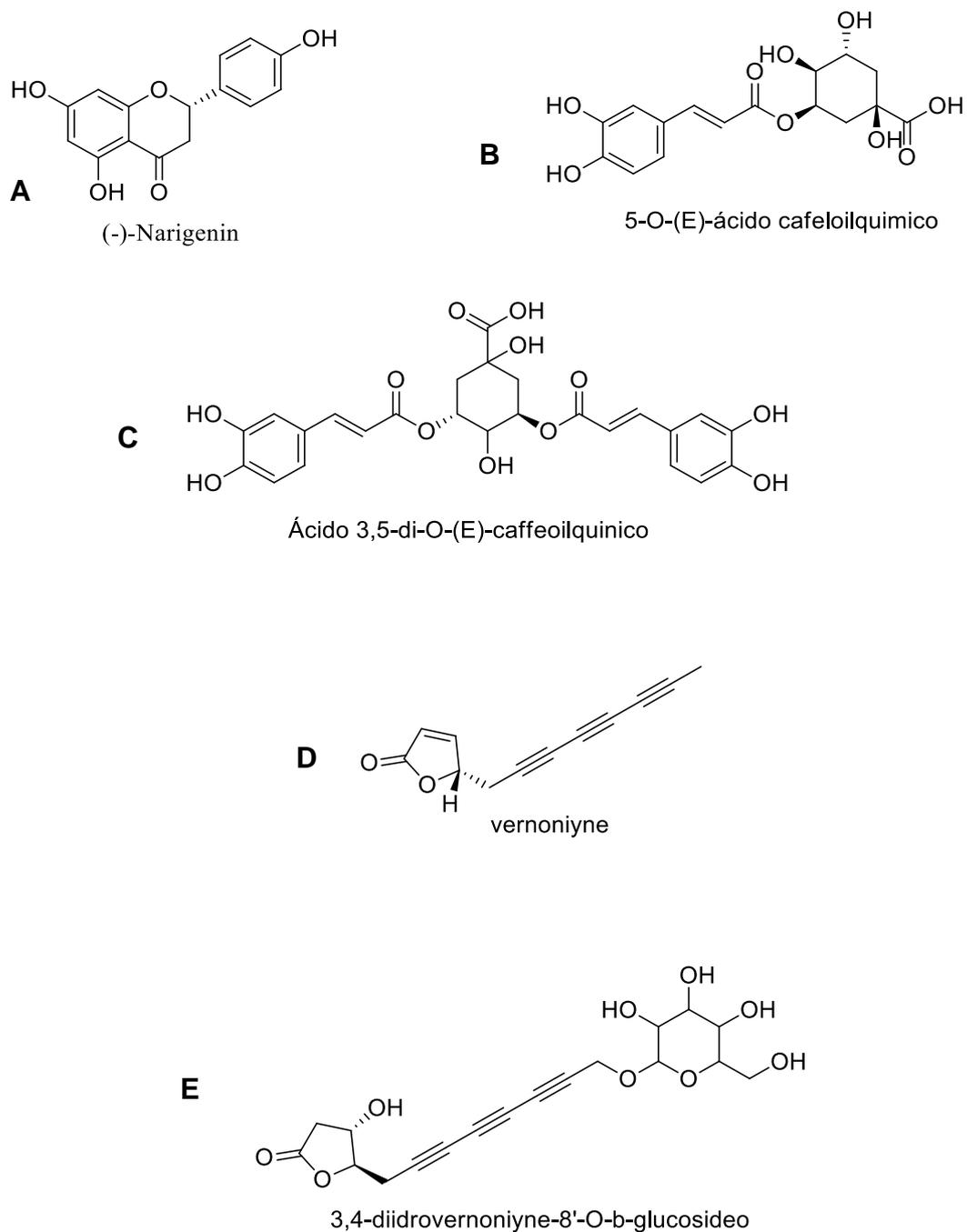


Figura 4 - Exemplos de metabólitos secundários isolados de espécies da família Asteraceae
Fonte: A,B e C (SILVA et al., 2013), D-E (POLLO et al., 2013).

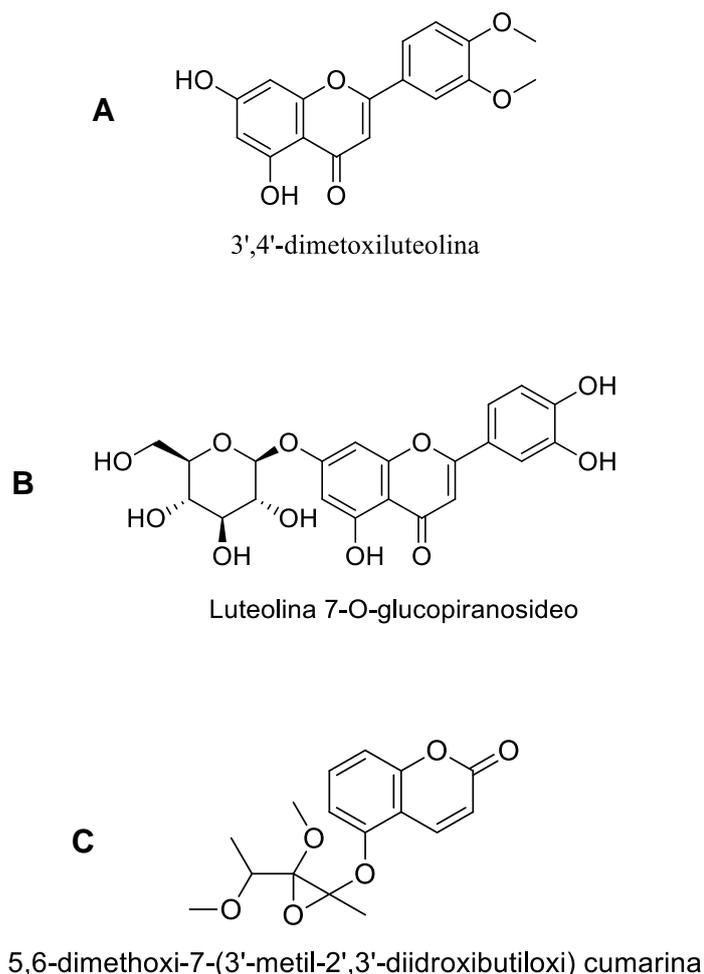


Figura 5 - Exemplos de metabólitos secundários isolados de espécies da família Asteraceae
 Fonte: A-B (VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005), C - (MEDEIROS-NEVES et al., 2015).

De acordo com (BAYER; STARR, 1998) existem 17 tribos para essa família, as quais podem ser divididas dentro de três subfamílias: Asteroideae (tribos: Athemideae, Astereae, Calenduleae, Eupatorieae, Gnaphalieae, Helenieae, Heliantheae, Inuleae, Plucheeae e Senecioneae); Barnadesioideae (tribo: Bernadesieae) e Cichorioideae (tribos: Arctoteae, Cardueae, Lactuceae, Liabeae, Mutisieae e Vernonieae). Mas para (KADEREIT; JEFFREY, 2007), a família Asteraceae está dividida em cinco subfamílias, tais como: Asteroideae, Barnadesioideae, Carduoideae, Cichorioideae e Mutisioideae, além da família se distribuir em 24 tribos.

3.2. O Gênero *Chresta*

Chresta Velloso ex Candolle é um gênero pouco estudado na literatura e relativamente pequeno dentro da tribo Vernonieae, composto por 15 espécies, das quais 14 são endêmicas do Brasil (SINISCALCHI, CAROLINA M., 2015; ALMEIDA; MONTEIRO; MELO, 2017; SINISCALCHI et al., 2017). No geral, as espécies de *Chresta* podem ser encontradas, nesse país, principalmente nos domínios da Caatinga e do Cerrado, com uma única espécie, *Chresta filicifolia* Siniscalchi e Loeuille, sendo endêmica do domínio da Mata Atlântica Figura 6. Dentro desses domínios, eles ocupam uma grande variedade de ambientes, desde o cerrado, campos rupestres, a afloramentos de rocha quartzítica ou granítica (MORIANI SINISCALCHI; FRANCIS PATRICE LOEUILLE; PIRANI, 2016).

Dentro desse gênero, algumas espécies apresentaram atividade antibacteriana e antiprotozoária (ROBINSON, 1999; SCHINOR et al., 2006, 2007b, 2007a). No Nordeste brasileiro, as espécies de *Chresta* são reconhecidas pela população como ervas tradicionais utilizadas no tratamento de doenças gástricas e outras desordens, apresentando, portanto, relevância etnofarmacológica (RODRIGUES E SILVA et al., 2012), justificando assim, seu estudo fitoquímico.

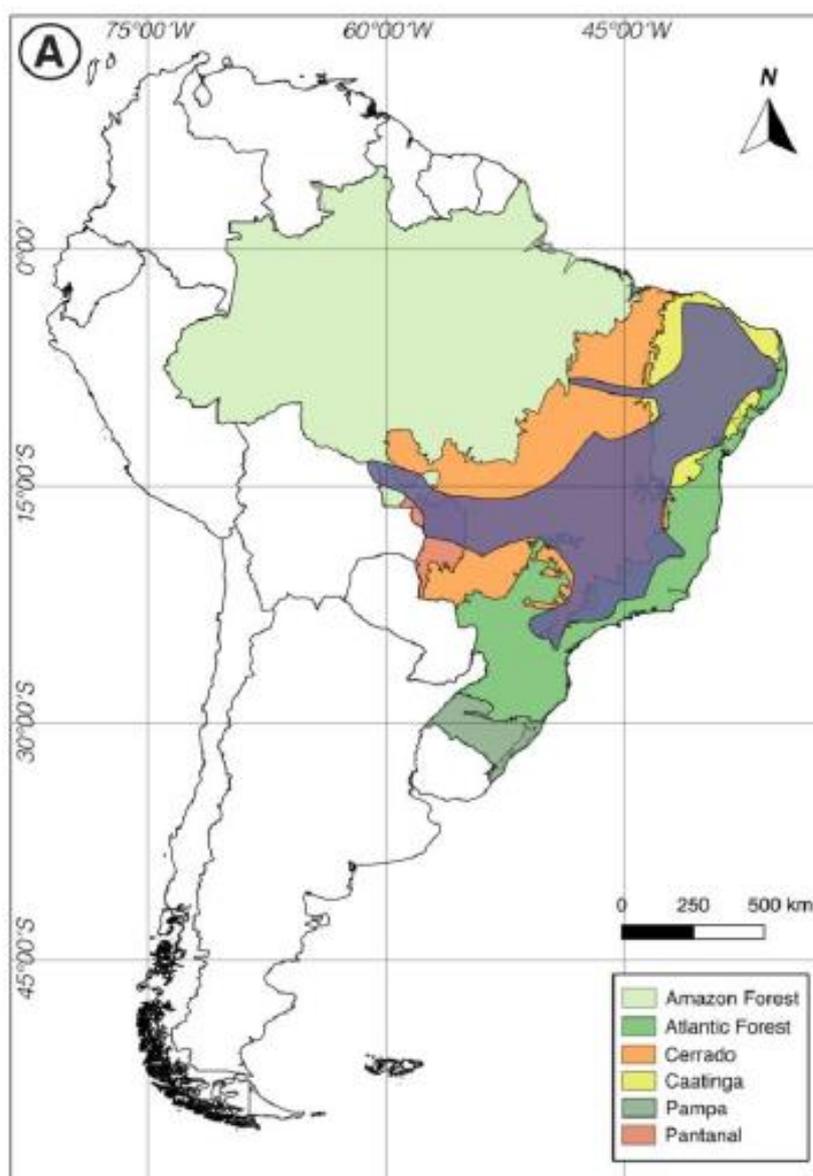


Figura 6 - Distribuição do gênero *Chresta* pelos domínios vegetais brasileiros. Sua presença está representada em roxo.

3.3. *Chresta pacourinoides*

Chresta pacourinoides também conhecida como *Pithecoseris pacourinoides*, se caracteriza botanicamente, por ser uma erva bianual 40-80 cm altura. Folhas alternas lamina 3,5-4 x 2-2,5 cm, oval, ápice agudo, margem pinatífidas, base atenuada, membranácea, discolor, face adaxial seríceo, face abaxial pubescente; pecíolo 8-10 mm. Sinflorescencia em glomérulos; capitlulus homógamos- discoides-pidicelados, receptáculos paleáceo, pelea linear, cerca de (ca.) 10 mm, glabra, involúcro campanulado, 2-seriado, 1-1,5 x 1,5-2 cm; brácteas involucrais externas lineares, 8x1

mm; as internas lanceoladas 8x1 mm, ápice agudo, margem interna, base truncada, glabra. Flores 20-25, tubulosas, monoclina, lilás, ca.6mm, estilete ca.14 mm, ramos agudos, papilosos, anteras ca.2 mm, apêndice do conectivo agudo, base truncada. Cipsela ca.9 mm, cilíndrica, 5-costada, pilosa, pápus paleáceo, ca.6 mm, estramineo (FRANÇA; MELO, 2014).

Essa espécie (Figura 7) pode ser encontrada na Paraíba, Ceará, Pernambuco e Rio Grande do Norte. Ela é encontrada amplamente na Caatinga, geralmente sobre afloramentos rochosos graníticos ou em seus arredores, crescendo também no solo. Devido a essa variação de local de crescimento, pode apresentar grandes variações em tamanho, com indivíduos adultos e em floração sendo encontrados desde ca. 30 cm altura, até ca. 2 m altura Apresenta sincéfalos com crescimento indeterminado, com numerosos capítulos completamente unidos (SINISCALCHI, CAROLINA M., 2015). *Pithecoseris* (Figura 8) se torna mais notável pela sua maturação de inflorescência fortemente acropetal, um tipo de maturação altamente anômala nas Asteraceae (ROBINSON, 1999).

Embora seja bem descrita botanicamente, os estudos fitoquímicos e farmacológicos são praticamente inexistentes, encontrando-se apenas um trabalho realizado anteriormente (GOMES, 2011) por essa mesma equipe, bem como uma avaliação preliminar de sua atividade fotoprotetora (TERTO; GOMES, 2017).

No trabalho anterior foram isolados da fase acetato dois esteroides sendo esses, o sitosterol-3-O- β -D-glicopiranosídeo e Estigmasterol-3-O- β -D-glicopiranosídeo. Também foram isolados três flavonoides sendo eles: 5,7,4'-trihidroxiflavona (apigenina), 3-metoxi-5,7,3',4'-tetrahidroxiflavona (3-O-metilquercetina) e Quercetina 3-O- α -L-raminosídeo, todos relatados pela primeira vez no gênero *Chresta*. Com relação aos estudos farmacológicos foram realizados testes de toxicidade frente a *Artemia salina* com os extratos e fases de *C. pacourinoides*, onde foi observado que o extrato etanólico (inflorescências) e as fase hexânica e diclorometano (inflorescências) apresentaram os melhores resultados. Além disso, também foi feito um teste de citotoxicidade frente à células leucêmicas da linhagem k562 demonstrando que a 3-O-metilquercetina apresentou excelente atividade antitumoral *in vitro* de maneira concentração-dependente.

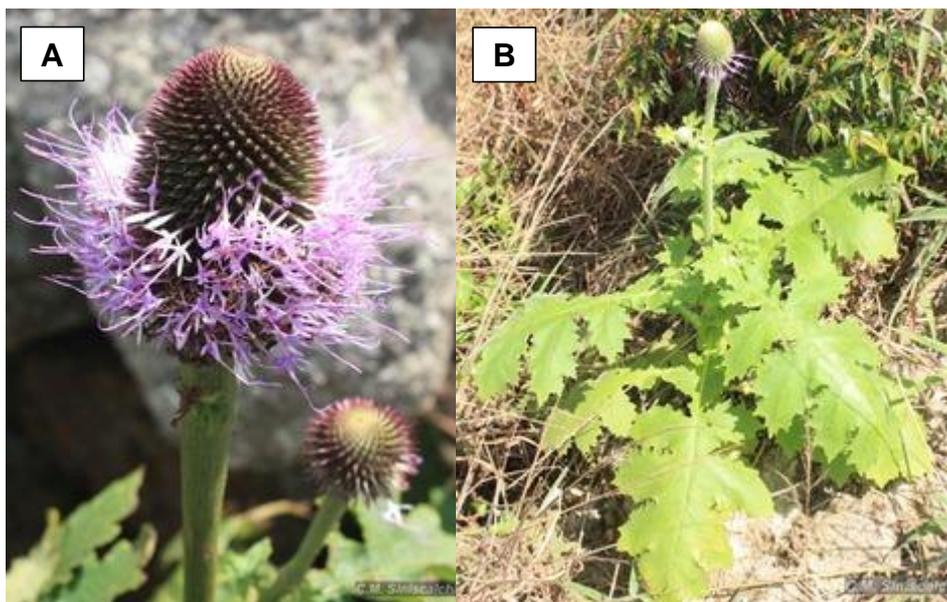


Figura 7 - (A) Inflorescências de *Chresta pacourinoides* (B) Ramos com inflorescências de *Chresta pacourinoides* Mart. Fonte: Carolina Moriani Siniscalchi, 2016.

Dessa forma, observou-se a necessidade de continuar os trabalhos fitoquímicos no intuito de contribuir para ampliação do conhecimento tanto do gênero quanto da espécie de *Chresta pacourinoides*.



Figura 8 - Chresta Pacourinoide. Mart. ex DC., subtribo Chrestinae: A, hábito com inflorescências e folha inferior; B, cabeça única em antítese; C, cabeça em seção longa com acheno maduro; D, superfície de controle; E, floret com corola e aquênico; F, floret em seção longa mostrando estilo e inserção de anteras. (De Baker, 1873)

Fonte (ROBINSON, 1999)

3.4. Considerações sobre flavonoides

A designação flavonoide vem da palavra latina "*Flavus*", que significa amarelo, no entanto, são metabólitos secundários do vegetal e também encontrados em outras cores como azul, vermelho e roxo (WINKEL-SHIRLEY, 2001). Esses são responsáveis pela coloração das plantas e flores, podem ser capazes de estar presentes em outras partes das plantas (BOAS et al., 2017).

Estes compostos desempenham um papel essencial para as plantas, pois tem como função de protetor contra agente oxidantes como os raios ultravioletas (MARTÍNEZ et al., 2002), a poluição do meio ambiente, substâncias químicas presentes no material, além de agir como agente antimicrobiano e terapêutico, como arteriosclerose e câncer (CORDEIRO, 2013).

Em relação a origem, os flavonoides são formados a partir dos aminoácidos fenilalanina e tirosina e também de unidades de acetato (GROTEWOLD, 2008). A fenilalanina e a tirosina preconizam ao ácido cinâmico e o ácido *parahidroxidocinâmico* o qual se condensa com a unidade de acetato dando origem a estrutura cinamol dos flavonoides. (HARBORNE; MABRY, 1982a). Em seguida são formados os derivados glicosilados e sulfatados (MARTÍNEZ et al., 2002).

Os flavonoides ocorrem em uma grande variedade de formas estruturais. Todos contêm 15 átomos de carbono arranjados em três anéis (C6-C3-C6) Figura 9, que são denominados A, B e C (RODRIGUES DA SILVA et al., 2015). Como consequência da ligação de dois grupos fenila a uma cadeia de três carbonos, isto é, derivados difenilpropânicos (MOREIRA et al., 2003).

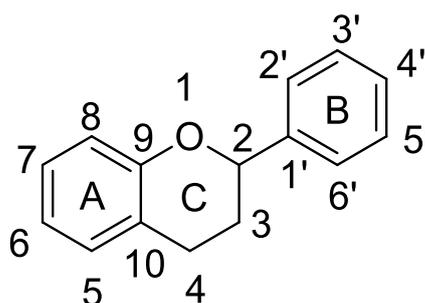


Figura 9 - Estrutura básica dos Flavonoides

3.5. Considerações sobre atividade antioxidante

3.5.1. Radicais livres e atividade antioxidante.

Os radicais livres (RL) são um grupo de substâncias químicas no qual seu orbital mais externo tem um ou mais elétrons não pareados, sua estabilidade é reduzida, com meia vida curta e quimicamente muito reativos. (DEVASAGAYAM et al., 2004). No Quadro 1 - Espécies reativas de oxigênio de interesse biológico podemos observar algumas espécies reativas de oxigênio (EROs): radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$); radical hidroxila ($\cdot OH$); radical peroxila ($ROO\cdot$), e como são instáveis.

Quadro 1 - Espécies reativas de oxigênio de interesse biológico

ESPÉCIE REATIVAS	SÍMBOLO	MEIA-VIDA (EM SEG)	Reatividade
Superóxido	$O_2^{\cdot-}$	10^{-6}	Gerado na mitocôndria, em sistema cardiovascular e outros.
Radical Hidroxila	$\cdot OH$	10^{-9}	Formado em no corpo pelo amplo número de reações, formando radicais potentes como $\cdot OH$.
Peróxido de Hidrogênio	H_2O_2	Estável	Altamente reativo, gerado durante sobrecarga de feee e situações semelhantes em nosso corpo.
Radical peroxila	$ROO\cdot$	Segundo	Reativo e formado de lipídios, proteínas, DNA etc., durante o dano oxidativo.
Hidroperóxido orgânico	$ROOH$	Estável	Reage com íons metálicos formando espécies reativas.
Oxigênio Singlete	1O_2	10^{-5}	Altamente reativo formado por fotosensibilidade e reações químicas.
Ozônio	O_3	Segundos	Presente como poluente atmosférico, pode reagir com várias moléculas, produzindo 1O_2 .

Fonte: adaptado DEVASAGAYAM et al., 2004.

Essas EROS são formadas nas células e realizam papéis importantes no organismo, operando na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular e sinalização intercelular, e na síntese de compostos biologicamente importantes (PIETTA, 2000; SOUSA et al., 2007).

(VALKO et al., 2007) definiu por estresse oxidativo a produção sem controle de radicais livres ou a deficiência de defesa. O estresse oxidativo está envolvido no aumento de várias doenças, entre elas o câncer (LOBO et al., 2010) (LOBO et al., 2010), aterosclerose (MAXWELL; LIP, 2003), aterosclerose, diabetes, doença de Alzheimer, doença de Parkinson (AHMADINEJAD et al., 2017), glaucoma e a degeneração macular relacionada a idade (EVANS; LAWRENSON, 2017).

Compostos que possuem atividades antioxidantes tem tomado lugar de destaque pelas características funcionais que protegem o organismo humano contra estresses oxidativos e várias doenças crônicas degenerativas (ANDRADE MATTIETTO; SANTOS LOPES; CASTLE DE MEN, 2010).

A ação descontrolada de radicais livres no organismo é debelado por antioxidantes, sendo estes definidos como substâncias que presentes em concentrações baixas, relacionadas ao substrato oxidável, desaceleram significativamente ou inibem a oxidação do substrato. Os radicais formados decorrentes de antioxidantes não são reativos para propagar a reação em cadeia, sendo neutralizados por reação com outro radical, formando produtos estáveis ou podem ser reciclados por outro antioxidante (ATOUI, 2005; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Antioxidantes podem ser divididos em dois grandes grupos: enzimáticos e não enzimáticos (Figura 10). Alguns deles são produzidos de forma endógena: enzimas, moléculas de baixo peso molecular e cofatores enzimáticos, outros são extraídos a partir de fontes alimentares (BUNACIU et al., 2016). Os antioxidantes encontrados na alimentação são distribuídos nas mais diversas classes (LIU, 2004), dentre eles os polifenóis, sendo a maior classe os ácidos fenólicos e os flavonoides.

Podemos encontrar diversos métodos para a avaliação da atividade antioxidante *in vitro* em extratos ou substâncias isoladas, estes apresentam diversidade: no grau de complexidade; sensibilidade, mecanismos e espécies reativas envolvidas. Conforme a reação envolvida, os métodos químicos para determinação

da atividade antioxidante estão divididos em dois grupos principais: os que envolvem transferência de elétrons, como do ensaio da capacidade sequestradora do radical livre 2,2-difenil--picril-hidrazila (DPPH) e os que envolvem transferência de átomos de hidrogênio, como o ensaio do sequestro do radical peroxil, ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) (HUANG; OU; PRIOR, 2005).

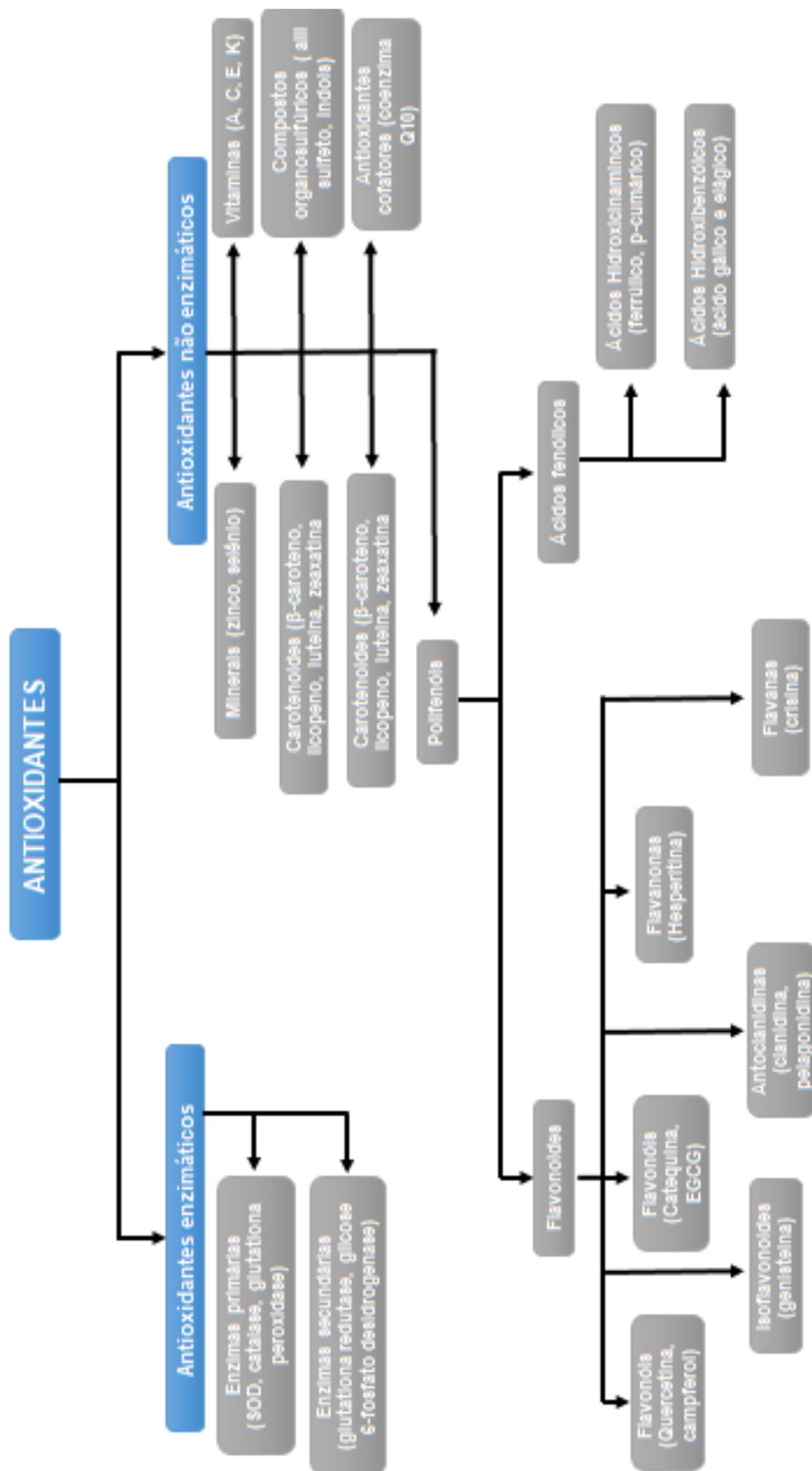


Figura 10 - Divisão dos Antioxidantes
 Fonte:Adaptado (BUNACIU et al., 2016).

Considerado uma técnica simples e de curta execução, o ensaio do DPPH é ensaio experimental que se adapta de modo simples para diferentes condições de análise (WOLLINGER et al., 2016), foi desenvolvido pela primeira vez por (BLOIS, 1958) e baseia-se na medida da capacidade dos antioxidantes em reduzir o radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH).

O principal mecanismo do DPPH é a reação de transferência de elétrons, sendo a abstração do átomo de hidrogênio uma reação de via marginal (HUANG; OU; PRIOR, 2005). A molécula de 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) é identificada como um radical livre estável em virtude da deslocalização de um elétron desemparelhado pela molécula, conferindo a esta uma cor violeta escura.

O DPPH é solúvel em etanol e em metanol e sua absorção máxima é seu comprimento de onda de 515 nm (WOLLINGER et al., 2016). Na presença de um antioxidante, o elétron desemparelhado torna-se emparelhado onde há uma diminuição da força de absorção, então, verifica-se a mudança de cor de violeta para amarelo (Figura 11), (WOLLINGER et al., 2016), esta mudança de cor ocorre em virtude da variação de absorbância a qual pode ser usada para determinar a atividade antioxidante dos compostos (BLOIS, 1958).

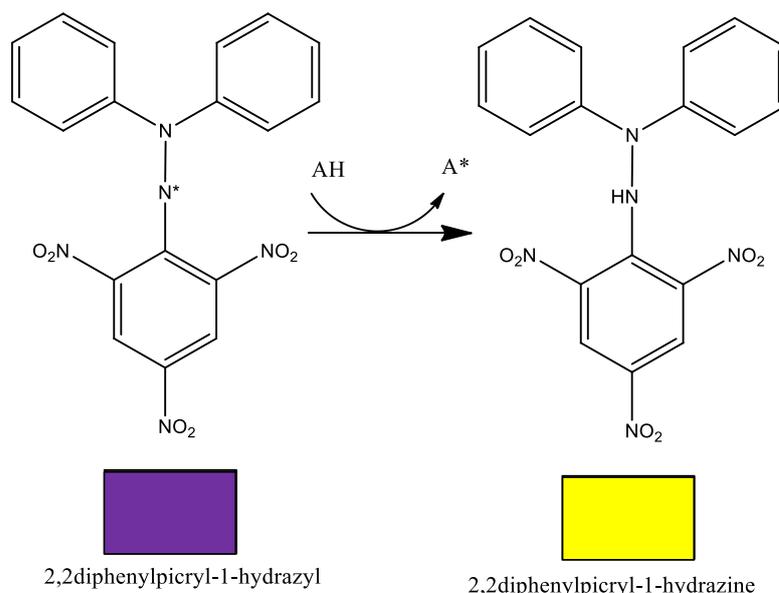


Figura 11 - Reação entre o radical DPPH (violeta) e um antioxidante, obtendo-se a molécula de DPPH neutralizada (laranja) e seus correspondentes espectros de UV / VIS.

Fonte: OMICS International.

3.6. Considerações sobre atividade larvicida

A dengue é caracterizada por ser uma doença sazonal, concentrando-se em um mesmo período, todos os anos. No Brasil, o período sazonal relacionado à essa doença coincide com o verão, já que durante essa época do ano as chuvas são mais frequentes e as temperaturas se elevam. Em torno de 70% dos casos de dengue no país são registrados entre Janeiro e Maio, entretanto, em estados no Norte e Nordeste, que apresentam o início do período chuvoso próximo de Março e duram até Julho e Agosto, são registrados casos durante um período maior. Porém, diante das condições climáticas do país, a proliferação do mosquito se torna favorável durante todo o ano (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

A doença é considerada uma das maiores preocupações em saúde pública ao redor do mundo, e já foi endêmica em 112 países (PINHEIRO; CORBER, 1997). A dengue é incidente em países tropicais e subtropicais, onde latitudes e longitudes, bem como as condições geográficas gerais do local favorecem o desenvolvimento e a proliferação do mosquito vetor (GUBLER, 2001).

Os sintomas causados pelas infecções pelo vírus da dengue, na sua forma clássica (sintomática ou assintomática) são caracterizados por febre alta, dores de cabeça, dor atrás dos olhos, dores musculares e articulares intensas, além de manchas na pele. A forma hemorrágica é mais severa, tornando possível a ocorrência de manifestações hemorrágicas, hepatomegalia, insuficiência cardíaca e ocasionalmente choque, podendo levar à morte (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

O mosquito da espécie *Aedes aegypti* é o vetor da doença e ele apresenta desenvolvimento por metamorfose completa, sendo o seu ciclo de vida holometabólico, possuindo quatro fases: ovo, larva (1^o a 4^o instar), pupa e indivíduo adulto (dimorfismo sexual) (SILVA, 2012).

Assim, estudos que busquem achar substâncias que possam atuar na prevenção da proliferação e desenvolvimento do mosquito vem ganhando espaço, onde as plantas podem se apresentar como interessante alternativa nesse sentido.

3.7. Considerações sobre cromatografia líquida de alta eficiência

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE ou *HPLC – High Performance Liquid Chromatography*) é uma técnica de separação que, nas últimas três décadas, tornou-se um dos métodos analíticos mais utilizados para fins qualitativos e quantitativos (TONHI et al., 2002). Essa crescente foi graças as melhorias realizadas como computadores para o monitoramento dos parâmetros experimentais, bem como o uso de fases estacionárias eficazes e bombas para líquidos de alta pressão (YARIWAKE et al., 2005).

O crescente uso da CLAE está correlacionado à sua adaptabilidade para determinações quantitativas eficientemente, com condições de separar espécies não voláteis e termicamente instáveis, com destaque para a indústria farmacêutica, bem como as suas aplicações em determinações ambientais e diversos campos da ciência, como o da medicina. Calcula-se que mais de 90% dos laboratórios de análise no mundo utilizam pelo menos um método que aplica a modalidade de CLAE em fase reversa (FR) (TONHI et al., 2002).

Segundo (MALDANER; JARDIM, 2009) nos últimos anos foram desenvolvidos vários detectores espectrofotométricos, além daqueles acoplados com o espectrômetro de massas, possibilitando a detecção da maioria dos compostos e análise de traços em amostras complexas, como sangue, urina, solo, alimentos, petróleo, etc.

Sistemas que usam a CLAE-FR fundamentam-se em uma fase estacionária de menor polaridade e uma fase móvel de maior polaridade, enquanto a fase normal tem as polaridades invertidas. Dentre as vantagens de cada fase podemos elencar o uso de fases móveis menos tóxicas e de menor custo, como metanol e água; fases estacionárias estáveis de muitos tipos diferentes; rápido equilíbrio da coluna após a mudança da fase móvel; possibilidade de empregar eluição por gradiente; diminuição no tempo das em análises e boa reprodutibilidade dos tempos de retenção. Além disso, são muito aplicadas à separação de solutos de diferentes polaridades, massas molares e funcionalidades químicas (PAVIA; LAMPMAN, 2016).

Material e Métodos

4. Material e Métodos

4.1. Material vegetal

As partes aéreas de *Chresta pacourinoides* (5,5 kg) foram coletadas no município de Fagundes, no Estado da Paraíba, em Agosto de 2009 e foi identificada pela professora Maria de Fátima Agra (CBiotec/UFPB), sendo uma exsicata desta espécie depositada no herbário Professor Lauro Pires Xavier (JPB) do Centro de Ciências Exatas e da Natureza sob registro AGRA et al. 7119.

4.2. Obtenção do extrato etanólico bruto das inflorescências de *Chresta pacourinoides* Mart

Depois de coletado, o material vegetal (inflorescências) foi desidratado em estufa com ar circulante a temperatura média de 45 °C, durante 3 a 4 dias, sendo em seguida submetido a um processo de pulverização em moinho mecânico tipo harley.

O material vegetal seco e pulverizado (3 kg) foi submetido à maceração com etanol a 95% (10 L) por 72 h, sendo este processo repetido por três vezes. A solução extrativa resultante, depois de filtrada, foi concentrada com o auxílio de um evaporador rotativo, sob pressão reduzida, a uma temperatura média de 40 °C, obtendo-se 247,60 g de extrato etanólico bruto (EEB), que resultou em um rendimento de 8,25%.

4.3. Obtenção das fases hexânica e metanólica de *Chresta pacourinoides* Mart.

Uma alíquota de 2 g do EEB foi solubilizada em 70 mL de MeOH:H₂O (8:2) sob agitação mecânica, após a dissolução, foi submetida à partição líquido/líquido, em ampola de separação, utilizando-se como solvente hexano (450 mL). Esta partição foi utilizada no intuito de diminuir as substâncias apolares para uma posterior injeção no CLAE/DAD. As soluções obtidas foram tratadas com sulfato de sódio (Na₂SO₄) anidro e submetidas à filtração. Após esse processo, os solventes foram evaporados em evaporador rotativo sob pressão reduzida, fornecendo as fases hexânica (460 mg) e metanólica (1540 mg) (Esquema 1) com rendimento de 23% e 77% respectivamente.

4.4. Fracionamento da fase metanólica (FM)

A fase metanólica foi submetida à uma separação em adsorvente de exclusão molecular (Sephadex LH-20), gerando 23 frações, algumas dessas foram submetidas a análise de RMN ^1H .

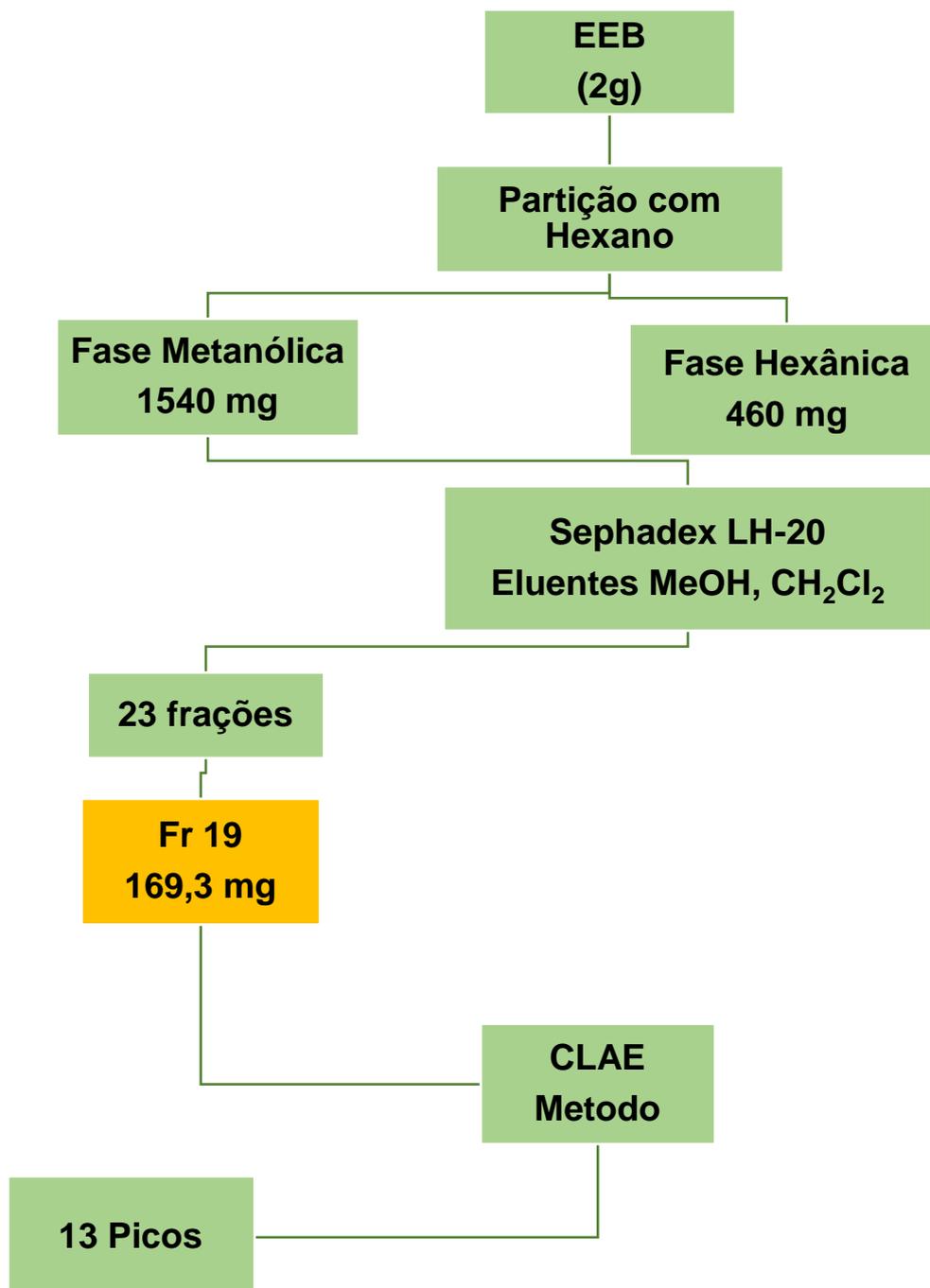
4.5. Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ^1H) e de Carbono (RMN de ^{13}C) uni e bidimensionais foram obtidos em espectrômetro da marca BRUKER-ASCENDtm-400 operando a 400 MHz (^1H) e 100 MHz (^{13}C) e VARIAN- NMR-SYSTEM operando a 500 MHz (^1H) e 125 MHz (^{13}C).

As amostras para análise foram preparadas dissolvendo-se em solvente deuterado da Cambridge Isotope Laboratories (CDCl_3 , CD_3OD , $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ e DMSO). Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e foram referenciados para RMN de ^1H pelos picos característicos dos hidrogênios pertencentes às frações não deuteradas destes solventes: clorofórmio (δ_{H} 7,24), metanol (δ_{H} 3,30), dimetilsufóxido (δ_{H} 2,49). Para os espectros de RMN de ^{13}C , estes mesmos parâmetros foram utilizados: clorofórmio (δ_{C} 77,0), metanol (δ_{C} 49,00) e dimetilsufóxido (δ_{C} 39,5)

As multiplicidades no espectro de RMN ^1H foram indicadas segundo as convenções: s (singleto), sl (singleto largo), d (dubleto), dd (duplo dubleto), dl (dubleto largo), t (tripleto), q (quadrupleto), m (multiplete).

A fração com maior massa (Fr 19) foi escolhida para dar continuidade aos experimentos, sendo desenvolvido um método em CLAE, para sua análise e separação dos picos nela presentes.



Esquema 1 - Obtenção e particionamento do extrato etanólico bruto das inflorescências de *Chresta pacourinoides* Mart

4.6. Desenvolvimento de metodologia analítica para análise da fase metanólica.

As análises foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise – LMCA. Para isso, foi utilizado um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) da Shimadzu (Prominence) (Figura 12) equipado com módulo de

bombeamento de solvente quaternário LC-20AT, auto injetor SIL-20A HT, um sistema de degaseificação DGU-20A5R, forno de coluna CTO-20A, detector SPD-M20A arranjo de diodo e controlador CBM-20A. A coluna utilizada foi Kromasil® C18 (250 mm x 4.6 mm d.i. preenchido com partículas 5 µm), com pré-coluna SecurityGuard Gemini® C18 (4 mm x 3.0 mm d.i. preenchido com partículas 5 µm). O software LC Solution® (Shimadzu, Japão) foi utilizado para o controle do equipamento, aquisição e análise dos dados.



Figura 12 - Cromatógrafo Líquido

Os solventes utilizados foram metanol grau cromatográfico (Tedia®, Brasil), Metanol grau cromatográfico (Tedia®, Brasil), ácido fórmico (H₂CO₂) (Dinâmica Química®) e água tipo I obtida por sistema de purificação (Milli-Q, Millipore®).

A fase móvel A foi constituída de água tipo I em mistura com 0,1% de ácido fórmico e fase móvel B, foi usado metanol puro. Todos os solventes foram degaseificados em sonicador (ultraCleaner 1600) antes da análise.

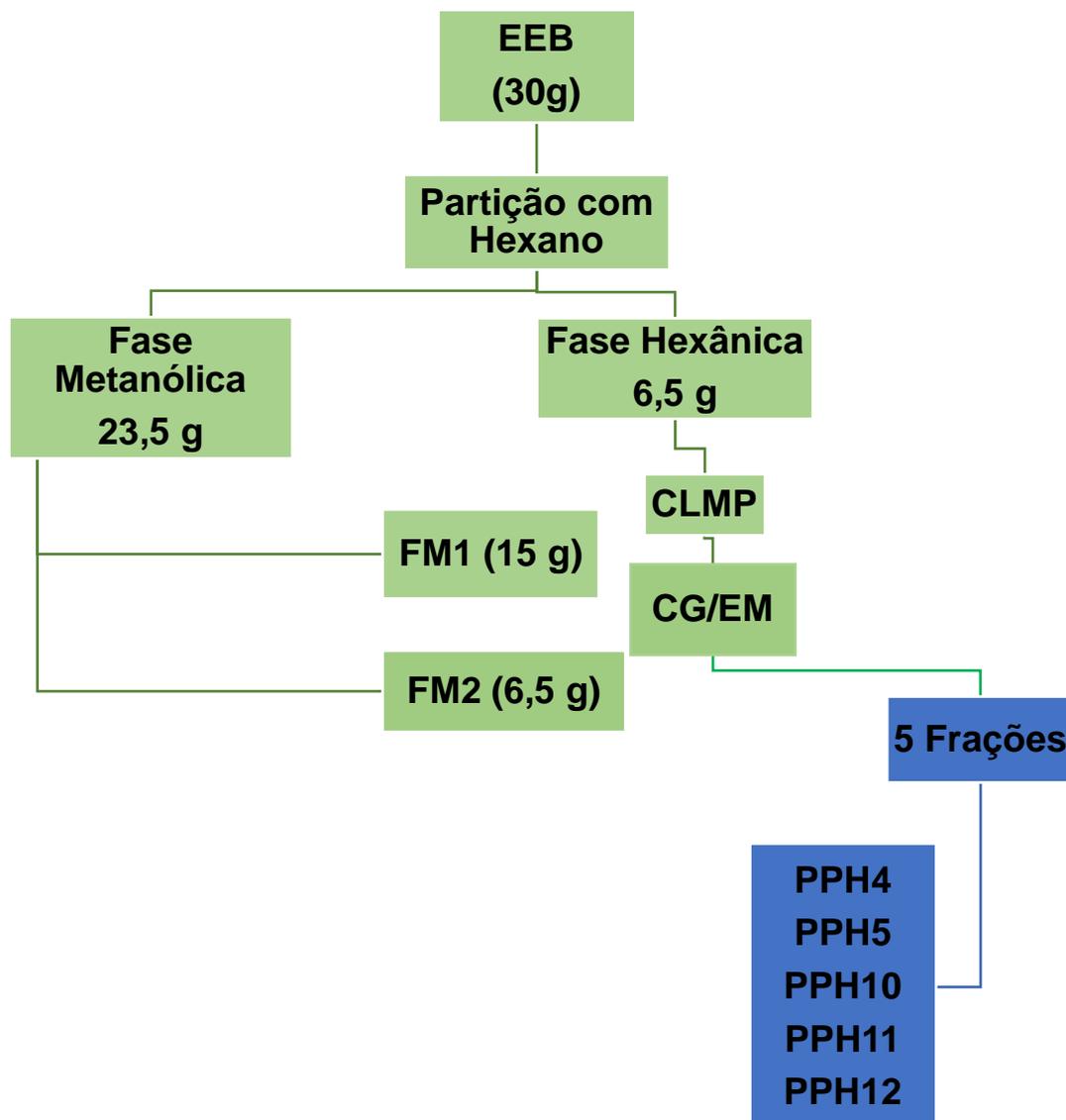
Foram preparadas soluções das frações utilizadas, sendo estas filtradas através de membrana filtrante Hexis® de 0,45 µm x 25 mm de diâmetro. Em todas essas soluções preparadas, foi utilizada como solução diluente o solvente MeOH. Em seguida elas foram submetidas à análise cromatográfica. Nos cromatogramas foram observados fatores como: tempo de retenção (T_R), áreas sob os picos (A_p) e a resolução (R_s) entre eles.

Durante o desenvolvimento da metodologia, foram avaliados diversos métodos de eluição em gradiente utilizando como fase móvel B metanol até que as condições fossem totalmente ajustadas, chegando aos parâmetros ideais (Tabela 1).

Tabela 1 - Parâmetros cromatográficos do método desenvolvido

Parâmetros Analíticos	
Fase móvel A	Água acidificada com 0,1% de CH_2O_2
Fase móvel B	Metanol
Método (gradiente)	0 min – 45% de B 90 min – 75% de B 110 min – 100% de B 130 min – 100% de B 135 min – 45% de B 155 min – 45% de B
Fluxo	0,6 mL / min
Temperatura do forno	26° C
Solução diluente	MeOH
Tempo de análise	155 min
Volume de injeção	20 µL
Comprimento de onda	280 nm
Coluna	Kromasil® C18 (250 mm x 4.6 mm d.i. preenchido com partículas 5 µm)

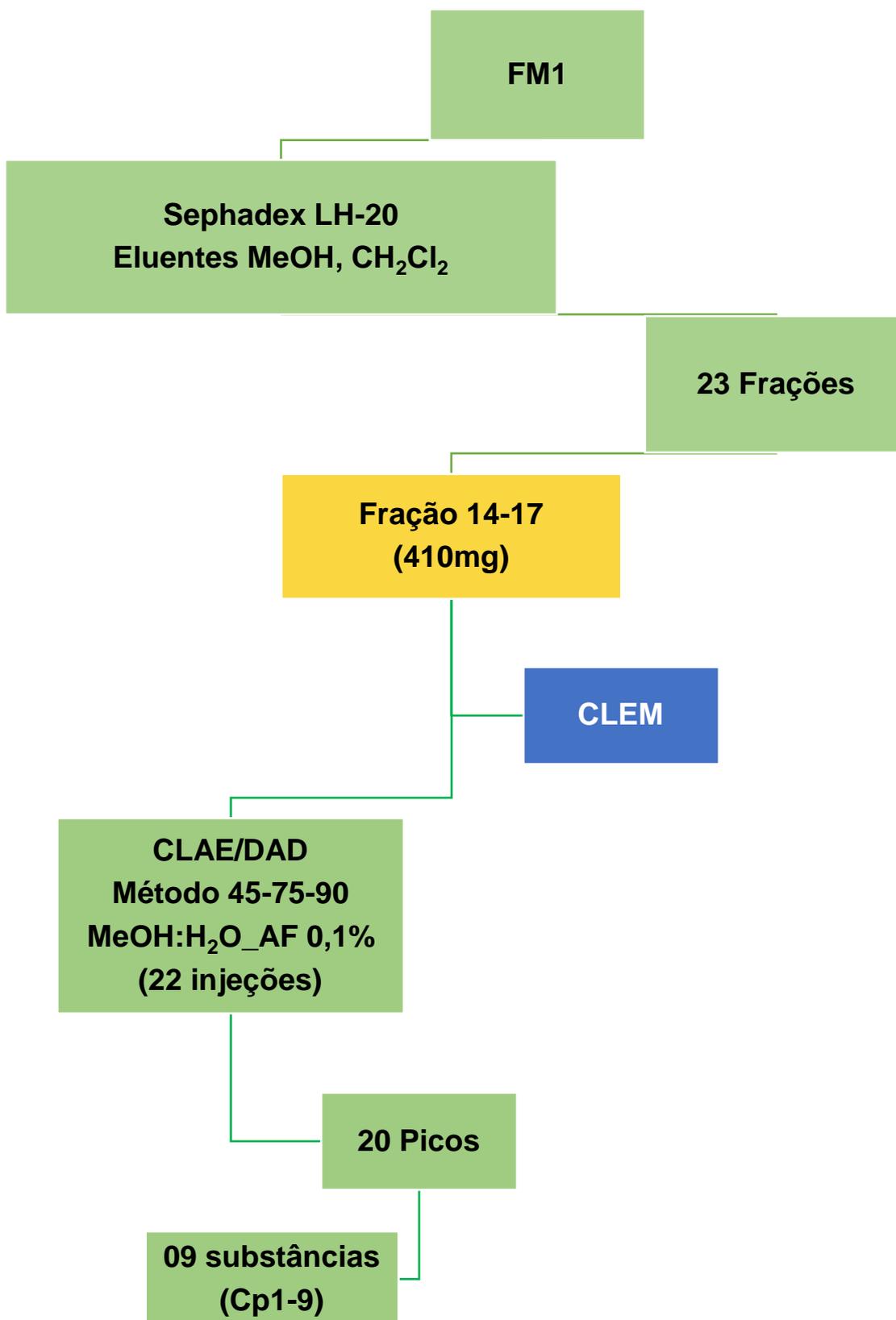
Após a partição com 2 g de extrato foi realizada outra seguindo o mesmo procedimento, mas utilizando 30 g de extrato. Para fins de facilitar o seu manuseio a fase metanólica foi dividida em duas FM1 (15 g) e FM2 (6,5 g), com rendimento de 50% e 21,6% respectivamente (Esquema 2).



Esquema 2 - Obtenção e particionamento do extrato etanólico bruto das inflorescências de *Chresta pacourinoides* Mart.

4.7. Fracionamento da fase metanólica 1 (FM1).

A FM1 foi submetida a uma separação utilizando Sephadex LH20 e como eluentes $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (1:1), obtendo-se 23 frações, nas quais as frações 14-17 foram reunidas, cuja massa resultante foi de 410 mg. Essa foi submetida a cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando mesmo método desenvolvido anteriormente, sendo possível observar vinte picos (Esquema 3). Após isso, essa fração foi submetida cromatografia líquida preparativa.



Esquema 3 - Fracionamento da FM1.

4.8. Cromatografia preparativa

Inicialmente, o método analítico desenvolvido anteriormente, foi transposto para escala preparativa, sendo o parâmetro alterado, o fluxo da coluna, que foi modificado de 1 mL / min para 8 mL / min (Tabela 2).

Para isso, a metodologia foi realizada utilizando um sistema de CLAE da Shimadzu equipado com módulo de bombeamento de solvente binário LC-6AD, injetor Rheodyne, detector SPD-M10A diode array e SCL-10A, com loop de 100 µL. A coluna utilizada foi ACE C18 (250 mm X 21.2 mm e 5 µm de tamanho de partícula). Na preparação das soluções utilizou-se filtros para seringa em PVDF com 0,45 µm de diâmetro de poro e diâmetro 30 mm (Allcrom). Os solventes orgânicos utilizados foram metanol de grau cromatográfico (TEDIA®, Brazil) e água tipo I obtida por sistema de purificação Milli-Q (Millipore®), esses foram sonicados em aparelho de banho de ultrassom (Unique-USC-1600).

Tabela 2 - Parâmetros cromatográficos do método transposto

Parâmetros Preparativos	
Fase móvel A	Água acidificada com 0,1% de CH ₂ O ₂
Fase móvel B	Metanol
Método (gradiente)	0 min – 45% de B 90 min – 75% de B 110 min – 100% de B 130 min – 100% de B 135 min – 45% de B 155 min – 45% de B
Fluxo	8 mL / min
Temperatura do forno	26° C
Solução diluente	MeOH
Tempo de análise	155 min
Volume de injeção	20 µL
Comprimento de onda	280 nm
Coluna	ACE C18 (250 mm X 21.2 mm e 5 µm de tamanho de partícula)

Após o desenvolvimento dessa cromatografia, foram isoladas e coletadas 9 substâncias, as quais foram codificadas como Cp-1 a Cp-9 e analisadas por RMN ^1H e ^{13}C e espectrometria de massas.

4.9. Espectrometria de massas das frações obtidas da fase metanólica.

As frações Cp-2 e Cp-9 e a reunião das frações 14-17 foram submetidas a análise por espectrometria de massas, por injeção direta, sendo o espectrômetro de massas de baixa resolução da marca Bruker, modelo Ion Trap-amaZonX utilizando a técnica de ionização por Eletrospray. Os parâmetros de análise do Ion-Trap foram: capilar 4,5 kV, ESI no modo negativo, offset da placa final 500 V, nebulizador 24,5 psi, gás seco (N_2) com fluxo de 4,5 L/h e temperatura de 200 °C. A fragmentação de CID foi conseguida no modo auto MS/MS utilizando o modo de resolução avançada para o modo MS e MS/MS. Os espectros (50-1000 m/z) foram registrados a cada 2 s.

4.10. Fracionamento da fase hexânica (FH).

Com relação a fase hexânica foi realizado um fracionamento em cromatografia de média pressão – CLMP e após essa etapa foram feitas análises por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, para a identificação dos compostos nela presentes (Esquema 2).

4.10.1. Cromatografia Líquida de Media Pressão (CLMP)

A fase hexânica foi submetida a CLMP para seu fracionamento, tendo como fase móvel primeiramente 100% de hexano, posteriormente, misturas de hexano: clorofórmio (8:2; 6:4; 5:5; 4:6 e 2:8), 100% clorofórmio e clorofórmio: metanol nas proporções (99:1; 97:3; 95:5; 9:1 e 8:2). Para isso, utilizou-se o cromatógrafo da Büchi® com um sistema de bomba e injetor de solventes automático, equipado com dois módulos de bombas (C-601 e C-605), módulo controlador (C-615) e coluna empacotada com sílica gel 60 (Silicycle® de partículas com dimensões entre 0,063-0,2 mm ou 0,04-0,063 mm).

4.10.2. Cromatografia gasosa acoplado a espectrometria de massas (CG-EM) da fase hexânica

A análise pela cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas foi feita para identificar os componentes majoritários presentes nas frações da fase hexânica.

Para isso, foi utilizado cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM) da marca Shimadzu, modelo GCMS-QP2010 Ultra, com ionizador por impacto de elétrons, 70 eV. Coluna RTX-5MS capilar (5% difenil / 95% dimetil polisiloxano), com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm df. Para isso, foram utilizados os seguintes parâmetros: temperatura de injeção: 250°C; pressão 57 KPa; gás carreador: hélio; fluxo total: 7,9 mL/min; fluxo da coluna: 0,82 mL/min; temperatura do forno: 100°C; Temperatura da fonte de íons: 200°C; temperatura da interface: 250°C, modo de injeção: split; método: A temperatura iniciou a 100 °C e finalizou a 300 °C em uma taxa de 3 °C/min; faixa de massa: m/z 40-500 Da.

Após obtenção do cromatograma e espectros de massas, foi calculado o índice de Kovats através da injeção de padrões de hidrocarbonetos utilizando a mesma metodologia das amostras. Os dados do espectro de massas e o índice de Kovats foram comparados com a biblioteca do equipamento (NIST08.LIB) e com a literatura.

4.11. Teste larvicida

Foram realizados ensaios no laboratório de Ecologia Química (LEQ-UFPE) para atividade larvicida do extrato, fase e substâncias isoladas de *Chresta pacourinoides*, diante de larvas de *Aedes aegypti* no quarto instar (L4). A metodologia da Organização Mundial de Saúde (WHO/CDS/WHOPES/GCDPP, 2005) foi ajustada para execução dos ensaios (SANTOS et al., 2012). Inicialmente foi efetuado o teste preliminar com 20 larvas do mosquito (L4) frente a soluções de 10, 50 e 100 ppm do analito a ser testado. Para preparar as soluções foi adicionado 0,005 g de cada amostra e 0,1 g de Tween[®]80, completando-se o volume para 100 mL com água destilada num balão volumétrico. No controle negativo foi usado água destilada e

Tween[®]80 e, para controle positivo uma solução de Themephos (0,01 ppm), as duas amostras sob iguais circunstâncias de teste. Decorridos 24 h realizou-se o exame de mortalidade, bem como qualquer alteração comportamental ou morfológica. Após 48 h de exposição ao agente testado nova observação foi realizada. Foram consideradas mortas as larvas as quais não houve resposta a estímulos físicos ou não expuseram o movimento de subir a superfície e descer no recipiente (convexão), natural para larvas em estado normal. Os ensaios foram feitos em triplicata.

As concentrações aplicadas posteriormente foram escolhidas seguindo o teste preliminar. A CL_{50} foi definido através de análise de sobrevivência Probit no software Statplus[®] 2008, com intervalo de confiança de 95%

4.12. Determinação do teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante.

4.12.1. Determinação do teor fenólicos

Na determinação do teor de fenólicos foi empregada uma das técnicas mais comuns: o método de Folin-Ciocalteu. Esse reagente é constituído de uma mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungstístico, cujos elementos molibdênio e o tungstênio apresentam estado de oxidação 6⁺, no entanto, na presença de substâncias redutoras, como os compostos fenólicos, há formação de molibdênio azul e o tungstênio azul, onde a média dos estados de oxidação está entre 5 e 6, permitindo através da coloração a determinação da concentração das substâncias redutoras (IKAWA et al., 2003; NACZK; SHAHIDI, 2004; CHAVES et al., 2010).

Para a realização do método empregou-se o ácido gálico como composto fenólico padrão, como descrito por (GULCIN, 2004). Adicionou-se 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu (10%) a 120 µL da amostra (extrato e fase, na concentração de 1 mg/mL). A reação foi mantida em repouso por 5 minutos, sendo adicionado em seguida 400 µL de carbonato de sódio (7,5 %) para neutralizar a mistura. As amostras foram mantidas a temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 120 minutos, sendo pipetadas para placa de 96 poços (200 microlitros/poço) e a absorbância foi medida a 765 nm em espectrofotômetro UV-visível (UV-2550, Shimadzu). As análises foram

realizadas em triplicatas (repetidas por três dias) para o extrato e a fase de *C. pacourinoides*.

O teor de fenólicos totais foi determinado pela equação de regressão linear a partir da curva de calibração construída com solução padrão de ácido gálico (25, 50, 75; 100 e 150 µg/mL) e expresso em miligramas de equivalente de ácido gálico por grama de extrato (mg EAG / g de amostra), sendo as análises realizadas em triplicatas (repetidas por três dias).

4.12.2. Atividade antioxidante *in vitro*: Método de sequestro de radicais (DPPH)

A metodologia empregada foi descrita por (GARCEZ et al., 2009), com algumas adaptações, onde 100 µL da solução de DPPH (0,3 mM) foram adicionados à 100 µL de diferentes concentrações das amostras (extrato e fase: 100; 200; 300; 400 e 500 µg/mL) e da fração 14-17 (3; 6; 12; 24 e 48 µg/mL) determinadas de acordo com triagem inicial. A mistura foi mantida em repouso e ao abrigo da luz por trinta minutos e em seguida a absorvância foi medida em espectrofotômetro UV-Visível (UV-2550, Shimadzu) em comprimento de onda de 518 nm. A porcentagem da atividade sequestradora (% AS) foi calculada conforme a equação 1 abaixo:

Equação 1 – Fórmula para o cálculo da Atividade sequestradora de radicais.

$$(\% AS) = \frac{A_{\text{controle negativo}} - A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controle negativo}} \times 100}$$

Onde,

$A_{\text{controle negativo}}$ = absorvância do DPPH em solução metanólica.

A_{amostra} = absorvância do radical na presença das amostras ou do padrão ácido ascórbico.

A atividade antioxidante das amostras foi expressa como CE50, que é a concentração (em µg / mL) da amostra que induziu a redução de 50% dos radicais DPPH. Como controle positivo foi utilizado o ácido. As análises foram realizadas em triplicatas (repetidas por três dias).

4.13. Análise estatística

Para comparar os resultados e avaliar a reprodutibilidade dos métodos usados na determinação de compostos fenólicos e atividade antioxidante, foi realizada análise estatística usando análise de Variância (ANOVA), no qual os resultados que apresentaram nível de significância de 95%, com posterior teste de Tukey, para determinar as diferenças significativas entre as médias, sendo para isso utilizando o programa GraphPad Prism 7.0, foram considerados diferentes.

Resultados e Discussão

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, como explicado na metodologia, realizou-se uma partição com 2 g de extrato e posteriormente foi feita uma coluna de Sephadex com a fase metanólica obtida. A partir disso foi observado que a fração 19 apresentava uma cor amarelo escuro, a qual foi positiva para flavonoides usando o reagente de Shinoda em CCDA, por isso, ela foi analisada por RMN de ^1H (Figura 13). Assim, através da análise do espectro de RMN, bem como levando em consideração que essa fração possuía a maior massa, ela foi escolhida para dar continuidade nos experimentos, onde foi desenvolvido um método em CLAE para sua análise e separação dos 13 picos nela presentes, dentre esses, 3 foram identificados.

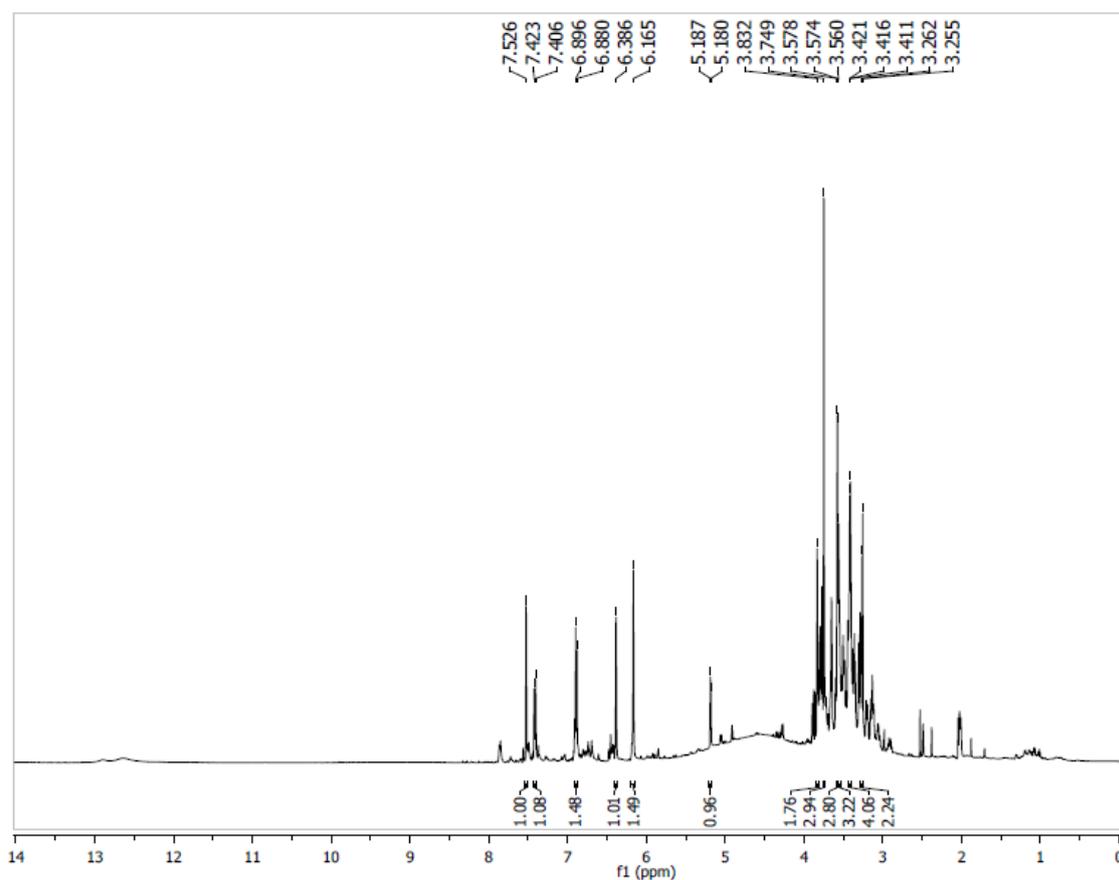


Figura 13 - Espectro de RMN ^1H da fração 19.

5.1. Desenvolvimento de metodologia analítica por CLAE

O desenvolvimento do método realizado no presente estudo teve como objetivo gerar um sistema cromatográfico que pudesse separar os constituintes químicos da fração 19 e posteriormente a fr14-17 (fase metanólica), de maneira a fazer sua

transposição para a escala preparativa, visando o isolamento do maior número possível de compostos.

Solventes como metanol e água ultra pura foram usados durante o desenvolvimento do método, por apresentarem polaridades compatíveis com às dos compostos presentes nas frações. A escolha pela utilização de metanol foi devido ao fato de que a resolução entre os picos melhoraram com esse solventes.

Durante as análises e através da revisão bibliográfica foi observada a necessidade de utilizar água com uma pequena quantidade de ácido a fim de evitar a ionização de compostos, os quais se mostraram como picos mal definidos em análises feitas sem ácido. Portanto, foi escolhido o uso do ácido fórmico a 0,1%, que produziu uma melhor definição dos picos e apresentou uma menor perturbação na linha de base.

Através de análise dos cromatogramas de CLAE/DAD foram observados vários comprimentos de onda, sendo escolhido o comprimento de onda de 280 nm, pois este é o comprimento onde a maioria dos compostos presentes (principalmente flavonoides) nas amostras apresentavam melhor absorção.

Com relação à solução diluente das amostras, ela foi escolhida como 100% de metanol, pois foi observado que as amostras diluíam melhor dessa forma, já que ao adicionar água foi observado a formação de emulsão que dificultava a filtração e conseqüentemente as análises.

Além disso, através da observação dos cromatogramas, ficou claro que um sistema isocrático de solventes não era possível para a obtenção de uma boa separação entre os compostos, por isso, o método foi desenvolvido em modo gradiente.

Os picos resultantes da fração 19 apresentaram uma boa separação, no entanto, obtiveram massas muito reduzidas, fator limitante para identificação de mais picos dessa fração. Por isto, foi feita uma nova partição com uma quantidade maior de massa e algumas frações da FM1 com mesmo perfil da 19, quando foram submetidas a este método apresentaram picos bem resolvidos e definidos, mostrando a eficiência do método.

Abaixo estão apresentados métodos cromatográficos realizados para a obtenção do método ideal para a fração escolhida (ver Figura 14; Figura 15; Figura 16; Figura 17; Figura 18).

Tabela 3 – Descrição do método cromatográfico 1

Parâmetros Analíticos	
Fase móvel A	Água Agua Tipo I
Fase móvel B	MeCN
Método (gradiente)	0 min – 13% de B 10 min – 20% de B 20 min – 30% de B 30 min – 50% de B 40 min – 60% de B 50 min – 70% de B 60 min – 20% de B 70 min – 10% de B
Fluxo	0,7 mL / min
Temperatura do forno	26° C
Solução diluente	MeOH
Tempo de análise	70 min
Volume de injeção	20 µL
Comprimento de onda	280 nm
Coluna	Kromasil® C18 (250 mm x 4,6 mm d.i. preenchido com partículas 5 µm)

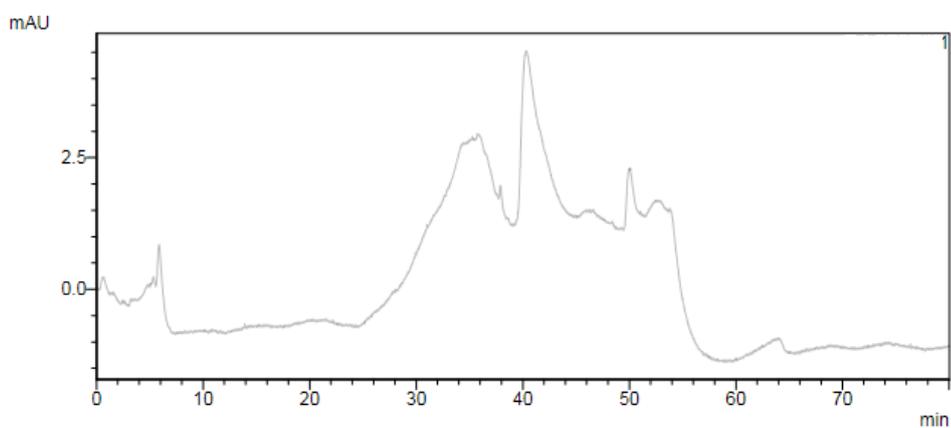


Figura 14 - Cromatograma do método 1.

Tabela 4 - Descrição do método cromatográfico 2

Parâmetros Analíticos	
Fase móvel A	Água Tipo I
Fase móvel B	MeOH
Método (gradiente)	0 min – 4% de B
	15 min – 10% de B
	20 min – 40% de B
	80 min – 75% de B
	90 min – 95% de B
Fluxo	1,0 mL / min
Temperatura do forno	26° C
Solução diluente	MeOH
Tempo de análise	70 min
Volume de injeção	20 µL
Comprimento de onda	280 nm
Coluna	Kromasil® C18 (250 mm x 4,6 mm d.i. preenchido com partículas 5 µm)

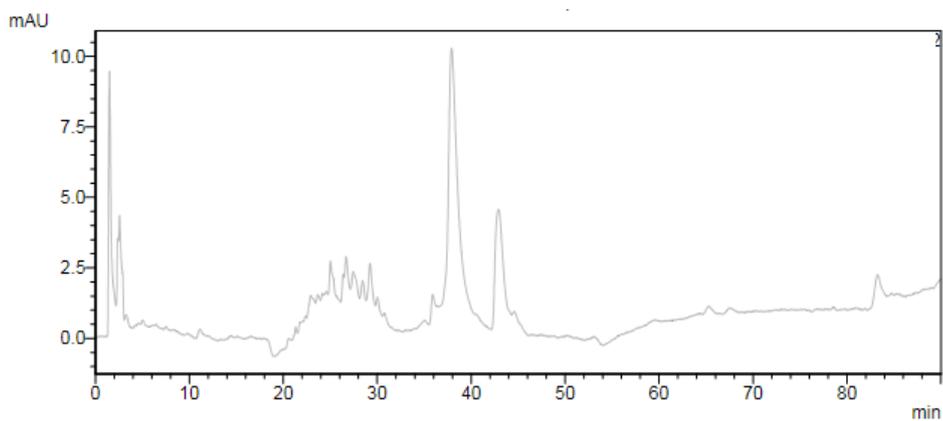


Figura 15 - Cromatograma do método 2.

Tabela 5 - Descrição do método cromatográfico 3

Parâmetros Analíticos	
Fase móvel A	Água acidificada com 0,1% de CH ₂ O ₂
Fase móvel B	MeOH
Método (gradiente)	0 min – 4% de B 10 min – 10% de B 15 min – 40% de B 55 min – 53,5% de B 95 min – 70% de B 105 min – 95% de B
Fluxo	1,0 mL / min
Temperatura do forno	26° C
Solução diluente	MeOH
Tempo de análise	105 min
Volume de injeção	20 µL
Comprimento de onda	280 nm
Coluna	Kromasil® C18 (250 mm x 4,6 mm d.i. preenchido com partículas 5 µm)

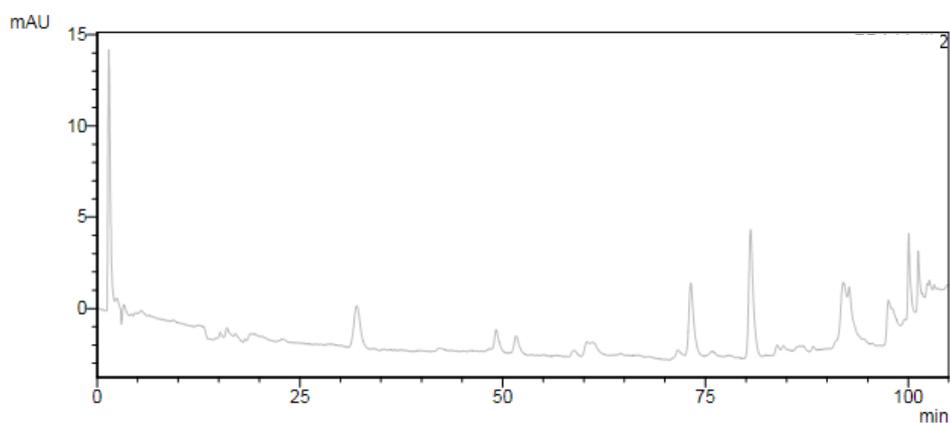


Figura 16 - Cromatograma do método 3.

Tabela 6 - Descrição do método cromatográfico 4

Parâmetros Analíticos (PP4)	
Fase móvel A	Água tipo I
Fase móvel B	Metanol
Método (gradiente)	0 min – 4 % de B
	10 min – 10 % de B
	15 min – 40 % de B
	55 min – 53,5 % de B
	95 min – 70 % de B
105 min – 95 % de B	
Fluxo	0,6 mL / min
Temperatura do forno	26° C
Solução diluente	MeOH
Tempo de análise	105 min
Volume de injeção	20 µL
Comprimento de onda	280 nm
Coluna	Kromasil® C18 (250 mm X 4,6 mm e 5 µm de tamanho de partícula)

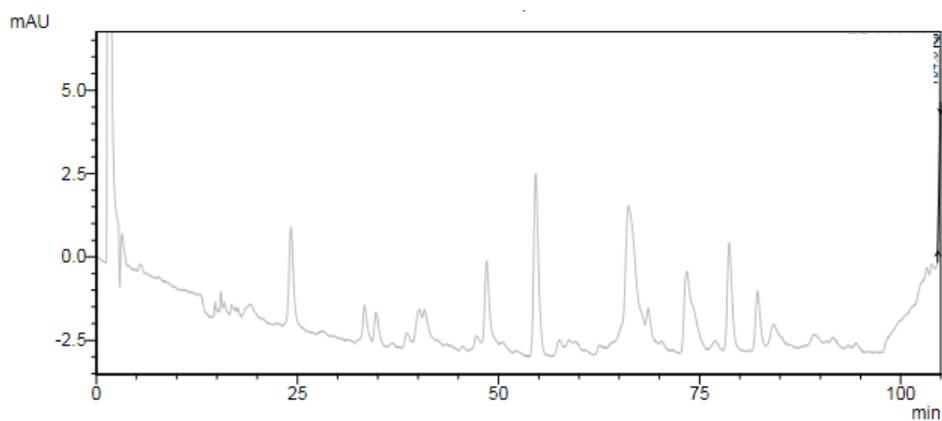


Figura 17 - Cromatograma do método 4.

Tabela 7 - Descrição do método cromatográfico 5

Parâmetros Analíticos (PP5)	
Fase móvel A	Água acidificada com 0,1% de CH ₂ O ₂
Fase móvel B	Metanol
Método (gradiente)	0 min – 4 % de B 10 min – 10 % de B 15 min – 40 % de B 55 min – 53,5 % de B 95 min – 70 % de B 115 min – 95 % de B
Fluxo	0,6 mL / min
Temperatura do forno	26° C
Solução diluente	MeOH
Tempo de análise	115 min
Volume de injeção	20 µL
Comprimento de onda	280 nm
Coluna	Kromasil® C18 (250 mm X 4,6 mm e 5 µm de tamanho de partícula)

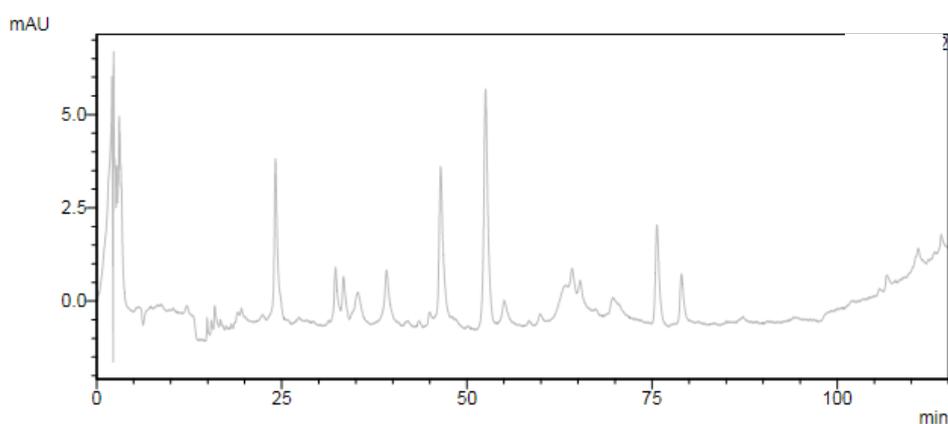


Figura 18 - Cromatograma do método 5.

Após várias tentativas para encontrar os parâmetros ideais, obteve-se uma corrida com um tempo total de 155 min. Esta corrida se inicia com 45% de solvente B e chega a 75% em 90 min, indo a 100% em 110min, permanecendo assim até 130 min. De 130 a 135 min, ele volta para 45% e permanece assim até 155 min,

terminando a corrida nesta concentração. O fluxo utilizado nesse método foi 0,6 mL / min, à uma temperatura do forno de 26° C, o volume de injeção foi igual a 20 µL e a detecção por meio do detector UV (DAD) foi feita no comprimento de onda de 280 nm.

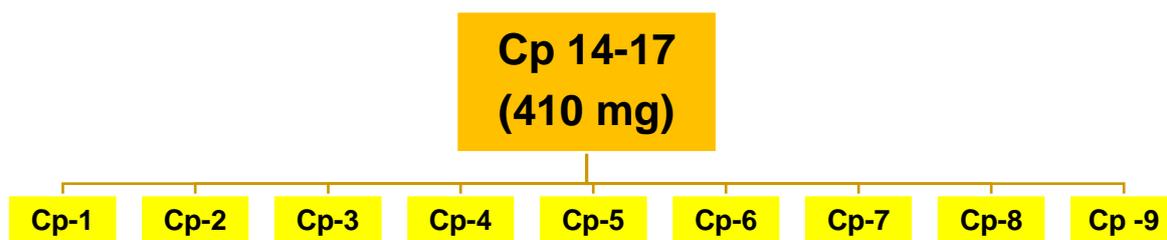
Tabela 8 - Descrição do método cromatográfico 6

Parâmetros Analíticos	
Fase móvel A	Água acidificada com 0,1% de CH ₂ O ₂
Fase móvel B	Metanol
Método (gradiente)	0 min – 45% de B
	90 min – 75% de B
	110 min – 100% de B
	130 min – 100% de B
	135 min – 45% de B
155 min – 45% de B	
Fluxo	0,6 mL / min
Temperatura do forno	26° C
Solução diluente	MeOH
Tempo de análise	155 min
Volume de injeção	20 µL
Comprimento de onda	280 nm
Coluna	Kromasil® C18 (250 mm x 4,6 mm d.i. preenchido com partículas 5 µm)

5.2. Transposição de método (CLAE) de escala analítica para preparativa.

Para transposição do método desenvolvido foram feitos ajustes nos parâmetros desse método utilizando o CLAE preparativo para total otimização das condições de análise. Assim, foi visto que o único parâmetro que necessitou de ajuste foi o fluxo, devido ao maior diâmetro da coluna, onde ele foi alterado de 0,6 mL / min para 8 mL / min e dessa forma, obteve-se o cromatograma apresentado na Figura 19.

Com este método, utilizando a fração 14-17 (FM1) foram feitas 22 injeções, sendo isolados 20 picos, dos quais, 9 puderam ser identificados por RMN (Esquema 4) (Figura 19).



Esquema 4 - Frações isoladas da reunião de frações 14-17 injetadas no CLAE preparativo.

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

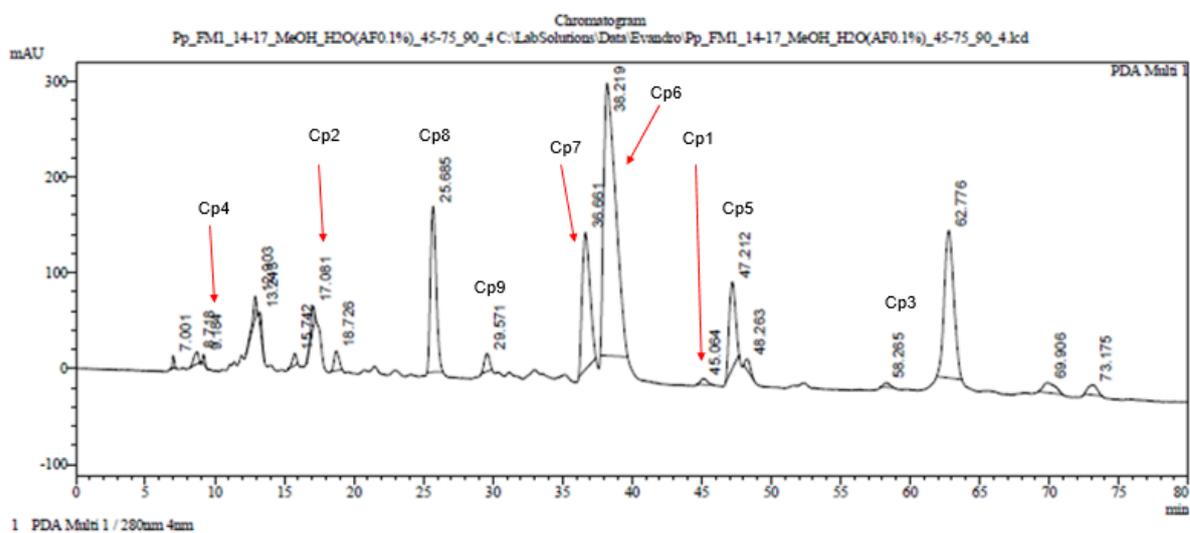


Figura 19 - Cromatograma geral CLAE preparativo.

5.3. Estudo Fitoquímico

5.3.1. Determinação estrutural de Cp-1

A substância Cp – 1 apresentou-se como um pó amorfo amarelo apresentou tempo de retenção (47,21 min) na cromatografia de CLAE, Figura 20

O espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de Cp-1 Figura 21 e suas expansões (Figura 22) mostraram sinais de hidrogênios aromáticos característicos de flavonoides, sendo um dubleto em δ_{H} 8,07 ($J= 8,8$ Hz) atribuídos aos hidrogênios H-2' e H-6' e outro em δ_{H} 6,10 ($J= 8,4$ Hz) referente aos hidrogênios H-3' e H-5', evidenciando um sistema AA'BB', ou seja, um anel B para substituído com integração para dois hidrogênios cada. As constantes de acoplamento calculadas (8,4 Hz) indicam uma correlação orto entre esses hidrogênios.

No anel A foi evidenciado sinal em δ_{H} 6,39 (H-6) e δ_{H} 6,15 (H-8) com integral para um hidrogênio cada. Segundo (MOREIRA et al., 2003) constante de acoplamento meta entre esses hidrogênios é sugestivo de flavonoide 5,7 oxigenado no anel A. A não observância de sinal (singleto entre δ_{H} 6,4 e δ_{H} 6,9), para a posição 3 nos permitiu inferir que se tratava de um flavonol (GROTEWOLD, 2008).

O espectro de RMN de ^{13}C (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) (Figura 23) foi possível observar a presença de 11 sinais atribuídos a 13 carbonos. No espectro de correção heteronuclear HMBC (Figura 24) pode-se constatar a presença de um sinal em δ_{C} 147,0, este atribuído ao carbono da posição 2.

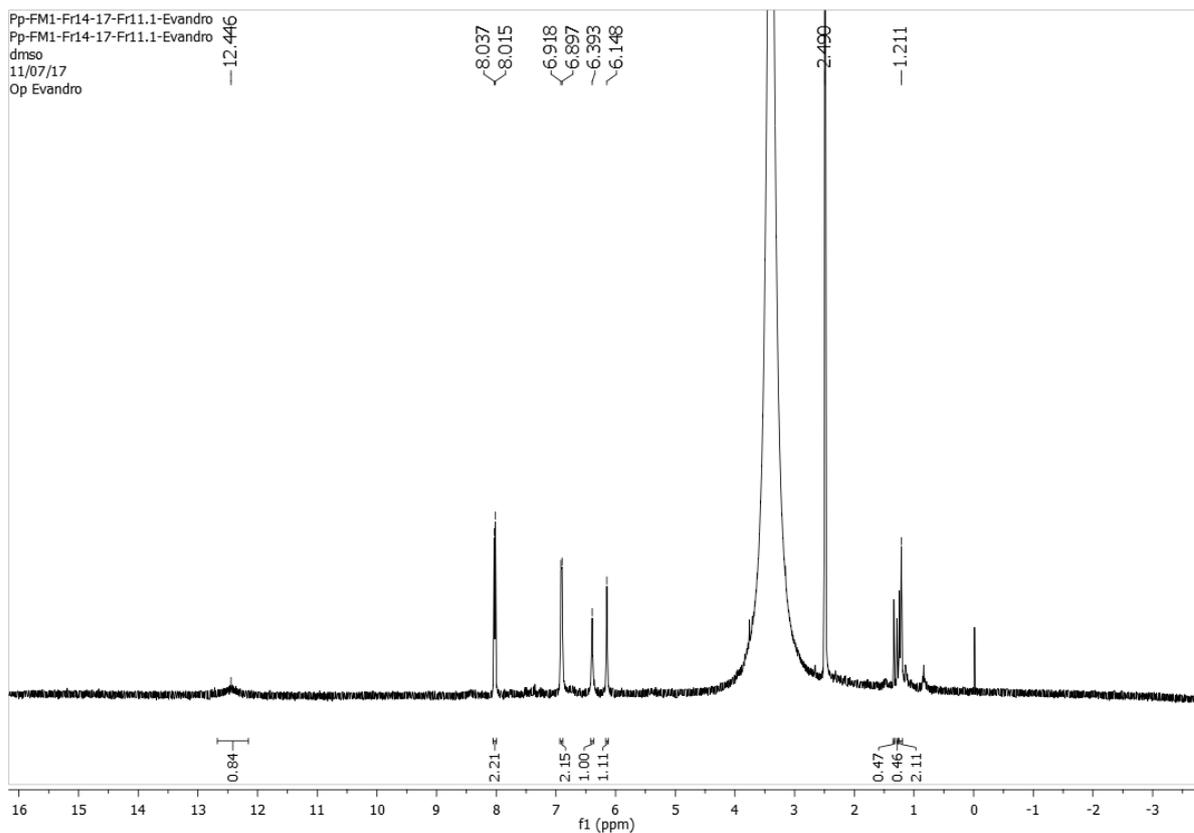


Figura 21 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) de Cp-1

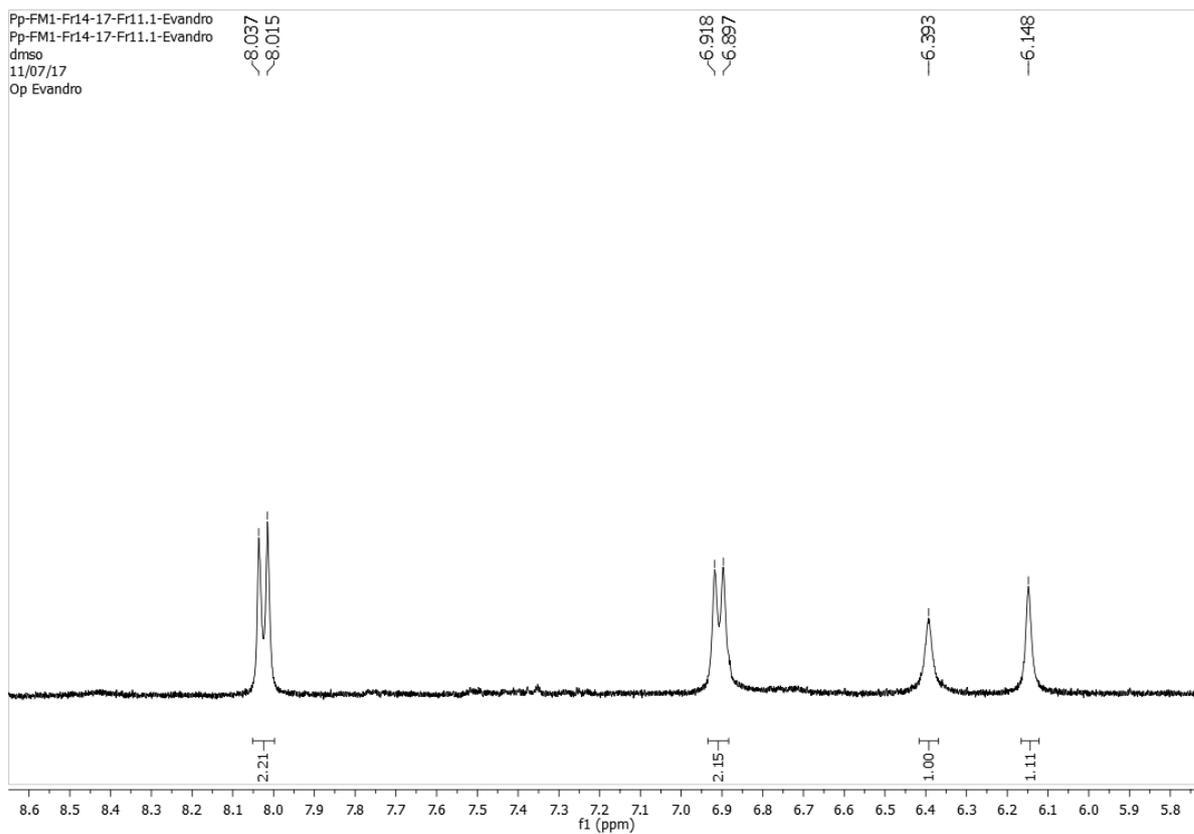


Figura 22 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) de Cp-1

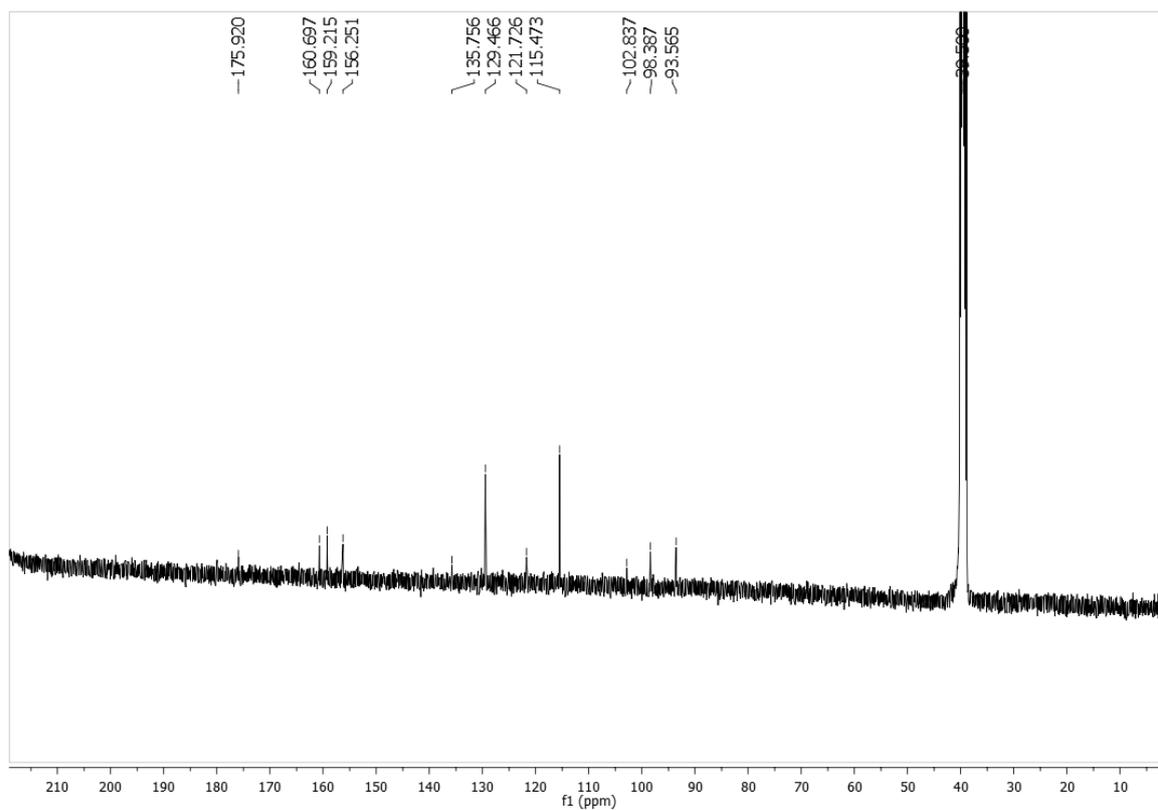


Figura 23 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO-d_6) de Cp-1

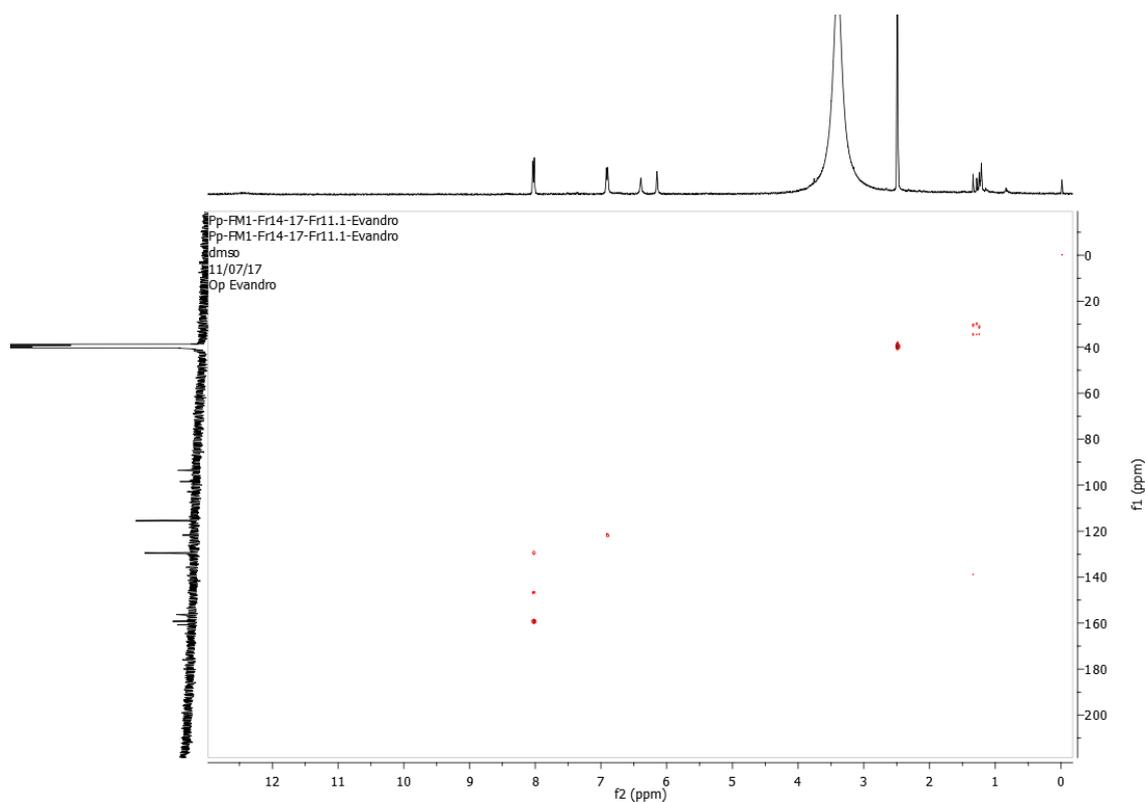


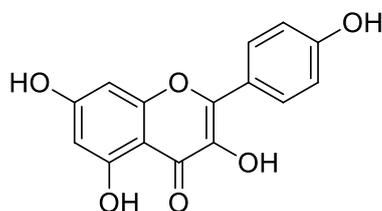
Figura 24 - Mapa de contorno HMBC (400 e 100 MHz, DMSO-d_6) de Cp-1

Após análises dos dados e comparação com a literatura (MOURA; VILEGA; SANTOS, 2011) (Tabela 9) foi possível identificar esse Cp1 como Campferol (3,5,7,4'-tetraidroxiflavonol (Figura 25). Este possui atividade antiinflamatória (HEINRICH et al., 1998), antioxidante (VINSON et al., 1995) e gastroprotetora (SALARITABAR et al., 2017).

Tabela 9 - Deslocamentos químicos, tipos de sinal e constantes de acoplamento (J) para os átomos de hidrogênio (δ_H) e carbono (δ_C) de Cp-1, verificados nos espectros de RMN de 1H e ^{13}C (400 e 100 MHz, respectivamente, DMSO- d_6), bem como, aqueles apresentados por (MOURA; VILEGA; SANTOS, 2011).

C	Cp - 1		Campferol	
	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
1	-	-	-	
2	147,0(HMBC J_2 - H2'-8,026)	-	147,0	
3	-	-	-	
4	175,9	-	-	
5	160,7	-	-	
6	98,4	6,15 (d)	99,0	6,20 (d, $J=2$ Hz 2H)
7	-	-	164,2	-
8	93,6	6,39 (d)	94,0	6,44 (d, $J=2$ Hz 2H)
9	156,2	-	156,2	-
10	102,8	-	103,0	-
1'	121,7	-	122,0	-
2'	129,5	8,03(d, $J=8,8$ Hz 2H)	130,0	8,05 (d, $J=8,5$ Hz 2H)
3'	115,5	6,91 (d, $J=8,4$ Hz 2H)	115,0	6,94 (d, $J=8,5$ Hz 2H)
4'	159,2	-	159,0	-
5'	115,5	6,91 (d, $J=8,4$ Hz 2H)	115,0	6,94 (d, $J=8,5$ Hz 2H)
6'	129,5	8,03 (d, $J=8,8$ Hz 2H)	130,0	8,05 (d, $J=8,5$ Hz 2H)

Figura 25 - Campferol



5.3.2. Determinação estrutural de Cp-2

A substância Cp – 2 apresentou-se como um pó amorfo amarelo apresentou tempo de retenção (17,08 min) no cromatografia de CLAE Figura 20.

O íon quase-molecular [M-H] em m/z 463 (pico base) (Figura 26) com fórmula molecular $C_{21}H_{20}O_{12}$, sugestivo de flavonoide glicosilado (quercetina glicosilada) (COTA et al., 2008).

No espectro de RMN de 1H (400 MHz, DMSO- d_6) de Cp – 2 foi percebido sinais de prótons aromáticos característicos de flavonoides (Figura 27). Um sigleto largo em δ_H 12,60 com integral para um hidrogênio foi atribuído a hidroxila da posição 5 (KRAFCZYK; GLOMB, 2008). Deslocamentos entre 6 - 8 ppm são semelhantes à aglicona (Figura 28). Os sinais no intervalo de δ_H 7,56 – 7,54, integrando para dois hidrogênios foram atribuídos aos H-2' e H-6'. Um dubleto em δ_H 6,82 acoplando orto ($J=8,8$ Hz) compatível com H-5'. Os singletos em δ_H 6,14 e δ_H 6,35 atribuiu-se a H-6 e H-8 respectivamente (OLSZEWSKA; WOLBIŚ, 2002).

A inexistência do sinal H-3, entre δ_H 6,5-7,0 (GROTEWOLD, 2008) de sinais na região entre (δ_H 3,78-3,07) (Figura 29), característicos de hidrogênios ligados a carbonos oxigenados além de um dubleto em δ_H 5,44 ($J=7,6$ Hz), típico de hidrogênio anomérico de β -glicosídeo, nos fazem sugerir que a unidade osídica está ligada ao C – 3.

O espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) de Cp – 2 e suas expansões (Figura 30),(Figura 31) e (Figura 32) apresentou 22 sinais concernentes com a nossa proposta de um flavonoide com uma unidade de açúcar, δ_C – 101,0, correspondente a carbono oximetínico anomérico dessa unidade. O sinal em δ_C 133,3 é característico de C-3 de flavonol. O deslocamento químico em δ_C 156,0 e δ_C 156,4 foram atribuídos ao C-2 e C-9 respectivamente, esses indicam a O-glicosilação em C-3, pois quando não existe substituição o sinal de C-2 é próximo de δ_C 147,0 (MARKHAM; CHARI, 1982).

Os deslocamentos em δ_C 144,9 e δ_C 148,7 correspondem especificamente a C-3' e C4'. Os outros sinais do anel B estão na região entre δ_C 115,3 e δ_C 121,6

(MARKHAM; CHARI, 1982) , isso ratifica a que a aglicona de Cp-2 tem esqueleto de quercetina.

A presença do deslocamento químico em δ_c 61,0 e comparação com dados da literatura (MARKHAM; CHARI, 1982) nos permitiu afirmar que a unidade osídica em questão se tratava de uma glicose.

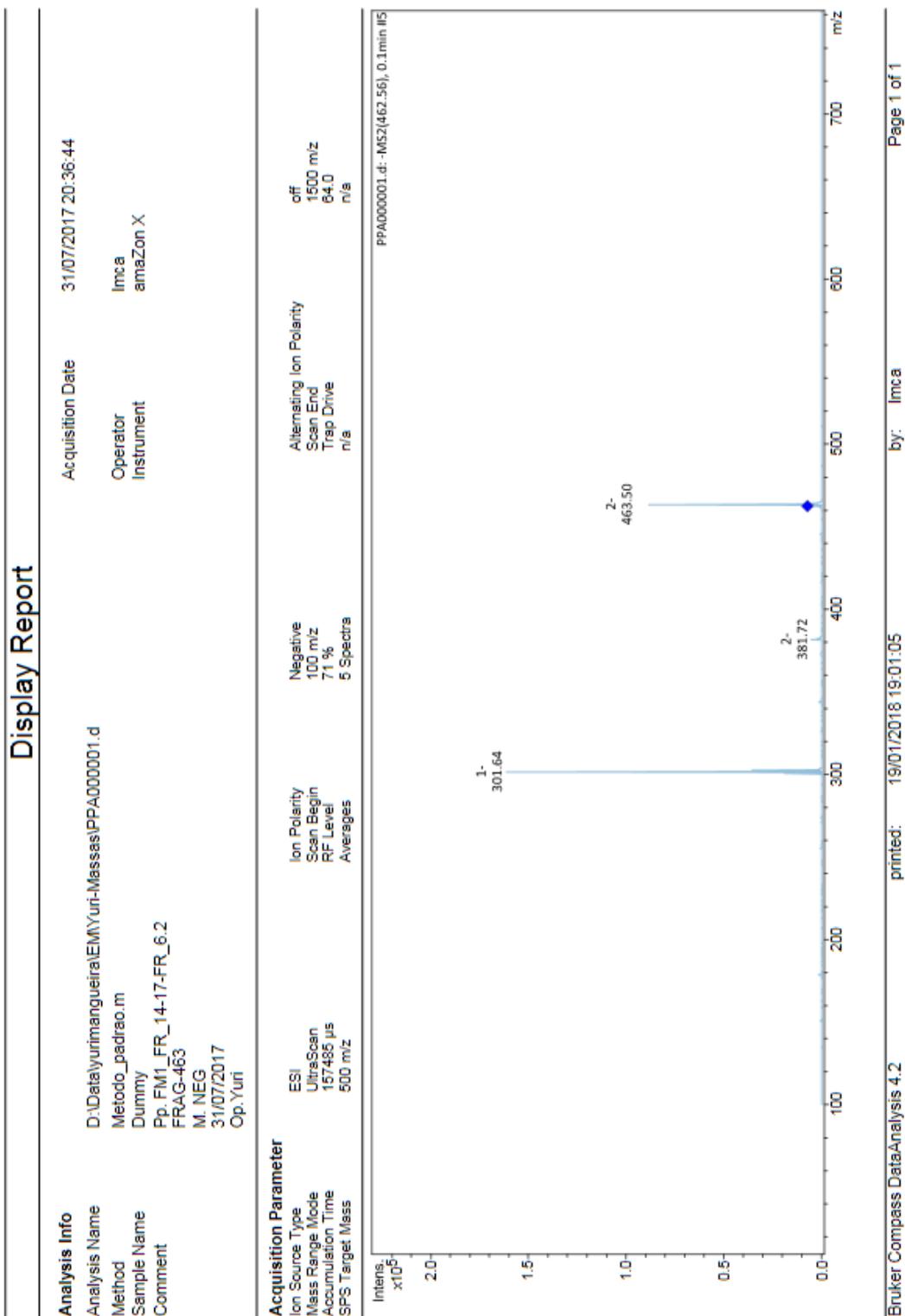


Figura 26 - Espectro de massas modo negativo de Cp-2

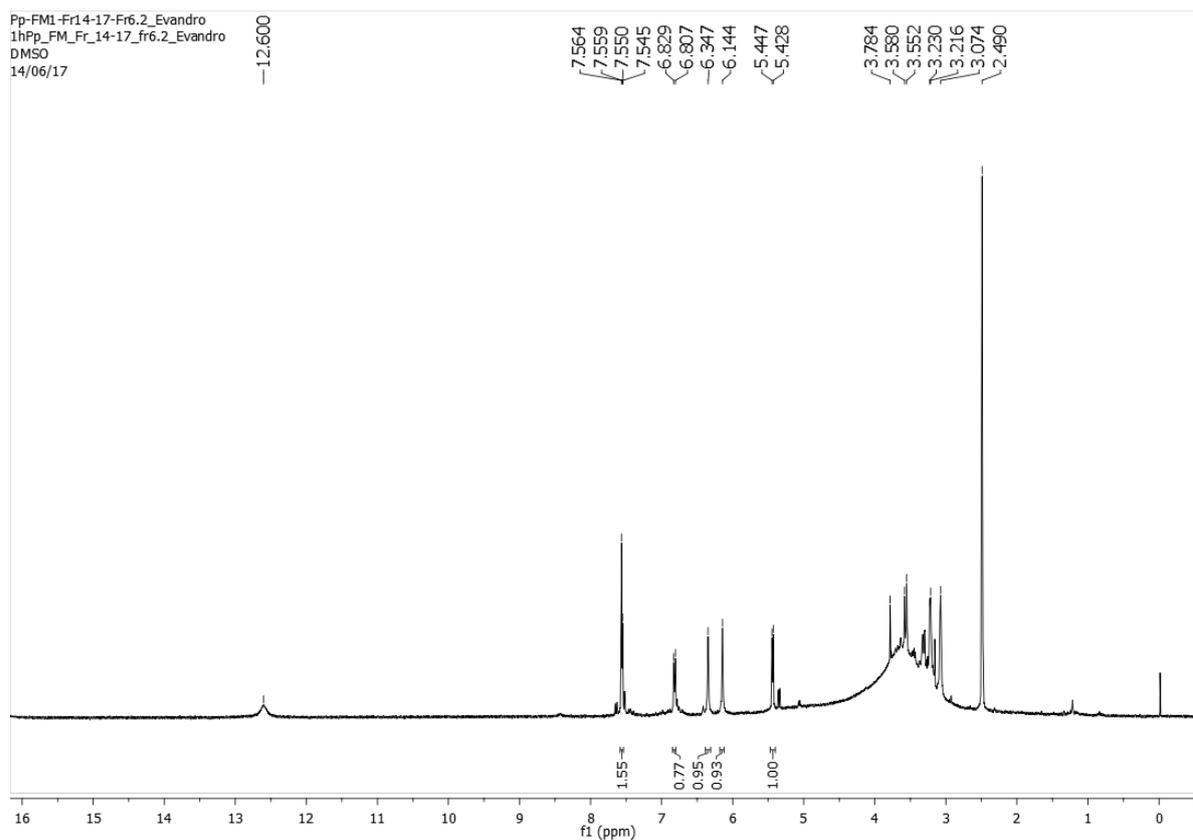


Figura 27 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) de Cp-2

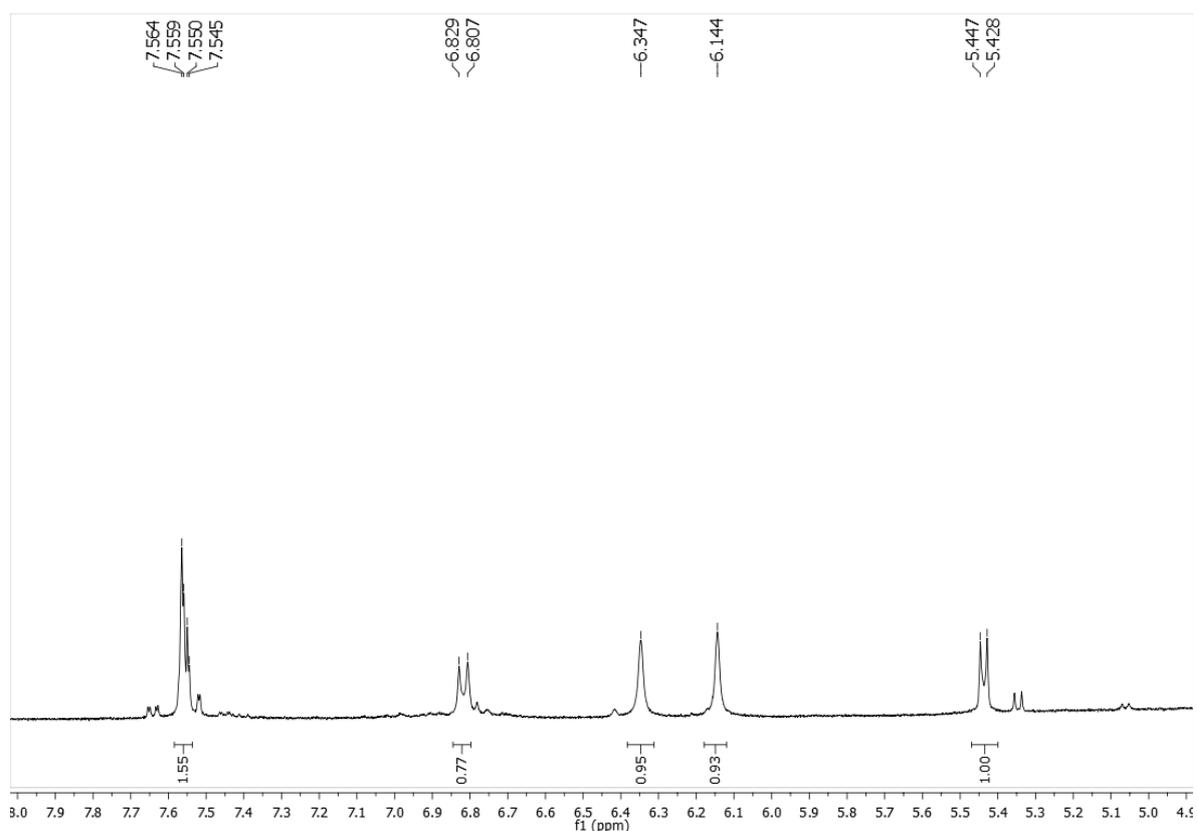
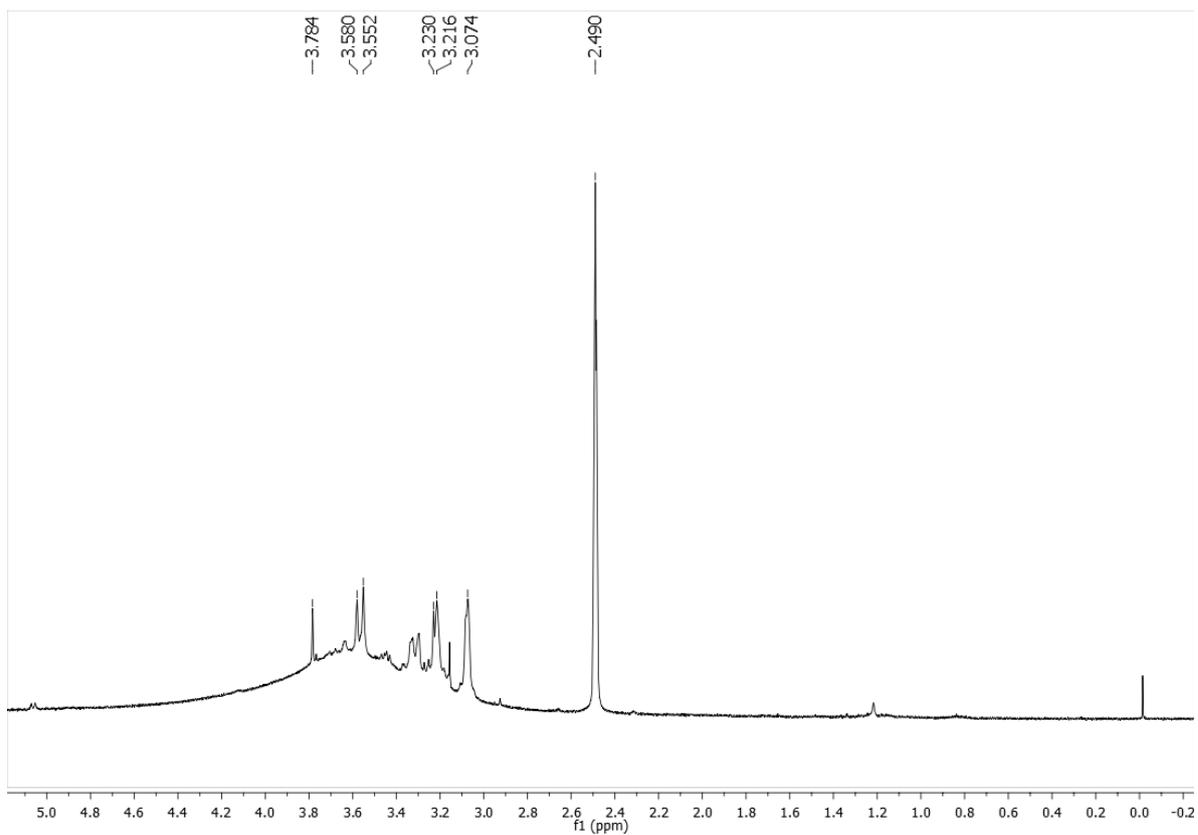
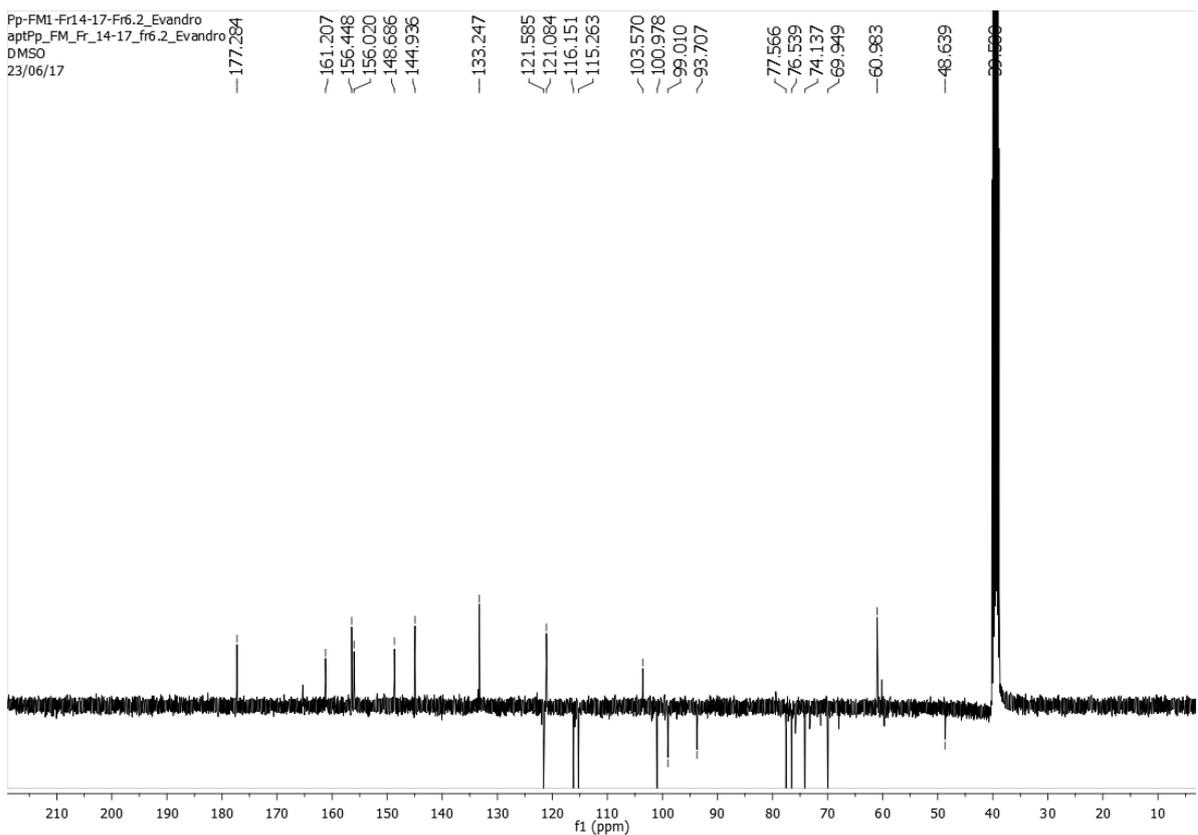


Figura 28 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) de Cp-2

Figura 29 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) de Cp-2Figura 30 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO-d_6) de Cp-2

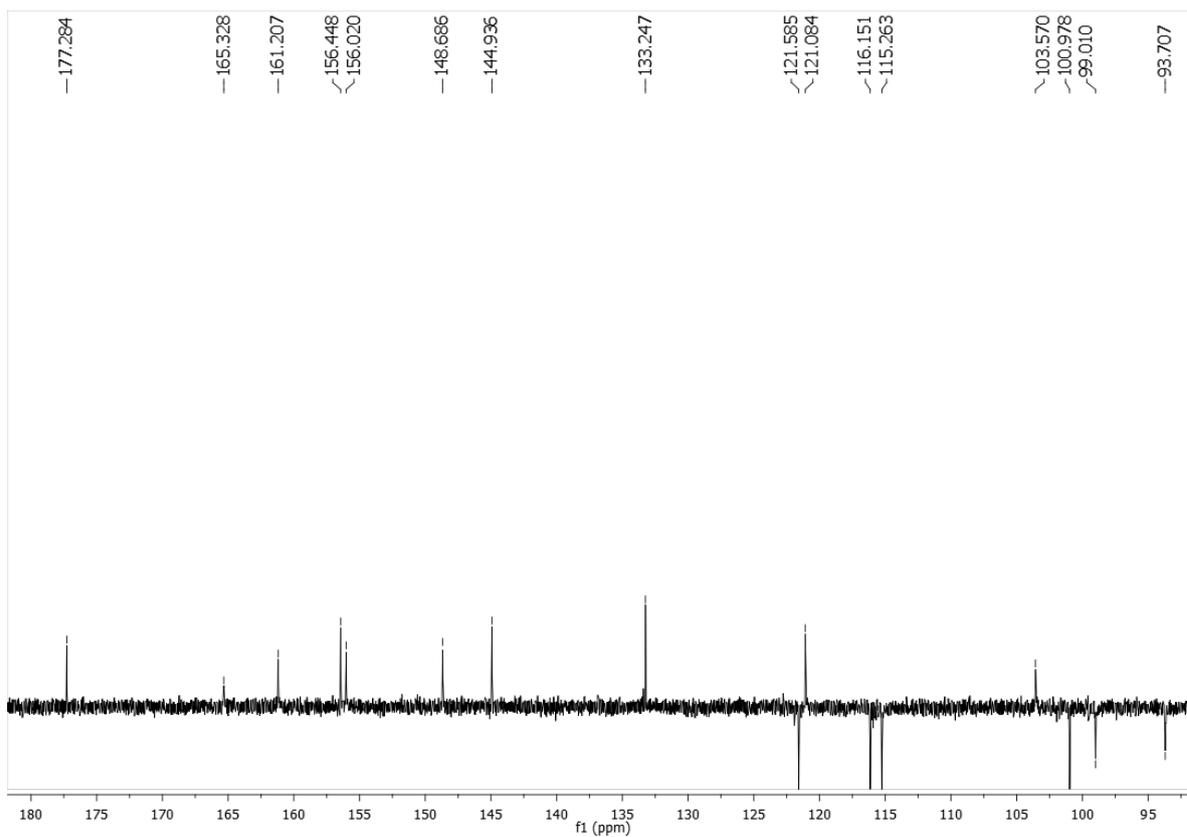


Figura 31 - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) de Cp-2 na região entre 180 - 93.

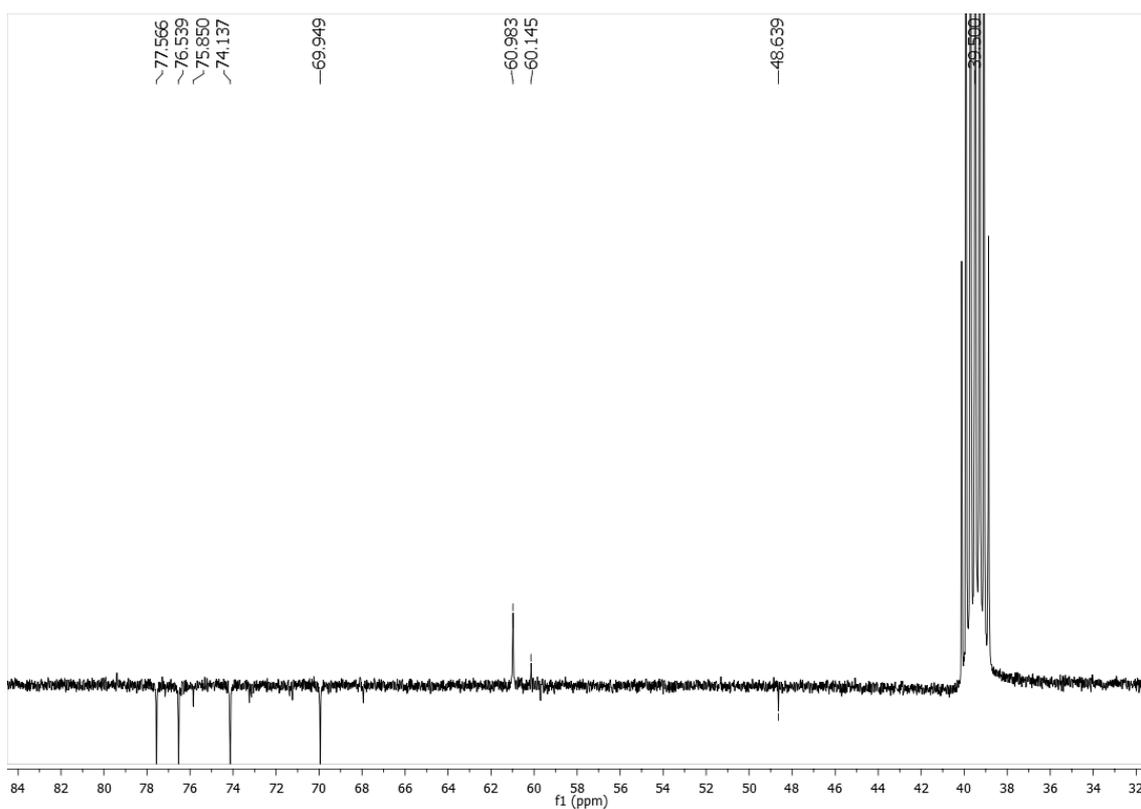


Figura 32 - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) de Cp-2 na região entre 84 - 32

Após análise dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C , bem como sua comparação com a literatura (PEREIRA et al., 2012) Tabela 10, foi possível identificar Cp-2 como sendo a flavona, 3,3',4',5,7-pentahidroxi-, 3- β -D-glicopiranosídeo, mais conhecida como quercetina 3-O- β -glicopiranosídeo (isoquercitrina) (Figura 33), isolada pela primeira vez no gênero *Chresta*.

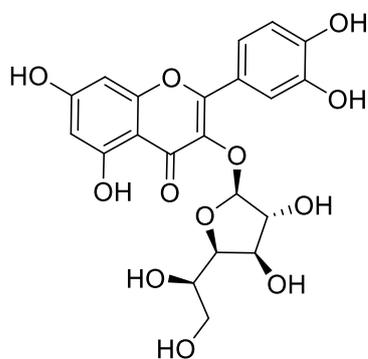


Figura 33 - Estrutura da Flavona, 3,3',4',5,7-pentahidroxi-, 3- β -D-glicopiranosídeo (Isoquercitrina)

Tabela 10 - Deslocamentos químicos, tipos de sinal e constantes de acoplamento (J) para os átomos de hidrogênio (δ_H) e carbono (δ_C) de Cp-2, verificados nos espectros de RMN de 1H e ^{13}C (400 e 100 MHz, respectivamente, DMSO- d_6), bem como, aqueles apresentados por (PEREIRA et al., 2012).

Posição	Cp - 2		Isoquercetrin	
	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
1	-	-	-	-
2	156,0	-	156,5	-
3	133,3	-	133,9	-
4	177,3	-	177,5	-
5	161,2	-	161,2	5- OH 12,29 s
6	99,0	6,144 (d)	99,1	6,20 (d, J=1,7 Hz)
7	165,3	-	165,1	-
8	93,7	6,374 (d)	94,0	6,38 (d, J=1,7Hz 2H)
9	156,4	-	156,8	-
10	103,6	-	103,9	-
1'	121,6	-	122,9	-
2'	116,4	7,56 (d, J=2 Hz, 2H)	116,4	7,54 (d, J=2,1 Hz)
3'	144,9	-	144,9	-
4'	148,7	-	148,7	-
5'	115,6	6,82 (d, J=8,4 Hz 2H)	115,5	6,83 (d, J=8,9Hz)
6'	121,1	8,03 (d, J=8,8Hz 2H)	122,2	7,56
1''	101,0		102,2	5,43 (d, J=7,5 Hz)
2''	74,1	3,58	71,7	3,23
3''	76,5	3,55	76,7	3,23
4''	69,9	3,23	70,2	3,08
5''	77,6	3,22	77,8	3,08
6''	60,9	3,78	61,0	3,57

Legenda: (d) dubleto; (s) singleto.

5.3.3. Determinação estrutural de Cp-3

O composto Cp – 3 apresentou-se como pó amorfo amarelo e exibiu TR (58,26 min) na cromatografia de CLAE Figura 20.

No espectro de RMN de 1H (400 MHz, DMSO- d_6) de Cp – 3 foi observado sinais de prótons aromáticos característicos de flavonoides (Figura 34). Um sigleto largo em δ_H 12,60 com integral para um hidrogênio foi atribuído a hidroxila da posição 5 (KRAFICYK; GLOMB, 2008).

Semelhante ao Cp-2 também foi percebido dois dubletos δ_H 6,16 ($J=2,0$) e δ_H 6,47 ($J=2,0$) (Figura 35) com integral para um hidrogênio cada acoplando meta entre si. Estes sinais foram atribuídos aos H-6 e H-8 respectivamente, sendo o H-6 mais protegido pois está orto a duas hidroxilas.

Foi observado um singleto intenso em δ_H 3,89 integrando para 3 hidrogênios atribuído ao grupo metoxila. Os sinais em δ_H 7,53 (1H, dd, $J = 6,8$ e $2,0$ Hz, H-6'), δ_H 6,92 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-5') e δ_H 7,54 (1H, d, $J = 1,6$ Hz, H-2'), revelaram presença de um sistema ABX através dos respectivos valores das constantes de acoplamento.

O espectro de RMN ^{13}C -APT (100 MHz) (Figura 36) exibiu dezesseis linhas espectrais aos quais foram atribuídos ao composto Cp-3, das quais a absorção em δ_C 55,9 foi associada a um carbono sp^3 oxigenado, e as quatorze linhas restantes na faixa de δ_C 94,2 – 165,0 foram relacionadas a carbonos sp^2 (Figura 37). Dentre os carbonos insaturados, observou-se que os seis sinais na faixa de δ_C 148,1 - 165,0 provavelmente se encontravam oxigenados.

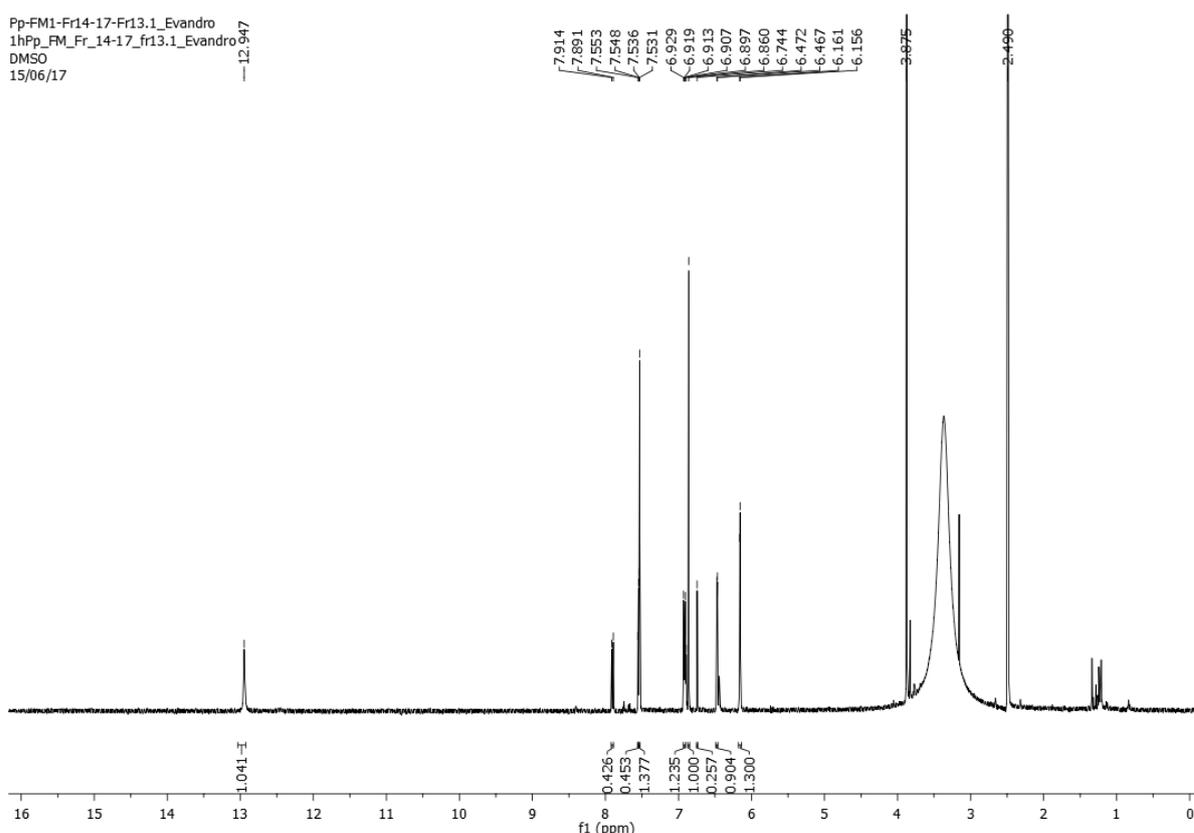


Figura 34 - Espectro de RMN de 1H (400 MHz, DMSO- d_6) de Cp-3.

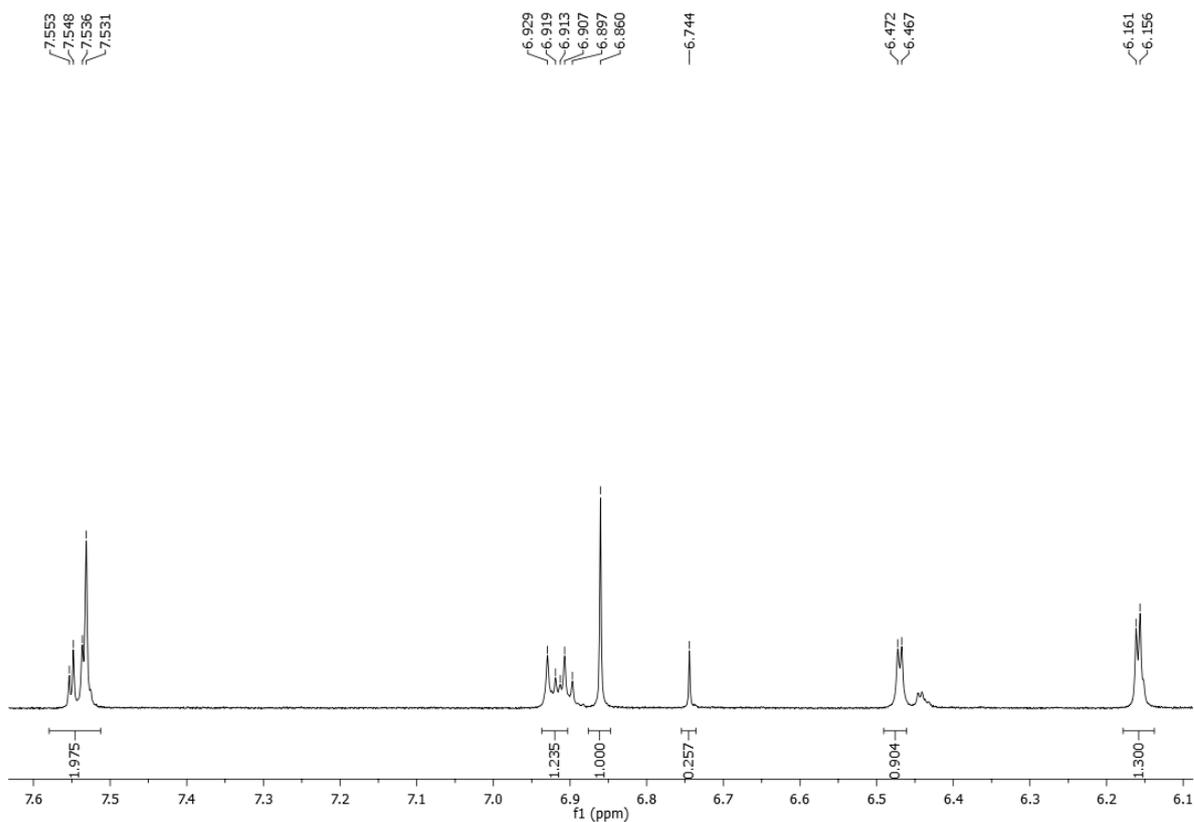


Figura 35 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) de Cp-3.

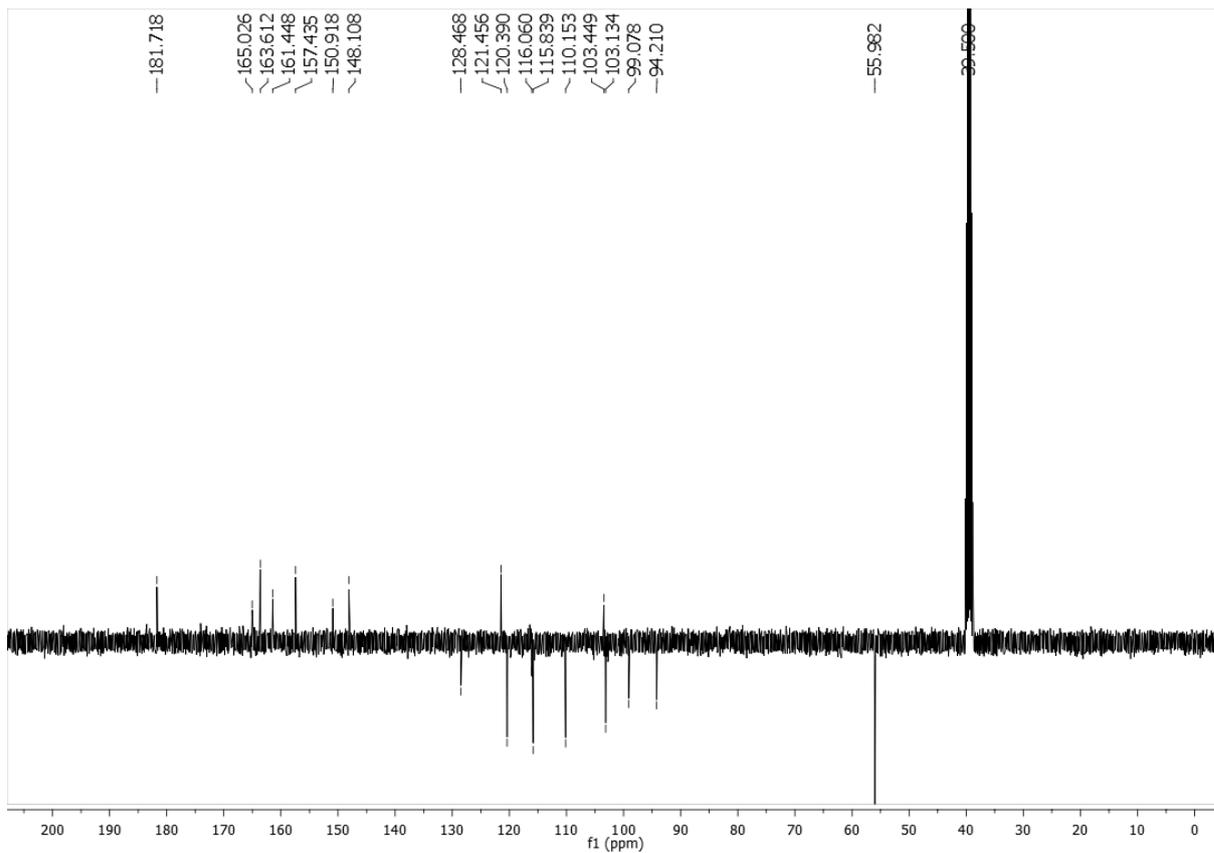


Figura 36 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO-d_6) de Cp-3

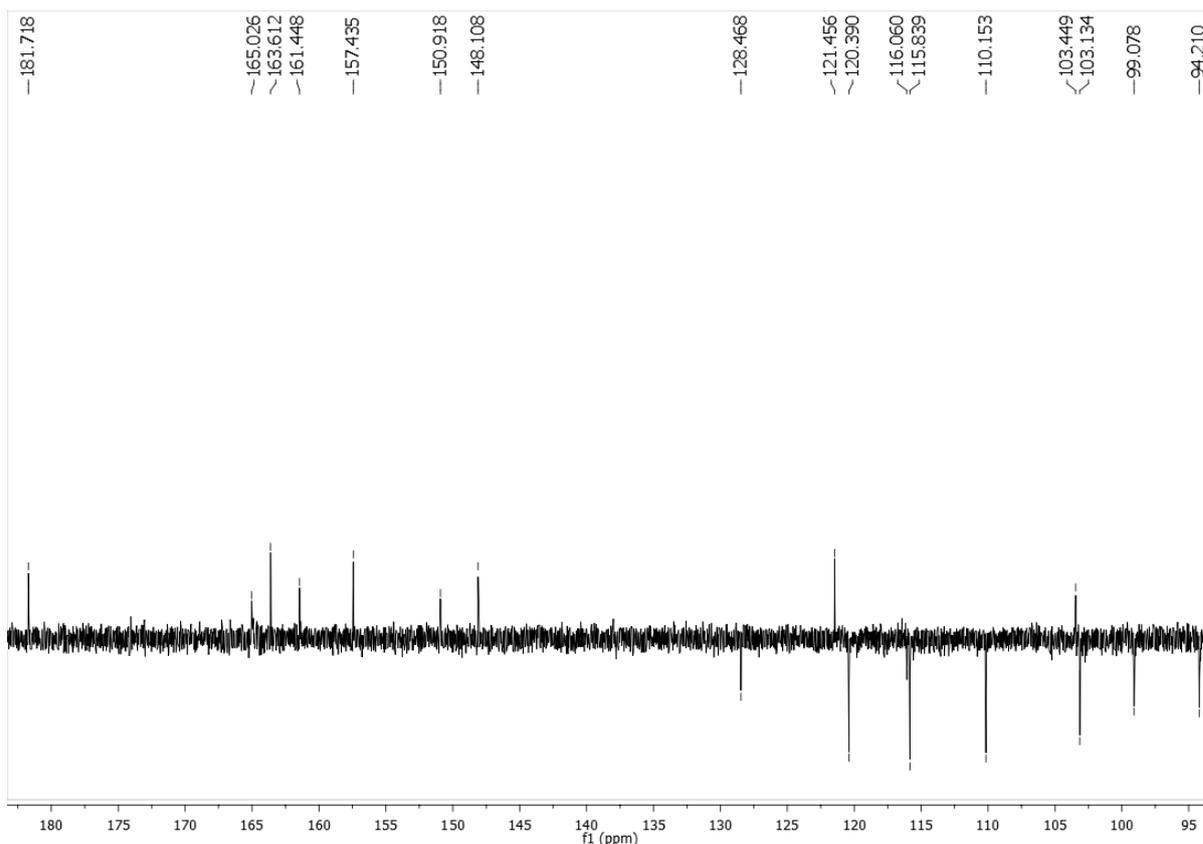


Figura 37 - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) de Cp-3

O espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear ^1H e ^{13}C a uma ligação, com detecção no canal de hidrogênio (HSQC) (Figura 38) e sua expansão (Figura 39) permitiu associar inequivocamente os sinais de todos os hidrogênios a seus respectivos carbonos (Tabela 11).

O espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C a mais de uma ligação, com detecção no canal de hidrogênio (HMBC) (Figura 40) revelou os acoplamentos à longa distância entre o hidrogênio olefínico em δ_{H} 6,87 (H-3) com os carbonos em δ_{C} 103,4 (C-10); δ_{C} 163,6 (C-2), δ_{C} 121,4 (C-2), e com o carbono carbonílico em δ_{C} 181,7 (C-4) (Figura 41), e definitivamente sugeriu a estrutura de uma flavona.

Nesse mesmo espectro, foram ainda observadas as correlações dos sinais dos hidrogênios aromáticos em δ_{H} 7,54 (H-2') e δ_{H} 7,53 (H-6') com o carbono oxigenado em δ_{C} 163,6 (C-2), e do hidrogênio em δ_{H} 6,93 (H-5') com os carbonos oxigenados em δ_{C} 121,4 (C-1') e δ_{C} 148,1 (C-3'). Tais informações levaram à confirmação de que o anel B encontrava-se 3',4' -O-dissubstituído. Após relacionar os dados de HMBC

com os de HSQC podemos afirmar que nas posições 3' e 4' estavam respectivamente uma metoxila (melhor observado na correção dos hidrogênios da metoxila δ_H 3,89 com o carbono em δ_C 148,1 (C-3') e uma hidroxila (Figura 42).

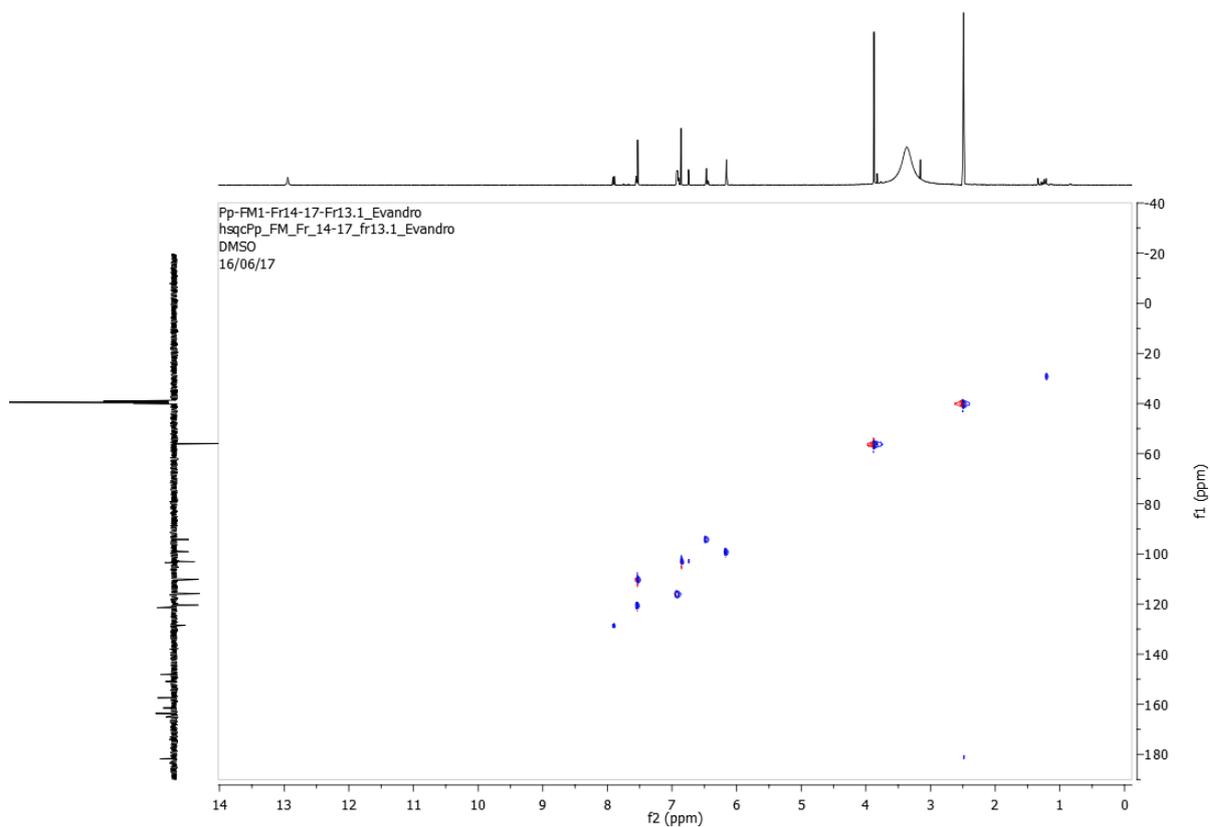


Figura 38 - Mapa de contorno HSQC de Cp-3 (DMSO- d_6 , 400 e 100 MHz).

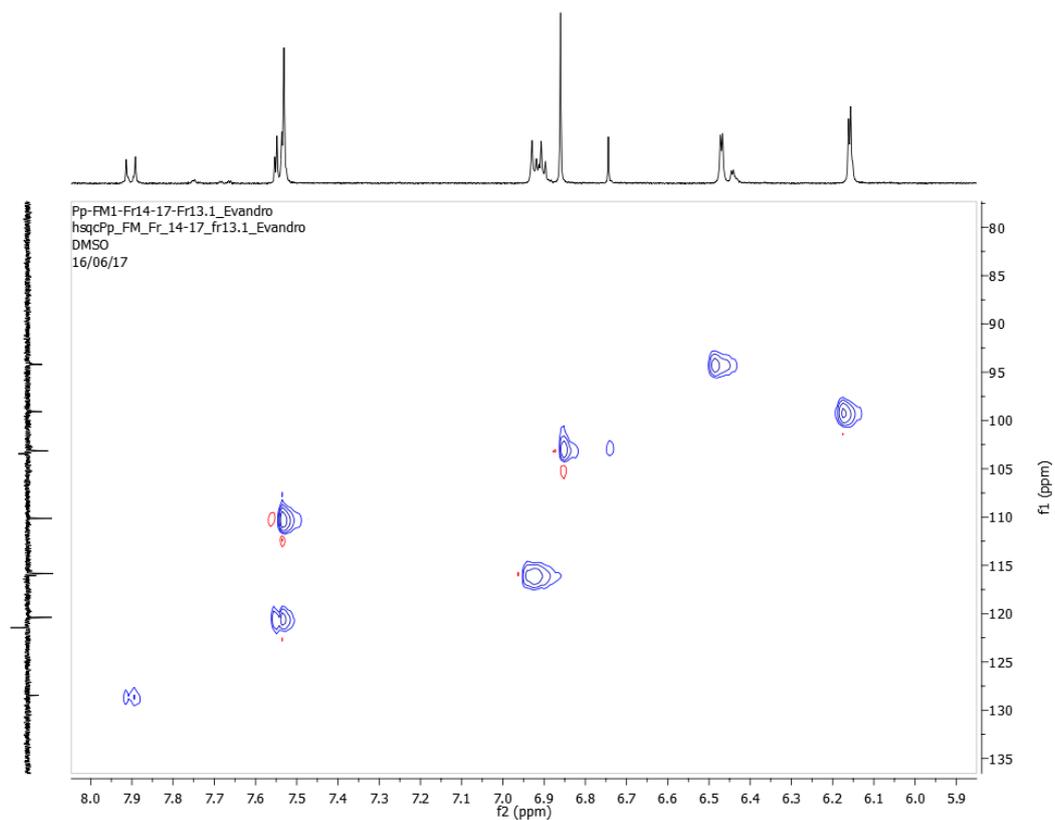


Figura 39 - Expansão do mapa de contorno HSQC de Cp-3 (DMSO- d_6 , 400 e 100 MHz) na região de (135-80 ppm) x (8,0-5,9 ppm).

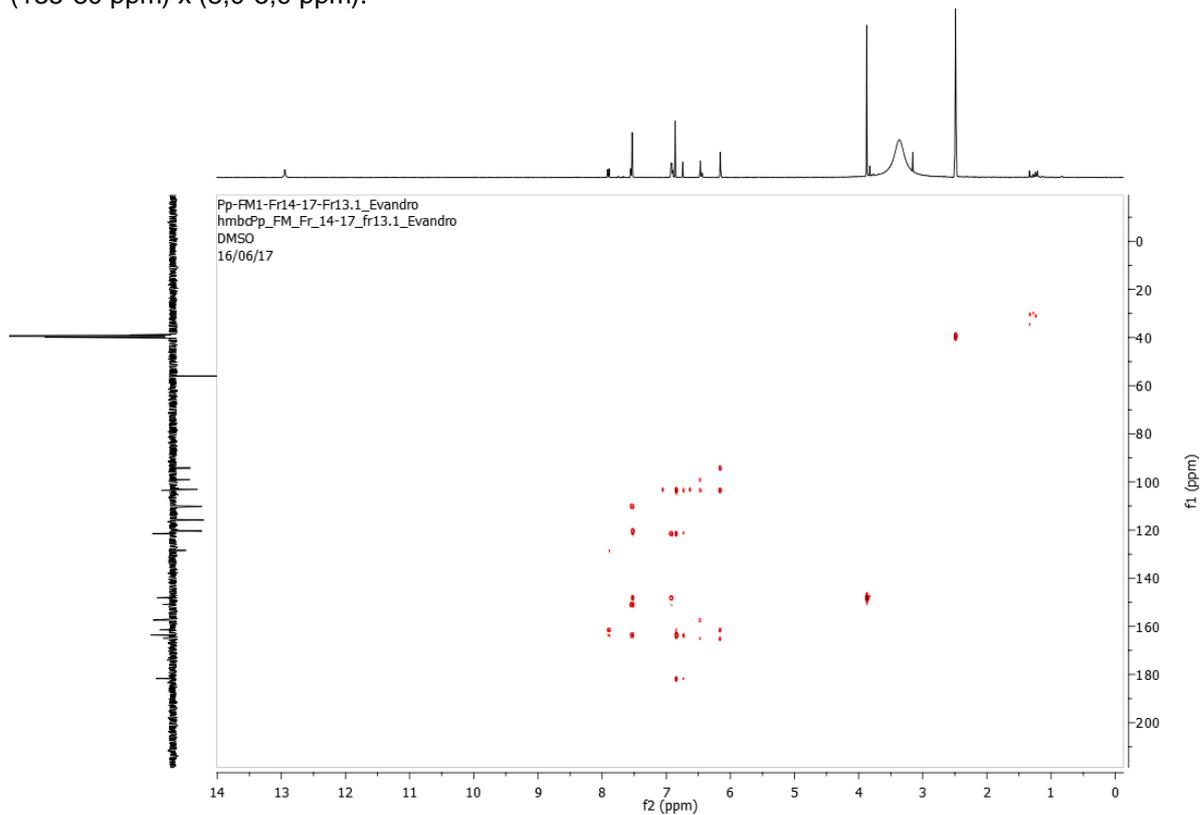


Figura 40 - Mapa de contorno HMBC de Cp-3 (DMSO- d_6 , 400 e 100 MHz).

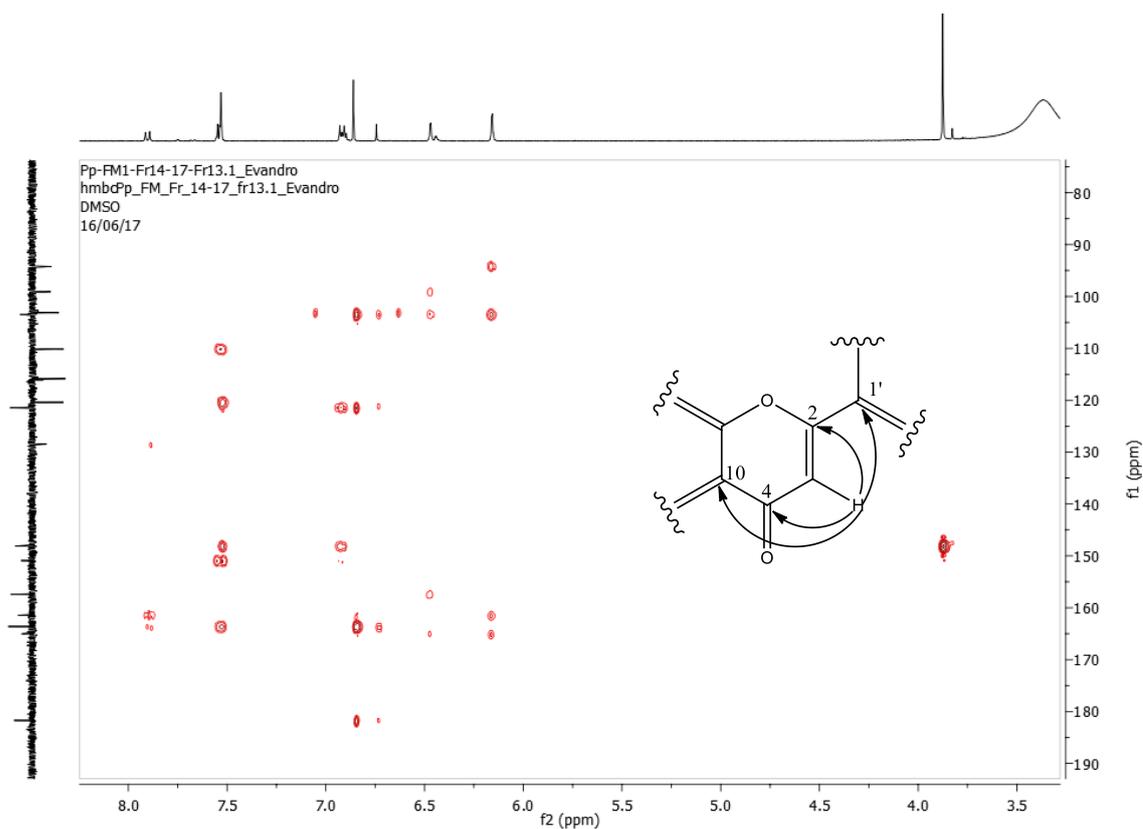


Figura 41 - Expansão do mapa de contorno HMBC de Cp-3 (DMSO- d_6 , 400 e 100 MHz) na região de (190-80 ppm) x (8,0-3,5 ppm).

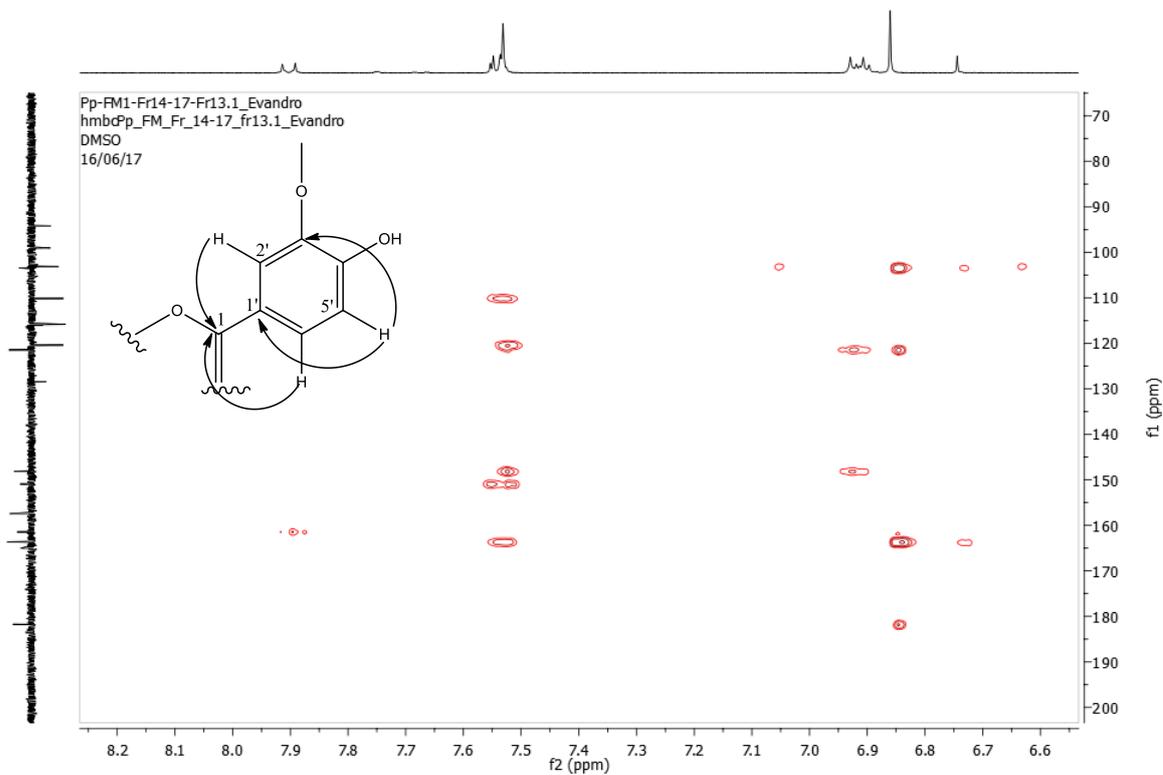


Figura 42 - Expansão do mapa de contorno HMBC de Cp-3 (DMSO- d_6 , 400 e 100 MHz) na região de (200-70 ppm) x (8,2-6,6 ppm).

Após análise dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C , bem como sua comparação com a literatura (PARK et al., 2007) e dados compilados na Tabela 11, foi possível identificar Cp-3 como sendo a da 5,7,4'-trihidroxi – 3' – metoxiflavona, mais conhecida como Crisoeriol (Figura 43), isolada pela primeira vez no gênero *Chresta*.

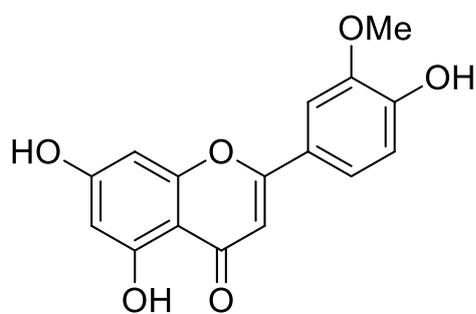


Figura 43 - Estrutura do Crisoeriol

Tabela 11 - Deslocamentos químicos, tipos de sinal e constantes de acoplamento (J) para os átomos de hidrogênio (δ_H) e carbono (δ_C) de Cp-3, verificados nos espectros de RMN de 1H e ^{13}C (400 e 100 MHz, respectivamente, DMSO- d_6), bem como, aqueles apresentados por (PARK et al., 2007).

Posição	Cp - 3				Crisorieol	
	$^1H \times ^{13}C$ HSQC		$^1H \times ^{13}C$ HMBC		δ_C	δ_H
	δ_C	δ_H	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$		
1		-				-
2	163,6	-	H-3	H-2'	163,7	-
3	103,1	6,87 (s)			103,2	6,88 (s)
4	181,7	-	H-3		181,8	-
5	161,4	-			161,5	-
6	99,0	6,16 (d $J=2,0$)			98,9	6,19 (d $J=2,0$)
7	165,0	-			164,2	-
8	94,2	6,48 (d, $J=2$)			94,1	6,50 (d, $J=2$)
9	157,4	-			157,4	-
10	103,4	-		H-3	103,7	-
1'	121,4	-		H-3/H-5'	121,5	-
2'	110,1	7,54 (d, $J=8,8$ Hz 2H)		H-6'	110,2	7,54 (m)
3'	148,1	-	H-2'	H-5'	148,1	-
4'	150,9	-		H-6'	150,8	-
5'	115,8	6,93 (d, $J=8,4$ Hz 1H)			115,8	6,93 (d, $J=8,9$ Hz)
6'	120,4	7,54 (dd 2H)			120,4	7,55 (dd, $J=8,8$ Hz 2H)
3' - OMe	55,9	3,89 (s)	H-3'		56,0	3,89 (s)
5 - OH		12,96				12,96

5.3.4. Determinação estrutural de Cp-4

A substância Cp – 4 apresentou-se como um pó amorfo marrom e apresentou tempo de retenção (9.18 min) na cromatografia de CLAE Figura 20.

No espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) de Cp – 4 foi observado sinais de prótons aromáticos característicos de compostos fenólicos (Figura 44). Foram observados dois dubletos em δ_{H} 6,70 e δ_{H} 7,23 integrando para um hidrogênio cada. Um sinal foi percebido em δ_{H} 7,32 (1H).

O espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) de Cp – 4 (Figura 45) apresentou cinco sinais na região entre δ_{H} 120 -150. Como o composto Cp-4 teve uma massa muito reduzida e os dados de ^1H e ^{13}C não deram subsídios necessários para elucidação da estrutura, então, lançamos mão de técnicas como HSQC (Figura 46) e HMBC (Figura 47). Na expansão do espectro de correlação de indireta a mais de uma ligação HMBC (Figura 48), evidenciou outros sinais que não eram perceptíveis no espectro de ^{13}C , com isso foi possível assinalar mais dois sinais δ_{H} 125,1 e δ_{H} 169,2 relativos ao composto Cp-4.

Pp-FM1-Fr14-17-Fr2-Evandro
1h_supr_Pp-FM1-Fr14-17-Fr2-Evandro
DMSO
04/08/17
Op Evandro

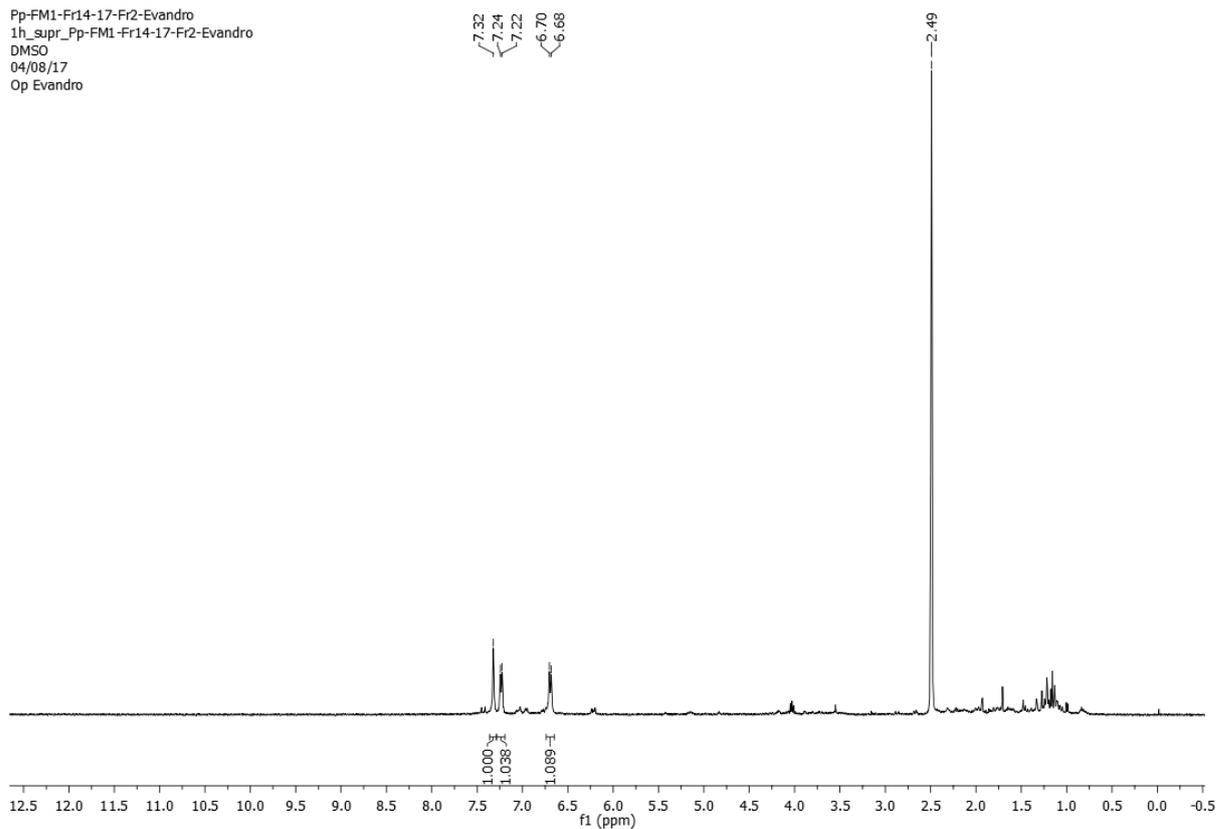


Figura 44 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) de Cp-4

Pp-FM1-Fr14-17-Fr2-Evandro
13C_bb_Pp-FM1-Fr14-17-Fr2-Evandro
DMSO
12/08/17
Op Evandro

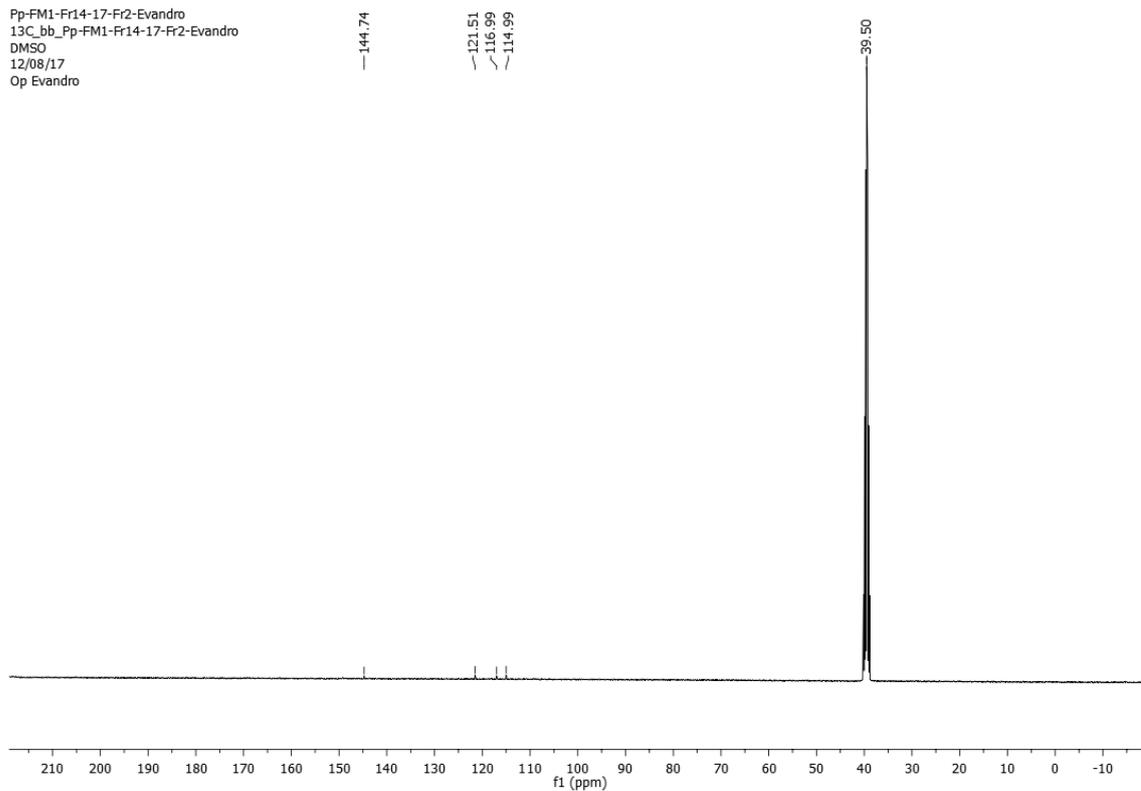


Figura 45 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) de Cp-4

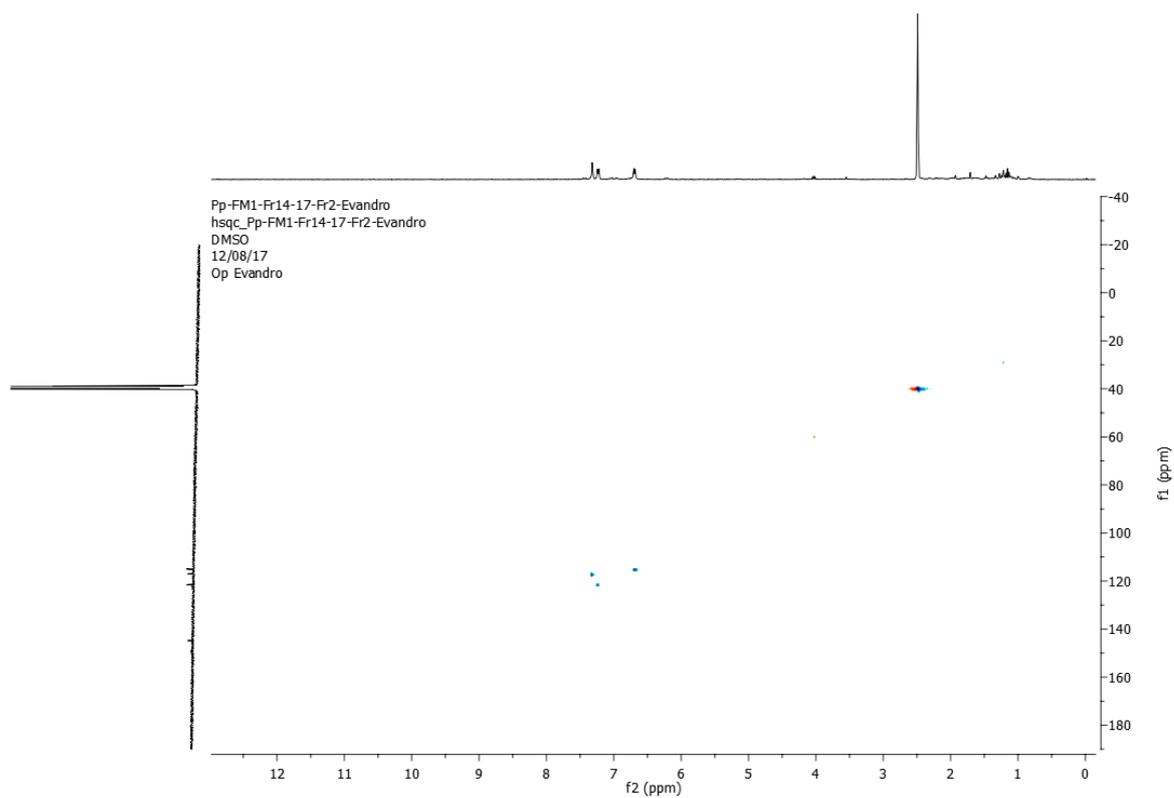


Figura 46 - Mapa de contorno HSQC de Cp-4 (DMSO-*d*₆, 400 e 100 MHz).

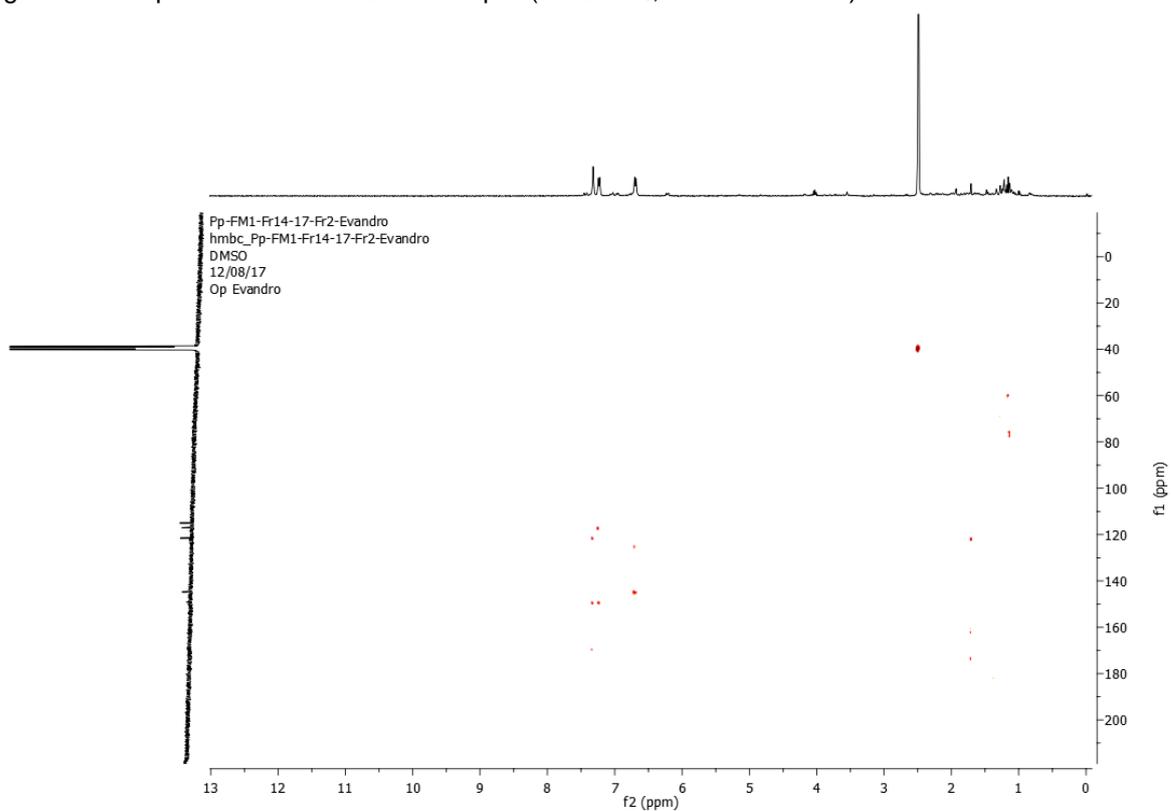


Figura 47 - Mapa de contorno HMBC de Cp-4 (DMSO-*d*₆, 400 e 100 MHz).

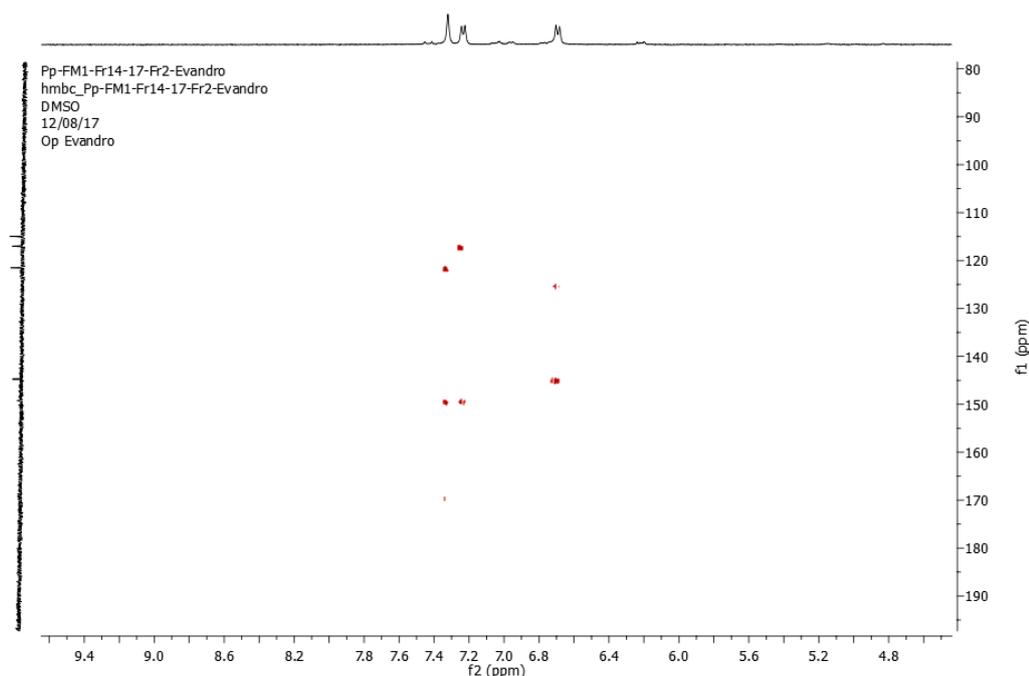


Figura 48 - Expansão do mapa de contorno HMBC de Cp-4 (DMSO- d_6 , 400 e 100 MHz) na região de (190-80 ppm) x (9,4-4,8 ppm).

Após análise dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C , bem como sua comparação com a literatura (MOURA; VILEGA; SANTOS, 2011) e dados compilados na Tabela 12 foi possível identificar Cp-4 como sendo o ácido 3,4-diidroxibenzoico, mais conhecido como ácido protocatecuico, isolada pela primeira vez no gênero *Chresta*.

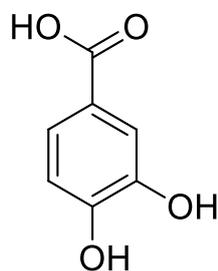


Figura 49 - Estrutura do ácido 3,4-diidroxibenzoico (ácido protocatecuico)

Tabela 12 - Deslocamentos químicos, tipos de sinal e constantes de acoplamento (J) para os átomos de hidrogênio (δ_H) e carbono (δ_C) de Cp-4, verificados nos espectros de RMN de 1H e ^{13}C (400 e 100 MHz, respectivamente, DMSO- d_6), bem como, aqueles apresentados por (MOURA; VILEGA; SANTOS, 2011).

Posição	Cp - 4			Ácido Protocatecuico	
	δ_C	δ_H	$^1H \times ^{13}C$ HMBC - J_3	δ_C	δ_H
1	125,1 (HMBC)	-	H-5	-	-
2	116,9	7,32	H-6	117,1	7,32 (d $J=1,5$)
3	144,8	-	H-5	145,0	-
4	149,1	-	H-6/ H-2	150,0	-
5	114,4	6,69 (d, $J=8,0$)		114,4	6,76(d, $J=8,5$)
6	121,4	7,23	H-2	122,4	7,23 (dd $J=8,5$ e 1,5)
1'	169,2 (HMBC)	-	H-2	167,0	-

5.3.5. Determinação estrutural de Cp-5

O composto Cp – 5 apresentou-se como sólido amorfo amarelo e exibiu TR (47.21min) no cromatograma de CLAE Figura 20.

O espectro de RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) de Cp – 5 e suas expansões (Figura 50 e Figura 51) revelaram a presença de sinais na faixa de δ_{H} 7,89 a δ_{H} 6,15, os quais foram associados a hidrogênios ligados a carbonos sp^2 . Dentre estes, os dupletos centrados em δ_{H} 7,89 (2H, d, $J = 8,0$ Hz) e δ_{H} 6,91 (2H, d, $J = 8,0$ Hz). Essas constates de acoplamento são sugestivos hidrogênios que guardam uma relação orto entre si (PAVIA; LAMPMAN, 2016) esses foram atribuídos a H-2'/6' e H-3'/5' respectivamente.

O deslocamento químico em δ_{H} 6,45 (1H, s) corroborado pela inexistência de sinal em δ_{H} 3,76 característico de hidrogênios de metoxila (HARBORNE; MABRY, 1982a), atesta que não há substituição na posição C-3.

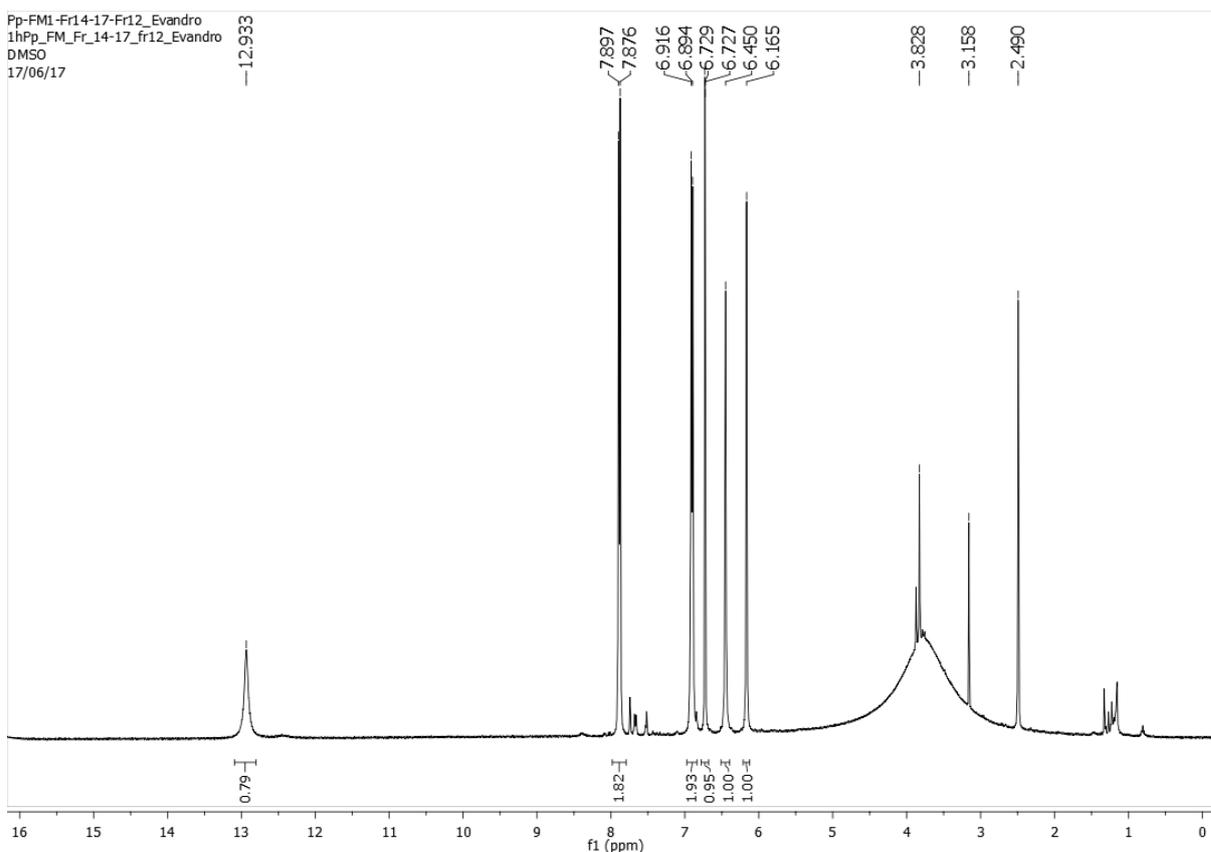


Figura 50 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) de Cp-5

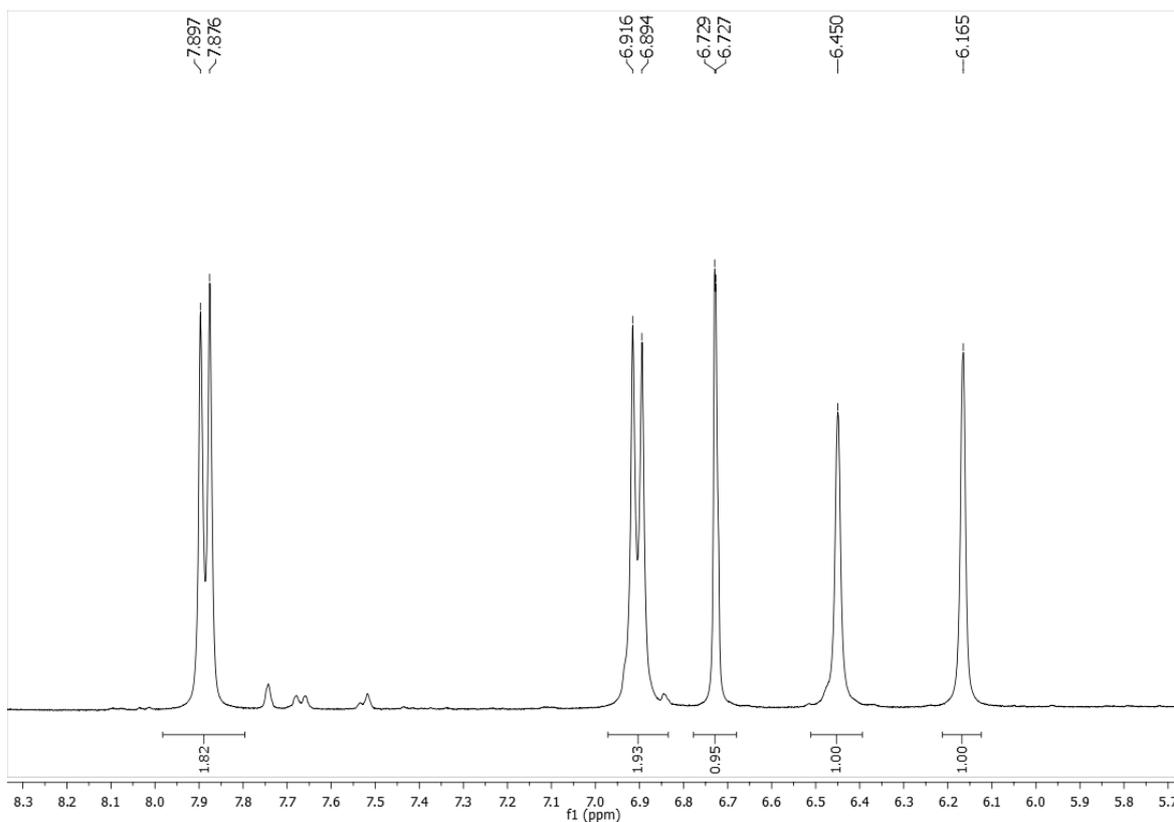


Figura 51 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) de Cp-5

O espectro de RMN ^{13}C -APT (100 MHz) de Cp - 5 exibiu treze linhas espectrais atribuídos a 15 carbonos (Figura 52). A absorção em δ_{C} 181,7 foi claramente atribuída a uma carbonila conjugada. Dentre os demais sinais, sete correspondem a carbonos não hidrogenados e cinco sinais a metínicos aromáticos, esses sinais eram sugestivos de esqueleto de flavona. A inexistência de sinais em δ_{C} 139,4 de C-3 e metoxila em δ_{C} 60,5 corroboram com a inexistência de substituição na posição C-3 (MARKHAM; CHARI, 1982).

Os sinais em δ_{C} 98,9 e δ_{C} 94,0 foram atribuídos a C-6 e C-8 do anel A de flavonas 5,7 substituídas. O sinal em δ_{C} 128,5 foi atribuído ao C-2' e C-6' e, δ_{C} 116,0 a C-3' e C-5', confirmando a proposta de flavona com sistema AA'BB'.

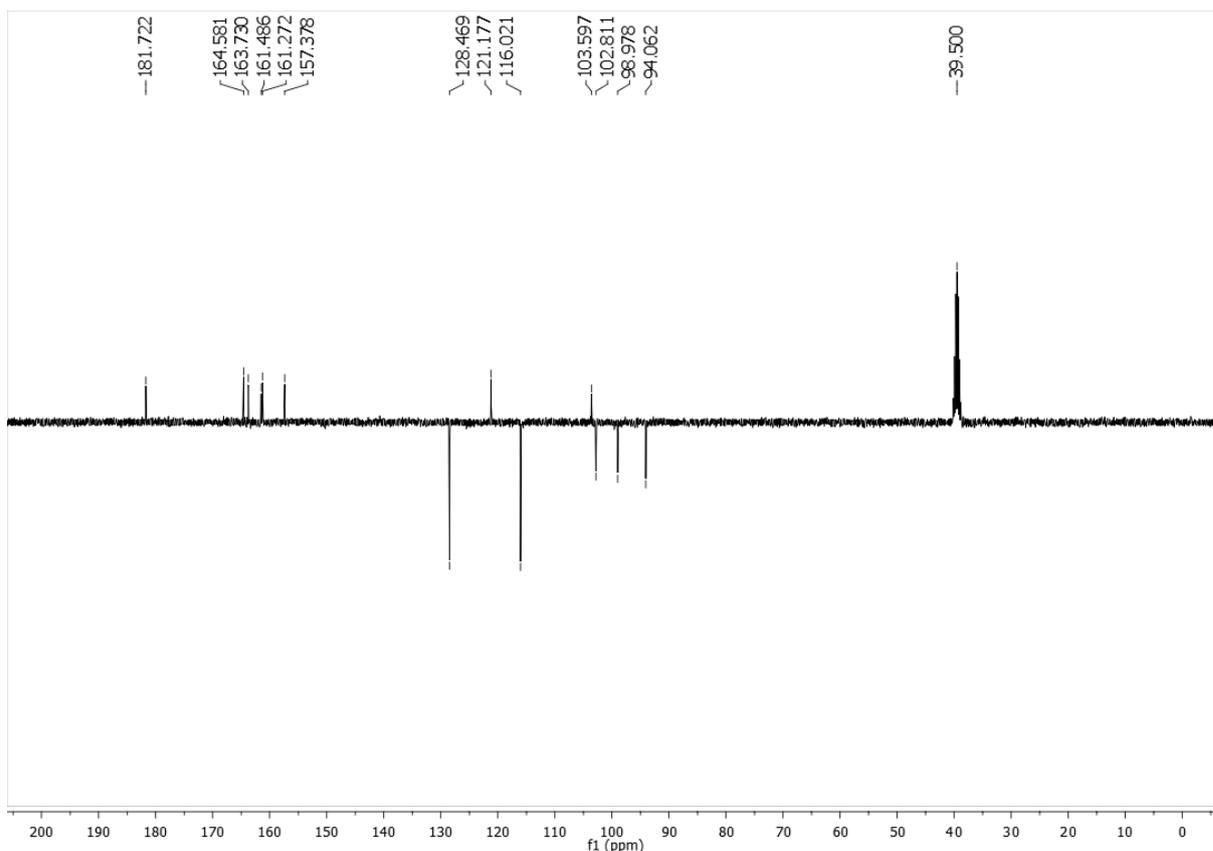


Figura 52 - Espectro de RMN de ^{13}C -APT (100 MHz, DMSO-d_6) de Cp-5

Após compilação dos dados de ^1H e ^{13}C e Tabela 13 e comparação com dados da literatura (ALI A. ALWAHSH; KHAIRUDDEAN; KENG CHONG, 2015), podemos afirmar que o composto se tratava do 5,7,4'-trihidroxi-flavona, também conhecido com apigenina, composto esse já isolado anteriormente na espécie *C. pacourinoides*. Na farmacologia já foi relatado seu potencial no estresse oxidativo (DORNAS et al., 2009).

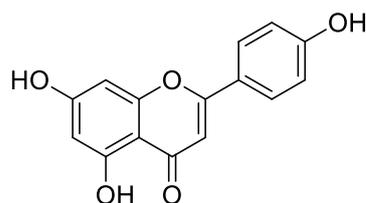


Figura 53 - Estrutura da Apigenina

Tabela 13 - Deslocamentos químicos, tipos de sinal e constantes de acoplamento (J) para os átomos de hidrogênio (δ_H) e carbono (δ_C) de Cp-5, verificados nos espectros de RMN de 1H e ^{13}C (400 e 100 MHz, respectivamente, DMSO- d_6), bem como, aqueles apresentados por (ALI A. ALWAHSH; KHAIRUDDEAN; KENG CHONG, 2015).

Posição	Cp - 5		Apigenina	
	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
1	-	-	-	-
2	163,7	-	163,7	-
3	102,8	6,72	102,8	6,78(s, 1H)
4	181,7	-	181,7	-
5	161,5	-	161,5	-
6	98,9	6,16	98,8	6,19 (d $J=2,0$, 1H)
7	164,6	-	164,3	-
8	94,1	6,45	94,0	6,48 (d, $J=2,0$ 1H)
9	157,4	-	157,3	-
10	103,6	-	103,6	-
1'	121,2	-	121,2	-
2'	128,5	7,89 (d, $J=8,4$ Hz 2H)	128,5	7,93 (d, $J=8,8$ Hz 2H)
3'	116,0	6,91 (d, $J=8,8$ Hz 1H)	116,0	6,93 (d, $J=8,8$ Hz 2H)
4'	161,3	-	161,2	-
5'	116,0	6,91 (d, $J=8,8$ Hz 1H)	116,0	6,93 (d, $J=8,8$ Hz 2H)
6'	128,5	7,89 (d, $J=8,4$ Hz 2H)	128,5	7,93 (d, $J=8,8$ Hz 2H)
5-OH	12,93	-	-	-

5.3.6. Determinação estrutural de Cp-6

A substância Cp – 6 apresentou-se como um pó amorfo amarelo e apresentou TR de 38.21 min no cromatograma de CLAE Figura 20.

No espectro de RMN de 1H (400 MHz, MeOD) de Cp - 6 (Figura 54) e suas expansões (Figura 55) foi observado sinais semelhantes ao Cp - 5. Nos sinais referentes ao anel A, δ_H 6,12 (H-6) e δ_H 6,29 (H-8) não houve mudança significativa, no entanto, foi observado um sinal em δ_H 3,73 com integral para três hidrogênios, sinal esse característico de metoxila (HARBORNE; MABRY, 1982a).

No composto Cp-6, ao contrário da apigenina (Figura 51), não foi observado o singlete relativo a C-3. (STOCHMAL et al., 2001). Foram observados dois dubletos, um em δ_H 7,45 (1H, $J = 2$) outro em δ_H 6,85 (1H, $J=8$) além do sinal em δ_H 7,57, sugestivo de anel B dissustituído de flavona.

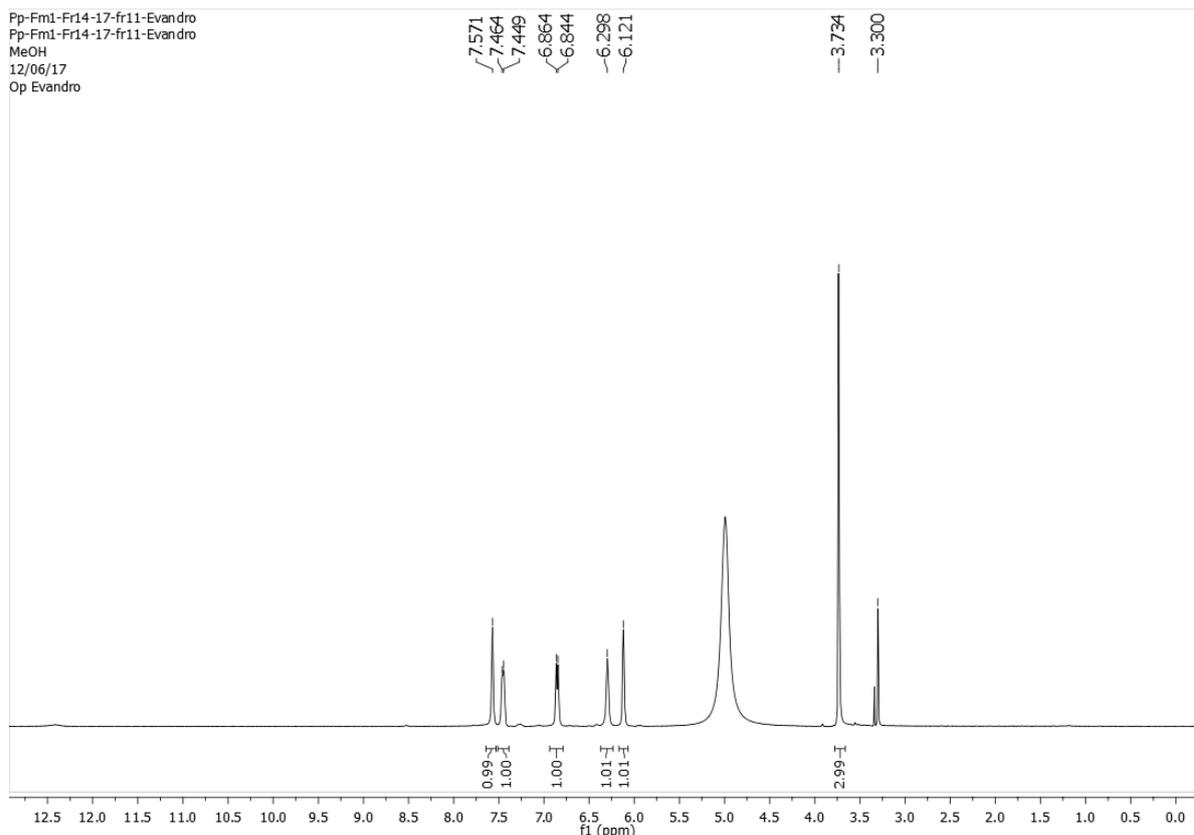


Figura 54 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, MeOD) de Cp-6

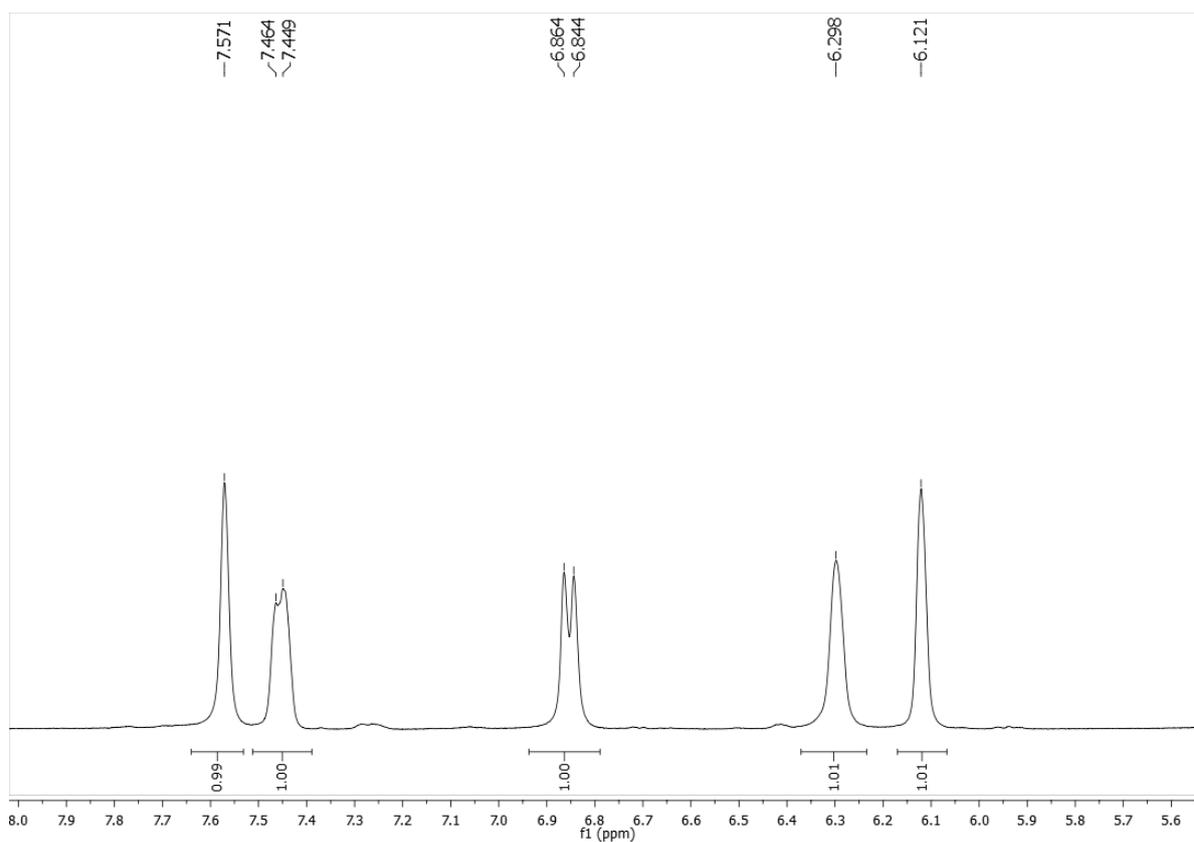


Figura 55 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, MeOD) de Cp-6

Nos dados de RMN de ^{13}C (100 MHz, MeOD) de Cp-6 (Figura 56) e (Figura 57) foi possível observar dezesseis sinais atribuídos ao composto Cp -6. A presença de uma linha espectral em δ_{C} 60,46, típico de carbono de metoxila (HARBORNE; MABRY, 1982a), confirmou o que havia sido proposto através do espectro de hidrogênio que na posição C-3 estava presente um grupo OCH_3 .

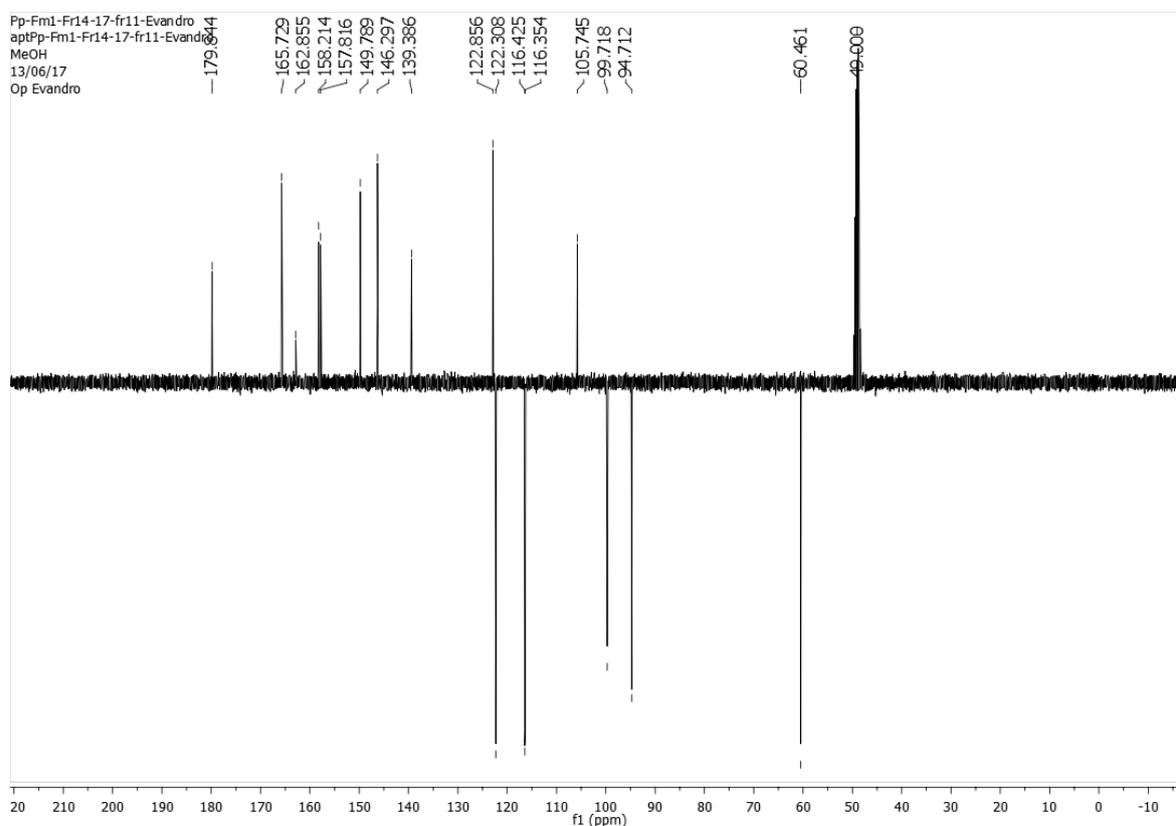


Figura 56 - Espectro deRMN de ^{13}C (100 MHz, MeOD) de Cp-6

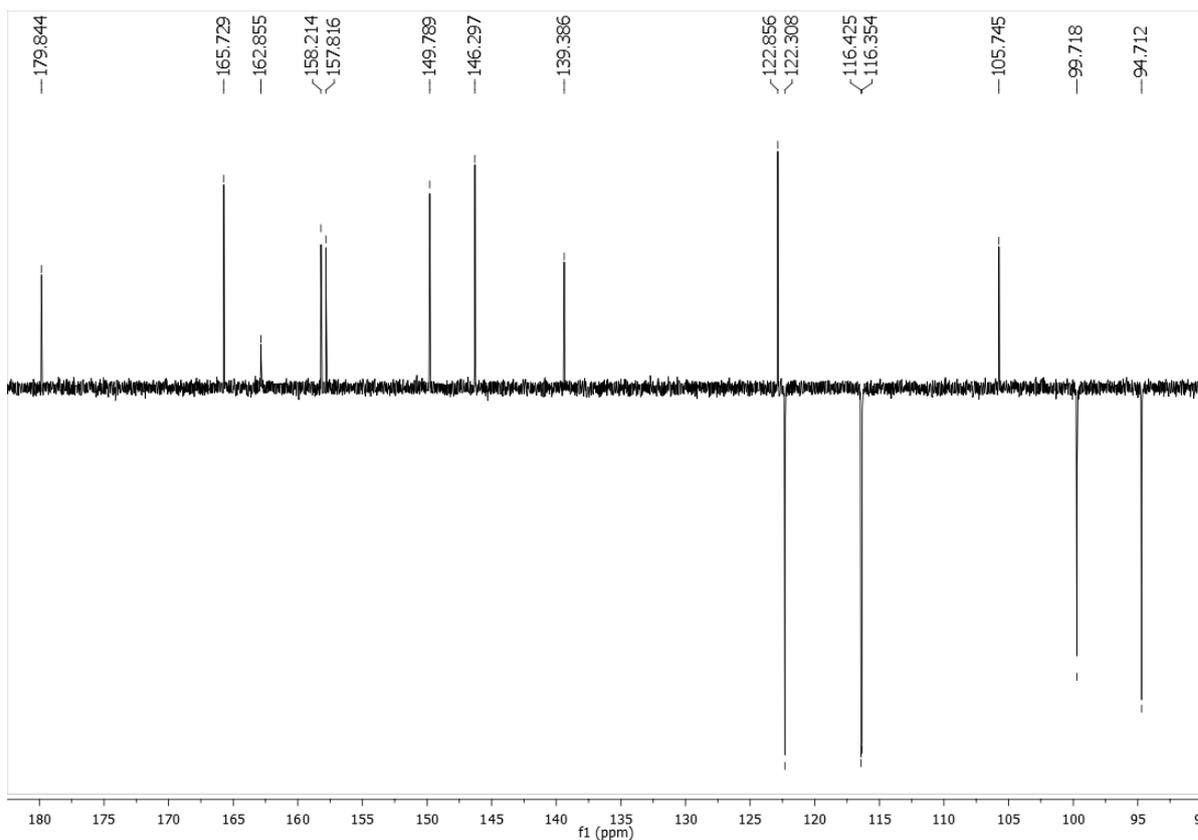


Figura 57 - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, MeOD) de Cp-6

Após compilação dos dados de ^1H e ^{13}C , Tabela 14, e comparação com dados da literatura (WANG et al., 2010) podemos afirmar que o composto Cp-6 se tratava do 3-metoxi-5,7,3',4'-tetrahidroxiflavona, também conhecido com 3-ometilquercetina, composto esse já isolado anteriormente na espécie *C. pacourinoides*. Há relatos de atividade antiinflamatória, citotoxicidade frente a cepas de câncer humano (SK-MEL, KB, BT-549, SK-OV-3) (AHMED et al., 2018).

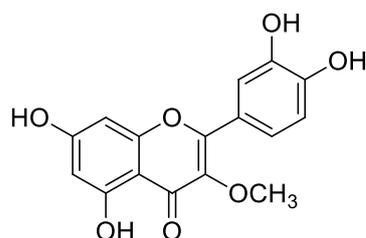


Figura 58 - 3-Ometilquercetina

Tabela 14 - Deslocamentos químicos, tipos de sinal e constantes de acoplamento (J) para os átomos de hidrogênio (δ_H) e carbono (δ_C) de Cp-6, verificados nos espectros de RMN de 1H e ^{13}C (400 e 100 MHz, respectivamente, DMSO- d_6), bem como, aqueles apresentados (WANG et al., 2010)

Posição	Cp - 6		3-Ometilquercetina	
	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
1	-	-	-	-
2	157,8	-	155,8	-
3	139,4	-	137,8	-
4	179,8	-	178,0	-
5	162,8	-	161,4	-
6	99,7	6,12 (1H)	93,7	6,20 (d $J=2,0$, 1H)
7	165,7	-	164,3	-
8	94,7	6,29 (1H)	98,7	6,41 (d, $J=2,1$ 1H)
9	158,2	-	156,5	-
10	105,7	-	104,3	-
1'	122,9	-	121,0	-
2'	116,3	7,57 (1H)	115,6	7,56 ($J=2,2$ Hz 1H)
3'	146,3	-	145,4	-
4'	149,8	-	148,9	-
5'	116,4	6,85 (d, $J=8,0$ Hz 1H)	115,9	6,92 (d, $J=8,5$, Hz 2H)
6'	122,3	7,89 (d, H)	120,7	7,40 (dd, $J=8,4$ e
OCH ₃	60,5	3,734 s	59,8	3,78 s(3H)

5.3.7. Determinação estrutural de Cp-7

O composto Cp – 7 apresentou-se como um sólido amarelo e apresentou TR de 36.66 min no cromatograma de CLAE Figura 20.

O espectro de RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6) de Cp – 7 (Figura 59) e suas expansões (Figura 60) revelaram a presença de sinais característicos de flavonoides, um conjunto de sinais em δ_H 7,38 (d, 2H) e δ_H 6,88 (d, 1H) nos sugeriu um sistema ABX no anel B. Dois sinais em δ_H 6,17 (sl, H-6) e δ_H 6,42 (sl, H-6), compatíveis com hidrogênios aromáticos meta-posicionados, (HARBORNE; MABRY, 1982a), a presença de um sinal em δ_H 6,63 com integral para um hidrogênio nos foi possível inferir que se tratava de uma flavona.

No espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) de Cp – 7 (Figura 61) observou-se 15 sinais de carbono sendo esses seis metilênicos e nove não hidrogenados. O carbono em δ_c 181,7 foi atribuído a carbonila (C-4) de flavona (HARBORNE; MABRY, 1982a).

No espectro de correlação HMBC (Figura 62) e sua expansão (Figura 63) foi possível afirmar inequivocamente a posição do H-3 em δ_H 6,63 no qual pode-se observar uma correlação J_3 com o C-1' em δ_c 121,5 desse mesmo hidrogênio com a carbonila J_2 C-4 em δ_c 181,5, além do J_3 C-10 δ_c 103,7. No mesmo mapa de contorno (Figura 64) pode-se confirmar a posição do H-5' em δ_H 6,88, correlacionando a J_3 com o C-1' e C-3' δ_c 121,6 e δ_c 145,8 respectivamente.

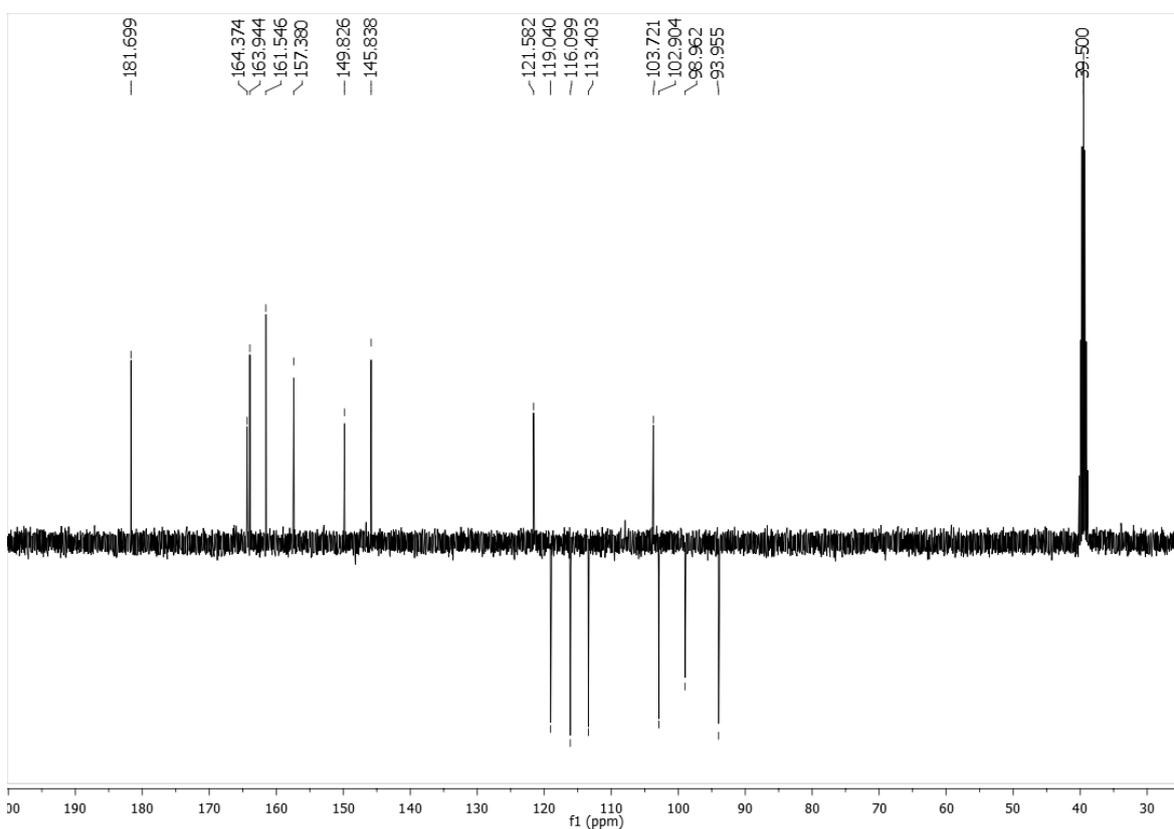


Figura 61 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) de Cp – 7

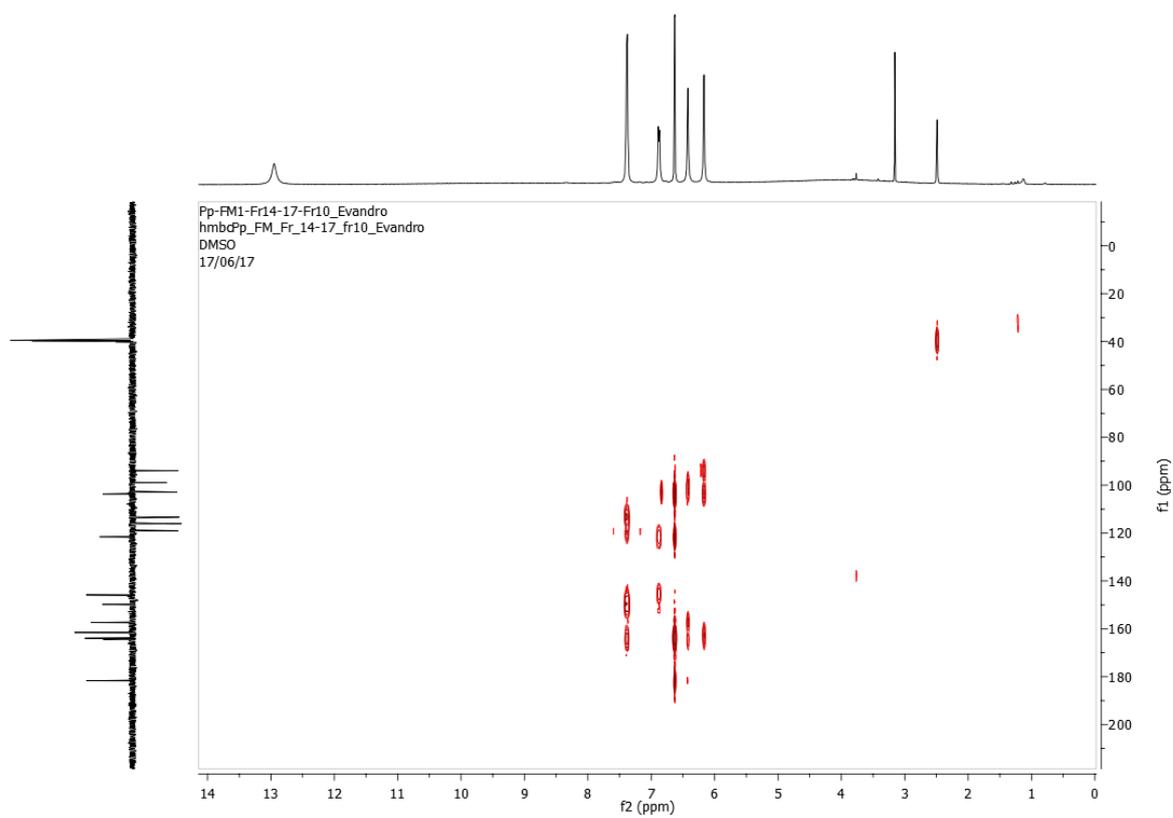


Figura 62 - Mapa de contorno HMBC (400 e 100 MHz, DMSO-d₆) de Cp-7

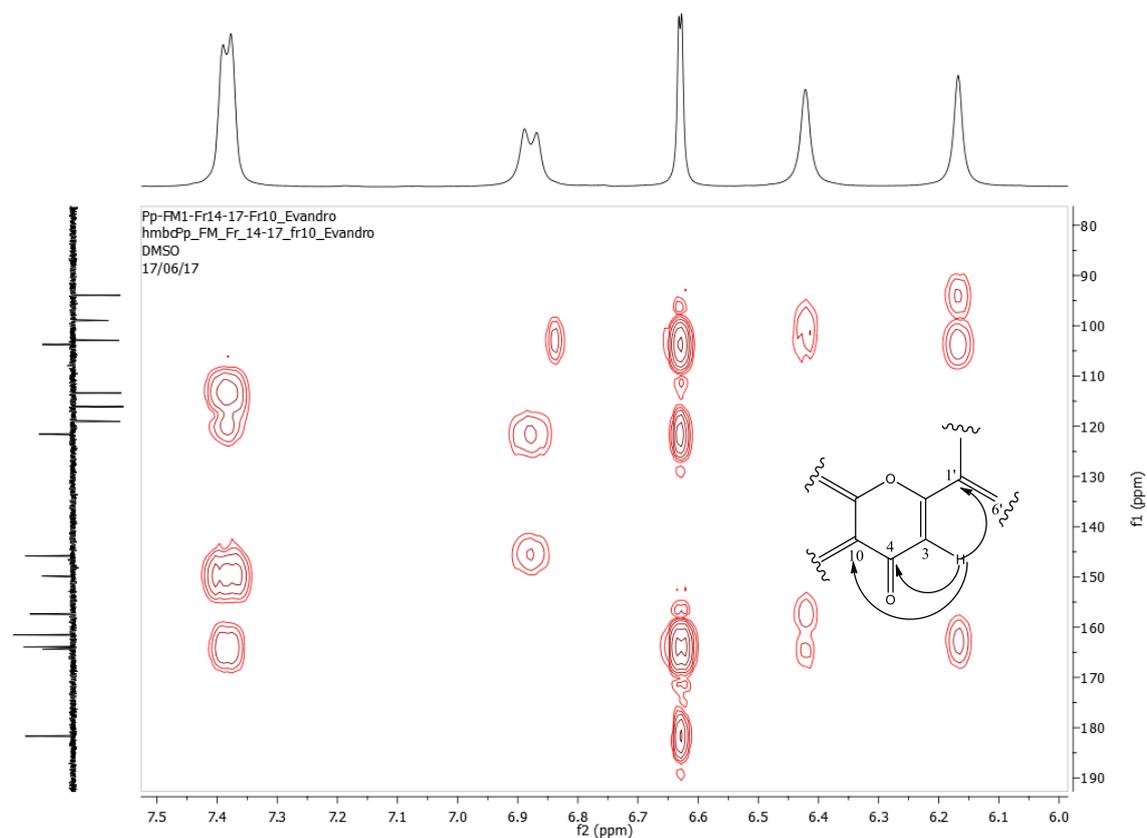


Figura 63 - Expansão do mapa de contorno HMBC de Cp-7 (DMSO- d_6 , 400 e 100 MHz) na região de (190-80 ppm) x (7,5-6,0 ppm).

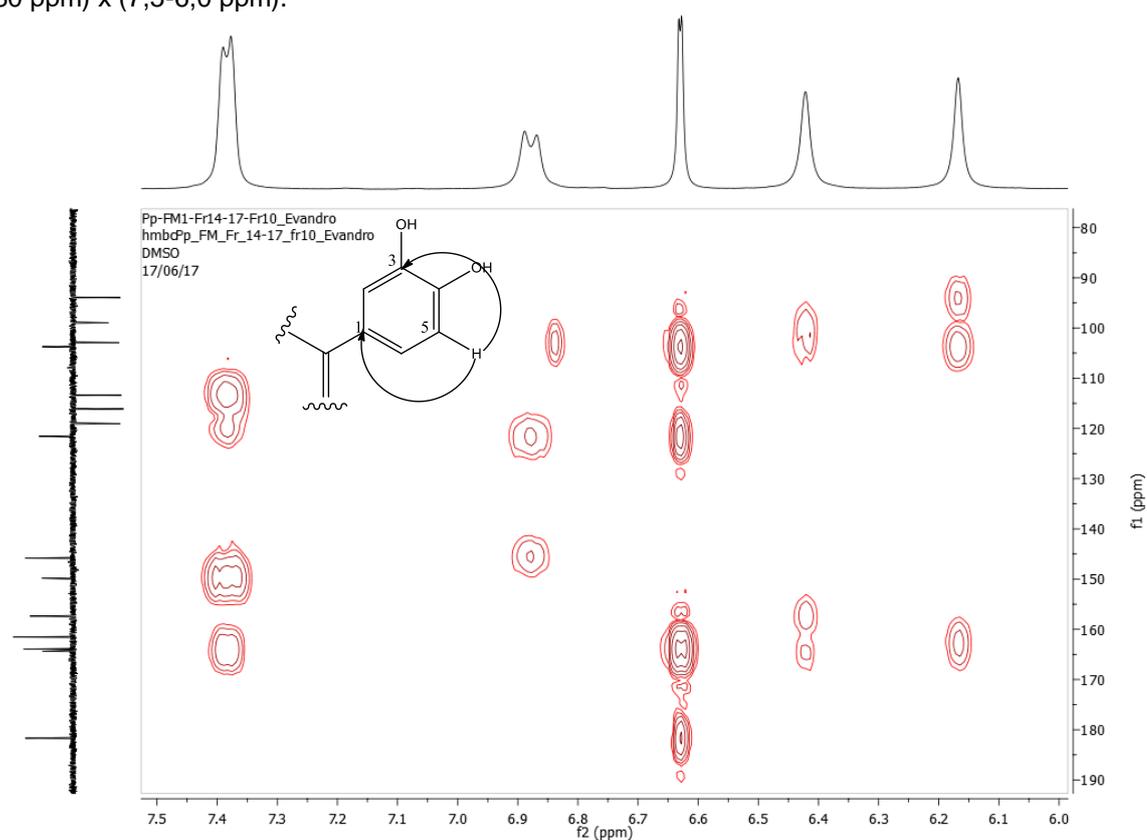


Figura 64 - Expansão do mapa de contorno HMBC de Cp-7 (DMSO- d_6 , 400 e 100 MHz) na região de (190-80 ppm) x (7,5-6,0 ppm).

Após compilação dos dados de ^1H e ^{13}C , Tabela 15, e comparação com dados da literatura (PARK et al., 2007), podemos afirmar que o composto Cp-7 se tratava do 3',4',5,7-tetrahidroxiflavona, também conhecido com Luteolina, relatado a primeira vez no gênero *Chresta*. Este composto possui atividades como: inibição da angiogênese, inibição da topoisomerases I e II (LÓPEZ-LÁZARO, 2009); inibidor da ATPase contra *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (JOUNG et al., 2016); antioxidante (GARCÍA-PÉREZ; GUTIÉRREZ-URIBE; GARCÍA-LARA, 2012)

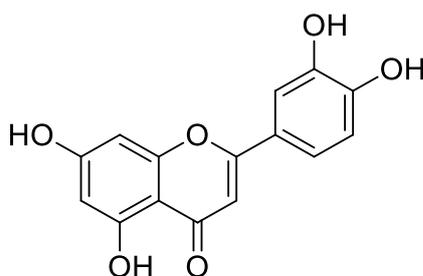


Figura 65 - Estrutura da Luteolina

Tabela 15 - Deslocamentos químicos, tipos de sinal e constantes de acoplamento (J) para os átomos de hidrogênio (δ_{H}) e carbono (δ_{C}) de Cp-6, verificados nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (400 e 100 MHz, respectivamente, DMSO- d_6), bem como, aqueles apresentados (PARK et al., 2007).

Posição	Cp - 7		Luteolina	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	-	-	-	-
2	163,9	-	163,9	-
3	102,9	6,63 (1H)	102,9	6,65 (s)
4	181,7	-	181,7	-
5	161,5	-	161,5	-
6	98,9	6,17 (1H)	98,9	6,18 (d $J=2,1$, 1H)
7	164,4	-	164,1	-
8	93,9	6,42 (1H)	93,9	6,43 (d, $J=2,1$ 1H)
9	157,4	-	157,3	-
10	103,7	-	103,8	-
1'	121,6	-	121,6	-
2'	113,4	7,39 (1H)	113,4	7,39 (d, $J=2,2$ Hz, 1H)
3'	145,8	-	145,8	-
4'	149,8	-	149,7	-
5'	116,1	6,85 (d, $J=8,8$ Hz, 1H)	116,1	6,89 (d, $J=9$, Hz, 1H)
6'	119,0	7,39 (d, H)	119,0	7,50 (d, $J=9$) 1H)
5-OH	-	12,96 s	-	12,97 s

5.3.8. Determinação estrutural de Cp-8

A substância Cp -8 apresentou-se como um pó solido levemente amarelo e apresentou T_R 25.68 min no cromatograma de CLAE Figura 20.

O espectro de RMN 1H (100 MHz, DMSO- d_6) de Cp-8 (Figura 66) e suas expansões (Figura 67 e Figura 68) apresentaram sinais na região de aromáticos semelhantes ao de flavonoides (HARBORNE; MABRY, 1982a), esse foi semelhante ao do Cp-7 (Figura 59), com algumas divergências como o aparecimento de um duplo-dublete em δ_H 5,36 (dd, $J= 12,5$ e $J= 3,1$ Hz) característicos de próton carbinólico (OLIVEIRA et al., 1999), os dois duplo dubletos de dois prótons metilênicos em δ_H 2,66 (dd, $J= 17,1$ e $J= 3,1$ Hz) e δ_H : 3,16 (dd, $J= 17,0$ e $J= 12,5$ Hz).

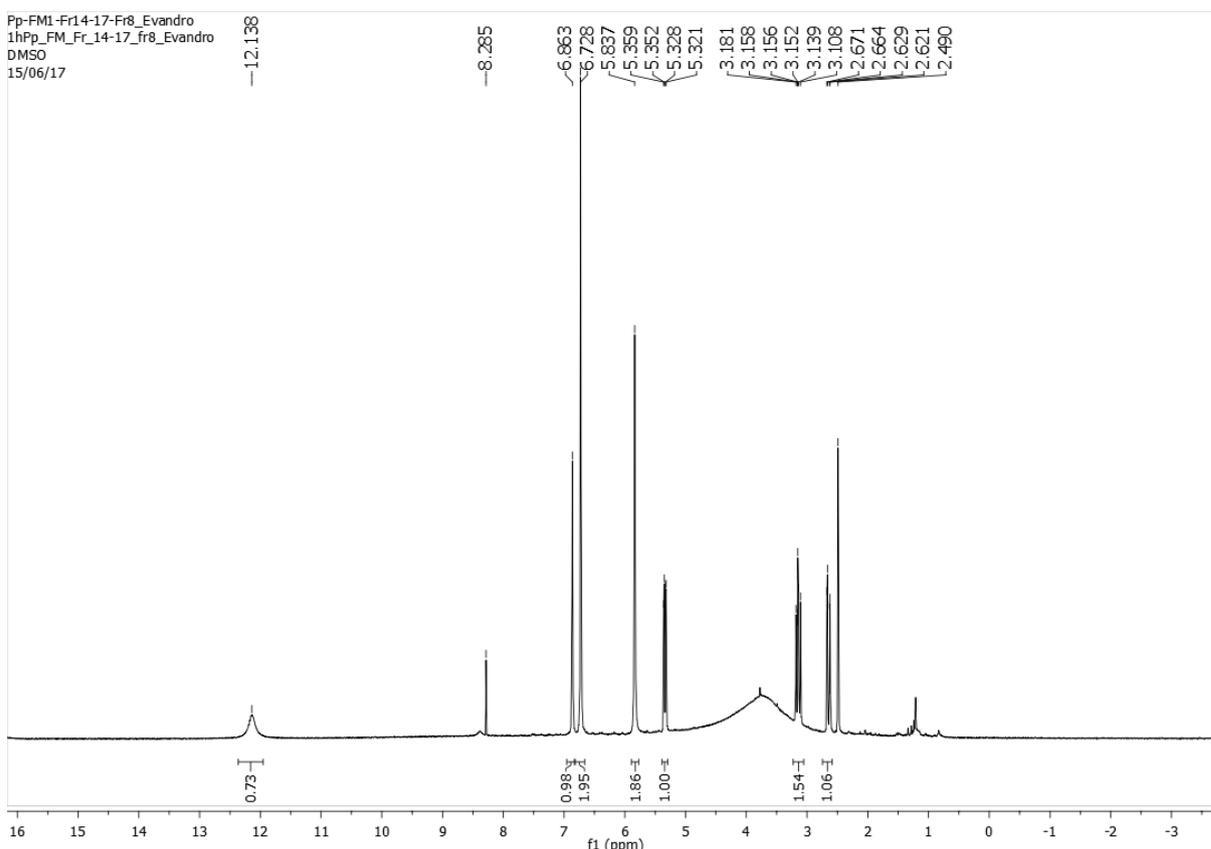


Figura 66 - Espectro de RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6) de Cp - 8

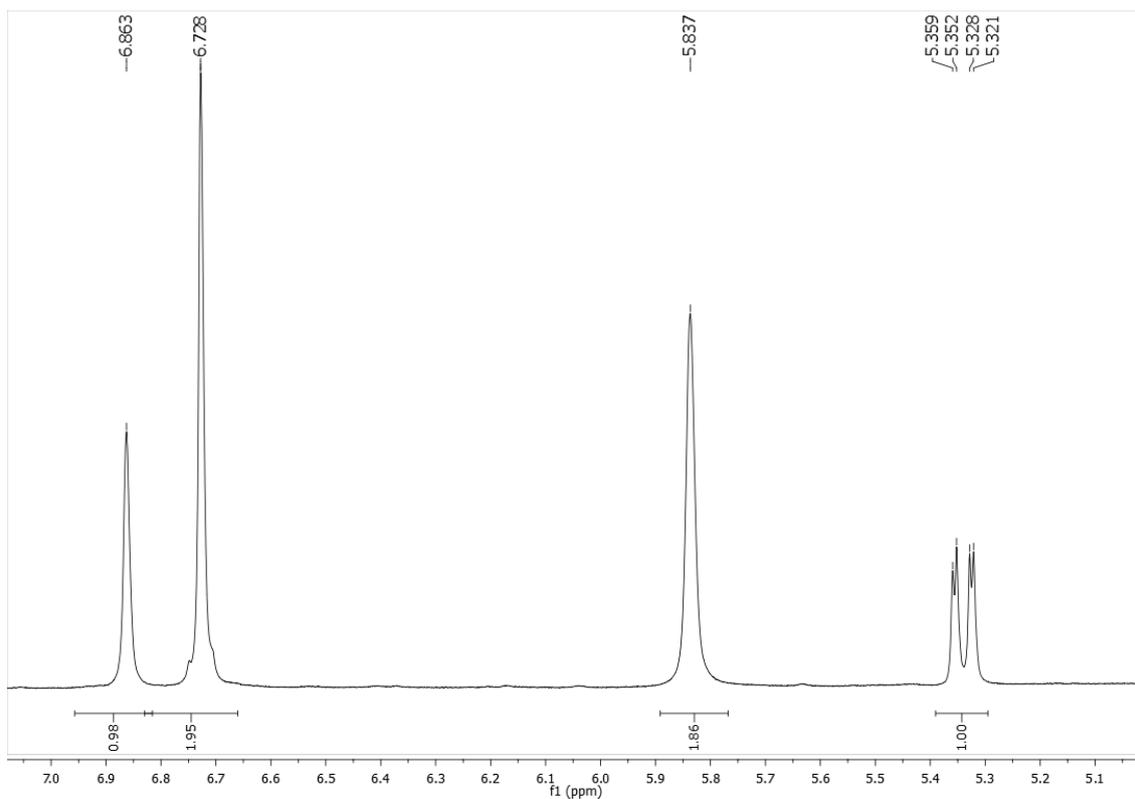


Figura 67 - Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) de Cp – 8

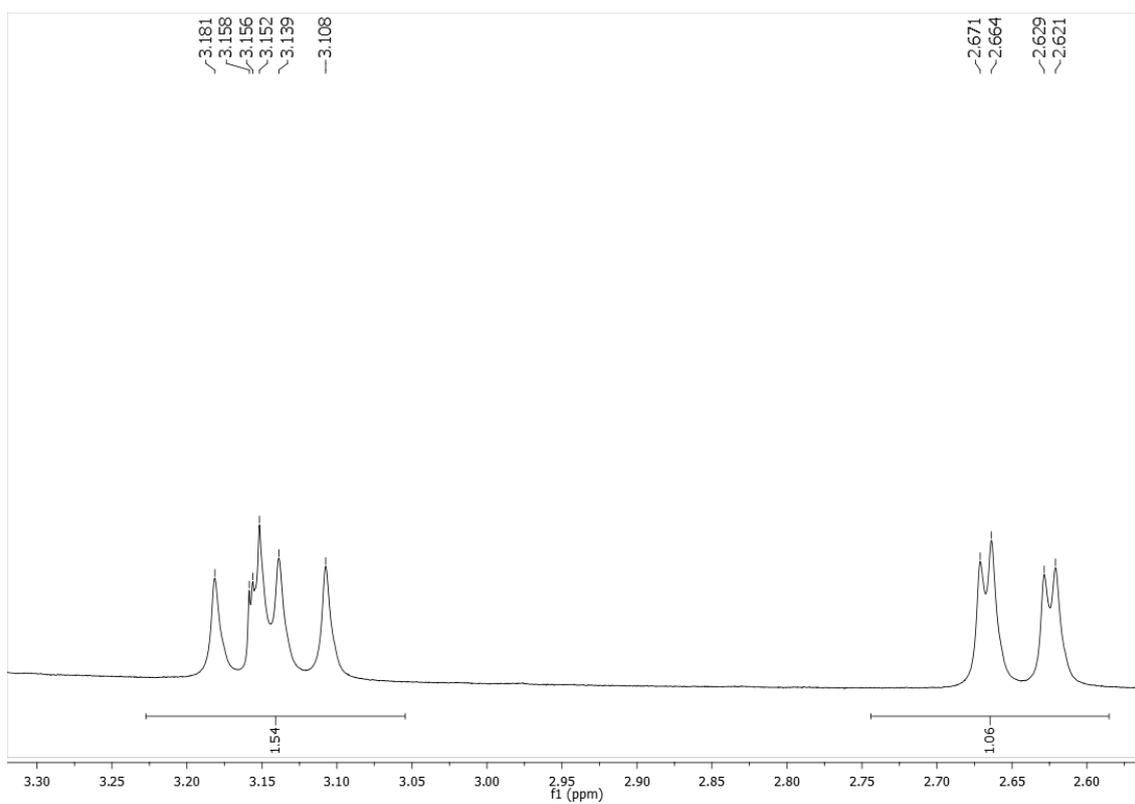


Figura 68 - Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) de Cp – 8

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 69) foi possível observar 15 linhas espectrais referentes a 15 carbonos, δ_{C} 117,9; δ_{C} 115,4; δ_{C} 114,4; δ_{C} 96,0 e δ_{C} 95,2 são compatíveis com sinais de cinco carbonos metínicos aromáticos protegidos (OLIVEIRA et al., 1999). O sinal em δ_{C} 195,8 atribuído a C-4 é característico de flavanona (HARBORNE; MABRY, 1982b), esse fato corrobora com os dados dos hidrogênios em H-3 e H – 2.

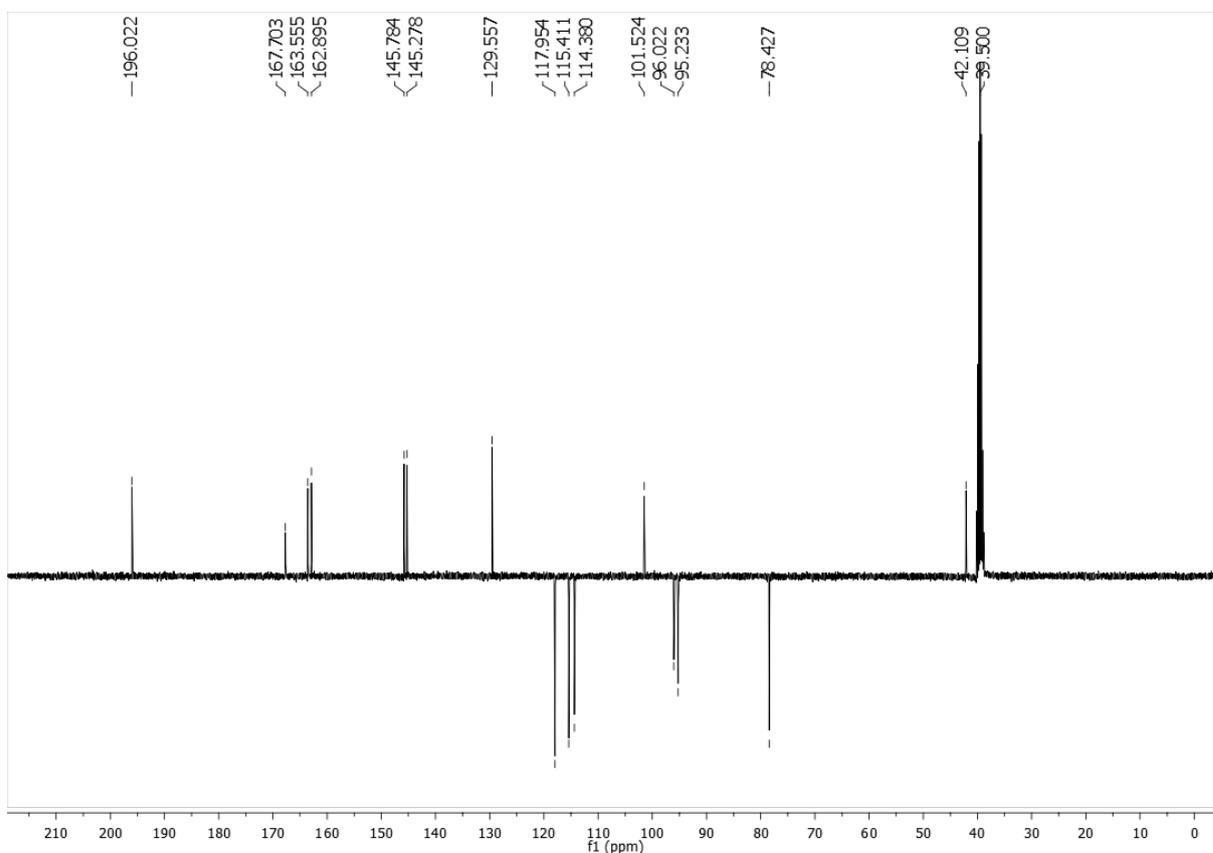


Figura 69 - Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz, DMSO- d_6) de Cp – 8

Observando o mapa de contorno do HMBC (Figura 70) e sua expansão (Figura 71) tornou-se evidente a posição do H-2 em δ_{H} 5,36 no qual pode-se observar uma correlação J_2 com o C-1' δ_{C} 129,5 e C-9 δ_{C} 163,5 e correlação J_3 com o C-2', C-6', C-4 em δ_{C} 114,3, δ_{C} 117,9 e δ_{C} 196,0 respectivamente. Neste mapa de contorno (Figura 72) pode-se atestar a posição do H-3a δ_{H} 2,66 a J_2 com C-4 δ_{C} 196,0 e J_3 com C-1' δ_{C} 129,5 e C-10 δ_{C} 101,4. Nesse mesmo espectro de correlação pode-se ratificar a posição do H-3b δ_{H} 3,16 a J_3 com C-1' δ_{C} 129,5 e J_2 com C-2 δ_{C} 78,4 e C-4 δ_{C} 196,0.

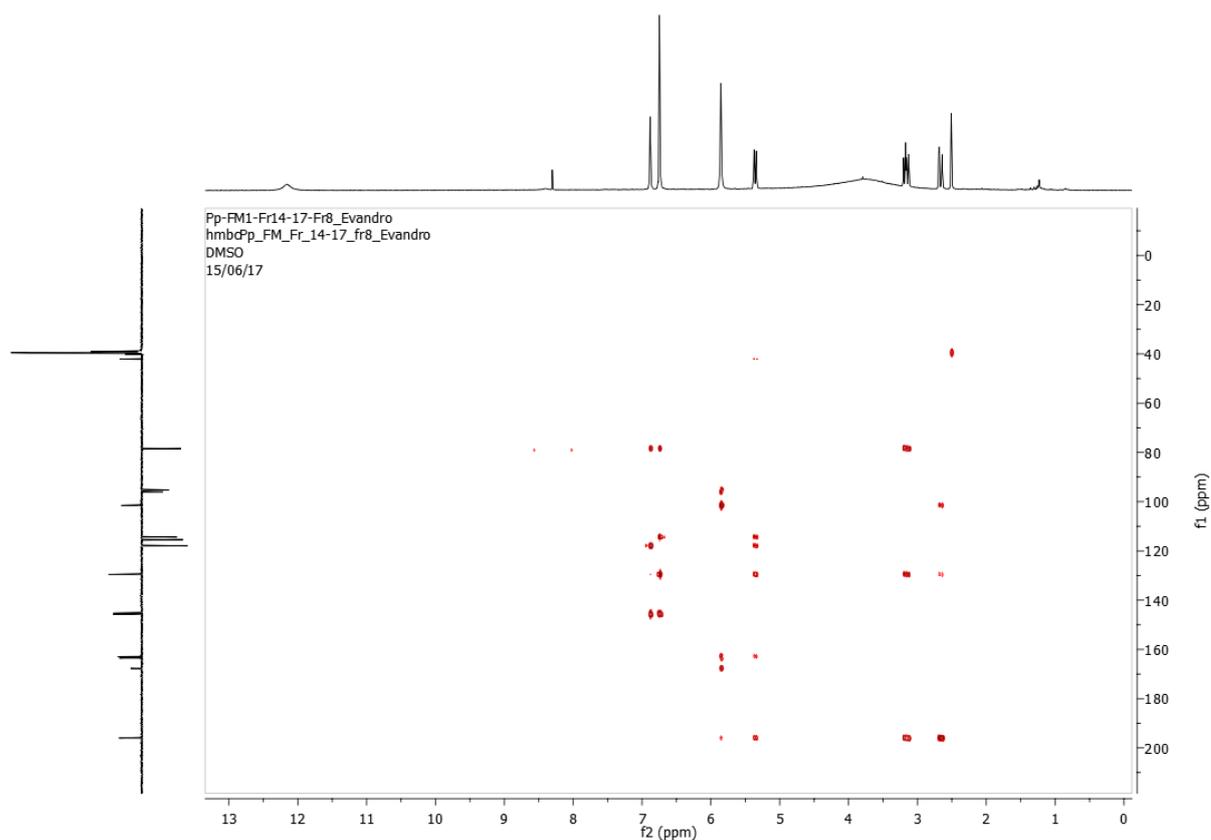


Figura 70 - Mapa de contorno HMBC de Cp-8 (DMSO- d_6 , 400 e 100 MHz).

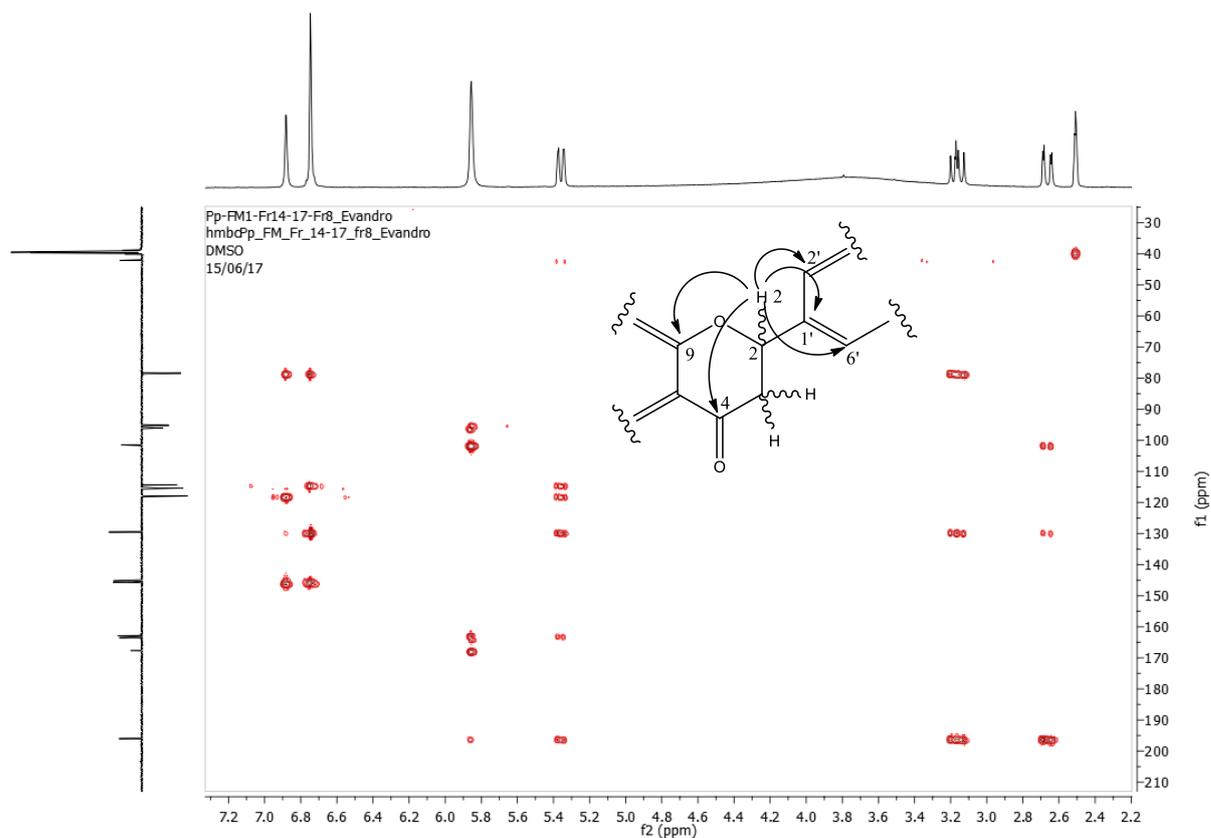


Figura 71 - Expansão do mapa de contorno HMBC de Cp-8 (DMSO- d_6 , 400 e 100 MHz) na região de (210-30 ppm) x (7,2-2,2 ppm).

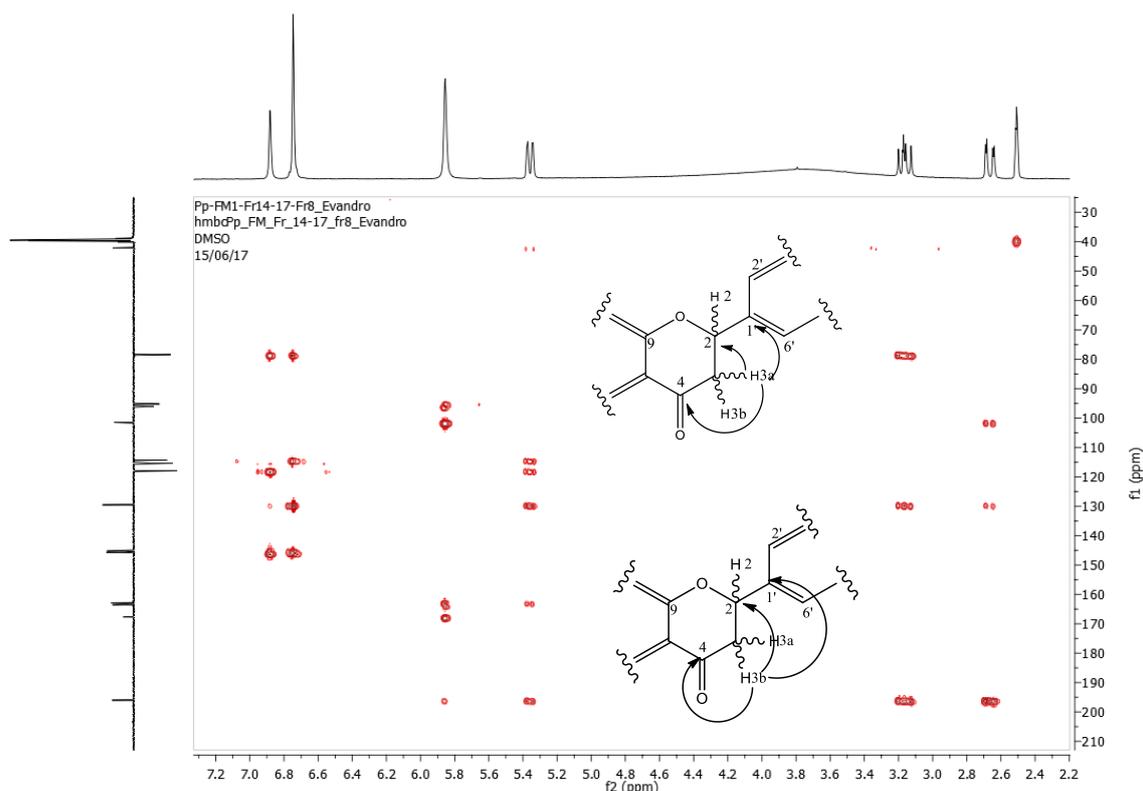


Figura 72 - Expansão do mapa de contorno HMBC de Cp-8 (DMSO- d_6 , 400 e 100 MHz) na região de (210-30 ppm) x (7,2-2,2 ppm).

Após compilação dos dados de ^1H e ^{13}C , Tabela 16, e comparação com dados da literatura (ENCARNACIÓN et al., 1999), podemos afirmar que o composto Cp-8 se tratava do 3',4',5,7-tetrahidroxiflavanona, também conhecido com eriodictiol, relatado a primeira vez no gênero *Chresta*. Esta substância já foi relatada na literatura com atividade anti-inflamatória, atuando como modulador da expressão de VLA-4, migração celular, e adesão mediada por VLA-4 em monócitos - evidência essa de que o eriodictiol regula a adesão moléculas durante a resposta imune (HUANG et al., 2010). Além disso, foi visto também que o eriodictiol apresentou atividade antinoceptiva frente a modelos experimentais *in vivo* (ROSSATO et al., 2011), bem como foi capaz de reduzir os danos nos rins causados pela cisplatina através da inibição do estresse oxidativo e inflamação (LI et al., 2016)

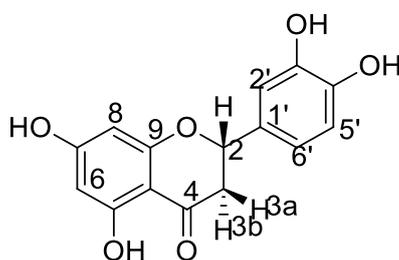


Figura 73 - Estrutura do Eriodictiol

Tabela 16 - Deslocamentos químicos, tipos de sinal e constantes de acoplamento (J) para os átomos de hidrogênio (δ_H) e carbono (δ_C) de Cp-8, verificados nos espectros de RMN de 1H e ^{13}C (400 e 100 MHz, respectivamente, DMSO- d_6), bem como, aqueles apresentados (KAI et al., 2016) e (ENCARNACIÓN et al., 1999).

Posição	Cp - 8					Eriodictiol	
	δ_C	δ_H	$^1H \times ^{13}C$ HMBC			δ_C	δ_H
			$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	$^4J_{CH}$		
1	-	-			H-5	-	-
2	78,4	5,36 (dd, $J=12,5$ e $3,1$ Hz)	H-3b	H-2'/H-6'		78,4	5,36 (dd, $J=12,5$ e $3,1$ Hz)
3a	42,1	2,66 (dd, $J=17,0$ e $3,1$ Hz)				42,1	2,66 (dd, $J=17,0$ e $3,1$ Hz)
3b		3,16 (dd, $J=17,0$ e $12,5$ Hz)					3,15 (dd, $J=17,0$ e $3,1$ Hz)
4	196,0	-	H-3b/ H-3a	H-6/ H-2		195,8	-
5	162,8					162,8	-
6	96,0	5,84		H-8		96,0	5,86
7	167,7	-	H-6/ H-8			166,1	-
8	95,2	5,84				95,3	5,86
9	163,5	-	H-8/ H-2			163,5	-
10	101,5	-		H-6/ H-3a		101,4	-
1'	129,5	-	H-2	H-5/ H-3b/ H-3a		129,6	-
2'	114,3	6,72 (2H, m, H-6,8)		H-6'/ H-2		114,3	6,74 (d, $J=2,2$ Hz 1H)
3'	145,3	-		H-2'		145,2	-
4'	145,7	-	H-5			145,7	-
5'	115,4	6,86 (s,1H)				115,4	6,81
6'	117,9	6,72 (2H, m, H-6,8)	H-5	H-2		117,9	6,87 (s)
5-OH	-	12,15 br				-	12,12 br

5.3.9. Determinação estrutural de Cp-9

O composto Cp – 9 apresentou-se como um sólido amarelo claro e apresentou T_R de 29.57 min no cromatograma de CLAE Figura 20.

O espectro de RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6) de Cp – 9 (Figura 74) e suas expansões (Figura 75) revelaram a presença de sinais característicos de flavonoides, no entanto, esses foram sugestivos de um dímero (Tabela 17). Os valores de RMN ^{13}C (Figura 77) e 1H foram semelhantes ao da substância 3-metoxi-5,7,3',4'-tetrahydroflavona, Cp 6, mas pela quantidade de sinais evidenciado no espectro de RMN ^{13}C (Figura 76) nos foi sugestivo de uma estrutura dimérica. O espectro RMN ^{13}C (Figura 77) apresentou 31 linhas espectrais, atribuídos a 32 carbonos, esses eram indicativo para duas unidades semelhantes a 3-metoxiquercetina.

Foi observado dois dubletos, δ_H (7,41 $J=2,0$ Hz) e 6,69 ($J=8,4$ Hz) além de um duplo dubleto δ_H (7,05 $J=2,0$ e 8,4 Hz), sugerindo a presença de um anel com sistema ABX para uma das unidades do flavonoide. Dois dubletos, um em δ_H 6,05 ($J=2,0$ Hz) e δ_H 5,57 ($J=2,0$ Hz) acoplado meta entre si, este atribuído ao hidrogênios H-6 e H-8 no anel A de uma das unidades do flavonoide. Outros dois dubletos δ_H (7,00 $J=8,4$ Hz) e 6,93 ($J=8,0$ Hz) acoplado orto entre si, nos indicou que o outro anel B estava tetrassubstituído. Há ausência de um dubleto relativo a H-8 (HARBORNE; MABRY, 1982b), observado na estrutura da 3-metoxi-5,7,3',4'-tetrahydroflavona do Cp 6 em δ_H 6,29, acoplado meta com H-6, nos fez inferir que a ligação entre as duas unidades do flavonoide foi feita pelo C-8, cujo deslocamento foi de δ_C 103,4 e no 3-metoxiquercetina é de δ_C 98,7.

No espectro de HSQC (DMSO- d_6 , 400 e 100 MHz) (Figura 78) e sua expansão (Figura 79) pudemos assinalar de forma evidente os sinais dos hidrogênios do composto. O espectro de HMBC (DMSO- d_6 , 400 e 100 MHz) (Figura 80) e suas expansões (Figura 81 e Figura 82) corroboraram com a nossa proposta no qual um dos anéis B estava tetrassubstituído, que o outro anel B possuía um sistema ABX, além de confirmar a fusão dos flavonoides pela posição C-8.

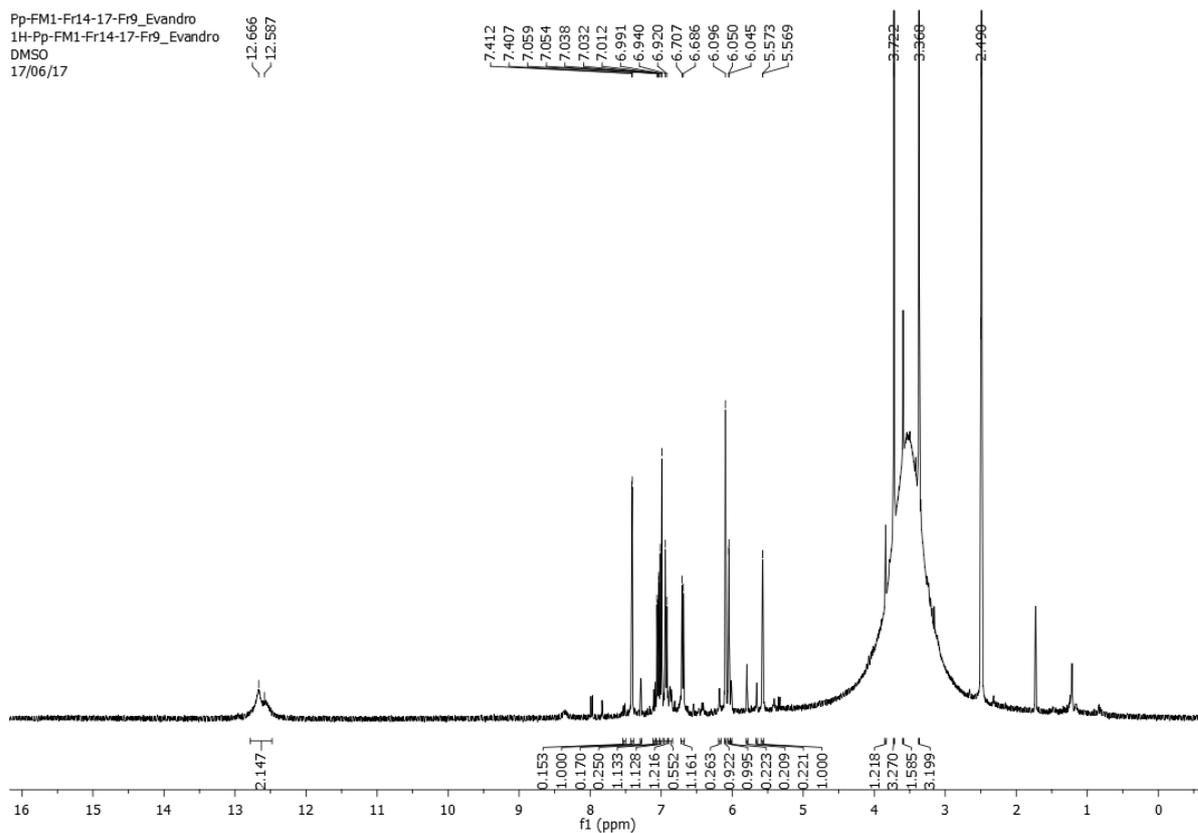


Figura 74 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) de Cp – 9

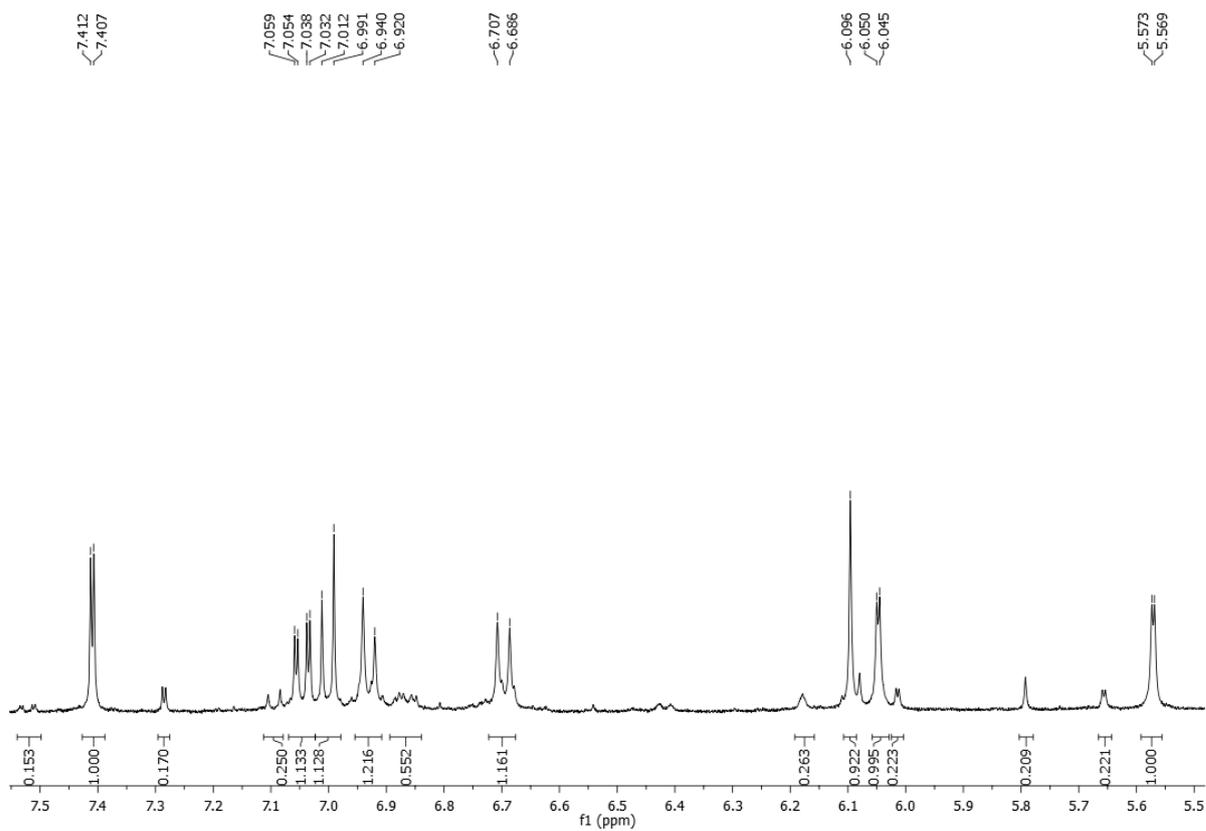


Figura 75 - Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) de Cp – 9

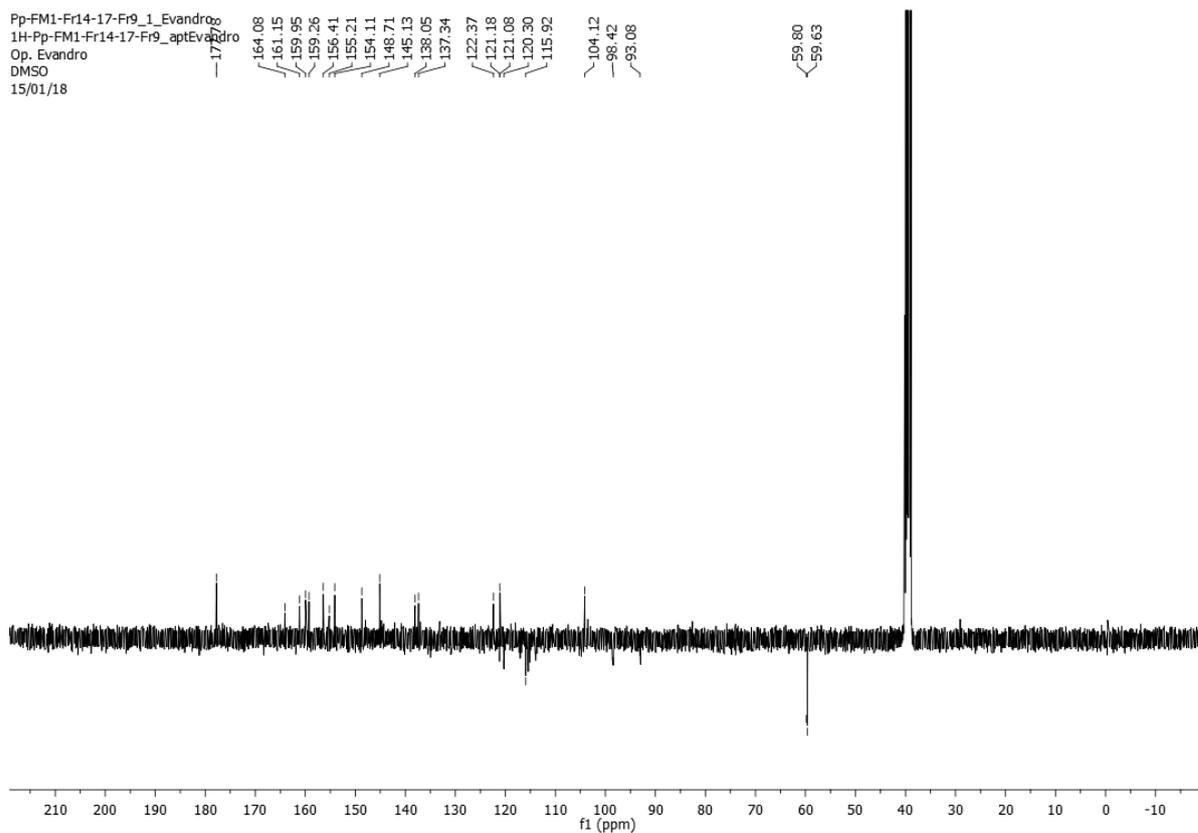


Figura 76 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) de Cp – 9

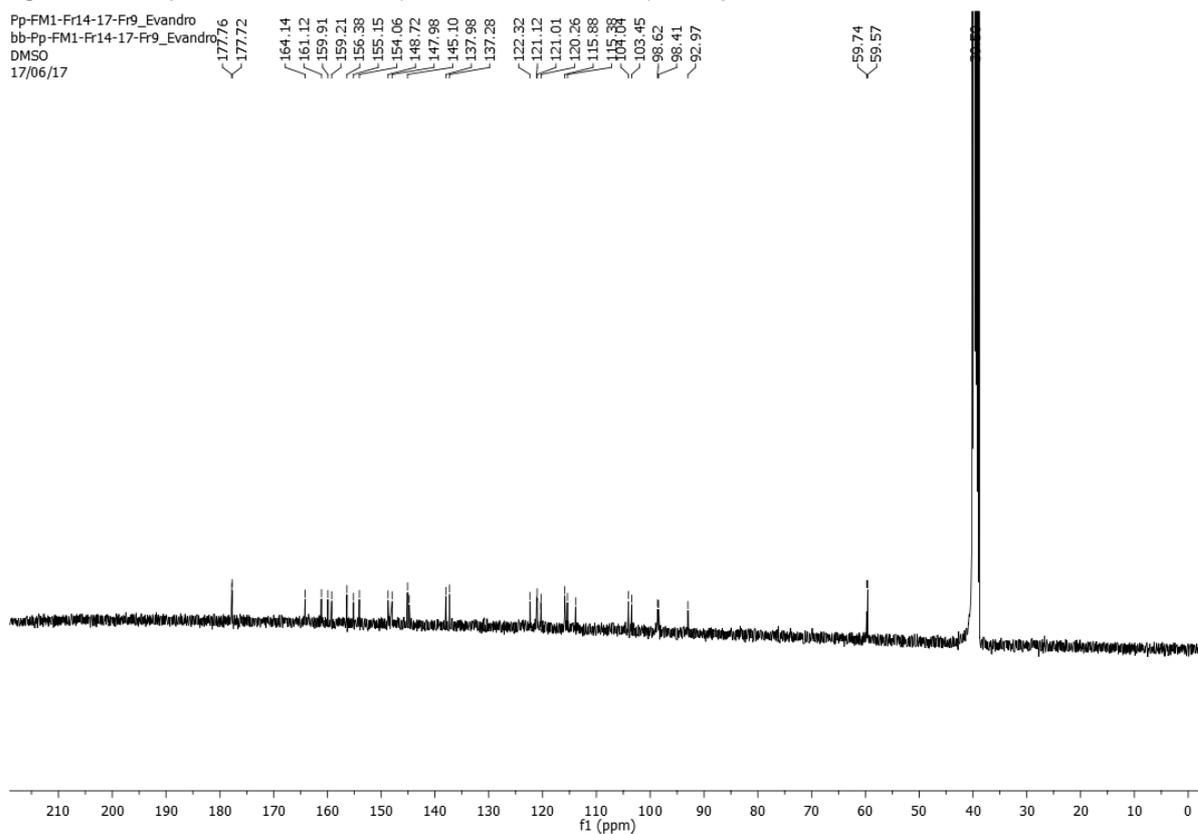


Figura 77 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) de Cp – 9

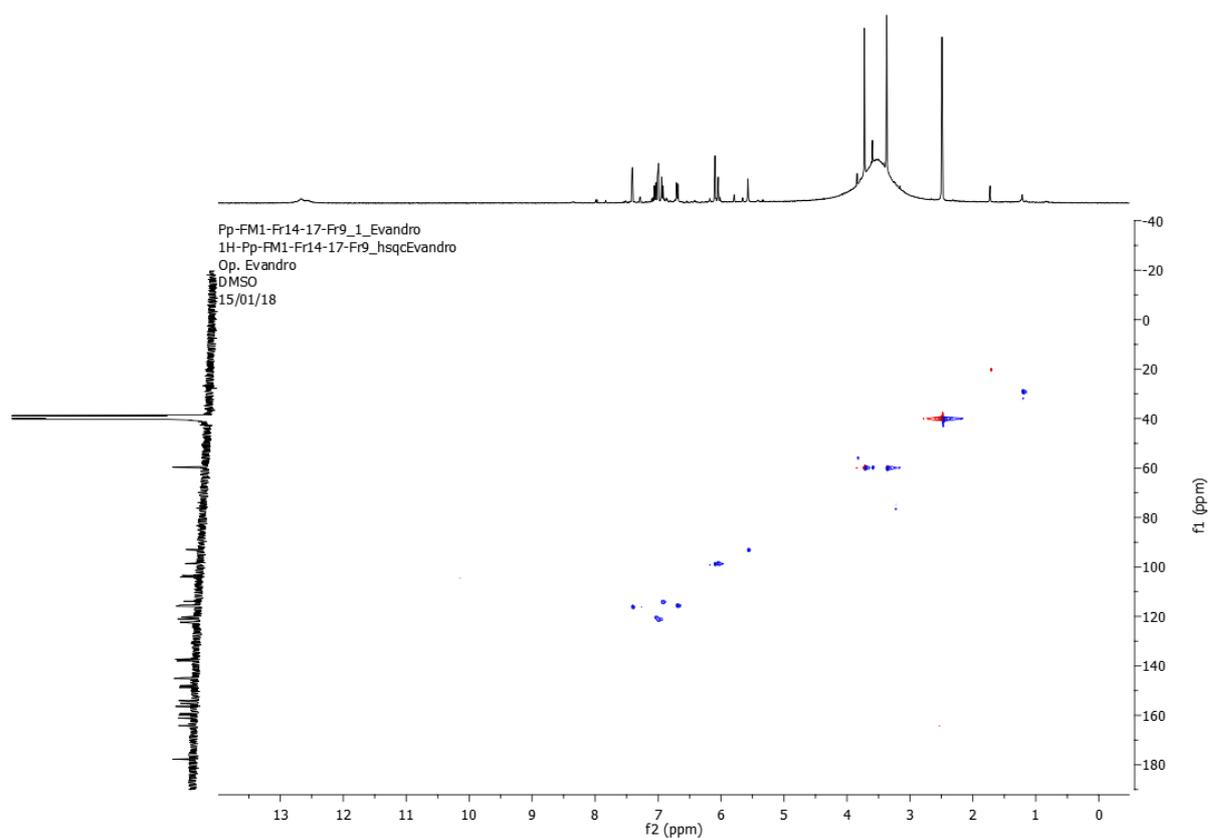


Figura 78 - Mapa de contorno HSQC de Cp-9 (DMSO- d_6 , 400 e 100 MHz).

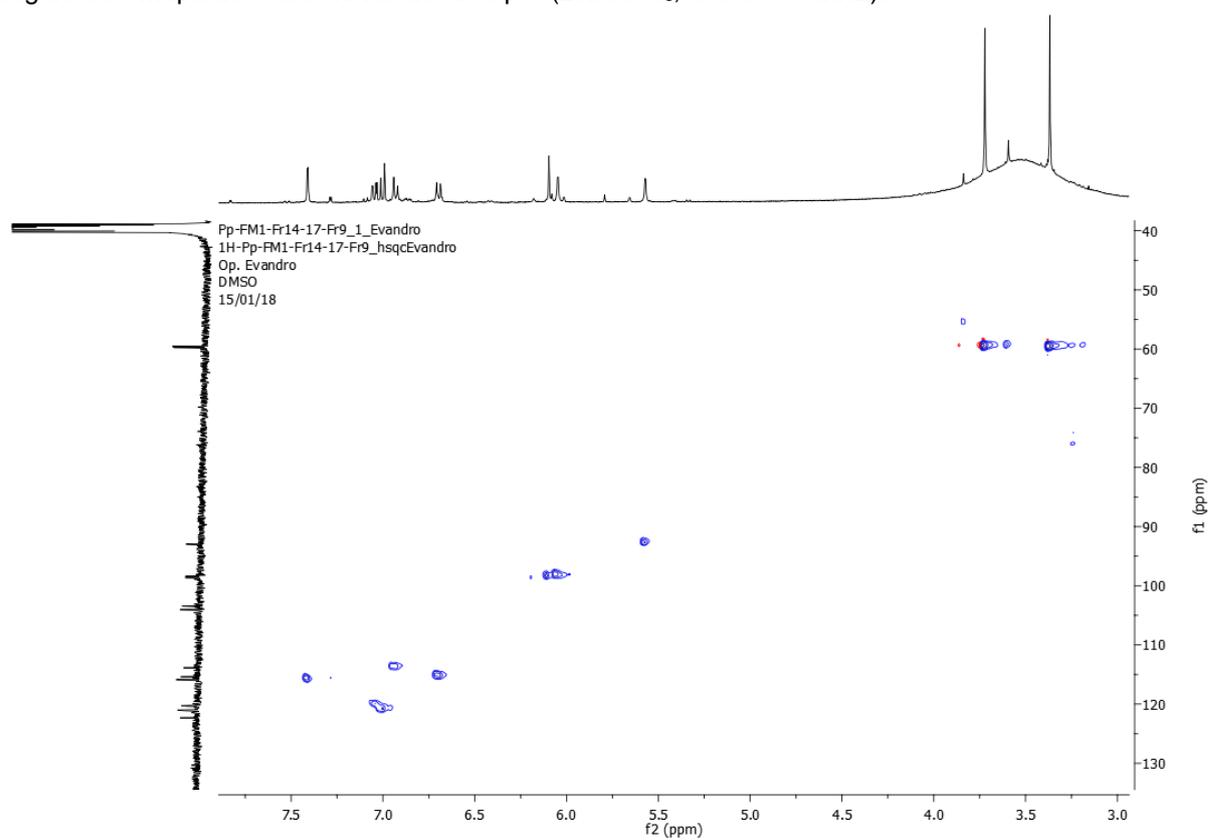


Figura 79 - Expansão do mapa de contorno HSQC de Cp-8 (DMSO- d_6 , 400 e 100 MHz) na região de (130-40 ppm) x (8,0-3,0 ppm).

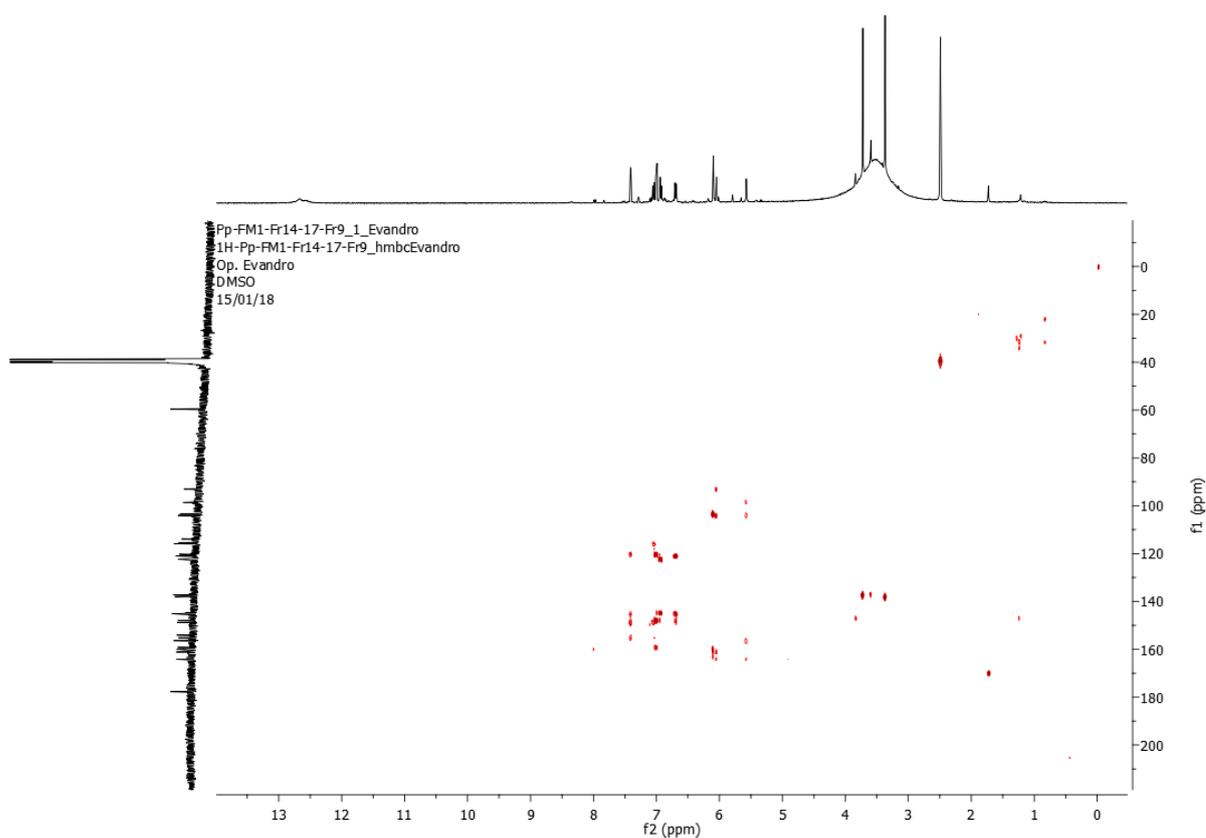


Figura 80 - Mapa de contorno HMBC de Cp-9 (DMSO- d_6 , 400 e 100 MHz).

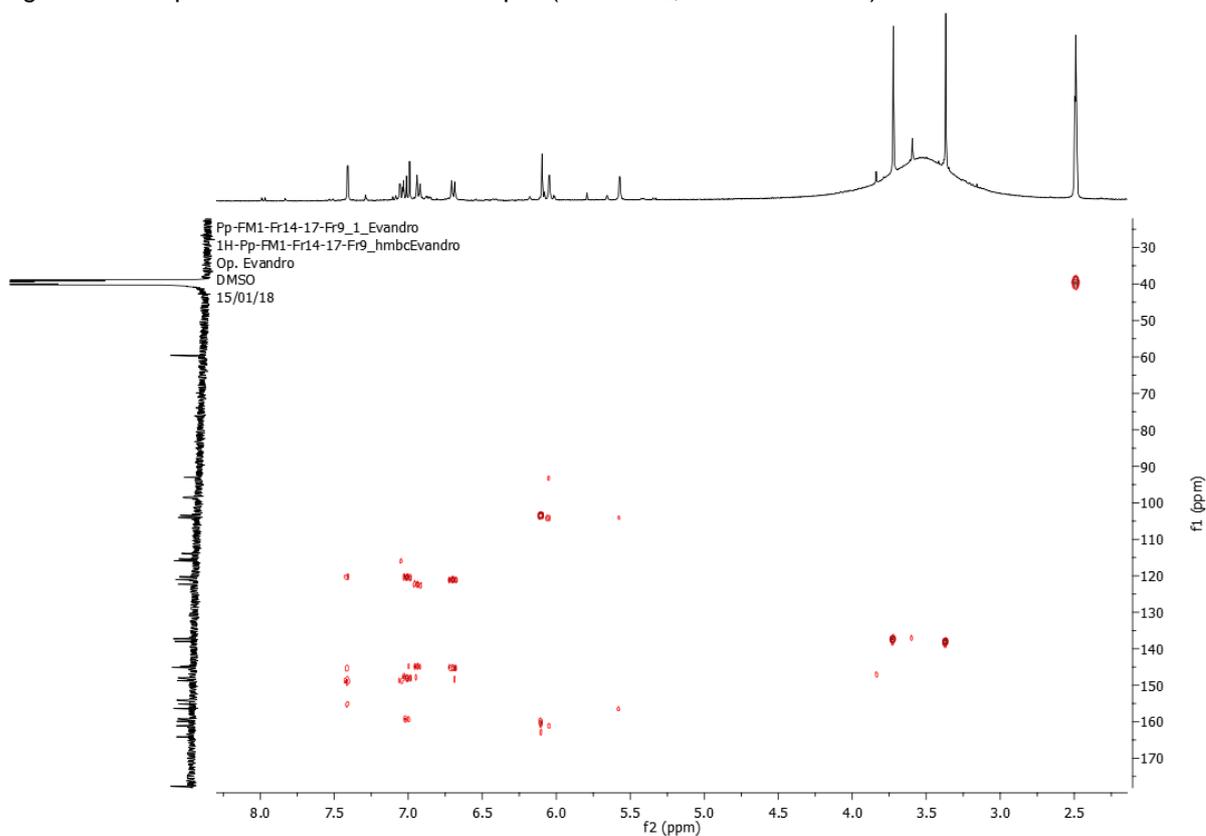


Figura 81 - Expansão do mapa de contorno HMBC de Cp-9 (DMSO- d_6 , 400 e 100 MHz) na região de (170-30 ppm) x (8,0-2,5 ppm).

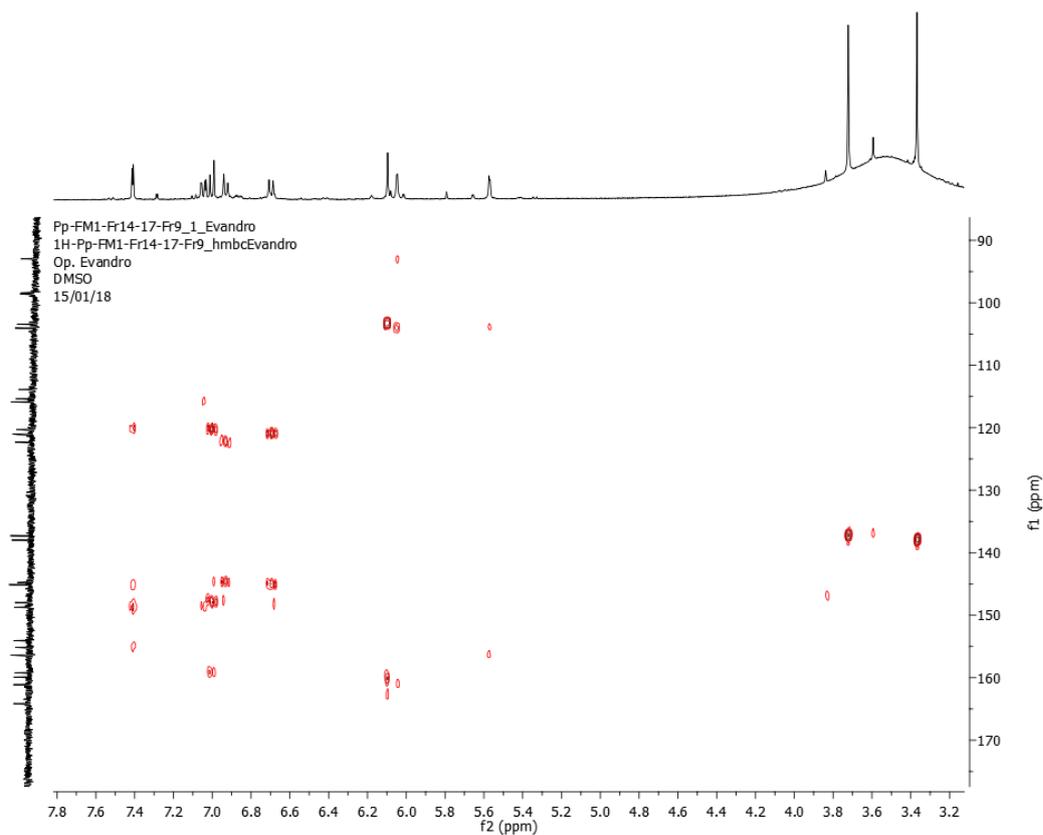


Figura 82 - Expansão do mapa de contorno HMBC de Cp-9 (DMSO- d_6 , 400 e 100 MHz) na região de (170-90 ppm) x (7,8-3,2 ppm).

No espectro de massas de ESI modo negativo de Cp-9 Figura 83, foi verificado um pico majoritário com uma m/z 629,15 $[M-H]^-$ após o isolamento deste pico no ESI-MS, com posterior fragmentação, foi possível observar os fragmentos m/z 614,07; 493,08; 447,04; 421,05 (Figura 84).

Display Report

Analysis Info

Analysis Name D:\Data\evandrofs\EMPPA011009.d
Method analise_geral_mod_socrates.m
Sample Name PPA001009
Comment ESI-

Acquisition Date 25/07/2017 16:58:53

Operator lmca
Instrument amaZon X

Acquisition Parameter

Ion Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Alternating Ion Polarity	off
Mass Range Mode	Enhanced Resolution	Scan Begin	50 m/z	Scan End	1000 m/z
Accumulation Time	113087 μ s	RF Level	43 %	Trap Drive	50.2
SPS Target Mass	183 m/z	Averages	5 Spectra	n/a	n/a

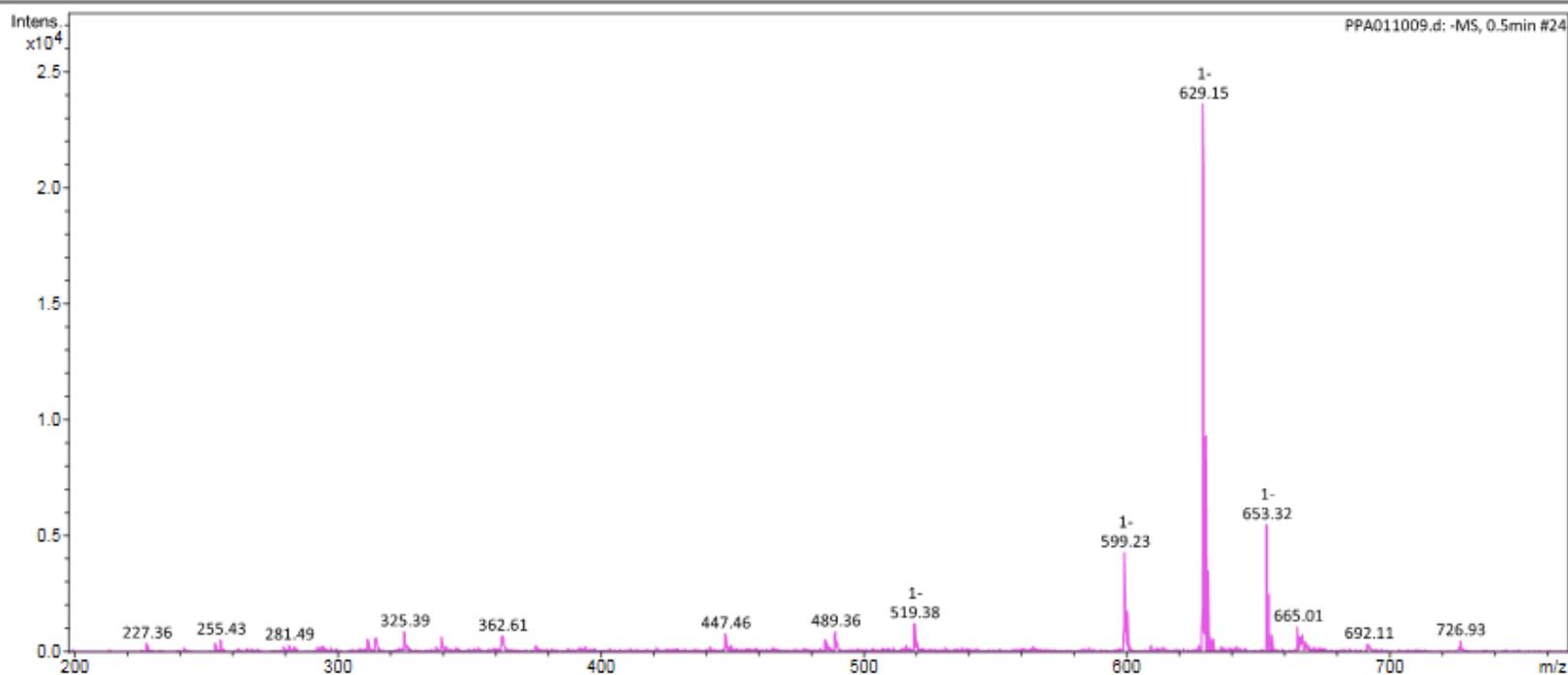


Figura 83 - Espectro de ESI-MS de Cp-9

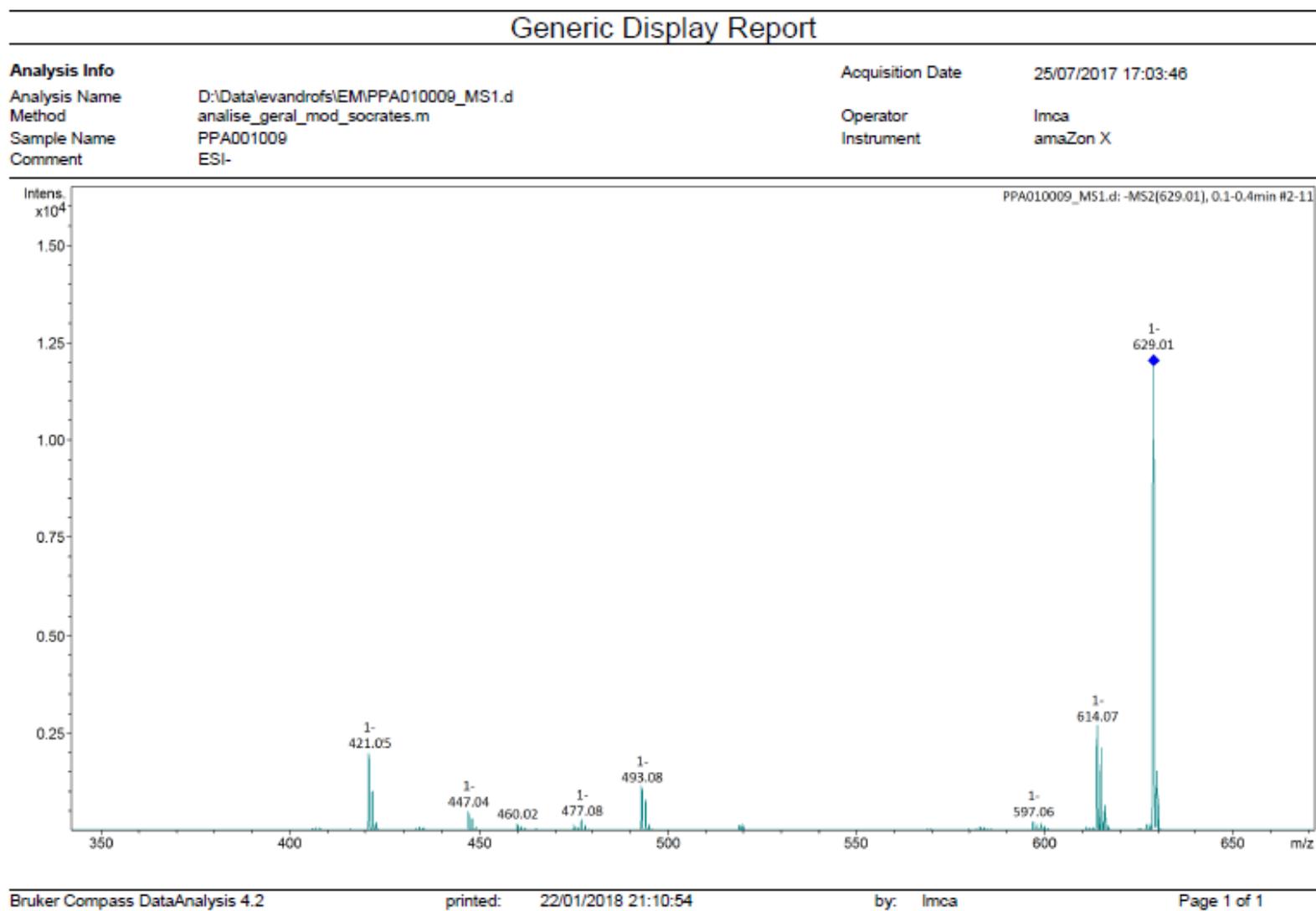
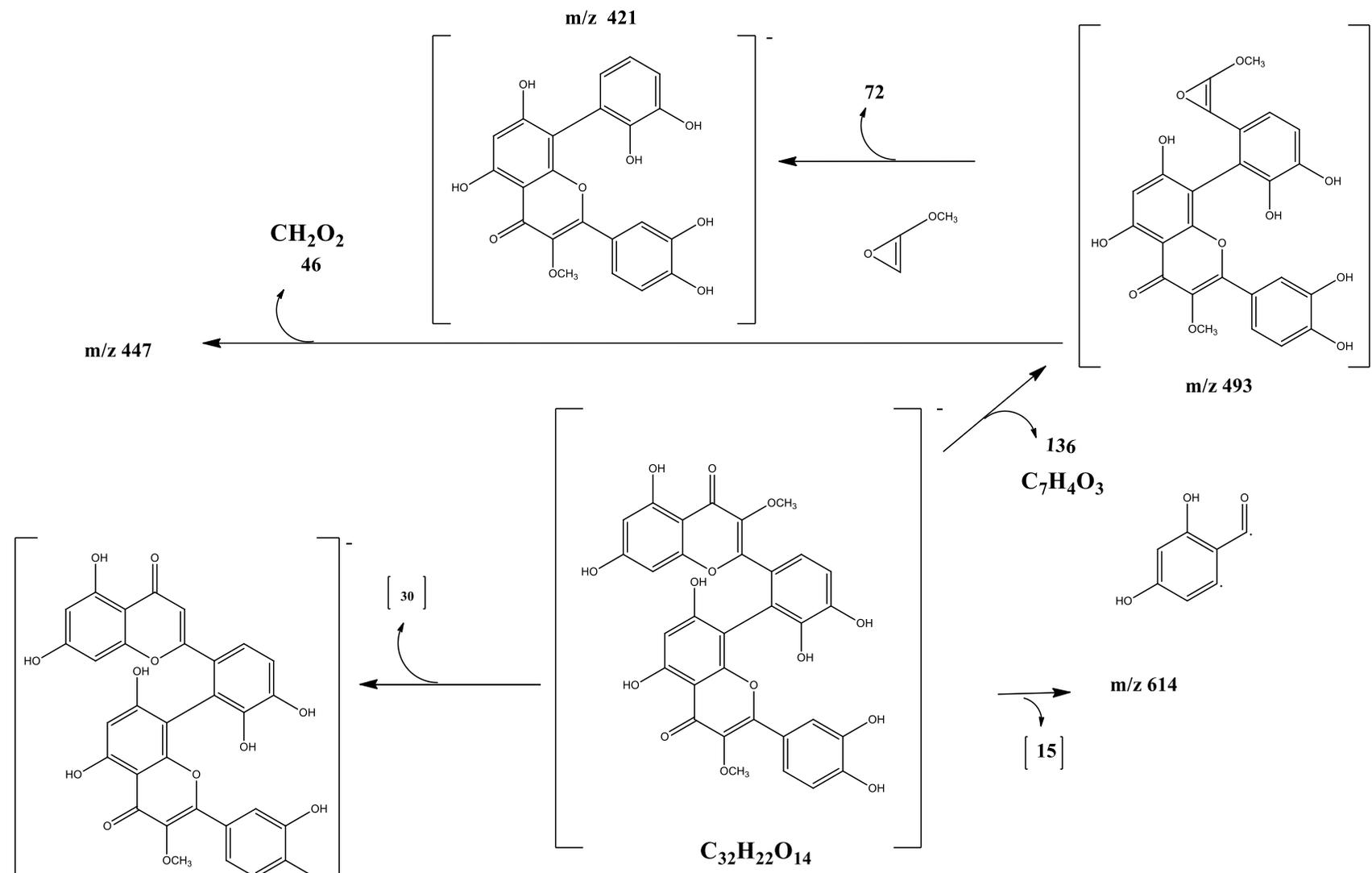


Figura 84 - Espectro de ESI-MS com fragmentações de Cp-9



Esquema 5 - Fragmentações de Cp-9

Tabela 17 - Deslocamentos químicos, tipos de sinal e constantes de acoplamento (J) para os átomos de hidrogênio (δ_H) e carbono (δ_C) de Cp-9, verificados nos espectros de RMN de 1H e ^{13}C (400 e 100 MHz, respectivamente, DMSO- d_6), bem como, aqueles apresentados (LAGE et al., 2013)

Posição	Cp - 9					Strychnobiflavona	
	$^1H \times ^{13}C$ HSQC		$^1H \times ^{13}C$ HMBC			δ_C	δ_H
	δ_C	δ_H	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	$^4J_{CH}$		
1		-					-
2	155,1	-		H-2'		155,5	-
3	137,3	-	3-OMe			137,4	-
4	177,8	-				178,0	-
5	154,1	-				154,1	-
6	98,6	6,09 (s)				97,9	6,16 (s)
7	159,9	-	H-6			159,9	-
8	103,4	-		H-6		102,8	-
9	161,1	-				161,2	-
10	104,0	-				104,0	-
1'	121,0	-		H-5'		121,1	-
2'	115,9	7,41 (d, $J = 2,0$ Hz)				115,9	7,44 (d, $J = 2,0$)
3'	145,1	-	H-2'	H-5'		145,1	-
4'	148,7	-		H-2' ; H-6'		148,6	-
5'	115,4	6,69 (d, $J = 8,4$ Hz)	H-6'			115,4	6,71 (d, $J = 8,4$ Hz)
6'	120,3	7,05 (dd, $J = 8,4 ; 2,0$ Hz)		H-2'		120,2	7,05 (dd, $J = 8,4$ Hz, 2H)
2''	159,2	-		H-6'''		159,1	-
3''	138,0	-				138,2	-

4''	177,7	-			177,8	-
5''	156,4	-		H-8''	156,3	-
6''	98,4	6,05 (d, $J = 2,0$)			98,4	6,07 (d, $J = 1,6$ Hz)
7''	164,1	-	H-6''		163,9	-
8''	93,0	5,57 (d, $J = 1,6$)		H-6''	92,8	5,66 (d, $J = 1,6$ Hz)
9''	161,1	-			161,2	-
10''	104,0	-		H-8'' ; H-6''	104,2	-
1'''	122,3	-			122,3	-
2'''	120,2	-		H-6'''	119,7	-
3'''	144,8	-			144,2	-
4'''	148,0	-		H-6'''	147,5	-
5'''	113,9	6,93 (d, $J = 8$)			114,1	6,97 (d, $J = 8,4$ Hz)
6'''	121,1	7 (d, $J = 8,4$)			121,4	7,05 (d, $J = 8,4$ Hz)
3 - OMe	59,7	3,72 (s)	H-3'		59,8	3,79 (s)
3'' - OMe	59,6	3,37 (s)			59,6	3,43 (s)
5 - OH					-	12,68 (s)
5'' - OH					-	12,56 (s)

Após compilação dos dados de ^1H e ^{13}C , Tabela 17 e comparação com dados da literatura (LAGE et al., 2013), podemos afirmar que o composto Cp-9 se tratava do 8-[6-(5,7-diidroxí-3-metoxi-4-oxocromen-2-il)-2,3-diidroxifenil]-2-(3,4-diidroxifenil)-5,7-diidroxí-3-metoxicromen-4-ona, também conhecido com stricnobiflavona, relatado a primeira vez no gênero *Chresta*. Esta substância mostrou uma atividade leishmanicida efetiva contra as formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonenses in vitro* e, nesse mesmo estudo foi visto que esse composto não apresenta citotoxicidade, nem atividade hemolítica, se mostrando um agente anti leishmania promissor.

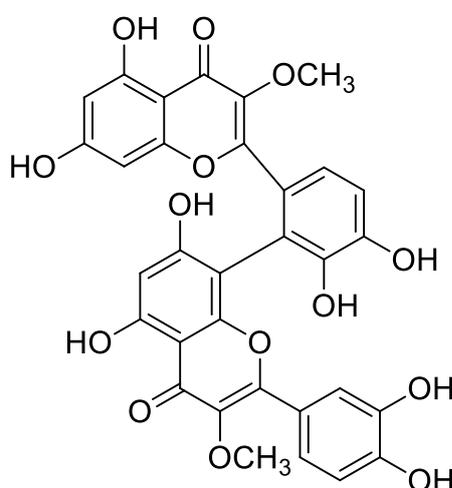


Figura 85 - Estrutura do Stricnobiflavona

5.4. Identificação de compostos por CG-EM

Foram realizadas as análises da composição volátil das frações PPH4, PPH5, PPH10, PPH11 e PPH12 por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM, ver anexo). No entanto, seus respectivos espectros de massas e índice de Kovats não corresponderam com dados da literatura. Por isso, não foi possível identificar os compostos voláteis das referidas frações.

5.5. Identificação por Espectrometria de Massas de Cp-14-17

No espectro de massas da fração Cp 14-17 (Figura 86) foi possível observar a presença de diversos íons de moléculas desprotonadas distribuídas entre os tempos de retenção de 0 a 135 minutos. Os íons foram fragmentados e a análise dos padrões de fragmentação e comparações com dados da literatura permitiram propor a presença de fenóis como: ácidos fenólicos, flavonoides glicosilados e agliconas. Foram identificados 06 compostos, que serão descritos nos itens a seguir.

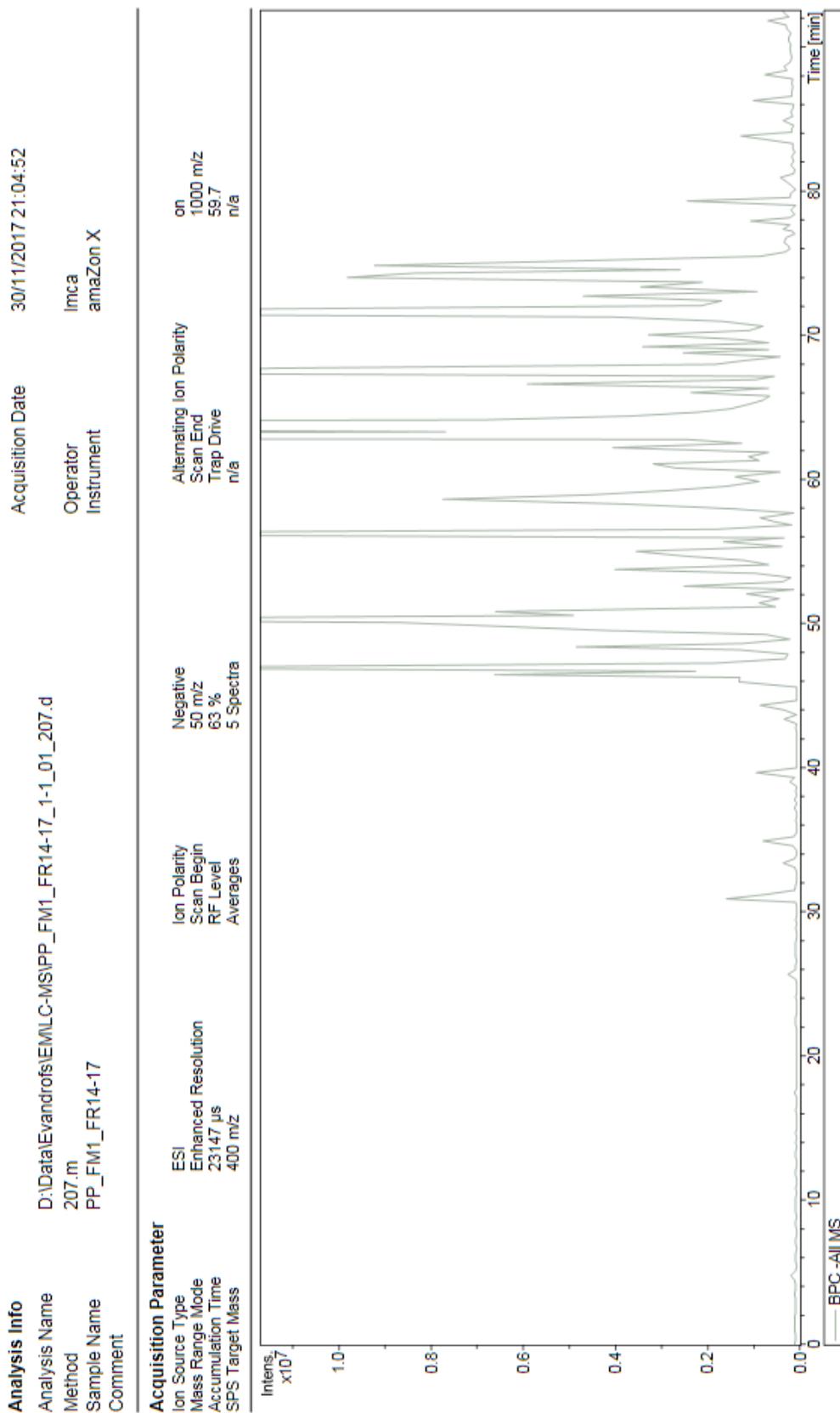


Figura 86 - Espectro de MS - ESI- Fração 14-17

5.5.1. Identificação de Cp-10

O íon com tempo de retenção 25,7 minutos e relação m/z 341 $[M - H]^-$ foi codificado como **Cp-10**, em suas fragmentações Ms^2 e Ms^3 Figura 87 mostraram a perda de 162 unidades de massa compatível com a perda de hexose $[M - 162 - H]$ gerando o íon fragmento m/z 179 compatível com a aglicona do ácido caféico e a perda de 18 unidades referente a perda de uma molécula H_2O gerando fragmento m/z 161, esses dados e comparações com a literatura permitiram identificar putativamente Cp-10 como Ác. Cafeíco O-hexose (SPÍNOLA; PINTO; CASTILHO, 2015), descrita pela primeira vez em *Chresta pacourinoides*. A fragmentação sugerida pode ser observada no Esquema 6

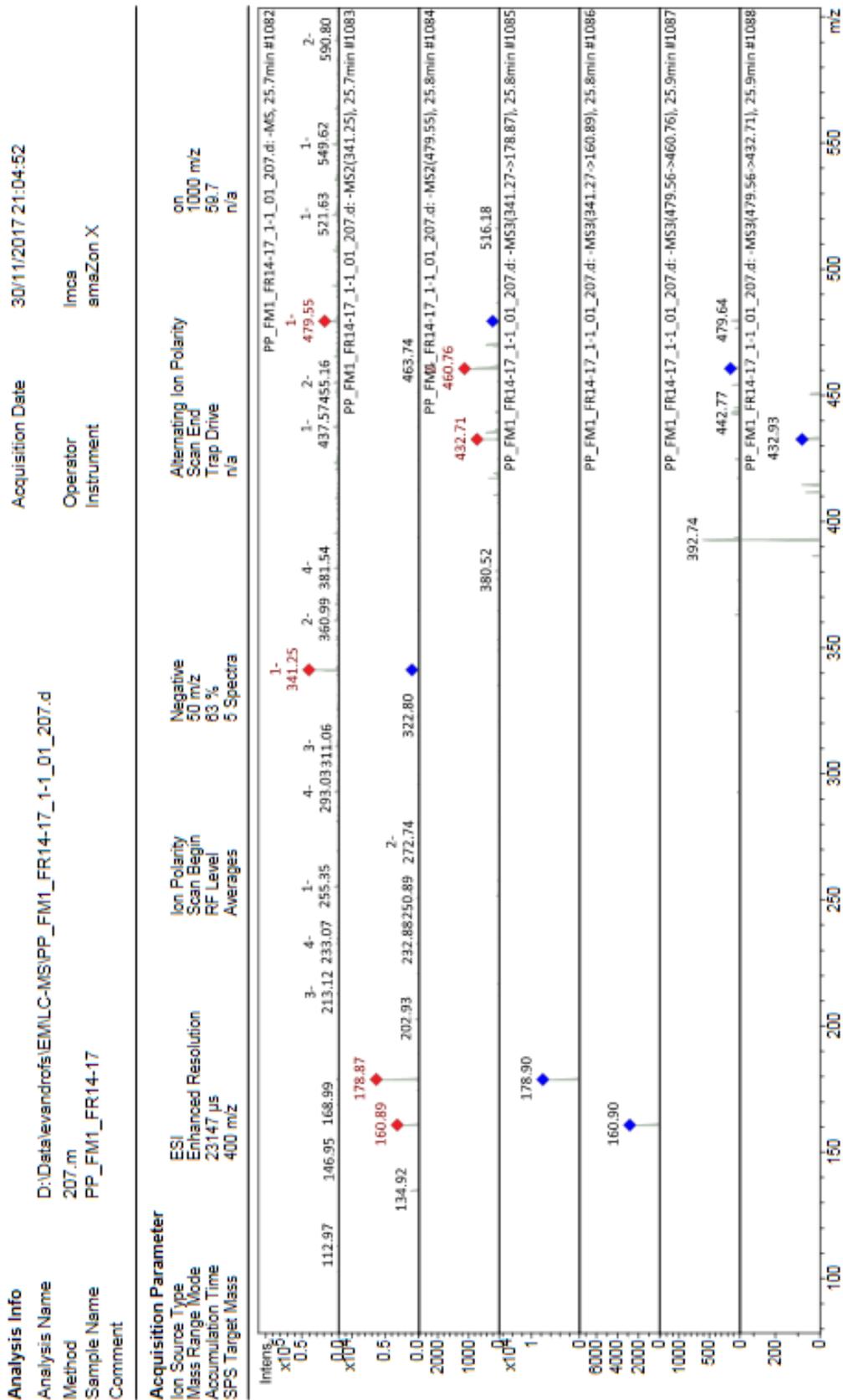
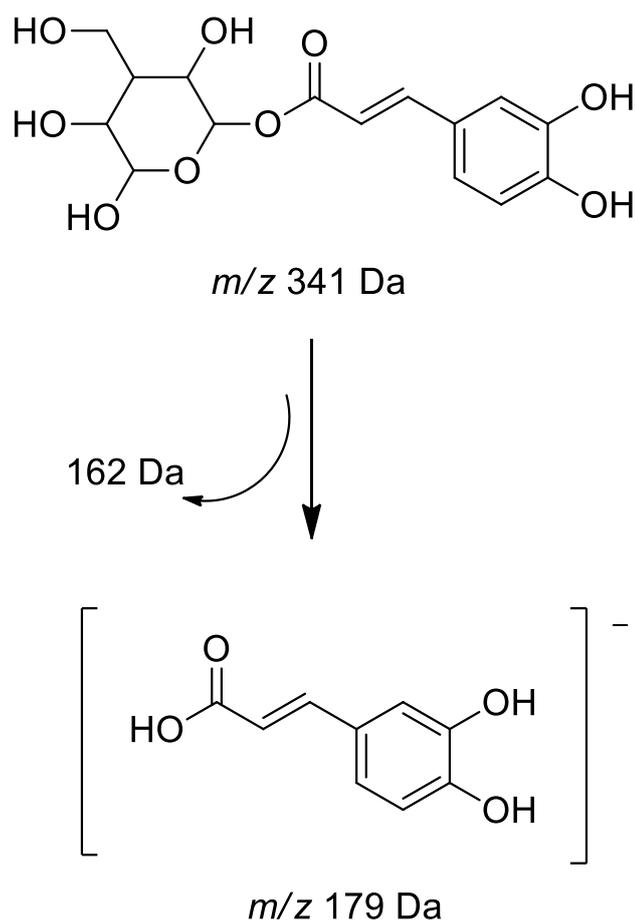


Figura 87 - Fragmentação de Cp-10



Esquema 6 - Proposta de Fragmentação de Cp-10

5.5.2. Identificação de Cp-11

O íon com tempo de retenção 31,0 minutos e relação m/z 353 $[M - H]^-$ foi codificado como Cp-11, em suas fragmentações Ms^2 e Ms^3 Figura 88 m/z 191, m/z 179 e m/z 135, que de acordo com dados da literatura são compatíveis com o ácido quínico m/z 191 $[M - 162 - H]^-$, m/z 179 ácido caféico $[M - 174 - H]^-$ e m/z 135 $[M - 174 - 44 H]^-$ referente a perda de CO_2 a partir do fragmento m/z 179, conforme fragmentação sugerida no Esquema 5. Esses dados e comparações com a literatura permitiram identificar putativamente Cp-11 como Ác. Clorogênico (Ác. Cafeoilquínico) (LLORENT-MARTÍNEZ et al., 2016), descrita pela primeira vez em *Chresta pacourinoides*. A fragmentação sugerida pode ser observada no Esquema 7.

Analysis Info
 Acquisition Date: 30/11/2017 21:04:52
 Analysis Name: D:\Data\androfs\EMILC-MS\PP_FM1_FR14-17_1-1_01_207.d
 Method: 207.m
 Sample Name: PP_FM1_FR14-17
 Comment:

Acquisition Parameter

Ion Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Alternating Ion Polarity	on
Mass Range Mode	Enhanced Resolution	Scan Begin	50 m/z	Scan End	1000 m/z
Accumulation Time	23147 µs	RF Level	63 %	Trap Drive	59.7
SPS Target Mass	400 m/z	Averages	5 Spectra	n/a	n/a

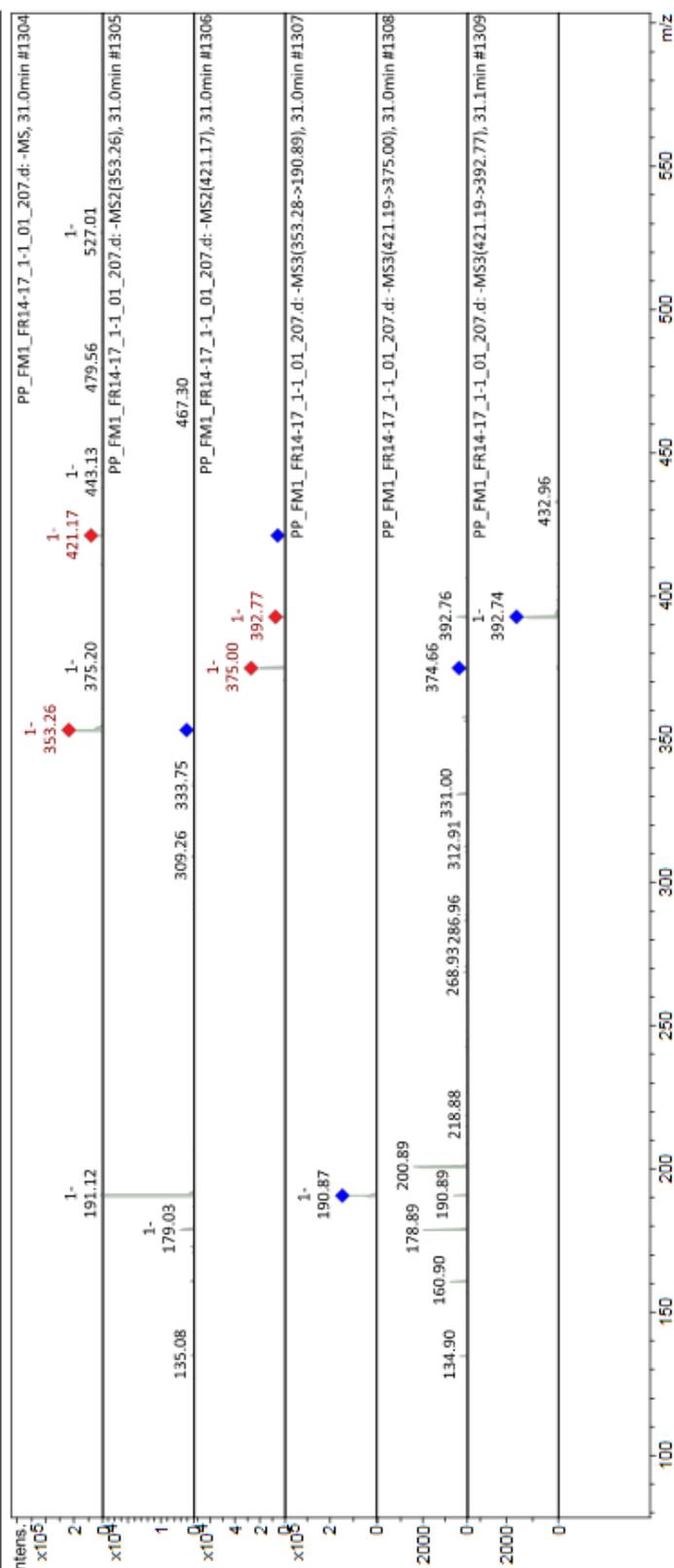
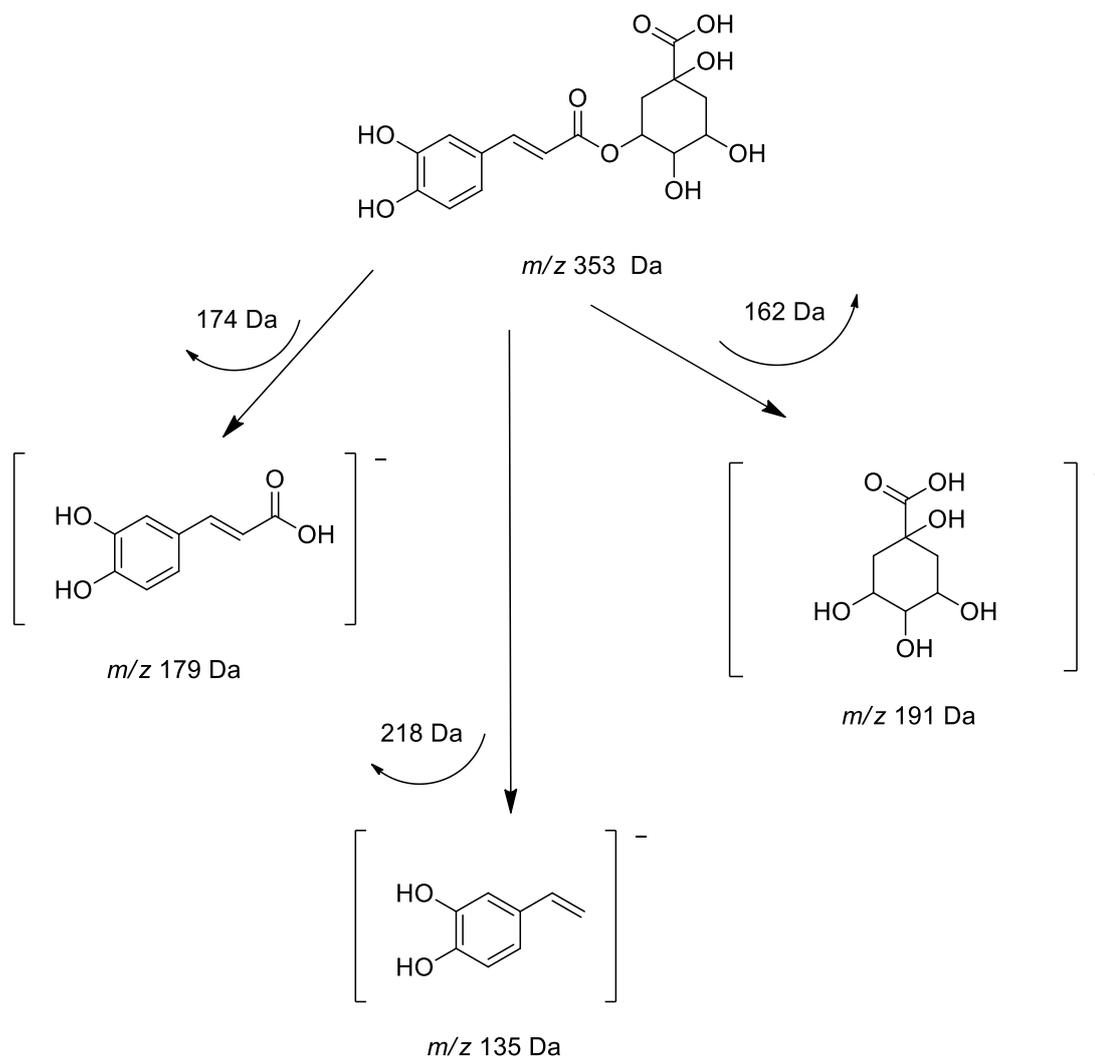


Figura 88 - Fragmentação de Cp-11



Esquema 7 - Proposta de Fragmentação de Cp-11

5.5.3. Identificação de Cp-12

O íon com tempo de retenção 34,9 minutos e relação m/z 515 $[M - H]^-$ foi codificado como **Cp-12**, em suas fragmentações Ms^2 e Ms^3 Figura 89 mostraram a perda de 163 unidades de massa compatível com a perda de um grupo cafeoil $[M - 163 - H]^-$ gerando o íon fragmento m/z 353 compatível com **Cp-11**, apresentando as mesmas fragmentações e intensidades, sugerindo que **Cp-12** se trataria de um derivado do ác. Cafeoilquínico, apresentando duas unidades de cafeoil. Esses dados e comparações com a literatura permitiram identificar putativamente **Cp-12** como Ác. 3,4-dicafeoilquínico (LLORENT-MARTÍNEZ et al., 2016) substância relatada pela primeira vez em *Chresta pacourinoides*. A fragmentação sugerida pode ser observada no Esquema 8.

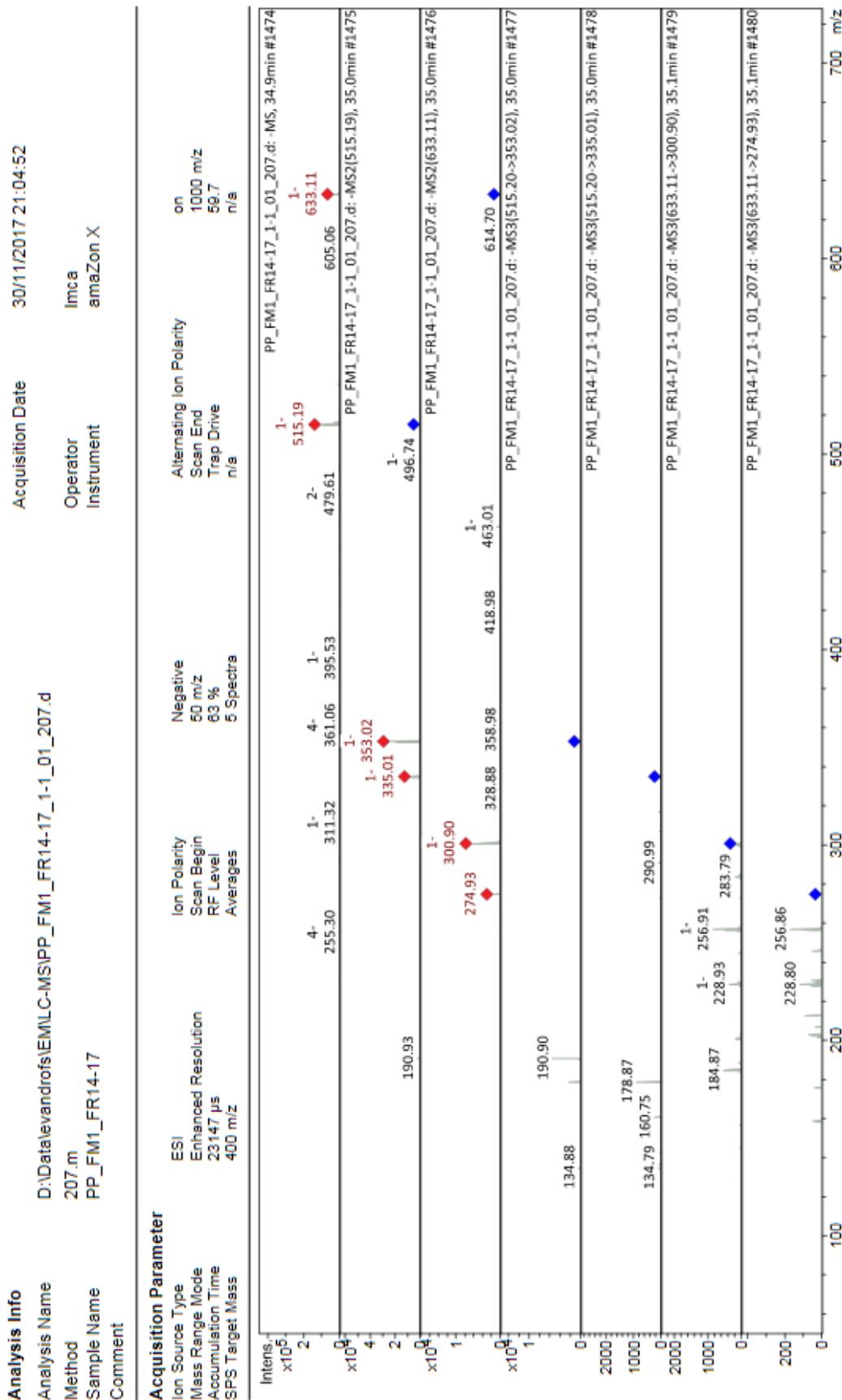
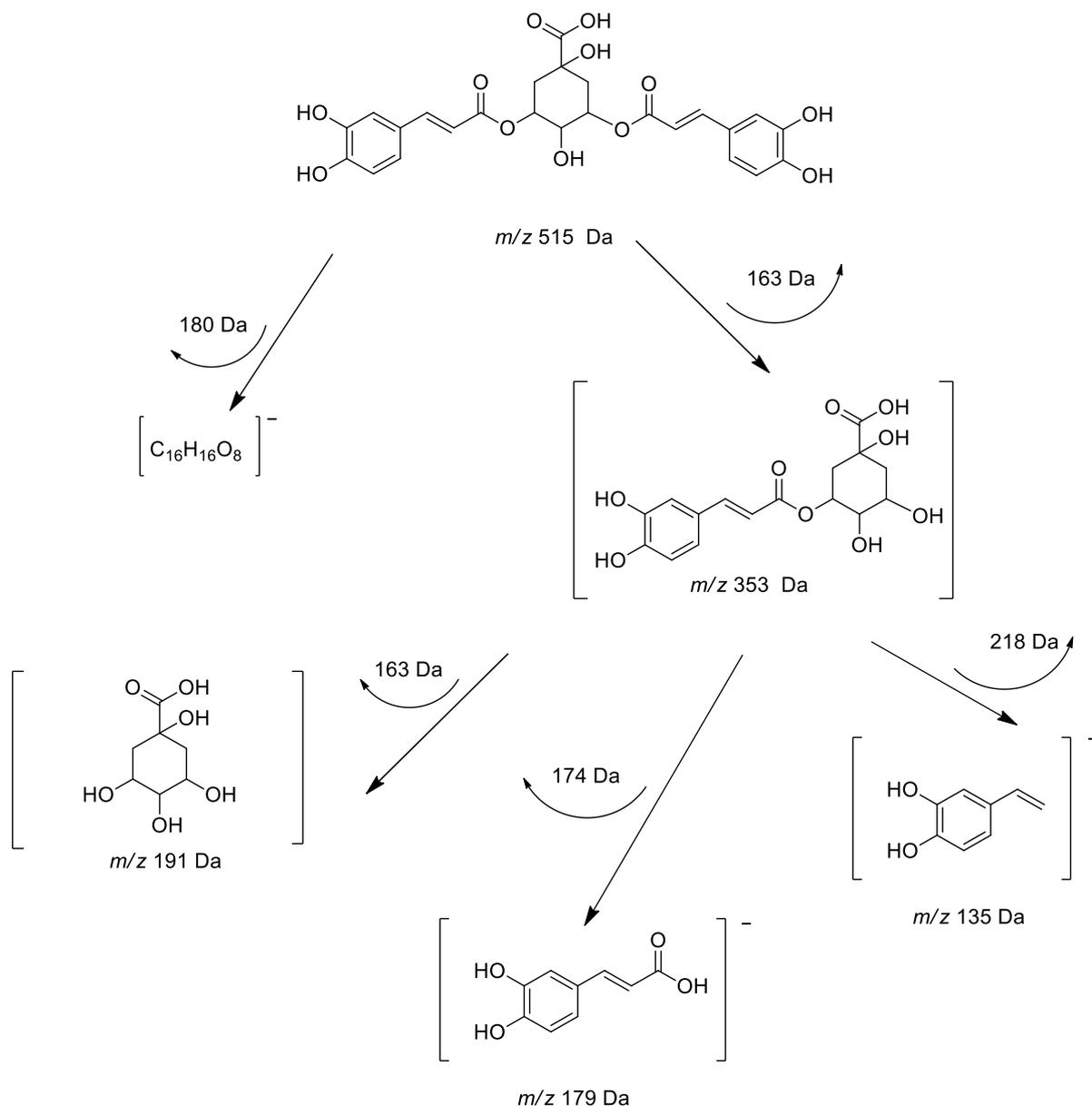


Figura 89 - Fragmentação de Cp-12



Esquema 8 - Proposta de fragmentação de Cp-12

5.5.4. Identificação de Cp-13

O íon com tempo de retenção 43,4 minutos e relação m/z 447 $[M - H]^-$ foi codificado como **Cp-13**, em suas fragmentações Ms^2 Figura 90 foi possível observar a perda de H_2O $[M-H-18]^-$ e perdas de 120 e 90 Da, características de perdas de unidades de C-hexose gerando os fragmentos m/z 357 e 327.

No Ms^3 gerado a partir do íon fragmento m/z 327, foi possível observar a perda de 28 Da referente a perda de CO gerando o íon m/z 299, outro fragmento observado

foi o m/z 285 através da perda atribuído a aglicona através da perda 42 Da atribuída a perda simultânea de CO e CH₂. Esses dados e comparações com a literatura permitiram identificar putativamente **Cp-13** como Luteolina-O-hexose (LLORENT-MARTÍNEZ et al., 2016), substância relatada pela primeira vez em *Chresta pacourinoides*. A fragmentação sugerida pode ser observada no Esquema 9.

Analysis Info
 Acquisition Date: 30/11/2017 21:04:52
 Analysis Name: D:\Data\evandrofs\EMILC-MS\PP_FM1_FR14-17_1-1_01_207.d
 Method: 207.m
 Sample Name: PP_FM1_FR14-17
 Comment: Imca
 Instrument: amazon X

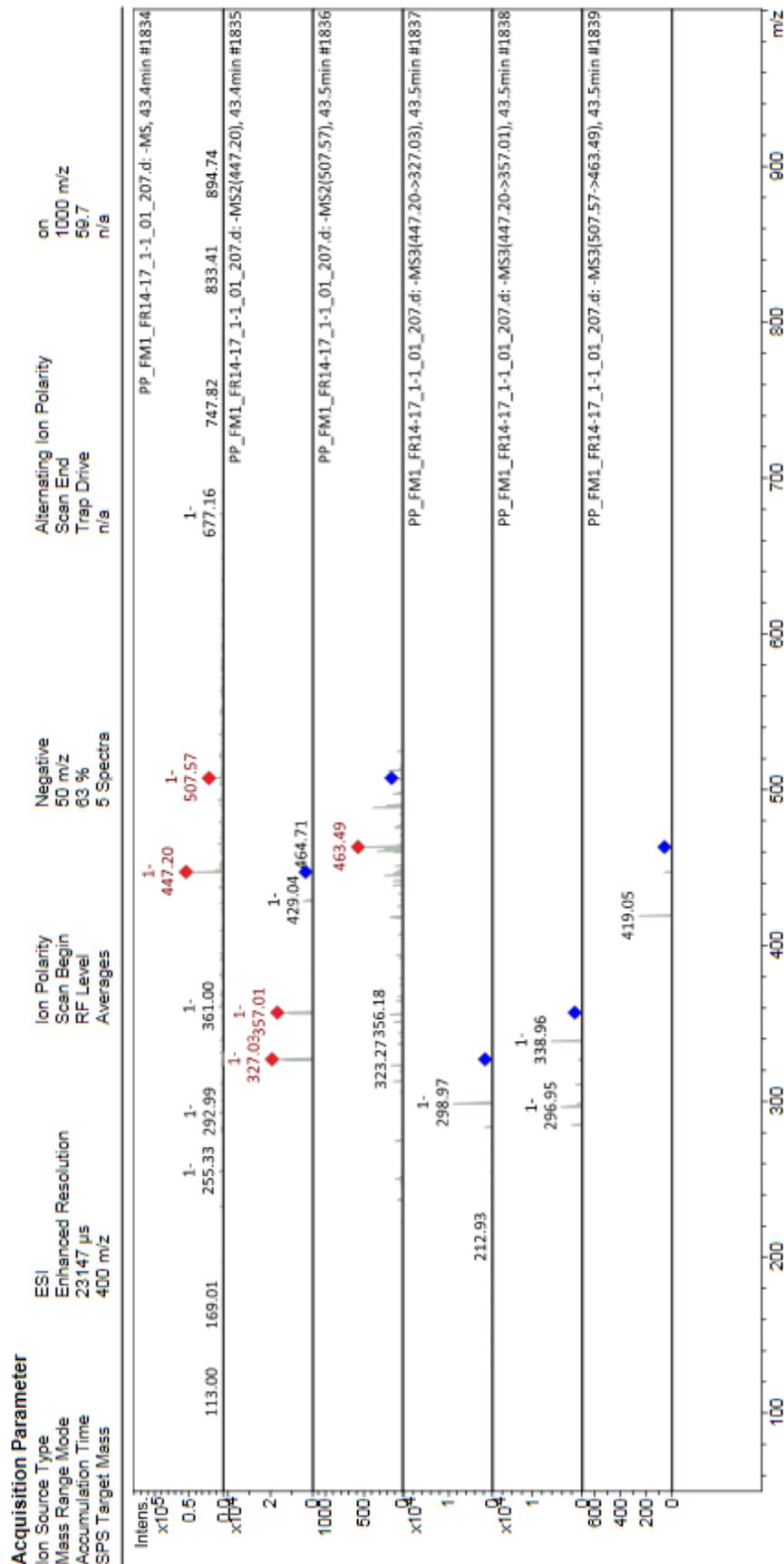
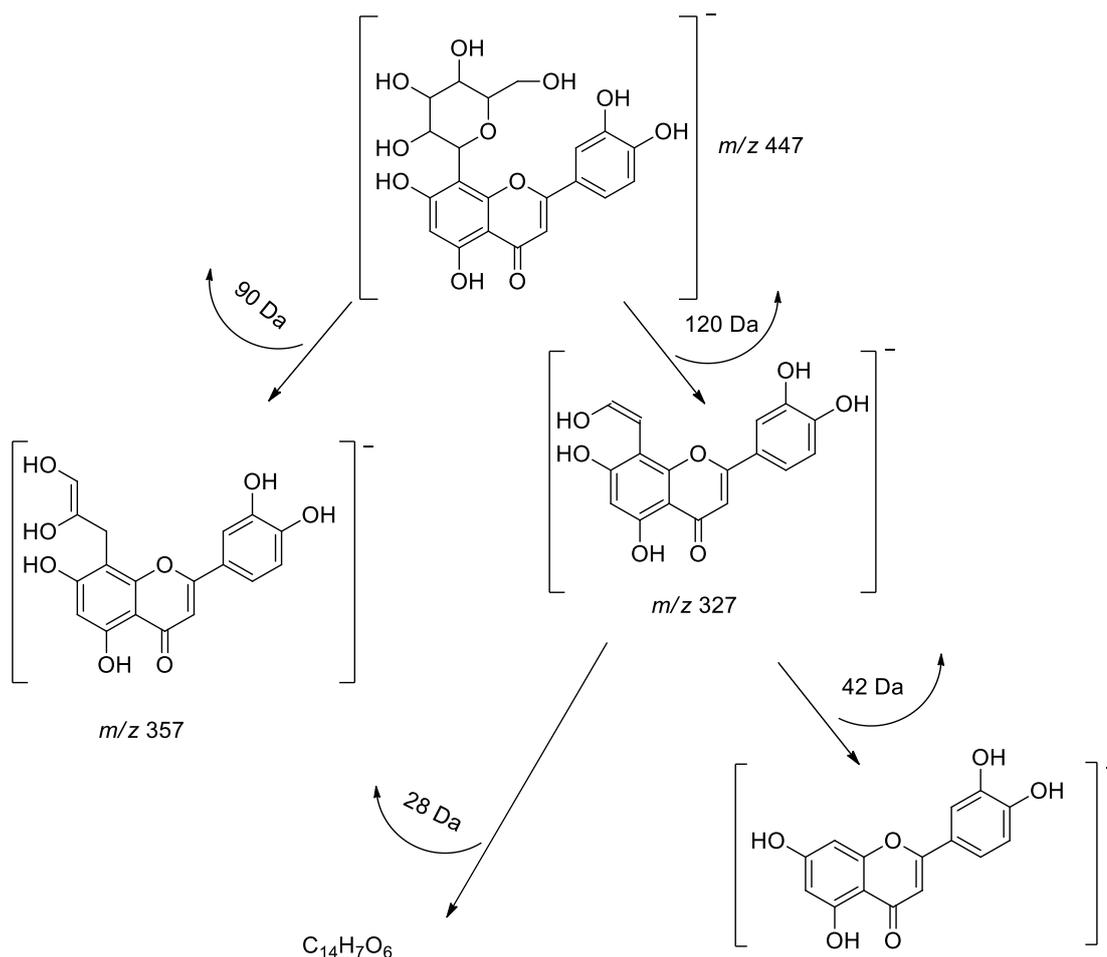


Figura 90 - Fragmentação de Cp-13



Esquema 9 - Proposta de fragmentação de Cp-13

5.5.5. Identificação de Cp-14

O íon com tempo de retenção 67,5 minutos e relação m/z 269 $[M - H]^-$ foi codificado como **Cp-14**, em suas fragmentações Ms^2 Figura 91 foi possível observar a perda de CO_2 $[M-H-44]^-$ gerando o íon fragmento m/z 225, e perdas de 120 e 152 Da.

Esses dados e comparações com a literatura permitiram identificar putativamente **Cp-14** como Apigenina (BASTOS et al., 2017), substância relatada pela primeira vez em *Chresta pacourinoides*. A fragmentação sugerida pode ser observada no Esquema 10.

Analysis Info
 Acquisition Date: 30/11/2017 21:04:52
 Analysis Name: D:\Data\evandrofs\EMLC-MSIPP_FM1_FR14-17_1-1_01_207.d
 Method: 207.m
 Sample Name: PP_FM1_FR14-17
 Operator: Imca
 Instrument: amazon X
 Comment:

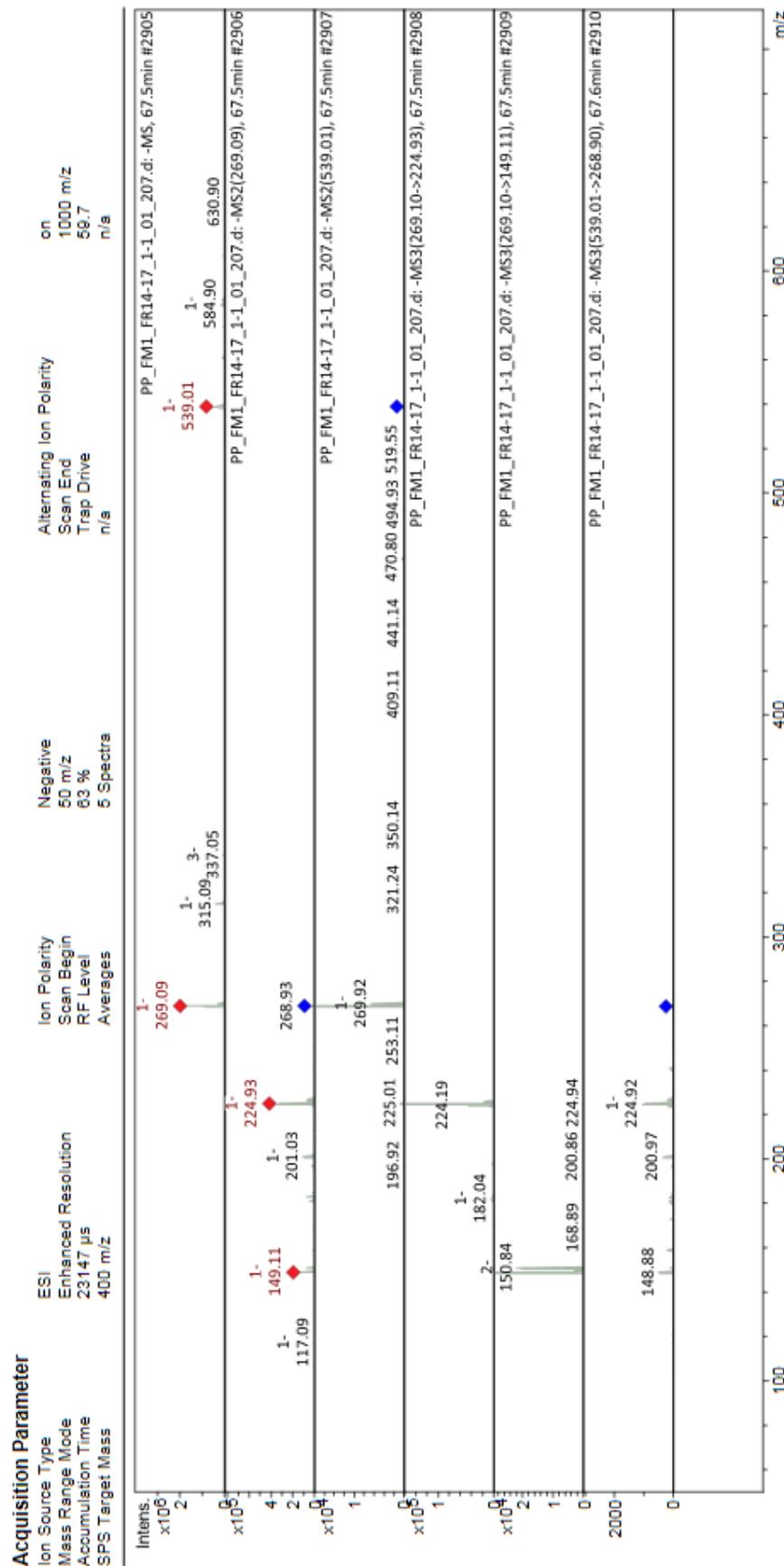
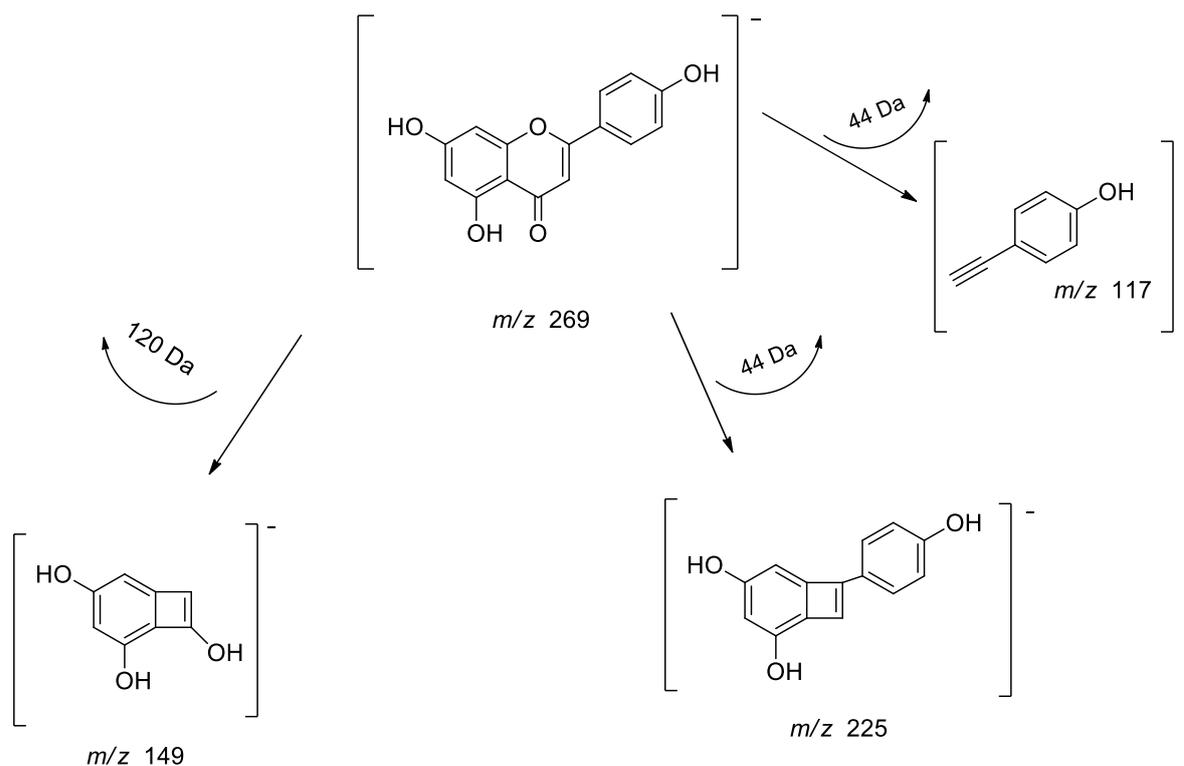


Figura 91 - Fragmentação de Cp-14



Esquema 10 - Proposta de fragmentação de Cp-14

5.5.6. Identificação de Cp-15

O íon com tempo de retenção 50,4 minutos e relação m/z 463 $[M - H]^-$ foi codificado como **Cp-15**, em suas fragmentações Ms^2 Figura 92 foi possível observar a perda de 162 Da correspondente a uma unidade de hexose gerando o íon fragmento m/z 301, em seu Ms^3 ele foi observado fragmentos com m/z 151 e 179, geralmente observados em fragmentação do tipo RDA (Retro-Diels Alder) em flavonoides. Comparação com dados da literatura (JAISWAL; JAYASINGHE; KUHNERT, 2012) nos permitiram identificar putativamente **Cp-15** como Quercetina-O-Hexose, substância relatada pela primeira vez em *Chresta pacourinoides*. A fragmentação sugerida pode ser observada no Esquema 11.

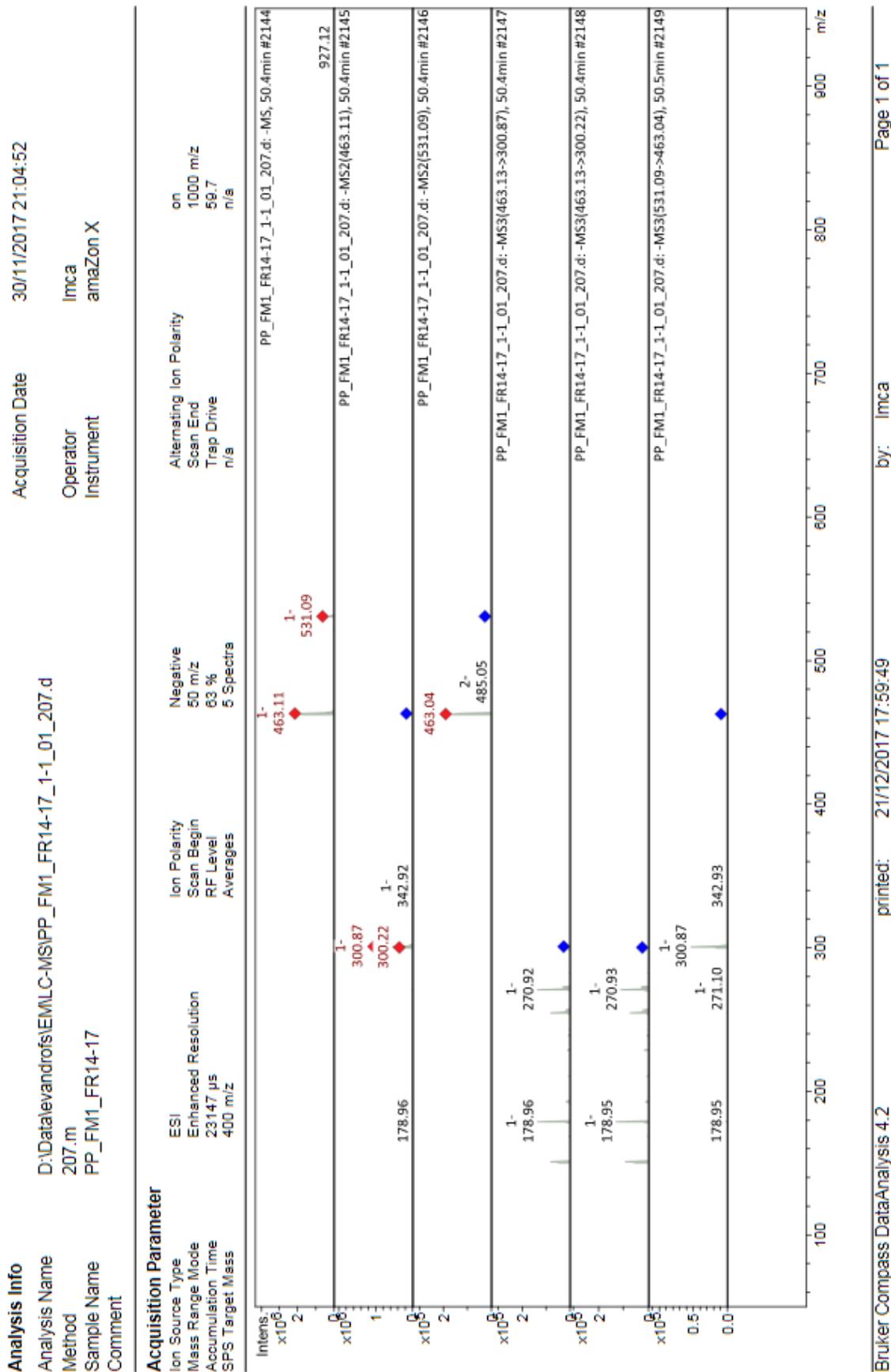
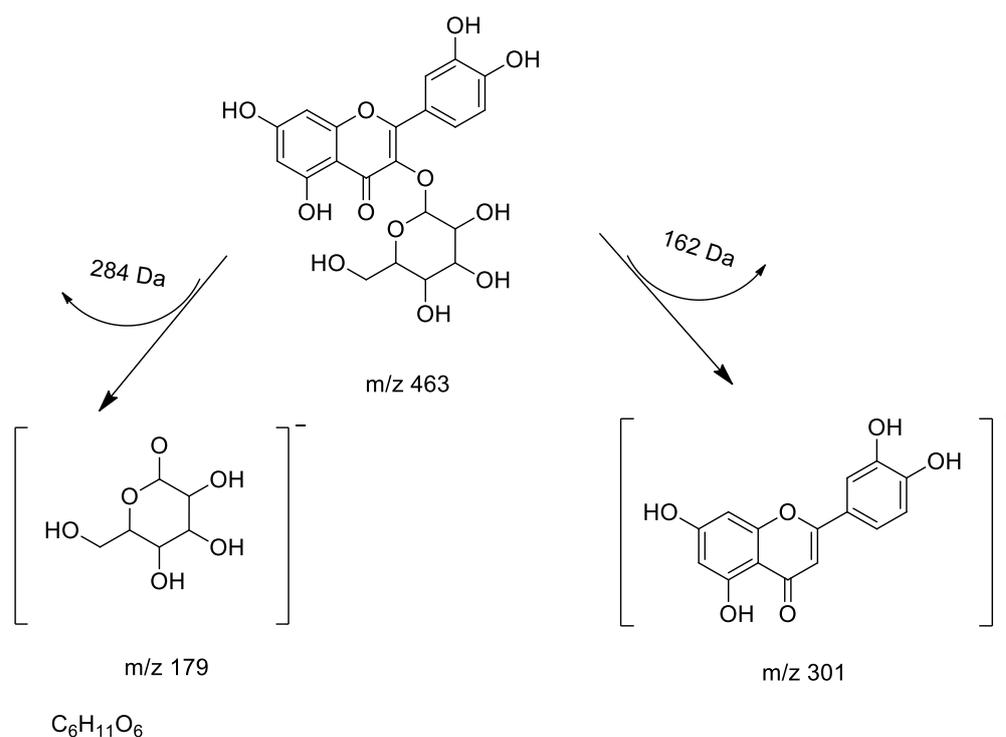


Figura 92 - Fragmentação de Cp-15



Esquema 11 - Proposta de fragmentação de Cp-15

5.6. Teste larvicida

O extrato etanólico bruto, a fase metanólica e o composto isolado Cp-6 (3-metoxiquercetina) foram submetidos a um ensaio larvicida preliminar diante de larvas de *Aedes aegypti*. No entanto, como observado na Tabela 18 não houve mortalidade significativa nas soluções testadas (10, 50 e 100 ppm).

Tabela 18 - Tabela de concentrações do bioensaio larvicida preliminar

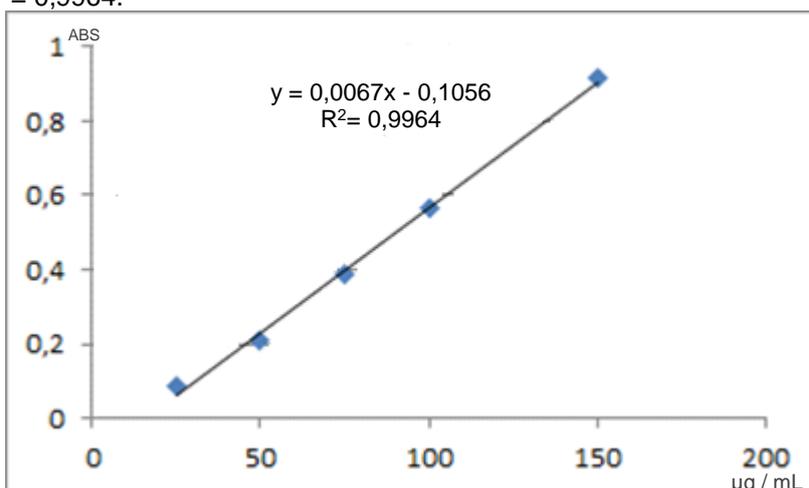
	Concentração (ppm)	V _{solução} (mL)	V _{água} (mL)	24h	%	48h	%
EEB	10	2	18	20V/0M	0	20V/0M	0
	50	10	10	20V/0M	0	20V/0M	0
	100	20	0	20V/0M	0	17V/3M	15
FM	10	2	18	20V/0M	0	20V/0M	0
	50	10	10	20V/0M	0	20V/0M	0
	100	20	0	20V/0M	0	19V/1M	5
Cp-6	10	2	18	20V/0M	0	17V/3M	15
	50	10	10	18V/2M	10	18V/2M	10
	100	20	0	19V/1M	5	19V/1M	5

Legenda: V=larvas vivas; M=larvas mortas

5.7. Determinação do Fenólicos Totais

Para a realização da quantificação do teor de fenólicos das amostras testadas foi utilizado o método do Folin-Ciocalteu. A equação de regressão linear e o r do padrão, ácido gálico (25; 50; 75; 100 e 150 $\mu\text{g} / \text{mL}$), encontram-se no Gráfico 1 abaixo. Esta foi feita para posterior interpolação dos dados e para calcularmos o teor de fenóis em mg EAG / g de amostra na concentração de 1 mg / mL, Quadro 2 e Gráfico 2.

Gráfico 1 - Curva padrão da quantificação de fenólicos totais empregando ácido gálico como substância de referência. $R^2 = 0,9964$.



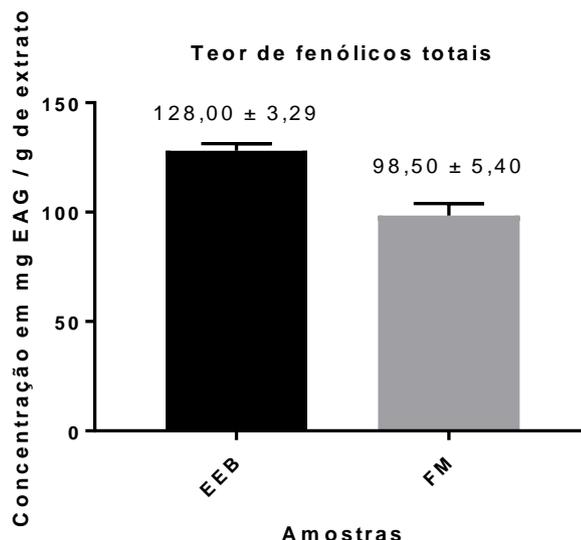
Quadro 2 - Média do teor de fenólicos totais das amostras em mg EAG/g de extrato por dia (n=3), na concentração de 1 mg/mL

Amostra	Teor de Fenólicos Totais (mg EAG / g)			CV(%)*	p
	Dia 1	Dia 2	Dia 3		
EEB	126,61 \pm 1,58	126,32 \pm 3,50	131,08 \pm 2,67	2,57	0,13
FM	93,82 \pm 0,91	99,97 \pm 5,50	101,68 \pm 5,80	5,48	0,18

Dados expressos como média \pm desvio padrão, em triplicata. Foram comparados os dados interdia e intradia, analisados por ANOVA seguida de Tukey. EEB = extrato etanólico bruto; FM = fase metanólica.

*Coeficiente de variação

Gráfico 2 - Teor de fenóis totais nas amostras (n = 9). Dados expressos como média \pm desvio padrão. Os dados foram analisados por ANOVA seguida de Tukey ($p > 0,05$).



Através dos dados expostos no Gráfico 2, foi possível concluir que não há diferença significativa entre os dias de teste ($p > 0,05$), sendo o método reprodutível na concentração utilizada. Diante desses resultados foi possível verificar que o EEB apresentou um teor de fenólicos totais maior ($128,00 \pm 3,29$ mg EAG/g) que a FM.

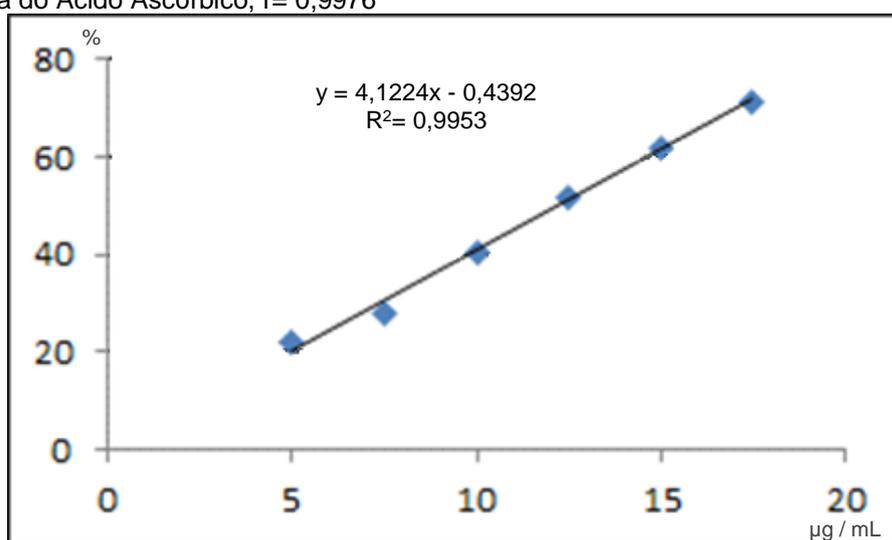
A determinação do teor de compostos fenólicos totais (TFT) em espécies de *Chresta* já foi efetuada anteriormente (DA COSTA et al., 2015), onde foi observado que o TFT de *C. sphaerocephala* foi 309,6 mg EAG/g; em outros estudos (CATARINO et al., 2018) foi visto que *Eriocephalus africanus* apresentou 321 mg EAG / g \pm 0,15 para o EEB e *Centaurea aggregata* 352.71 ± 17.23 mg EAG / g (AYAZ et al., 2017); *C. solstitialis* 391.53 ± 25.70 mg EAG / g para extratos metanólicos. Por causa da escassez de estudos com o gênero *Chresta*, o TFT foi comparado com o de outras espécies da família Asteraceae.

Comparando as diversas espécies de Asteraceae, foi observado um menor teor de compostos fenólicos totais na fase metanólica ($128,00 \pm 3,29$ mg EAG/g) Gráfico 2. Fatores como sistema de solventes utilizados pode alterar significativamente o rendimento e a composição do extrato (MOURE et al., 2001). Outra explicação pode estar associada a fatores edáficos (localização geográfica), nutrientes, poluição ambiental, altitude, estação do ano, calor, umidade podem afetar a proporção desses constituintes (SANTOS; MARTINS, 2007).

5.8. Determinação da atividade antioxidante in vitro: método DPPH

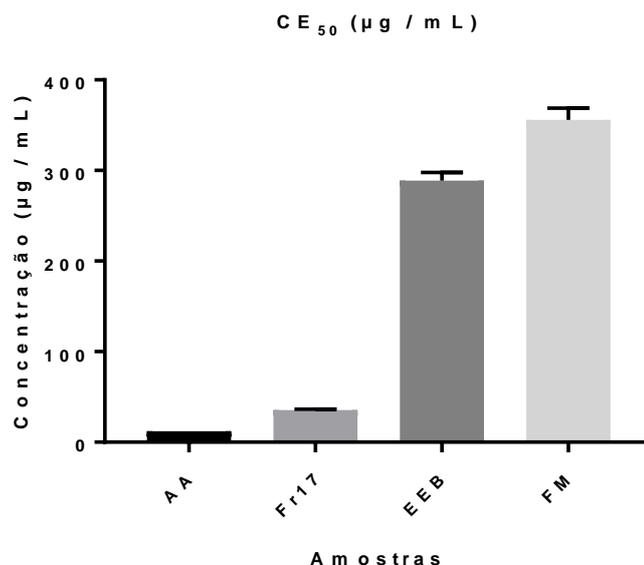
O composto padrão utilizado foi o Ácido ascórbico (AA) e tanto a equação de regressão linear como o r estão expressos no Gráfico 3. As concentrações padrão utilizadas foram 5; 7,5; 10; 12,5; 15 e 17,5 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados foram expressos como média da $CE_{50} \pm \text{D.P}$ (desvio padrão) das amostras referentes ao teste do DPPH no Quadro 3 bem como no Gráfico 4

Gráfico 3 - Curva do Ácido Ascórbico, $r = 0,9976$



Quadro 3 - Média da $CE_{50} \pm \text{DP}$ das amostras e do AA, analisados pelo método de DPPH em três dias de análise (n=3).

Amostra	CE ₅₀ $\mu\text{g/mL}$			CV(%)*	p
	Dia 1	Dia 2	Dia 3		
EEB	287,2596 \pm 7,259854	285,5073 \pm 11,5769	293,7296 \pm 9,596079	3,17	0,79
FM	348,79 \pm 13,04	368,75 \pm 11,04	349,60 \pm 5,53	3,73	0,09
Fr 14-17	35,03471 \pm 0,598146	36,56696 \pm 0,27247	35,37082 \pm 1,197417	2,74	0,12

Gráfico 4 - Média geral das $CE_{50} \pm DP$ das amostras de ácido ascórbico (n=9)

AA = ácido ascórbico; Fr 17 = fração 14-17; EEB = extrato etanólico bruto; FM = fase metanólica.

A partir dos resultados observados no Gráfico 4 foi possível observar que não houve diferença entre as médias de CE_{50} nos três dias de teste no nível de 95% de significância. Observando os dados expostos nesse mesmo gráfico, foi possível observar que a fração 17 apresentou uma boa atividade antioxidante, no entanto, tanto o extrato etanólico bruto quanto a fase de *C. pacourinoides*, apresentaram um atividade antioxidante muito baixa.

Comparando o EEB e a FM de *C. pacourinoides*, verificamos que o extrato apresentou um teor de fenólicos totais maior que a FM, no entanto, ao que se refere à atividade antioxidante, é o extrato que se sobressai, exibindo uma maior atividade antioxidante. Esse comportamento inesperado pode ser justificado pelo fato da atividade antioxidante dos compostos existentes em extratos está relacionada à sua estrutura química (SOUSA et al., 2007; MORAIS et al., 2009; VIEIRA et al., 2011), e suas concentrações, estando em baixas doses, podem agir como antioxidante e em altas doses como pró-oxidantes (FUJISAWA et al., 2002; SAKIHAMA et al., 2002; BEZERRA et al., 2017). Podemos inferir que os flavonoides presentes na fase metanólica podem estar ligados a unidades de açúcar, tendo seu poder antioxidante diminuído (PIETTA, 2000; OLDONI, 2007).

Conclusões

6. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos é possível concluir que o estudo fitoquímico de *Chresta pacourinoides* resultou no isolamento de vinte frações, das quais nove foram identificadas, sendo elas: oito flavonoides: campferol (Cp-1); isoquercetrin (Cp-2); crisoeriol (Cp-3); apigenina (Cp-5); 3-ometilquercetina (Cp-6); luteolina (Cp-7); eriodictiol (Cp-8); stricnobilavona (Cp-9), e um ácido fenólico: ácido protocatecuico (Cp-4). As substâncias Cp-5 e Cp-6 já haviam sido isoladas anteriormente na espécie. Os demais compostos foram isolados pela primeira vez no gênero. Por espectrometria de massas foi possível identificar seis substâncias (Cp10) ácido cafeíco *o*-hexose; (Cp11) ácido cafeoilquínico; (Cp12) ácido 3,4-dicafeoilquínico; (Cp13) luteolina-*o*-hexose; (Cp14) apigenina; (Cp15) quercetina-*o*-hexose, dentre essas substâncias cinco foram citadas a primeira vez no gênero.

Com relação as atividades biológicas, embora o extrato e a fase metanólica tenham apresentado boas concentrações de compostos fenólicos, suas atividades antioxidantes não foram satisfatórias pelo método de DPPH, já a fração 14-17, apresentou atividade antioxidante promissora necessitando de mais estudos para confirmá-la.

Assim, esse trabalho contribuiu para a ampliação do conhecimento fitoquímico desta espécie que dentro da família é pouco estudada, mas os resultados obtidos corroboram com dados da família Asteraceae, dessa forma, vale ressaltar a necessidade de continuação do estudo dessa espécie já que esta demonstrou uma grande riqueza de compostos na fase metanólica.

Referências

7. REFERÊNCIAS

ABEYSIRI, G. R. P. I.; DHARMADASA, R. M.; ABEYSINGHE, D. C.; SAMARASINGHE, K. Screening of Phytochemical, Physico-Chemical and Bioactivity of Different Parts of *Acmella Oleraceae* Murr. (Asteraceae), a Natural Remedy for Toothache. **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 852–856, 2013.

AGRA, M. de F.; FREITAS, P. F. de; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the Plants Known as Medicinal and Poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 114–140, 2007.

AGRA, M. F.; BARACHO, G. S.; NURIT, K.; BASÍLIO, I. J. L. D.; COELHO, V. P. M. Medicinal and Poisonous Diversity of the Flora of “Cariri Paraibano”, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 383–395, 2007.

AHMADINEJAD, F.; GEIR MØLLER, S.; HASHEMZADEH-CHALESHTORI, M.; BIDKHORI, G.; JAMI, M.-S. Molecular Mechanisms behind Free Radical Scavengers Function against Oxidative Stress. **Antioxidants**, v. 6, n. 3, p. 51, 2017.

AHMED, S.; AL-REHAILY, A. J.; AHMAD, M. S.; YOUSAF, M.; NUR-E-ALAM, M.; THOMAS, J.; KHAN, S. I.; KHAN, I. A. Cytotoxic and Antiinflammatory Activities of the Chemical Constituents Isolated from *Baccharoides Schimperii* DC. **South African Journal of Botany**, v. 114, p. 9–13, 2018.

ALI A. ALWAHSH, M.; KHAIRUDDEAN, M.; KENG CHONG, W. **Chemical Constituents and Antioxidant Activity of *Teucrium barbeyanum* Aschers.** v. 9, 2015.

ALMEIDA, J. R. G. da S.; MEIRA, P. R. M.; NOBRE, I. B. de C.; TUPINÁ, J. D. R. Uso de plantas medicinais em uma unidade de saúde da família no município de Juazeiro-BA. **Interfaces Científicas - Saúde e Ambiente**, v. 1, n. 1, p. 09, 2012.

ALMEIDA, L. S.; MONTEIRO, F. K.; MELO, J. I. **A família Asteraceae bercht. & j.presl no campus central da universidade estadual da Paraíba, Campina Grande, Paraíba, 2017.**

ALVES, L. F. Production of Phytotherapeutics in Brazil: History, Problems and Perspectives. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 3, 2013.

ALVES, M.; ROQUE, N. Flora da Bahia: Asteraceae – Tribo Heliantheae. **SITIENBIBUS série Ciências Biológicas**, v. 16, 2016.

ANDRADE MATTIETTO, R. de; SANTOS LOPES, A.; CASTLE DE MEN, H. Caracterização física e físico-química dos frutos da cajazeira (*Spondias mombin L.*) e de suas polpas obtidas por dois tipos de extrator. **Brazilian Journal of food technology**, v. 13, n. 03, p. 156–164, 2010.

ANISZEWSKI, T. **Alkaloids: chemistry, biology, ecology and applications**. 2015.

AQUINO, V. V. F.; COSTA, J. G. M.; ANGÉLICO, E. C.; MEDEIROS, R. S.; LUCENA, M. de F. A.; RODRIGUES, O. G. Metabólitos Secundários e ação antioxidante de *Croton heliotripifolius* e *Croton blanchetianus*. **Acta Brasiliensis**, v. 1, n. 3, p. 28, 2017.

ARAÚJO, E.; CASTRO, C.; ALBUQUERQUE, U. **Dynamics of Brazilian Caatinga – A Review Concerning the Plants, Environment and People**. v. 1, 2007.

ATOUI, A. Tea and Herbal Infusions: Their Antioxidant Activity and Phenolic Profile. **Food Chemistry**, v. 89, n. 1, p. 27–36, 2005.

AYAZ, F. A.; OZCAN, M.; KURT, A.; KARAYIGIT, B.; OZOGUL, Y.; GLEW, R.; OZOGUL, F. Fatty acid composition and antioxidant capacity of cypselas in *Centaurea s.l. taxa* (Asteraceae, Cardueae) from NE Anatolia. **South African Journal of Botany**, v. 112, p. 474–482, 2017.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse Oxidativo: Relação Entre Geração de Espécies Reativas e Defesa Do Organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.

BASTOS, K.; DIAS, C.; NASCIMENTO, Y.; DA SILVA, M.; LANGASSNER, S.; WESSJOHANN, L.; TAVARES, J. Identification of Phenolic Compounds from *Hancornia Speciosa* (Apocynaceae) Leaves by UHPLC Orbitrap-HRMS. **Molecules**, v. 22, n. 1, p. 143, 2017.

BAYER, R. J.; STARR, J. R. Tribal Phylogeny of the Asteraceae Based on Two Non-Coding Chloroplast Sequences, the trnL Intron and trnL/trnF Intergenic Spacer. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 85, n. 2, p. 242, 1998.

BEN HASSINE, D.; KHLIFI, D.; FERHOUT, H.; RAOELISON, E. G.; BOUAJILA, J. Curry Plant (*Helichrysum* sp.) Oils. In: **Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety**. Elsevier, p. 395–403, 2016.

BEZERRA, D.; MILITÃO, G.; DE MORAIS, M.; DE SOUSA, D. The Dual Antioxidant/Prooxidant Effect of Eugenol and Its Action in Cancer Development and Treatment. **Nutrients**, v. 9, n. 12, p. 1367, 2017.

BLOIS, M. S. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. **Nature**, v. 181, n. 4617, p. 1199–1200, 1958.

BOAS, A. C. V.; NASSUR, R. D. C. M. R.; FREIRE, J. M.; DECARLOS NETO, A.; LIMA, L. C. D. O. Quality characteristics and antioxidant activity of juices produced with irradiated grapes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 39, n. 2, 2017.

BUNACIU, A. A.; DANET, A. F.; FLESCHEIN, Ş.; ABOUL-ENEIN, H. Y. Recent Applications for in Vitro Antioxidant Activity Assay. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 46, n. 5, p. 389–399, 2016.

CARVALHO, J.; MARTINS, J.; MENDONÇA, M. da C.; LIMA, L. **Uso popular das plantas medicinais na comunidade da várzea, Garanhuns - Pe**. Revista de biologia e ciências da terra, v. 13, n. 2, p. 58–65, 2013.

CATARINO, M. D.; SILVA, A. M. S.; SARAIVA, S. C.; SOBRAL, A. J. F. N.; CARDOSO, S. M. Characterization of phenolic constituents and evaluation of antioxidant properties of leaves and stems of *Eriocephalus africanus*. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 11, n. 1, p. 62–69, 2018.

CHAVES, M. H.; ANTÔNIA MARIA DAS GRAÇAS LOPES, C.; LOPES, J. A. D.; COSTA, D. A. da; OLIVEIRA, C. A. A. de; COSTA, A. F.; BRITO JÚNIOR, F. E. M. Fenóis Totais, Atividade Antioxidante e Constituintes Químicos de Extratos de *Anacardium Occidentale* L., Anacardiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 1, p. 106–112, 2010.

CORDEIRO, A. M. **Desenvolvimento de bioaditivos antioxidantes para otimização da estabilidade oxidativa de óleos comestíveis**. 2013. Universidade Federal da Paraíba, 2013.

COTA, B. B.; MAGALHÃES, A.; PIMENTA, A. M. C.; SIQUEIRA, E. P.; ALVES, T. M. A.; ZANI, C. L. Chemical Constituents of *Habenaria Petalodes* Lindl. (Orchidaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 6, p. 1098–1104, 2008.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981.

CROTTI, A. E. M.; CUNHA, W. R.; LOPES, N. P.; LOPES, J. L. C. Sesquiterpene Lactones from *Minasia Alpestris*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 3b, p. 677–680, 2005.

DA COSTA, L. S.; ANDREAZZA, N. L.; CORREA, W. R.; CUNHA, I. B. da S.; RUIZ, A. L. T. G.; DE CARVALHO, J. E.; SCHINOR, E. C.; DIAS, D. A.; SALVADOR, M. J. Antiproliferative Activity, Antioxidant Capacity and Chemical Composition of Extracts from the Leaves and Stem of *Chresta Sphaerocephala*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 4, p. 369–374, jul. 2015.

DEVASAGAYAM, T. P. A.; TILAK, J. C.; BOLOOR, K. K.; SANE, K. S.; GHASKADBI, S. S.; LELE, R. D. Free Radicals and Antioxidants in Human Health: Current Status and Future Prospects. **The Journal of the Association of Physicians of India**, v. 52, p. 794–804, 2004.

DORNAS, W.; T. OLIVEIRA, T.; G. RODRIGUES-DAS-DORES, R.; F. SANTOS, A.; J NAGEM, T. **Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo**. v. 28, 2009.

ENCARNACIÓN, D. R.; NOGUEIRAS, C. L.; SALINAS, V. H. A.; ANTHONI, U.; NIELSEN, P. H.; CHRISTOPHERSEN, C.; WANG, H.-G.; YAO, X.-K.; WANG, H.-G.; TUCHAGUES, J.-P.; ÖGREN, M. Isolation of Eriodictyol Identical with Huazhongilexone from *Solanum Hindsianum*. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 53, p. 375–377, 1999.

EVANS, J. R.; LAWRENSON, J. G. Antioxidant Vitamin and Mineral Supplements for Slowing the Progression of Age-Related Macular Degeneration. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, 30 jul. 2017.

FORZZA, R. C.; FILARDI, F. L. R.; LEITMAN, P.; LANNA, J. M. **Flora do Brasil 2020**. Rio de Janeiro: UFRJ, 2018.

FRANÇA, F.; MELO, E. **Flora de Inselbergues no Semiárido da Bahia: Região de Milagres e Adjacências**. 1^a ed. v. 1, 2014.

FRIIS, I.; BALSLEV, H.; SYMPOSIUM PLANT DIVERSITY AND COMPLEXITY PATTERNS - LOCAL, REGIONAL AND GLOBAL DIMENSIONS; DET KONGELIGE DANSKE VIDENSKABERNES SELSKAB (ed.). **Symposium Plant Diversity and Complexity Patterns - Local, Regional and Global Dimensions**. Copenhagen: Reitzel, 2005.

FUJISAWA, S.; ATSUMI, T.; KADOMA, Y.; SAKAGAMI, H. Antioxidant and Prooxidant Action of Eugenol-Related Compounds and Their Cytotoxicity. **Toxicology**, v. 177, n. 1, p. 39–54, 2002.

GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; HAMERSKI, L.; MIGUITA, C. H. Fenilpropanóides e Outros Constituintes Bioativos de *Nectandra Megapotamica*. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 407–411, 2009.

GARCÍA-PÉREZ, E.; GUTIÉRREZ-URIBE, J. A.; GARCÍA-LARA, S. Luteolin content and antioxidant activity in micropropagated plants of *Poliomintha glabrescens* (Gray). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 108, n. 3, p. 521–527, 2012.

GILABERTE, Y.; GONZÁLEZ, S. Update on Photoprotection. **Actas Dermo-Sifiliográficas (English Edition)**, v. 101, n. 8, p. 659–672, 2010.

GOMES, I. F. **Estudo fitoquímico e atividade biológica de duas espécies do semi-árido paraibano: *Pithecoseris pacourinoides* Mart. (Asteraceae) e *Solanum rhytidoandrum* Sendtn. (Solanaceae)**. 2011. Universidade Federal da Paraíba, 2011.

GROTEWOLD, E. (ed.). **The Science of flavonoids**. New York, NY: Springer, 2008.

GUBLER, D. J. Human Arbovirus Infections Worldwide. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 951, p. 13–24, 2001.

GULCIN, W. Comparison of Antioxidant Activity of Clove (*Eugenia Caryophyllata* Thunb) Buds and Lavender (*Lavandula Stoechas* L.). **Food Chemistry**, v. 87, n. 3, p. 393–400, 2004.

HARBORNE, J. B.; MABRY, T. J. **The Flavonoids: Advances in Research**, Boston, MA, 1982.

HARBORNE, J. B.; MABRY, T. J. (ed.). **The Flavonoids**. Boston, MA: Springer US, 1982b.

HEINRICH, M.; ROBLES, M.; WEST, J. E.; ORTIZ DE MONTELLANO, B. R.; RODRIGUEZ, E. ETHNOPHARMACOLOGY OF MEXICAN ASTERACEAE

(COMPOSITAE). **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 38, n. 1, p. 539–565, 1998.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841–1856, 2005.

HUANG, T.-C.; TSENG, K. Y.; TSAI, S.-S.; LIU, H.-J.; HO, C.-T.; LIN, H. Y.; CHENG, L. T.; CHUANG, K. P. Eriodictyol Decreases Very Late Antigen-4 (VLA-4) Expression, Cellular Adhesion, and Migration through an NF κ B-Dependent Pathway in Monocytes. **Journal of Functional Foods**, v. 2, n. 4, p. 263–270, 2010.

IGUAL, M. O.; MARTUCCI, M. E. P.; DA COSTA, F. B.; GOBBO-NETO, L. Sesquiterpene Lactones, Chlorogenic Acids and Flavonoids from Leaves of *Vernonia Polyanthes Less* (Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 51, p. 94–97, 2013.

IKAWA, M.; SCHAPER, T. D.; DOLLARD, C. A.; SASNER, J. J. Utilization of Folin–Ciocalteu Phenol Reagent for the Detection of Certain Nitrogen Compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 7, p. 1811–1815, 2003.

JAISWAL, R.; JAYASINGHE, L.; KUHNERT, N. Identification and Characterization of Proanthocyanidins of 16 Members of the *Rhododendron Genus* (Ericaceae) by Tandem LC-MS: Proanthocyanidins from *Rhododendron*. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 47, n. 4, p. 502–515, 2012.

JANSEN, R. K.; PALMER, J. D. A Chloroplast DNA Inversion Marks an Ancient Evolutionary Split in the Sunflower Family (Asteraceae). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, n. 16, p. 5818–5822, 1987.

JOUNG, D.-K.; LEE, Y.-S.; HAN, S.-H.; LEE, S.-W.; CHA, S.-W.; MUN, S.-H.; KONG, R.; KANG, O.-H.; SONG, H.-J.; SHIN, D.-W.; KWON, D.-Y. Potentiating Activity of Luteolin on Membrane Permeabilizing Agent and ATPase Inhibitor against Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 9, n. 1, p. 19–22, 2016.

KADEREIT, J. W.; JEFFREY, C. (ed.). **Flowering plants: Eudicots, Asterales**. Berlin ; New York: Springer, 2007.

KAI, L.; CAI, Y.; FU, Y.-H.; SONG, X.-P.; CHEN, G.-Y.; HAN, C.-R.; YU, M. **Chemical constituents from *Alpinia coriacea***. v. 47, 2016.

KRAFCZYK, N.; GLOMB, M. A. Characterization of Phenolic Compounds in Rooibos Tea. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 9, p. 3368–3376, 2008.

LAGE, P. S.; DE ANDRADE, P. H. R.; LOPES, A. de S.; CHÁVEZ FUMAGALLI, M. A.; VALADARES, D. G.; DUARTE, M. C.; PAGLIARA LAGE, D.; COSTA, L. E.; MARTINS, V. T.; RIBEIRO, T. G.; FILHO, J. D. de S.; TAVARES, C. A. P.; PÁDUA, R. M. de; LEITE, J. P. V.; COELHO, E. A. F. *Strychnos Pseudoquina* and Its Purified Compounds Present an Effective *In Vitro* Antileishmanial Activity. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1–9, 2013.

LI, C.; JIN, H.; SUN, H.; ZHANG, Z.; ZHENG, J.; LI, S.; HAN, S. Eriodictyol Attenuates Cisplatin-Induced Kidney Injury by Inhibiting Oxidative Stress and Inflammation. **European Journal of Pharmacology**, v. 772, p. 124–130, 2016.

LIU, R. H. Potential Synergy of Phytochemicals in Cancer Prevention: Mechanism of Action. **The Journal of Nutrition**, v. 134, n. 12 Suppl, p. 3479S-3485S, 2004.

LLORENT-MARTÍNEZ, E. J.; ORTEGA-BARRALES, P.; ZENGİN, G.; UYSAL, S.; CEYLAN, R.; GULER, G. O.; MOCAN, A.; AKTUMSEK, A. *Lathyrus Aureus* and *Lathyrus Pratensis*: Characterization of Phytochemical Profiles by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, and Evaluation of Their Enzyme Inhibitory and Antioxidant Activities. **RSC Advances**, v. 6, n. 92, p. 88996–89006, 2016.

LOBO, V.; PATIL, A.; PHATAK, A.; CHANDRA, N. Free Radicals, Antioxidants and Functional Foods: Impact on Human Health. **Pharmacognosy Reviews**, v. 4, n. 8, p. 118, 2010.

LÓPEZ-LÁZARO, M. Distribution and Biological Activities of the Flavonoid Luteolin. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 1, p. 31–59, 2009.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2a ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2008.

MAGENTA, G. ***Viguiera Kunth* (Asteraceae, Heliantheae) na América do Sul e sistemática das espécies do Brasil**. 2006. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. O Estado Da Arte Da Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 214–222, 2009.

MARKHAM, K. R.; CHARI, V. M. Carbon-13 NMR Spectroscopy of Flavonoids. In: HARBORNE, J. B.; MABRY, T. J. (Ed.). **The Flavonoids**. Boston, MA: Springer US, p. 19–134, 1982.

MARTÍNEZ, F.; GALLEGO, G.; CULEBRAS, J. M.; TUÑÓN, M. . J. Nutrición Hospitalaria. **Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes**, v. XVII, n. 6, p. 271–278, 2002.

MAXWELL, S. R. J.; LIP, G. Y. H. Free Radicals and Antioxidants in Cardiovascular Disease. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 44, n. 4, p. 307–317, 2003.

MEDEIROS-NEVES, B.; DE BARROS, F.; VON POSER, G.; TEIXEIRA, H. Quantification of Coumarins in Aqueous Extract of *Pterocaulon Balansae* (Asteraceae) and Characterization of a New Compound. **Molecules**, v. 20, n. 10, p. 18083–18094, 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Dengue**, 2018.

MIRANDA, M. A. F. M.; VARELA, R. M.; TORRES, A.; MOLINILLO, J. M. G.; GUALTIERI, S. C. J.; MACÍAS, F. A. Phytotoxins from *Tithonia Diversifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 78, n. 5, p. 1083–1092, 2015.

MORAIS, S. M. de; CAVALCANTI, E. S. B.; COSTA, S. M. O.; AGUIAR, L. A. Ação Antioxidante de Chás e Condimentos de Grande Consumo No Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1b, p. 315–320, 2009.

MOREIRA, F. de P. M.; COUTINHO, V.; MONTANHER, A. B. P.; CARO, M. S. B.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G.; MONACHE, F. D. Flavonóides e Triterpenos de *Baccharis Pseudotenuifolia*: Bioatividade Sobre Artemia Salina. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 309–311, 2003.

MORIANI SINISCALCHI, C.; FRANCIS PATRICE LOEUILLE, B.; PIRANI, J. R. A new species of *Chresta* (Vernonieae, Asteraceae) endemic to the Mata Atlântica Domain, Brazil. **Phytotaxa**, v. 244, n. 1, p. 80, 2016.

MOURA, A. C. da S.; VILEGA, W.; SANTOS, L. C. dos. Identificação de Alguns Constituintes Químicos de *Indigofera Hirsuta* Linn. (Fabaceae) Por CLAE-IES-EM (TOF) e Avaliação Da Atividade Antirradicalar. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1136–1140, 2011.

MOURE, A.; CRUZ, J. M.; FRANCO, D.; DOMÍNGUEZ, J. M.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; JOSÉ NUÑEZ, M.; PARAJÓ, J. C. Natural Antioxidants from Residual Sources. **Food Chemistry**, v. 72, n. 2, p. 145–171, 2001.

MROCZEK, T.; NDJOKO, K.; GŁOWNIAK, K.; HOSTETTMANN, K. On-Line Structure Characterization of Pyrrolizidine Alkaloids in *Onosma Stellulatum* and *Emilia Coccinea* by Liquid Chromatography-Ion-Trap Mass Spectrometry. **Journal of Chromatography. A**, v. 1056, n. 1–2, p. 91–97, 2004.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and Analysis of Phenolics in Food. **Journal of Chromatography. A**, v. 1054, n. 1–2, p. 95–111, 2004.

NAKAJIMA, J.; LOEUILLE, B.; HEIDEN, G.; DEMATTEIS, M.; HATTORI, E. K. .; MAGENTA, M. A. G.; RITTER, M. .; MONDIN, C. A.; ROQUE, N.; FERREIRA, S. .; BORGES, R. A. .; SOARES, P. .; ALMEIDA, G.; SCHNEIDER, A.; SANCHO, G.; SAAVEDRA, M. M.; LIRO, R. M.; PEREIRA, A. C. M.; MORAES, M. D.; SILVA, G. A. .; MEDEIROS, J. D.; LORENCINI, T. S.; TELES, A. M.; MONGE, M.; SINISCALCHI, C. .; SOUZA-BUTURI, F. .; BRINGEL; J.B., A.; CARNEIRO, C. R.; PASINI, E.; OLIVEIRA, C. T. Asteraceae. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.**, 2015.

OLDONI, T. L. C. **Isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante de uma nova variedade de própolis brasileira produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera*.** 2007. USP, Piracicaba, 2007.

OLIVEIRA, D. M. .; LUCENA, E. M. P. O uso de plantas medicinais por moradores de Quixadá–Ceará. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 17, n. 3, p. 407–412, 2015.

OLIVEIRA, A. C. F. de; NOGUEIRA, J. R.; SILVA, G. F. da; LIMA, E. S.; ALBUQUERQUE, P. M. ESTUDO FITOQUÍMICO E DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE *Aniba parviflora*. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v. 3, n. 4, 2017.

OLIVEIRA, M. C. C. de; CARVALHO, M. G. de; FERREIRA, D. T.; BRAZ-FILHO, R. Flavonóides Das Flores de *Stiffitia Chrysantha* Mikan. **Química Nova**, v. 22, n. 2, p. 182–184, 1999.

OLSZEWSKA, M.; WOLBIŚ, M. Further Flavonoids from the Flowers of *Prunus Spinosa* L. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 59, n. 2, p. 133–137, 2002.

OTUSANYA, O.; ILORI, O. Phytochemical Screening and the Phytotoxic Effects of Aqueous Extracts of *Tithonia diversifolia* (Hemsl) A. Gray. **International Journal of Biology**, v. 4, n. 3, 2012.

PANERO, J. L.; FUNK, V. A. The Value of Sampling Anomalous Taxa in Phylogenetic Studies: Major Clades of the Asteraceae Revealed. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 47, n. 2, p. 757–782, 2008.

PARK, Y.; MOON, B.-H.; YANG, H.; LEE, Y.; LEE, E.; LIM, Y. Complete Assignments of NMR Data of 13 Hydroxymethoxyflavones. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 45, n. 12, p. 1072–1075, 2007.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M. **Introdução à Espectroscopia Tradução da 5ª edição norte-americana**. 5ª Edição ed. 2013.

PEREIRA, C.; BARRETO JÚNIOR, C. B.; KUSTER, R. M.; SIMAS, N. K.; SAKURAGUI, C. M.; PORZEL, A.; WESSJOHANN, L. Flavonoids and a Neolignan Glucoside from *Guarea Macrophylla* (Meliaceae). **Química Nova**, v. 35, n. 6, p. 1123–1126, 2012.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. das G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits. **Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes Vegetable secondary metabolites and antioxidants be nefits**, p. 146–152, 2012.

PIETTA, P. G. Flavonoids as Antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 7, p. 1035–1042, 2000.

PINHEIRO, F. P.; CORBER, S. J. Global Situation of Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever, and Its Emergence in the Americas. **World Health Statistics Quarterly. Rapport Trimestriel De Statistiques Sanitaires Mondiales**, v. 50, n. 3–4, p. 161–169, 1997.

POLLO, L. A. E.; BOSI, C. F.; LEITE, A. S.; RIGOTTO, C.; KRATZ, J.; SIMÕES, C. M. O.; FONSECA, D. E. P.; COIMBRA, D.; CARAMORI, G.; NEPEL, A.; CAMPOS, F. R.; BARISON, A.; BIAVATTI, M. W. Polyacetylenes from the Leaves of *Vernonia Scorpioides*

(Asteraceae) and Their Antiproliferative and Antiherpetic Activities. **Phytochemistry**, v. 95, p. 375–383, 2013.

QUEIROZ, L. P. de; RAPINI, A.; GIULIETTI, A. M. **Rumo ao Amplo Conhecimento da Biodiversidade do Semi-árido Brasileiro**, 2006.

RIOS, M. Y.; ESTRADA-SOTO, S.; FLORES-MORALES, V.; AGUILAR, M. I. Chemical Constituents from *Flourensia Resinosa* S.F. Blake (Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 51, p. 240–242, 2013.

ROBINSON, H. E. **Generic and subtribal classification of American Vernonieae**. Washington, D.C. : Smithsonian Institution Press, 1999.

RODRIGUES DA SILVA, L.; DO VALE MARTINS, L.; BANTIM FELICIO CALOU, I.; DEUS, M.; MICHE PINHEIRO FERREIRA, P.; PAULA PERON, A. **Flavonóides: constituição química, ações medicinais e potencial tóxico**.v. 23, 2015.

RODRIGUES E SILVA, A. A.; MARQUES BEZERRA, M.; VASCONCELOS CHAVES, H.; DE PAULO TEIXEIRA PINTO, V.; DE SOUZA FRANCO, E.; MAGALHÃES VIEIRA, Â.; BARBOSA ARAÚJO, E.; CUNHA RIOS, L.; RESENDE LEITE, A. C.; DE SOUSA MAIA, M. B. Protective Effect of *Chresta Martii* Extract on Ethanol-Induced Gastropathy Depends on Alpha-2 Adrenoceptors Pathways but Not on Nitric Oxide, Prostaglandins or Opioids. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, n. 1, p. 206–212, 2012.

ROQUE, N.; BAUTISTA, H. **ASTERACEAE Caracterização e Morfologia Floral**. 2008

ROSSATO, M. F.; TREVISAN, G.; WALKER, C. I. B.; KLAFKE, J. Z.; DE OLIVEIRA, A. P.; VILLARINHO, J. G.; ZANON, R. B.; ROYES, L. F. F.; ATHAYDE, M. L.; GOMEZ, M. V.; FERREIRA, J. Eriodictyol: A Flavonoid Antagonist of the TRPV1 Receptor with Antioxidant Activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 81, n. 4, p. 544–551, 2011.

SAKIHAMA, Y.; COHEN, M. F.; GRACE, S. C.; YAMASAKI, H. Plant Phenolic Antioxidant and Prooxidant Activities: Phenolics-Induced Oxidative Damage Mediated by Metals in Plants. **Toxicology**, v. 177, n. 1, p. 67–80, 2002.

SALARITABAR, A.; DARVISHI, B.; HADJIAKHOONDI, F.; MANAYI, A.; SUREDA, A.; NABAVI, S. F.; FITZPATRICK, L. R.; NABAVI, S. M.; BISHAYEE, A. Therapeutic

Potential of Flavonoids in Inflammatory Bowel Disease: A Comprehensive Review. **World Journal of Gastroenterology**, v. 23, n. 28, p. 5097, 2017.

SANTOS, R. L.; GUIMARAES, G. P.; NOBRE, M. S. C.; PORTELA, A. S. Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 4, p. 486–491, 2011.

SANTOS, R.; MARTINS, R. Revista PIBIC. Variação química da constituição do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (capim limão). **Revista PIBIC**, v. 4, n. 1, p. 63–70, 2007.

SCHINOR, E. C.; SALVADOR, M. J.; ITO, I. Y.; DIAS, D. A. Evaluation of the Antimicrobial Activity of Crude Extracts and Isolated Constituents from *Chresta Scapigera*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 145–149, 2007a.

SCHINOR, E. C.; SALVADOR, M. J.; PRAL, E. M. F.; ALFIERI, S. C.; ALBUQUERQUE, S.; DIAS, D. A. Effect of Extracts and Isolated Compounds from *Chresta Scapigera* on Viability of *Leishmania Amazonensis* and *Trypanosoma Cruzi*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, 2007b.

SCHINOR, E. C.; SALVADOR, M. J.; TOMAZ, J. C.; PRAL, E. M. F.; ALFIERI, S. C.; ALBUQUERQUE, S. de; ITO, I. Y.; DIAS, D. A. Biological Activities and Chemical Composition of Crude Extracts from *Chresta Exsucca*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 1, p. 83–90, 2006.

SILVA, D. B.; OKANO, L. T.; LOPES, N. P.; DE OLIVEIRA, D. C. R. Flavanone Glycosides from *Bidens Gardneri* Bak. (Asteraceae). **Phytochemistry**, v. 96, p. 418–422, 2013.

SILVA, D. B.; RODRIGUES, E. D.; DA SILVA, G. V. J.; LOPES, N. P.; DE OLIVEIRA, D. C. R. Post-Column Sodiation to Enhance the Detection of Polyacetylene Glycosides in LC–DAD–MS Analyses: An Example from *Bidens Gardneri* (Asteraceae). **Talanta**, v. 135, p. 87–93, 2015.

SILVA, P. C. B. da. **Caracterização química, atividade larvicida e deterrente de oviposição do óleo essencial da inflorescência do Bastão do Imperador (*Etlingera elatior*) frente à *Aedes aegypti***. UFPE, Recife, 2012.

SINISCALCHI, C. M.; SOUZA-SOUZA, R. M. B.; LOEUILLE, B.; PIRANI, J. R.; GONÇALVES-ESTEVES, V. The Systematic Value of Pollen Morphology in *Chresta Vell*. Ex

DC. (Vernonieae, Asteraceae). **Review of Palaeobotany and Palynology**, v. 244, p. 182–191, 2017.

SINISCALCHI, CAROLINA M. **Chresta in Flora do Brasil 2020 em construção**. Rio de Janeiro: UFRJ, 2015.

SOUSA, C. M. de M.; SILVA, H. R. e; VIEIRA-JR., G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S. da; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. de M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis Totais e Atividade Antioxidante de Cinco Plantas Medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351–355, 2007.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa, SP, Brasil: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2005.

SPÍNOLA, V.; PINTO, J.; CASTILHO, P. C. Identification and Quantification of Phenolic Compounds of Selected Fruits from Madeira Island by HPLC-DAD–ESI-MSn and Screening for Their Antioxidant Activity. **Food Chemistry**, v. 173, p. 14–30, 2015.

STOCHMAL, A.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; DE RICCARDIS, F.; LEITZ, R.; OLESZEK, W. Alfalfa (*Medicago Sativa* L.) Flavonoids. 1. Apigenin and Luteolin Glycosides from Aerial Parts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 2, p. 753–758, 2001.

TERTO, M. V. C.; GOMES, J. M. **Anais do VI Simpósio de Plantas Medicinais no Vale do São Francisco - PLAMEVASF**. Juazeiro - BA: UNIVASF, 30 set. 2017..

TONHI, E.; COLLINS, K. E.; JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H. Fases Estacionárias Para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Em Fase Reversa (CLAE-FR) Baseadas Em Superfícies de Óxidos Inorgânicos Funcionalizados. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 616–623, 2002.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T. D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44–84, 2007.

VERDI, L. G.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): Aspectos Químicos, Econômicos e Biológicos. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 85–94, 2005.

VIEIRA, L. M.; SOUSA, M. S. B.; MANCINI-FILHO, J.; LIMA, A. de. Fenólicos totais e capacidade antioxidante in vitro de polpas de frutos tropicais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 3, p. 888–897, 2011.

VINSON, J. A.; DABBAGH, Y. A.; SERRY, M. M.; JANG, J. Plant Flavonoids, Especially Tea Flavonols, Are Powerful Antioxidants Using an in Vitro Oxidation Model for Heart Disease. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n. 11, p. 2800–2802, 1995.

WANG, J.; GAO, H.; ZHAO, J.; WANG, Q.; ZHOU, L.; HAN, J.; YU, Z.; YANG, F. Preparative Separation of Phenolic Compounds from Halimodendron Halodendron by High-Speed Counter-Current Chromatography. **Molecules**, v. 15, n. 9, p. 5998–6007, 2010.

WHO/CDS/WHOPES/GCDPP. **WORLD HEALTH ORGANIZATION COMMUNICABLE DISEASE CONTROL, PREVENTION AND ERADICATION WHO PESTICIDE EVALUATION SCHEME**, 2005.

WINKEL-SHIRLEY, B. Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology. **PLANT PHYSIOLOGY**, v. 126, n. 2, p. 485–493, 2001.

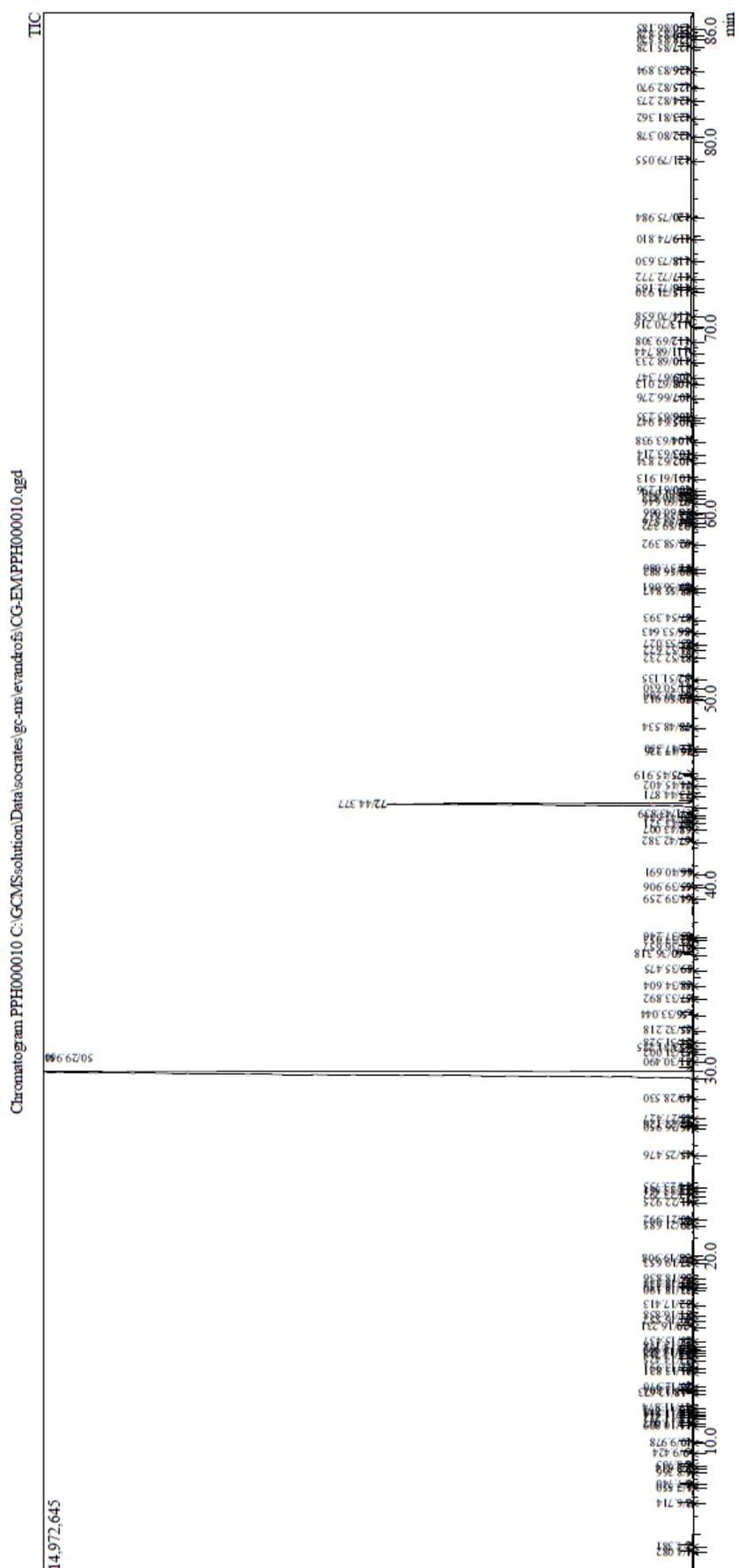
WOLLINGER, A.; PERRIN, É.; CHAHBOUN, J.; JEANNOT, V.; TOURAUD, D.; KUNZ, W. Antioxidant Activity of Hydro Distillation Water Residues from *Rosmarinus Officinalis* L. Leaves Determined by DPPH Assays. **Comptes Rendus Chimie**, v. 19, n. 6, p. 754–765, 2016.

YARIWAKE, J. H.; LANÇAS, F. M.; CAPPELARO, E. A.; VASCONCELOS, E. C. de; TIBERTI, L. A.; PEREIRA, A. M. S.; FRANCA, S. de C. Variabilidade Sazonal de Constituintes Químicos (Triterpenos, Flavonóides e Polifenóis) Das Folhas de *Maytenus Aquifolium* Mart. (Celastraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, p. 162–168, 2005.

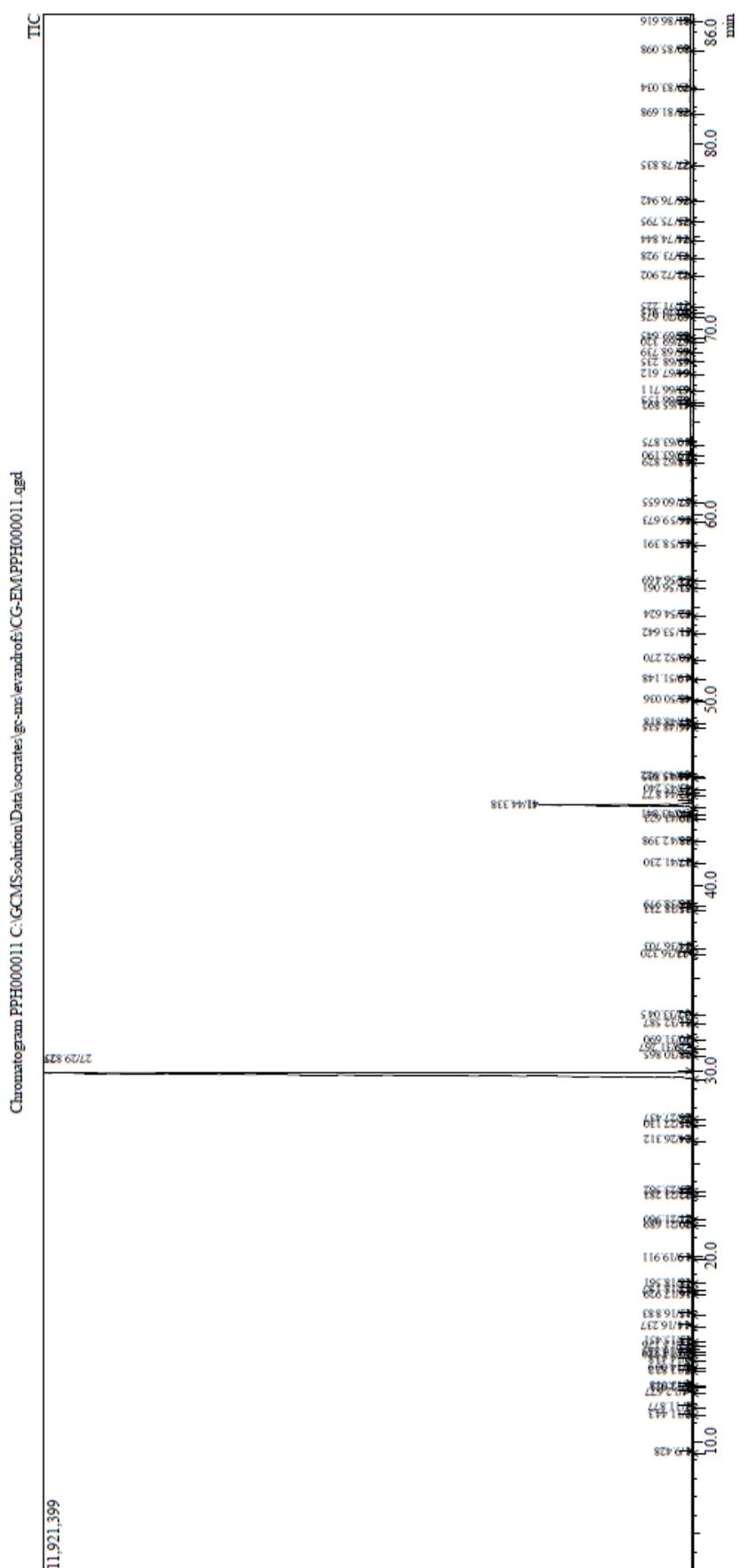
ZANON, R. B.; PEREIRA, D. F.; BOSCHETTI, T. K.; SANTOS, M. dos; ATHAYDE, M. L. Fitoconstituintes Isolados Da Fração Em Diclorometano Das Folhas de *Vernonia Tweediana* Baker. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, jun. 2008.

ZAPPI, D. C.; SOUZA, V. C.; CHAUTEMS, A.; COSTA, L. C.; WEIGEND, M.; WOODGYER, E.; ZANIN, A. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, v. 66, n. 4, p. 1085–1113, 2015.

Anexos



Cromatograma do CGEM da fração PPH10



Cromatograma do CGEM da fração PPH11

