

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA
“PROF. DELBY FERNANDES DE MEDEIROS”
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS
E SINTÉTICOS BIOATIVOS

GABRIELA LEMOS DE AZEVEDO MAIA

CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO QUÍMICO DE
ESPÉCIES DA FAMÍLIA ASTERACEAE (*Verbesina
macrophylla* (Cass.) S.F.Blake e *Praxelis clematidea* R.M.
King & Robinson.)

João Pessoa – PB

2011

GABRIELA LEMOS DE AZEVEDO MAIA

**CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO QUÍMICO DE
ESPÉCIES DA FAMÍLIA ASTERACEAE (*Verbesina
macrophylla* (Cass.) S.F.Blake e *Praxelis clematidea* R.M.
King & Robinson.)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica “Prof. Delby Fernandes de Medeiros” 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. José Maria Barbosa Filho

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Luis Cezar Rodrigues

João Pessoa – PB

2011

M217c Maia, Gabriela Lemos de Azevedo.
 Contribuição ao conhecimento químico de espécies da
 família Asteraceae (*Verbesina macrophylla* (Cass.) S.F. Blake
 e *Praxelis clematidea* R.M. King & Robinson.) / Gabriele
 Lemos de Azevedo Maia.-- João Pessoa, 2011.
 200f. : il.
 Orientador: José Maria Barbosa Filho
 Co-orientador: Luis Cezar Rodrigues
 Tese (Doutorado) - UFPB/CCS
 1. Produtos Naturais. 2. *Praxelis clematidea*. 3. *Verbesina*
 macrophylla. 4. Flavona. 5. Sesquiterpeno. 6. Monoterpeno.

UFPB/BC

CDU: 547.9(043)

GABRIELA LEMOS DE AZEVEDO MAIA

**CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO QUÍMICO DE ESPÉCIES DA
FAMÍLIA ASTERACEAE (*Verbesina macrophylla* (Cass.) S.F.Blake e
Praxelis clematidea R.M. King & Robinson.)**

Tese aprovada em 01 / 09 / 2011

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho

Universidade Federal da Paraíba - (Orientador)

Profa. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima

Universidade Federal da Paraíba – (Examinadora interna)

Prof. Dr. Emídio Vasconcelos Leitão da Cunha

Universidade Federal da Paraíba – (Examinador Interno)

Prof. Dr. Petrônio Filgueiras de Athayde Filho

Universidade Federal da Paraíba – (Examinador Externo)

Prof. Dr. Haroudo Sátiro Xavier

Universidade Federal de Pernambuco – (Examinador Externo)

**" Aos meus pais e avós os
verdadeiros mestres da minha jornada."**

AGRADECIMENTOS

Bem sei que corro o risco de não dar conta desse "muitíssimo obrigada" como é merecido, por que será difícil exprimir a importância de sentimentos na realização de um trabalho científico.

Foram justamente o sentimento de afeto e amizade que permitiram passar finais de semana eluindo pacientemente placas preparativas, reabrir as colunas cromatográficas após memorandos e regras de difícil compreensão, coletar mais uma fração mesmo estando muito cansada.

Se os desafios foram grandes, a motivação e a generosidade de meus amigos e familiares foram ainda maiores.

É por nunca terem me deixado só que agradeço:

- Aos meus pais (Gerôncio e Petinha) e avós (Lívio e Abigail): por não medirem esforços para me ajudar, pela dedicação constante e pelo incentivo. É muito fácil ir pra qualquer lugar quando sabemos que temos um porto seguro, um lugar onde sempre seremos bem recebidos. Muito obrigada por muito me amarem.
- Aos meus tios Pedro e Marli, por todo o carinho que me dedicam desde que cheguei a João Pessoa para cursar a minha graduação.
- A todos os meus familiares, meus irmãos, Thiago e Daniel, minha sobrinha Lívia, minha cunhada Aline, meus tios, Anselmo, Lina, Selma e Lula e primos Paula, Myriam, Christianne e Maurício por cada um a sua maneira, ter me dado forças pra chegar até aqui.
- Ao Prof. José Maria Barbosa Filho expresso meus sinceros agradecimentos pela orientação deste trabalho, por ter sempre uma palavra de incentivo, pela confiança depositada, por todos os ensinamentos. Tenho imenso orgulho de ter desde a graduação a graça de ser orientanda de um homem muito educado e essencialmente bom.
- Ao Prof. Luis Cezar pela co-orientação.

- Ao Prof. Josean Fachine Tavares amigo e grande colaborador deste trabalho.
- Ao Prof. José Pinto Siqueira Júnior e Vivyanne dos Santos Falcão Silva pela colaboração na realização dos testes farmacológicos.
- A todos os meus colegas de turma, em especial a Adriana, Camila, Ana Cláudia, Daniele, Roosevelt, Rafael, Steno, Sócrates, e Vivianne por que a amizade de vocês faz toda a diferença.
- Aos meus amigos de laboratório: Analúcia, Ana Silvia, Thaiza, Fábio, Gal, Deyse, Sandro, Camila (Rio), Helane, Isis, Cíntia e, Manso. Vocês fizeram com que o dia a dia do laboratório fosse muito divertido. Tenho saudade da agradável convivência diária com vocês.
- A David Neri pelo companheirismo e incentivo.
- Aos professores do colegiado de Farmácia da UNIVASF por facilitarem a realização desse trabalho.
- A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, pela ajuda na minha formação acadêmica, especialmente ao professor Marcelo Sobral pela valiosa contribuição a este trabalho, passando ensinamentos e sempre tirando dúvidas quando precisei.
- A todos os funcionários do LTF, pelos diversos serviços prestados em especial a Raimundo Nonato pelas ajudas constantes na bancada e a Vicente Carlos pela obtenção dos espectros de RMN.
- A todos os cidadãos brasileiros, que com o pagamento dos seus impostos, financiaram os meus estudos e o desenvolvimento deste trabalho.
- Ao CNPq, pela bolsa concedida.

RESUMO

MAIA, G. L. A. **CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO QUÍMICO DE ESPÉCIES DA FAMÍLIA ASTERACEAE (*Praxelis clematidea* R.M. King & Robinson e *Verbesina macrophylla* (Cass.) S.F.Blake.)** 2011. Tese (Doutorado em Farmacoquímica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica “Prof. Delby Fernandes de Medeiros”, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2011.

A família Asteraceae é a maior família de angiospermas e representa quase 10% da flora mundial. A família tem sido uma das mais estudadas, em grande parte devido aos compostos químicos promissores produzidos por este grupo. Visando contribuir para o estudo quimiotaxonômico da família Asteraceae, *Praxelis clematidea* e *Verbesina macrophylla* foram submetidos a um estudo fitoquímico para isolar seus constituintes químicos, através de métodos cromatográficos usuais, e depois para identificá-los por meio de métodos espectroscópicos, tais como RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais, além de comparação com dados da literatura. O estudo químico das partes aéreas de *V. macrophylla* resultou no isolamento de seis compostos (ácido *p*-cumárico, 6-*E*-*p*-cumaroil-4 α -hidroxieudesmano, 6-*Z*-*p*-cumaroil-4 α -hidroxieudesmano, bornil-*p*-*cis*-cumarato, bornil-*p*-*trans*-cumarato e ácido *p*-hidroxibenzóico). Uma flavona (5,7,3',4'-tetrahidroxiflavona) foi isolada do extrato acetato de etila das partes aéreas de *P. clematidea* e seis flavonas foram isoladas a partir de extrato clorofórmico (4',5,7- trihidroxiflavona ; 4',5-dihidroxi-7 metoxiflavona; 5-hidroxi-4',7-dimetoxiflavona; 4',5,7-trimetoxiflavona; 5,4'-dihidroxi-6,7 dimetoxiflavona e 4',5,6,7- tetrametoxiflavona), todos os flavonóides estão sendo descritos pela primeira vez na espécie. O flavonas do extrato clorofórmico de *P. clematidea* foram testadas para a toxicidade contra *Staphylococcus aureus* SA-1199B, uma cepa que possui a bomba de efluxo NorA. O flavonas testadas não mostraram qualquer atividade antibacteriana significativa contra a cepa *Staphylococcus aureus* usados, mas foram capazes de modular a resistência bacteriana à drogas. Esta propriedade pode estar relacionado com o grau de lipofilicidade do flavonas conferidos pelos grupos metoxila, já que a 4, 5,6,7 tetramethoxyflavone o composto mais metoxilados, reduziu a concentração inibitória mínima do fármaco (Norfloxacin) 16 vezes.

Palavras-chave: *Praxelis clematidea*, *Verbesina macrophylla*, Flavona. Sesquiterpeno, Monoterpeno.

ABSTRACT

MAIA, G. L. A. **CONTRIBUTION TO THE KNOWLEDGE OF CHEMICAL SPECIES OF ASTERACEAE FAMILY (*Praxelis clematidea* R.M. King & Robinson e *Verbesina macrophylla* (Cass.) S.F.Blake.)** 2011. Thesis (Ph.D. in Pharmacchemistry of Natural Products and Bioactive Synthetic) – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica “Prof. Delby Fernandes de Medeiros”, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2011.

The family Asteraceae is the largest angiosperm family and represents nearly 10% of the world's total flora. The family has been one of the most studied, in large part due to the promising chemical compounds produced by this group. Aiming at contributing to the chemotaxonomic study of the family Asteraceae, *Praxelis clematidea* e *Verbesina macrophylla* were submitted to a phytochemical study to isolate its chemical constituents, through usual chromatographic methods, and after identifying them by means of spectroscopic methods such as ^1H and ^{13}C NMR, with the add of two-dimensional techniques, besides comparison with literature data. Chemical study of the aerial parts of *V. macrophylla* resulted in the isolation of six compounds (*p*-coumaric acid, 6-*E*-*p*-cumaroil-4 α -hydroxieudesmane, 6-*Z*-*p*-cumaroil-4 α -hydroxieudesmane, bornil-*p*-*cis*-cumarate, bornil-*p*-*trans*- coumarate and *p*-hydroxybenzoic acid). One flavone (5,7,3',4'-tetrahydroxyflavone) was isolated from ethyl acetate extract of the aerial parts of *P. clematidea* and six flavones were isolated from chloroform extract (4',5,7- trihydroxyflavone; 4',5-dihydroxy-7 methoxyflavone; 5-hydroxy-4',7 dimethoxyflavone; 4',5,7- trimethoxyflavone; 5,4'-dihydroxy-6,7 dimethoxyflavone and 4',5,6,7- tetramethoxyflavone), all flavonoids are described by first time in the specie. The flavones of chloroform extract of *P. clematidea* were tested for their toxicity against *Staphylococcus aureus* SA-1199B, a strain possessing the NorA efflux pump. The flavones tested did not show any significant antibacterial activity against the *Staphylococcus aureus* strain used, but were able to modulate bacterial drug resistance. This property might be related to the degree of lipophilicity of the flavones conferred by the methoxyl groups, since 4',5,6,7 tetramethoxyflavone the most methoxylated compound, reduced the minimal inhibitory concentration of the drug (Norfloxacin)16-fold.

Keywords: *Praxelis clematidea*, *Verbesina macrophylla*, Flavone. Sesquiterpen, Monoterpen.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt	Acetato de Etila
APT	Attached Proton Test
CC	Cromatografia em coluna
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CD₃OD	Metanol deuterado
COSY	Correlation Spectroscopy
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
DMSO-<i>d</i>₆	Dimetilsulfóxido deuterado
EEB	Extrato Etanólico Bruto
EtOH	Etanol
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
<i>J</i>	Constante de acoplamento
<i>m</i>	Multiplete
MDR	Resistência a múltiplas drogas
MHz	Megahertz
MS	Ministério da Saúde
NCEs	Novas entidades químicas
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
OMS	Organização Mundial de Saúde
p.	Página
ppm	Partes por milhão
RMN ¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
s	Simpleto
sl	Simpleto largo
<i>t</i>	Triplete
δ	Deslocamento químico em ppm
μm	Micromêtro
VRSA	<i>S. aureus</i> resistentes a vancomicina

LISTA DE FLUXOGRAMAS

- Fluxograma 1-** Fracionamento do extrato etanólico bruto das partes aéreas 49
de *Praxelis clematidea*.
- Fluxograma 2-** Fracionamento do extrato etanólico bruto das partes aéreas 50
de *Verbesina macrophylla*.
- Fluxograma 3-** Fracionamento cromatográfico da fase hexânica das partes 52
aéreas de *Verbesina macrophylla*.
- Fluxograma 4-** Fracionamento cromatográfico da fase Acetato de etila de 53
Verbesina macrophylla.
- Fluxograma 5-** Fracionamento cromatográfico da fase clorofórmica de 55
Praxelis clematidea.
- Fluxograma 6-** Fracionamento cromatográfico da fase Acetato de Etila de 56
Praxelis clematidea.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Foto de <i>Verbesina macrophylla</i> (Cass.) S. F. Blake. Detalhe da inflorescência	35
Figura 2-	Foto de <i>Praxelis clematidea</i> (Griseb.) R.M. King & Robinson. Detalhe da inflorescência.	38
Figura 3-	Substância isolada por Bolhmann e colaboradores (1984) de <i>Praxelis clematidea</i>	39
Figura 4-	Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de Vm-1.	61
Figura 5-	Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de Vm-1 na região de 7,7-6,3 ppm.	61
Figura 6-	Espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CD_3OD) de Vm-1.	62
Figura 7-	Espectro de RMN ^1H x ^{13}C HMQC (500 e 125 MHz, CD_3OD) de Vm-1.	62
Figura 8-	Expansão do espectro de RMN ^1H x ^{13}C HMQC (500 e 125 MHz, CD_3OD) de Vm-1 na região de (5,5-9,0 ppm) x (90-165ppm).	63
Figura 9-	Expansão do espectro de RMN ^1H x ^{13}C HMQC (500 e 125 MHz, CD_3OD) de Vm-1 na região de (5,3-8,0 ppm) x (60-130 ppm).	63
Figura 10-	Espectro de IV (KBr , cm^{-1}) de Vm-2.	70
Figura 11-	Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Vm-2.	71
Figura 12-	Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Vm-2 na região de 0,8 a 2,0 ppm.	72
Figura 13-	Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Vm-2 na região de 4,5 a 7,8 ppm.	73

Figura 14-	Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de Vm-2.	74
Figura 15-	Expansão do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de Vm-2 na região de 105-170 ppm.	75
Figura 16-	Expansão do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de Vm-2 na região de 15-75 ppm.	75
Figura 17-	Espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Vm-2.	76
Figura 18-	Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Vm-2 na região de (0,0-1,9 ppm) x (58-44 ppm).	76
Figura 19-	Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Vm-2 na região de (0,0 – 4,5 ppm) x (65 - 5 ppm).	77
Figura 20-	Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMQC (500 MHz, CDCl_3) de Vm-2 na região de (5,0 – 8,0 ppm) x (110 – 145 ppm).	77
Figura 21-	Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMQC (500 MHz, CDCl_3) de Vm-2 na região de (0,6 – 2,6 ppm) x (12 – 32 ppm).	78
Figura 22-	Espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (500 MHz, CDCl_3) de Vm-2 .	79
Figura 23-	Espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Vm-2 na região de (0,6 – 2,0 ppm) x (15 – 70 ppm).	80
Figura 24-	Espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Vm-2 na região de (5,6 – 8,2 ppm) x (110 – 175 ppm).	81
Figura 25-	Espectro de RMN $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY (500 MHz, CDCl_3) de Vm-2.	82
Figura 26-	Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY (500 MHz, CDCl_3) de Vm-2	82
Figura 27-	Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY (500 MHz, CDCl_3) de Vm-2 na região de (0,0 – 6,0 ppm).	83

Figura 28-	Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY (500 MHz, CDCl_3) de Vm-2 na região de (5,5- 7,9 ppm).	84
Figura 29-	Espectro de RMN $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ NOESY (500 MHz, CDCl_3) de Vm-2.	85
Figura 30-	Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ NOESY (500 MHz, CDCl_3) de Vm-2 na região de (5,6- 8,0 ppm).	86
Figura 31-	Espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) de Vm-3.	90
Figura 32-	Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Vm-3.	91
Figura 33-	Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Vm-3 na região de 7,6-5,0 ppm.	92
Figura 34-	Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Vm-3 na região de 0,0-2,4 ppm.	93
Figura 35-	Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Vm-3 na região de 4,93-5,05 ppm	94
Figura 36-	Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Vm-3 na região de (1,0- 8,0 ppm) x (5,0- 40 ppm).	95
Figura 37-	Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Vm-3 na região de 4,5- 6,2 ppm) x (64-82 ppm).	96
Figura 38-	Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Vm-3 na região de (5,0-8,0 ppm) x (110-145 ppm).	96
Figura 39-	Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Vm-3 na região de (0,6-1,15 ppm) x (12-22 ppm).	97
Figura 40-	Espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Vm-3.	98

Figura 41-	Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (500 MHz, CDCl_3) de Vm-3 na região de (0,5-2,6 ppm) x (20-80 ppm).	99
Figura 42-	Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Vm-3 na região de (6,0-8,2ppm) x (170-115ppm).	100
Figura 43-	Espectro de RMN $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY (500 MHz, CDCl_3) de Vm-3.	101
Figura 44-	Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY (500 MHz, CDCl_3) de Vm-3 na região de (5,8-8,0 ppm).	101
Figura 45-	Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY (500 MHz, CDCl_3) de Vm-3 na região de (1,0-5,0 ppm).	102
Figura 46-	Espectro de RMN $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ NOESY (500 MHz, CDCl_3) de Vm-3.	103
Figura 47-	Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ NOESY (500 MHz, CDCl_3) de Vm-3 na região de (0,5-5,0 ppm).	104
Figura 48-	Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ NOESY (500 MHz, CDCl_3) de Vm-3 na região de (6,4-7,8 ppm).	105
Figura 49-	Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ NOESY (500 MHz, CDCl_3) de Vm-3 na região de (0,6 -1,3 ppm).	106
Figura 50-	Espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) de Vm-4.	110
Figura 51-	Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Vm-4.	111
Figura 52-	Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Vm-4 na região de (7,6-5,0 ppm).	112
Figura 53-	Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Vm-4 na região de (1,7-2,4 ppm).	113
Figura 54-	Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Vm-4 na região de (4,86-4,98 ppm).	113
Figura 55-	Espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Vm-4	114

Figura 56-	Expansão do espectro de RMN ^1H x ^{13}C -HMQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Vm-4 na região de (0,6-3,0 ppm)x(10-50 ppm).	115
Figura 57-	Expansão do espectro de RMN ^1H x ^{13}C -HMQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Vm-4 na região de (5,6-8,2 ppm) x (145-115 ppm).	115
Figura 58-	Espectro de RMN ^1H x ^{13}C -HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Vm-4.	116
Figura 59-	Expansão do espectro de RMN ^1H x ^{13}C -HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Vm-4 na região de (6,7-7,8 ppm) x (125-170 ppm).	116
Figura 60-	Expansão do espectro de RMN ^1H x ^{13}C -HMBC (500e 125 MHz, CDCl_3) de Vm-4 na região de (5,4-8,0 ppm) x (170-115 ppm).	117
Figura 61-	Expansão do espectro de RMN ^1H x ^{13}C -HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Vm-4 na região de (0,6-2,2 ppm) x (25-80 ppm).	118
Figura 62-	Espectro de RMN ^1H x ^1H -COSY (500 MHz, CDCl_3) de Vm-4.	119
Figura 63-	Expansão do espectro de RMN ^1H x ^1H -COSY (500 MHz, CDCl_3) de Vm-4 na região de (5,8-7,8 ppm).	119
Figura 64-	Expansão do espectro de RMN ^1H x ^1H -COSY (500 MHz, CDCl_3) de Vm-4 na região de (1,0-5,0 ppm).	120
Figura 65-	Expansão do espectro de RMN ^1H x ^1H -COSY (500 MHz, CDCl_3) de Vm-4 na região de (0,8-2,4 ppm).	120
Figura 66-	Espectro de RMN ^1H x ^1H -NOESY (500 MHz, CDCl_3) de Vm-4.	121
Figura 67-	Expansão do espectro de RMN ^1H x ^1H -NOESY (500 MHz, CDCl_3) de Vm-4 na região de (5,6-7,9 ppm).	121
Figura 68-	Expansão do espectro de RMN ^1H x ^1H -NOESY (500 MHz, CDCl_3) de Vm-4 na região de (1,0-6,0 ppm).	122

Figura 69-	Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de Vm-5.	125
Figura 70-	Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de Vm-5 na região de 6,8-8,0 ppm.	125
Figura 71-	Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de Vm-5	126
Figura 72-	Espectro de RMN ^1H x ^{13}C -HMQC (500 e 125 MHz, CD_3OD) de Vm-5 .	127
Figura 73-	Expansão do espectro de RMN ^1H x ^{13}C -HMBC (500 e 125 MHz, CD_3OD) de Vm-5.	127
Figura 74-	Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Pc-1.	132
Figura 75-	Espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Pc-1.	133
Figura 76-	Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Pc-1.	134
Figura 77-	Espectro de RMN ^1H x ^{13}C HMQC (500 e 125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Pc-1 .	135
Figura 78-	Expansão do espectro de RMN ^1H x ^{13}C HMQC (500 e 125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Pc-1 na região de (6,2-7,1 ppm) x (92-103 ppm).	135
Figura 79-	Expansão do espectro de RMN ^1H x ^{13}C HMQC (500 e 125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Pc-1 na região de (7,0-8,3 ppm) x (115-129 ppm).	136
Figura 80-	Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de Pc-2.	140
Figura 81-	Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) de Pc-2 na região de 150-220 ppm.	140
Figura 82-	Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) de Pc-2 na região de 100-140 ppm.	141
Figura 83-	Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) de Pc-2 na região de 55-63 ppm.	141

Figura 84-	Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Pc-2 na região de 3,4-4,8 ppm.	142
Figura 85-	Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Pc-2 na região de 6,6-7,8 ppm.	142
Figura 86-	Espectro de RMN ^1H x ^{13}C HMQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Pc-2 na região de (1,0-10 ppm) x (20-140 ppm).	143
Figura 87-	Expansão do espectro de RMN ^1H x ^{13}C HMQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Pc-2 na região de (6,0-8,2 ppm) x (95-130 ppm).	143
Figura 88-	Expansão do espectro de RMN ^1H x ^{13}C HMQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Pc-2 na região de (6,7-7,4 ppm) x (106-115 ppm).	144
Figura 89-	Expansão do espectro de RMN ^1H x ^{13}C HMQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Pc-2 na região de (3,6-4,4 ppm) x (55-63 ppm).	144
Figura 90-	Espectro de RMN ^1H x ^{13}C HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Pc-2).	145
Figura 91-	Expansão do e spectro de RMN ^1H x ^{13}C HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Pc-2 na região de (6,0-8,2 ppm) x (95-130 ppm).	145
Figura 92-	Expansão do espectro de RMN ^1H x ^{13}C HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Pc-2 na região de (6,6-8,0 ppm) x (140-160 ppm).	146
Figura 93-	Expansão do espectro de RMN ^1H x ^{13}C HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Pc-2 na região de (3,6-4,1 ppm) x (140-166 ppm).	146
Figura 94-	Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de Pc-3.	150
Figura 95-	Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Pc-3	151
Figura 96-	Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Pc-3 na região de 3,78-4,0 ppm.	152
Figura 97-	Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Pc-3 na região de 6,4-7,8 ppm.	152

Figura 98-	Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Pc-3 na região de (6,1-8,0 ppm) x (95-125 ppm).	153
Figura 99-	Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Pc-3 na região de (3,5-4,1 ppm) x (54-57 ppm).	153
Figura 100-	Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Pc-4.	156
Figura 101-	Espectro de RMN ^1H (200 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Pc-4.	157
Figura 102-	Expansão do espectro de RMN ^1H (200 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Pc-4.	157
Figura 103-	Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Pc-5.	161
Figura 104-	Espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Pc-5.	162
Figura 105-	Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Pc-5 na região de 3,2-4,3 ppm.	163
Figura 106-	Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Pc-5 na região de 6,8-8,0 ppm.	163
Figura 107-	Espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC (500 e 125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Pc-5.	164
Figura 108-	Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC (500 e 125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Pc-5 na região de (6,0-9,0 ppm) x (90-130 ppm).	165
Figura 109-	Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC (500 e 125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Pc-5 na região de (3,5-4,0 ppm) x (50-72 ppm).	165
Figura 110-	Espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (500 e 125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Pc-5.	166
Figura 111-	Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (500 e 125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Pc-5 na região de (6,6-8,2 ppm) x (152-165	167

ppm).

Figura 112-	Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC(500 e 125 MHz, DMSO- d_6) de Pc-5 na região de (3,3-5,0 ppm)x(60-160 ppm).	167
Figura 113-	Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) de Pc-6.	170
Figura 114-	Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) de Pc-6	171
Figura 115-	Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) de Pc-6.	171
Figura 116-	Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) de Pc-7.	175
Figura 117-	Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) de Pc-7.	176
Figura 118-	Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) de Pc-7	177
Figura 119-	Espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC (500 e 125 MHz, DMSO- d_6) de Pc-7.	177
Figura 120-	Expansão o espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC (500 e 125 MHz, DMSO- d_6) de Pc-7.	178
Figura 121-	Espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (500 e 125 MHz, DMSO- d_6) de Pc-7.	178
Figura 122-	Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (500 e 125 MHz, DMSO- d_6) de Pc-7 na região de (6,0-8,2 ppm) x (95-125 ppm).	179
Figura 123-	Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (500 e 125 MHz, DMSO- d_6) de Pc-7 na região de (6,0-8,2 ppm) x (145-185 ppm).	180

LISTA QUADROS

Quadro 1-	Substâncias isoladas de espécies de <i>Verbesina</i>	32
Quadro 2-	Substâncias de <i>Verbesina macrophylla</i> isoladas por Bohlmann e colaboradores (1980)	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Deslocamentos químicos para os núcleos de hidrogênio e carbono treze de Vm-1, verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais (500 e 125 MHz, respectivamente) em CD_3OD , bem como, os deslocamentos químicos dos hidrogênios (δ_{H}^*) apresentados por Mihara et al. (2004) para a mesma substância (200 MHz) em CD_3OD .	60
Tabela 2-	Deslocamentos químicos para os núcleos de hidrogênio e carbono treze de Vm-2a, verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais (500 e 125 MHz, respectivamente) em CDCl_3 .	67
Tabela 3-	Deslocamentos químicos para os núcleos de hidrogênio e carbono treze de Vm-2b, verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais (500 e 125 MHz, respectivamente) em CDCl_3 .	68
Tabela 4-	Deslocamentos químicos para os núcleos de hidrogênio e carbono treze de Vm-2a e Vm-2b, verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, respectivamente) em CDCl_3 , bem como, os deslocamentos químicos dos hidrogênios (δ_{H}^*) e carbonos (δ_{C}^*) apresentados por Herz e Kumar (1981) e por Xu et al. (2010) para as mesmas substâncias (200 MHz) em CDCl_3 .	69
Tabela 5-	Deslocamentos químicos para os núcleos de hidrogênio e carbono treze de Vm-3, verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais (500 e 125 MHz, respectivamente) em CDCl_3 .	89
Tabela 6-	Deslocamentos químicos para os núcleos de hidrogênio e carbono treze de Vm-4, verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais (500 e 125 MHz, respectivamente) em CDCl_3 .	109

Tabela 7-	Deslocamentos químicos para os núcleos de hidrogênio e carbono treze de Vm-5, verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais (500 e 125 MHz, respectivamente) em CDCl_3 .	124
Tabela 8-	Deslocamentos químicos para os núcleos de hidrogênio e carbono treze de Pc-1, verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (200 e 50 MHz, respectivamente) em DMSO-d_6 , bem como, os deslocamentos químicos dos carbonos (δ_{C}^*) apresentados por Almeida et al (2006) para a mesma substância (50 MHz) em CDCl_3 .	131
Tabela 9-	Deslocamentos químicos para os núcleos de hidrogênio e carbono treze de Pc-2, verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, respectivamente) em CD_3OD , bem como, os deslocamentos químicos dos carbonos (δ_{C}^*) apresentados por Almeida et al (2006) para as mesmas substâncias (50 MHz) em CDCl_3 .	139
Tabela 10-	Deslocamentos químicos para os núcleos de hidrogênio e carbono treze de Pc-3, verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, respectivamente) em CDCl_3 , bem como, os deslocamentos químicos dos carbonos (δ_{C}^*) apresentados por Almeida et al (2006) para as mesmas substâncias (50 MHz) em CDCl_3 .	149
Tabela 11-	Deslocamentos químicos para os núcleos de hidrogênio e carbono treze de Pc-4, verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, respectivamente) em DMSO-d_6 , bem como, os deslocamentos químicos dos carbonos (δ_{C}^*) apresentados por Almeida et al (2006) para as mesmas substâncias (50 MHz) em CDCl_3 .	155

Tabela 12-	Deslocamentos químicos para os núcleos de hidrogênio e carbono treze de Pc-5, verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, respectivamente) em DMSO-d ₆ , bem como, os deslocamentos químicos dos carbonos (δ_{C}^*) apresentados por Yim et al. (2003) para as mesmas substâncias (potência não informada) em Piridina.	160
Tabela 13-	Deslocamentos químicos para os núcleos de hidrogênio e carbono treze de Pc-6, verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (200 e 50 MHz, respectivamente) em CD ₃ OD, bem como, os deslocamentos químicos dos carbonos (δ_{C}^*) apresentados por Agrawal (1989) para a mesma substância (potência não informada) em DMSO-d ₆ + D ₂ O .	169
Tabela 14-	Deslocamentos químicos para os núcleos de hidrogênio e carbono treze de Pc-7, verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, respectivamente) em CD ₃ OD, bem como, os deslocamentos químicos dos carbonos (δ_{C}^*) apresentados Agrawal (1989) para a mesma substância (potência não informada) em DMSO-d ₆ .	174
Tabela 15-	Concentrações inibitórias mínima para os antibióticos e o brometo de etídeo contra <i>Staphylococcus aureus</i> cepa AS-1199B, na presença e ausência das flavonas.	181
Tabela 16-	LogP das flavonas isoladas da fase clorofórmica de <i>P. clematidea</i> .	182

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE FLUXOGRAMAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE QUADROS

LISTA DE TABELAS

1. INTRODUÇÃO	26
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	30
2.1 Considerações sobre a família Asteraceae.	30
2.2 Tribo Heliantheae Cass.	31
2.3 Considerações sobre o gênero <i>Verbesina</i> .	32
2.4 Considerações sobre <i>Verbesina macrophylla</i> (Cass.) S.F.Blake	35
2.5 Tribo Eupatorieae.	38
2.6 Considerações sobre a espécie <i>Praxelis clematidea</i> .	38
2.7 Produtos naturais como Agentes Modificares de Atividade Antibiótica.	40
3 OBJETIVOS	44
3.1 Objetivo Geral	44
3.2 Objetivos específicos	44
4 MATERIAL E MÉTODOS	46
4.1 Métodos cromatográficos	46
4.2 Métodos espectroscópicos	46
4.3 Pontos de fusão	47
4.4 Rotação específica	47
4.5 Coleta do material botânico	47
4.6 Processamento do material botânico	47
4.7 Preparação do extrato	47

4.8 Fracionamento cromatográfico da fase hexânica das partes aéreas de <i>Verbesina macrophylla</i> .	51
4.9 Fracionamento cromatográfico da fase acetato de etila de <i>Verbesina macrophylla</i> .	53
4.10 Fracionamento cromatográfico da fase clorofórmica das partes aéreas de <i>Praxelis clematidea</i>	54
4.11 Fracionamento cromatográfico da fase acetato de etila das partes aéreas de <i>Praxelis clematidea</i>	55
4.12 Linhagens de <i>Staphylococcus aureus</i>	56
4.13 Antibióticos	57
4.14 Soluções das drogas	57
4.15 Avaliação da atividade antimicrobiana	57
4.16 Avaliação da atividade moduladora da resistência a drogas	57
4.17 Estimação do <i>LogP</i>	57
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5.1 Determinação estrutural de Vm-1	59
5.2 Determinação estrutural de Vm-2	64
5.3 Determinação estrutural de Vm-3	87
5.4 Determinação estrutural de Vm-4	107
5.5 Determinação estrutural de Vm-5	123
5.6 Determinação estrutural de Pc-1	128
5.7 Determinação estrutural de Pc-2	137
5.8 Determinação estrutural de Pc-3	147
5.9 Determinação estrutural de Pc-4	154
5.10 Determinação estrutural de Pc-5	158
5.11 Determinação estrutural de Pc-6	168
5.12 Determinação estrutural de Pc-7	172
5.13 Atividade moduladora da resistência bacteriana a drogas.	181
6. CONCLUSÕES	185
REFERÊNCIAS	186

INTRODUÇÃO



1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais têm sido utilizadas sob os critérios dos conhecimentos popular e científico em diferentes contextos terapêuticos (CECHINEL-FILHO; YUNES, 1998). Porém, a humanidade se aproveita de uma fração muito pequena das plantas e o reino vegetal ainda permanece como uma incógnita; e sendo possuidor da maior e mais rica biodiversidade do planeta, o Brasil não pode abdicar de sua vocação para os produtos naturais (PINTO et al., 2002).

A natureza, de forma geral, tem produzido a maioria das substâncias orgânicas conhecidas. O reino vegetal é que tem contribuído de forma mais significativa para o fornecimento de metabólitos secundários, muitos destes de grande valor agregado devido às suas aplicações como medicamento, cosméticos, alimentos e agroquímicos (PINTO et al., 2002).

É importante ressaltar que, devido ao desenvolvimento de técnicas analíticas de separação e elucidação estrutural, nas últimas três décadas, mais recentemente de instrumentos analíticos hifenados, conhecem-se cerca de 50.000 metabólitos secundários isolados de angiospermas, muitos desses ainda sem qualquer avaliação com relação ao seu potencial farmacológico. Devido a tais constatações, os produtos naturais e derivados foram, e continuam sendo, notoriamente, de importância crucial em uma sociedade moderna, mesmo considerando-se o grande número de produtos oriundos de síntese (MONTANARI; BOLZANI, 2001). A química de produtos naturais é dentro da química brasileira, a área mais antiga, e talvez a que congrega o maior número de pesquisadores (PINTO et al., 2002).

O interesse pelas plantas medicinais e pelos produtos naturais aumenta ao considerarmos a problemática para os tratamentos atuais de várias patologias. As drogas ansiolíticas, por exemplo, podem apresentar risco de dependência e síndrome de abstinência ou retardo para início do efeito ou efetividade duvidosa (ANDREATINI; BOERNGEN-LACERDA; ZORZETTO FILHO, 2001). Os analgésicos e anti-inflamatórios, por sua vez, podem produzir ulceração gástrica, intolerância gastrointestinal, bloqueio da agregação plaquetária e reações de hipersensibilidade, além de outras complicações quando do uso prolongado com glicocorticóides ou analgésicos opióides (GYLMAN, 1996). Considerando isto, há a necessidade de investigação e pesquisa de novas drogas que possam diminuir tais efeitos colaterais e tratar de modo efetivo e seguro estas desordens, seja com o extrato bruto ou com os compostos isolados da imensa flora brasileira.

As recentes investigações etnobotânicas da flora nordestina têm demonstrado o constante uso de plantas medicinais, inclusive por usuários de serviços públicos de áreas urbanas (AMORIM et al., 2003; SILVA; ANDRADE, 2005). A maior facilidade na coleta e comercialização de plantas cultiváveis em áreas urbanas, entretanto, tem contribuído para o uso de plantas medicinais sem respaldo científico, resultando em automedicação e elevação tanto do risco à saúde quanto dos custos operacionais dos serviços de saúde pública (OLIVEIRA, 2006).

Para uma planta ser considerada medicinal no Brasil, faz-se necessário uma resposta positiva a ensaios que comprovem a propriedade terapêutica que lhe é atribuída, bem como, o seu grau de toxicidade nas doses compatíveis com seu emprego medicinal, através de estudo farmacológico pré-clínico com avaliação da toxicidade, seguido de ensaio clínico (LORENZI; MATOS, 2008).

No processo de embasamento científico de uma medicina alternativa, a química de produtos naturais se destaca ao permitir o conhecimento estrutural dos metabólitos secundários responsáveis pelos efeitos farmacológicos das plantas medicinais (SOUZA; SILVA, 2006). Em suas inúmeras atribuições, ela engloba o isolamento e a identificação dos constituintes químicos bioativos, atuando como fonte de novos fármacos, e realiza pesquisas para validação de medicamentos de origem vegetal, sendo assim, a base essencial para o direcionamento de estudos farmacológicos.

O conhecimento cada vez mais aprofundado das espécies vegetais, desenvolvido por estudos integrados nas áreas de botânica, química, farmacologia e outras ciências afins, é fundamental para dar suporte e maior longevidade ao uso do potencial natural ainda existente no planeta. A contribuição científica brasileira é valiosa. Há nas áreas de Química de Produtos Naturais cerca de 900 profissionais e, pelo menos, 1500 outros atuando na Farmacologia. Corroborando este cenário, o sistema de pós-graduação é capaz de formar 8.000 doutores/ano. São aproximadamente 70 grupos lidando com pesquisa de Produtos Naturais no Brasil, especializados em química e farmacologia (BARRETO DE CASTRO, 1994).

No nosso país, as pesquisas com plantas ainda estão muito centradas no âmbito da Universidade e Institutos de Pesquisa onde se desenvolve basicamente a fitoquímica tradicional. Muito embora já existam vários grupos nacionais envolvidos com a busca de princípios bioativos de plantas, essa pesquisa é fundamentalmente acadêmica. Apesar disso, a academia poderá contribuir de forma decisiva para o

descobrimiento de novas entidades químicas (NCEs). Talvez, esse seja o seu papel exatamente porque essa etapa da pesquisa demanda muito tempo e pode envolver a qualificação de recursos humanos (MONTANARI; BOLZANI, 2006).

Considerando-se que um programa de descoberta de novos fármacos de origem natural é um processo muito longo, complexo e de alto custo e reconhecendo a importância destes produtos como fonte inigualável de diversidade estrutural de substâncias químicas, das mais variadas classes, capaz de construir moléculas com grande complexidade estrutural, com absoluta quimio, régio e estereosseletividade, pesquisadores do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba vem ao longo de 33 anos contribuindo com a pesquisa científica brasileira, estudando dentre outras a família Asteraceae, o grupo sistemático de maior número dentro das Angiospermas, (EMERECIANO et al., 2007). Plantas desta família têm sido estudadas quanto ao potencial químico e farmacológico, sendo que algumas têm proporcionado o desenvolvimento de novos fármacos.

Vislumbrando o potencial farmacológico das substâncias isoladas de espécies da família Asteraceae e a ocorrência de muitas espécies ainda não devidamente exploradas do ponto de vista químico e farmacológico, resolvemos iniciar o estudo de *Praxelis clematidea* e *Verbesina macrophylla*, espécies facilmente encontradas na Paraíba cujos estudos químicos e farmacológicos ainda são pouco conhecidos, o que poderá conduzir à descoberta de novas fontes de substâncias ativas.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA



2 FUNDAMENAÇÃO TEÓRICA

2.1 Considerações sobre a família Asteraceae

A família Asteraceae é composta por cerca de 1.100 gêneros e 25.000 espécies (EMERECIANO et al., 2007). Encontram-se representantes em todas as zonas do globo, com exceção do continente Antártico, podendo ser encontradas em todas as formações (lugares úmidos, secos, sombreados, ensolarados, em selvas, montes e campos, em solos normais, arenosos, salitrosos ou humíferos). A maioria das espécies é composta por ervas anuais ou perenes; somente nas zonas tropicais e subtropicais chegam a formar arbustos e até árvores e, mais raramente, trepadeiras (HEYWOOD, 1993).

A América do Sul comporta cerca de 20% dos gêneros existentes. No Brasil, são estimados aproximadamente 180 gêneros e 3.000 espécies distribuídas desde as regiões mais frias e úmidas, como as serras do Sudeste e Sul, até as áreas secas na região do semi-árido nordestino, sendo menos freqüentes em formações florestais (LING, 1995).

No que diz respeito à importância econômica pode-se levar em conta o número de espécies úteis e também as daninhas (invasoras tóxicas ou espinhosas). Plantas da família Asteraceae são comumente utilizadas na medicina popular em todo o mundo, com mais de 1000 espécies registradas em databases etnomedicinais (MONKS et al., 2002). O girassol (*Helianthus annuus* L.) e o falso-açafrão (*Carthamus tinctorius* L.) são oleaginosos de grande cultivo. Muitas Asteraceae são hortaliças apreciadas, como a alface (*Lactuca sativa* L.), a chicória (*Cichorium intybus* L.), a salsa (*Tragopogon porrifolius* L.), a alcachofra (*Cynara scolymus* L.), etc. As espécies medicinais, inseticidas e aromáticas são numerosas, como a camomila (*Matricaria chamomilla* L.), o piretro (*Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis.), o absinto (*Artemisia absinthium* L.), a marcela (*Achyrocline satureioides*), etc. Por outro lado, há muitas Asteraceae prejudiciais por invasão. São conhecidos os cardos (*Carduus*, *Cynara*, *Cirsium*, *Centaurea*, *Silybum* div. Espécies), o abrolho (*Xanthium cavanillesii* Schouv.), que invadem os campos e deslocam os pastos úteis, competindo com as plantas cultivadas (BURKART et al., 1974).

Plantas dessa família são extensivamente estudadas quanto a sua composição química e atividade biológica, sendo que algumas têm proporcionado o

desenvolvimento de novos fármacos, inseticidas, entre outros (ZOMLEFER, 1994). Inúmeros trabalhos científicos realizados com espécies da família Asteraceae apresentam o isolamento de uma variedade de metabólitos secundários como flavonóides, poliacetilenos, lactonas sesquiterpênicas, alcalóides (CRONQUIST, 1981), óleos essenciais (AGOSTINI et al, 2005), antocianinas (TAKEDA; HARBORNE, 1986) e diterpenos (BATISTA; BRAGA; OLIVEIRA, 2005). Os flavonóides têm grande destaque, sendo alocados como importantes marcadores quimiotaxonômicos desta família (EMERENCIANO, 2001). Cada vez mais, essa classe de produtos naturais está se tornando objeto de investigação e muitos grupos isolaram e identificaram flavonóides que possuem atividade antifúngica, antiviral e antibacteriana. Além disso, vários estudos têm demonstrado sinergia entre flavonóides ativos, bem como entre flavonóides e quimioterápicos já existentes (TIM CUSHNIE; LAMB, 2005; MOTA et al., 2009).

Os constituintes químicos isolados de plantas da família Asteraceae, apresentam atividades variadas como: antioxidante, alelopática, espasmolítica, antibacteriana, antiviral, aleloquímica, citotóxica, inseticida, gastroprotetora, antileucêmica, antibiótica, antifúngica, vasorelaxante, moluscicida, antimutagênica e hepatoprotetora (VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005).

2.2 Tribo Heliantheae Cass.

A tribo Heliantheae é composta por cerca de 190 gêneros e 2500 espécies. Os maiores gêneros são *Verbesina* com 300 espécies, seguido de *Bidens* com 240 espécies e *Viguiera* com 180. A maioria de suas espécies são ervas ou arbustos, embora existam gêneros com espécies arbóreas. Grande parte dos gêneros de Heliantheae é encontrada na América do Norte e do Sul e particularmente no México (KARIS; RIDING, 1994).

Dentre as espécies economicamente importantes desta tribo destaca-se o girassol (*Helianthus annuus*) que possui terpenoides e flavonoides, com atividade biológica, além de ser usado como óleo comestível, o margaridão (*Tithonia diversifolia*) planta que apresenta atividade anti-inflamatória e alelopática (GUIMARÃES, 2006), o picão (*Bidens pilosa*) que é usada no tratamento de desobstruções do fígado, hepatite e icterícia, além de febre, afecções do peito, tosses, inflamações da garganta, reumatismo articular e na gonorréia também são conhecidos, como relataram Rodrigues e Carvalho (2001).

2.3 Considerações sobre o gênero *Verbesina*.

O gênero *Verbesina* L. pertence a família Asteraceae e está classificado na tribo Heliantheae, subtribo Ecliptinae e possui 150 espécies nativas do Novo Mundo (MARTINEZ et al., 1983). Destacam-se nesse gênero muitas espécies apresentando grande importância como promotora de crescimento vegetal e germinação. Adicionalmente, muitas espécies têm demonstrado atividades antibacteriana, fungicida, antiviral e antitumoral (BRUNO-COLMENAREZ et al., 2010).

Dentre as substâncias características do gênero estão os derivados de eudesmano e sesquiterpenos esterificados frequentemente como cinamatos ou cumaratos. Os primeiros a serem isolados foram os cumaratos de α - e β -verbesinol, extraídos das raízes de *Verbesina virginica* (GARDNER; PARK; ALBERS, 1961). Desde o primeiro relato da presença de sesquiterpenos do tipo eudesmano, a maioria dos estudos químicos posteriores relatam a presença desse tipo de substância nas espécies do gênero *Verbesina*. (Quadro 1)

Quadro 1- Substâncias isoladas de espécies de *Verbesina*.

Espécie	Substância	Referência
<i>V. eggersii</i> Hieron.	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Éster decahidro-8-hidroxi-8-(hidroximetil)-4a-metil-2-(1-metiletil) 1-naftaleno ▪ Éster 5-(acetiloxi)-8 [(acetiloxi)metil]decahidro-8-hidroxi-4a-metil-2-(1-metiletil)-1-naftalenil 	BANERJEE et al., 1985
<i>V. glabrata</i> Hook & Arn.	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 6β-cinamoileudesmano-15-al 	BOHLMANN et al., 1980
<i>V. luetzelburgii</i> Mattf.	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 6β-cinamoiloxi-1β-hidroxieudesman-3-en ▪ 6β-cinamoiloxi-1β-hidroxieudesman-4(15)-en ▪ 6β-cinamoiloxi-4β-hidroxieudesmano ▪ 6β-cinamoiloxi-1β,4β- 	BOHLMANN et al., 1980

	hidroxieudesmano	
<i>V. oerstediana</i> S. F. Blake	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Éster 8-formildecáhidro-7-hidroxi-4a-metil-2-(1-metiletil)-1-naftalenil. ▪ Éster decáhidro-8-hidroxi-4a,8-dimetil-2-(1-metiletil)-1-naftalenil ▪ Ácido 1-Naftalenecarboxílico 	MURILLO; ARAYA; POVEDA, 2004.
<i>V. persicifolia</i> DC.	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 6β-hidroxieudesm-3-eno ▪ Cinamato de 5-hidroxi-2-isopropil-4a-metil-8-metilen-decaidronaftalen-1-ila 	JAKUPOVIC et al., 1987
<i>V. rupestris</i> S. F. Blake.	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Rupestriol 	BOX; BARDOUILLE; CHAN, 1977.
<i>V. sordescens</i> DC.	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Éster 1,2,3,4,4a,5,6,8a-octáhidro-5-hidroxi-4a,8-dimetil-2-(1-metiletil)-1-naftaleni ▪ Éster decáhidro-5-hidroxi-8-metileno-2-(1-metiletil)-1-naftalenil ▪ Éster decáhidro-8-hidroxi-4a,8-dimetil-2-(1-metiletil)-1-naftalenil 	BOHLMANN et al., 1982
<i>V. sphaerocephala</i> A. Gray	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Verocepol 	COATEA, 1976
<i>V. subcordata</i> DC.	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Cinamato de 5-hidroxi-2-isopropil-4a-metil-8-metilen-decaidronaftalen-1-ila 	JAKUPOVIC et al., 1987
<i>V. turbacensis</i> Kunth	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ácido 6β-[cinamoiloxi]-eudesman-15-oico ▪ Metil-6β-[cinamoiloxi]-eudesman-15-oato 	AMARO-LUIS et al., 2002.

	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ácido 1α-Acetoxi-6β-[cinamoiloxi]-eudesman-15-oico ▪ Metil-1α-acetoxi-6β-[cinamoiloxi]-eudesman-15-oato 	
<i>V. virgata</i> Cav.	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Éster 1,2,3,4,4a,5,8,8a-octahidro-3,4-dihidroxi-1,4a-dimetil-7-(1-metiletil)-1-naftalenil ▪ Éster 1,2,3,4,4a,5,8,8a-octahidro-2,4-dihidroxi-1,4a-dimetil-7-(1-metiletil)-1-naftalenil 	MARTINEZ et al., 1983.
<i>V. virginica</i> A. Gray	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 6-O-β-E-p-cumaroil-4α-hidroxieudesmano ▪ 6-O-β-Z-p-cumaroil-4α-hidroxieudesmano ▪ 6-O-α-E-p-cumaroil-1β,4α-dihidroxieudesmano 	XU et al., 2009

Além desta classe de compostos também é relatado o isolamento de flavonoides (GLENNIE, 1980), sesquiterpenos lactonas (ORTEGA, et al., 1985), amidas (ORTEGA et al; 1999), compostos acetilênicos (BOHLMANN; LONITZ, 1978) e vários sesquiterpenos com grande variedade de esqueletos (BOHLMANN et al, 1980).

Dentre algumas espécies que foram estudadas biologicamente, destaca-se a atividade hipotensora das substâncias caracasamida e caracasandiamida de *Verbesina caracasana*, espécie encontrada na Venezuela, para a qual foi descrita a atividade hipotensora em ensaio em ratos por via intravenosa com doses de 50-6400 μ g/Kg (CARMIGNANI et al., 2001; MONACHE et al., 1999).

A espécie *V. enceloides*, planta nativa da América do Norte, conhecida por apresentar atividade tóxica, causando morte em bovinos e ovinos, apresenta como princípio tóxico a guanidina galegina (3-metil-2-butenil-guanidina) (AMARO-LUIS et

al., 2002). O teste de toxicidade dessa substância foi realizado em fêmeas de camundongos administrados por via intraperitoneal (OELRICHS et al., 1981).

Estudos realizados com o ester de (-)bornil isolado de *V. turbacensis* mostrou que essa substância é capaz de inibir a cisteína protease (OGUNGBE et al., 2010). O óleo essencial dessa espécie tem como componente principal o germacreno e apresentou atividade antimicrobiana moderada frente *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* (ROJAS et al., 2005)

2.4 Considerações sobre *Verbesina macrophylla* (Cass.) S.F.Blake.

Verbesina macrophylla é um arbusto (Figura 1, abaixo) e encontra-se distribuída na América do Sul tendo sido encontrada especialmente na Bolívia (FOSTER, 1958) e no Brasil. Neste último foi localizada nos estados da Paraíba e Pernambuco (FORZZA; 2010). Possui como sinonímia científica *Ditrichum macrophyllum* Cass. (JORGENSEN, 2011) e popularmente é conhecida como “Assa peixe” (AGRA et al., 2007).

As suas flores são usadas pela população na forma de infusão ou decocto para tratamento de diversos tipos de inflamações (AGRA et al., 2007) e o chá das folhas é indicado para tratar problemas nos rins e uretra e para abaixar a febre (MOREIRA et al., 2002).

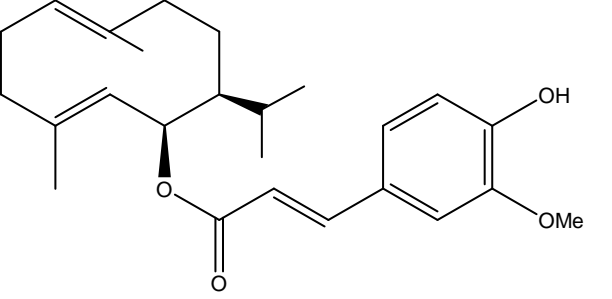
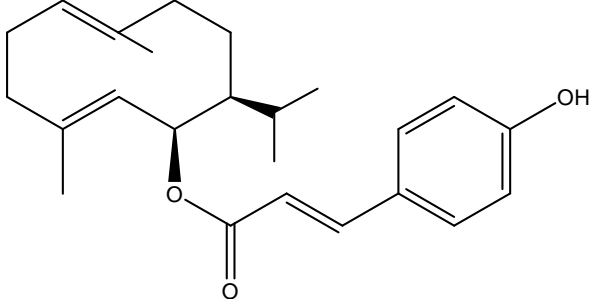
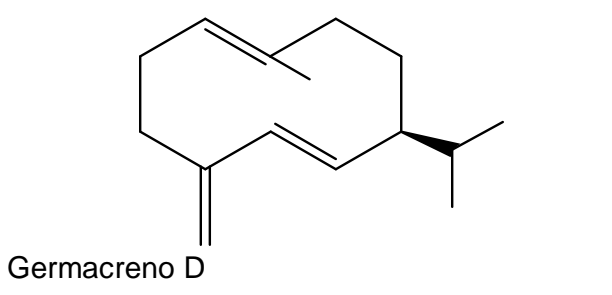
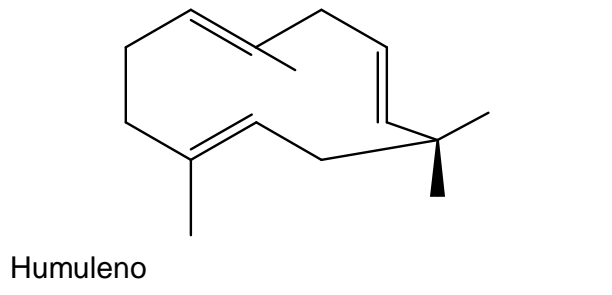
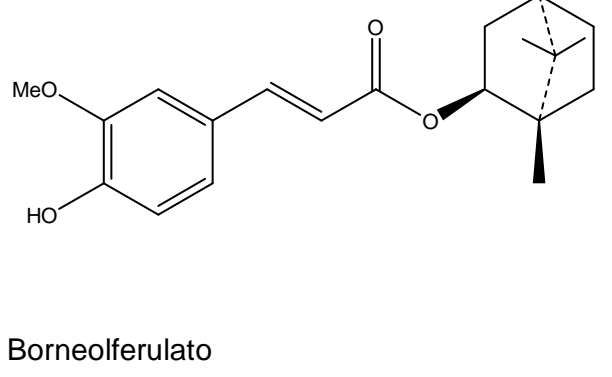
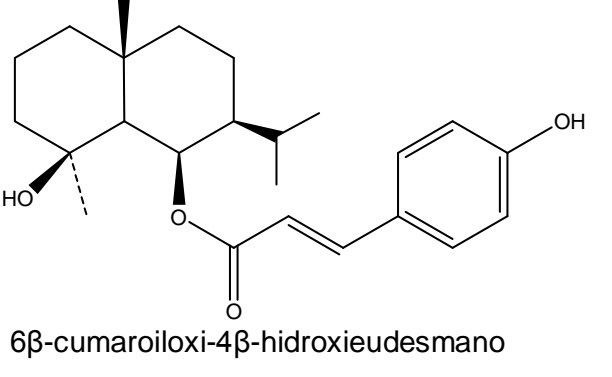
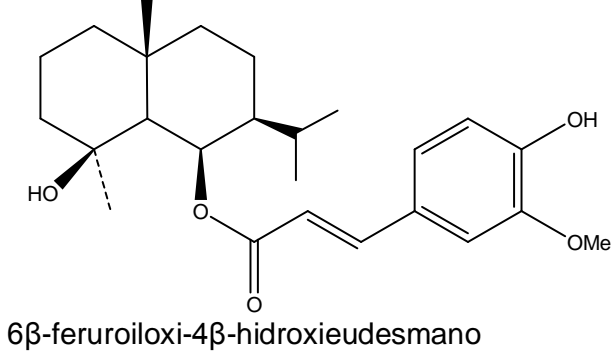
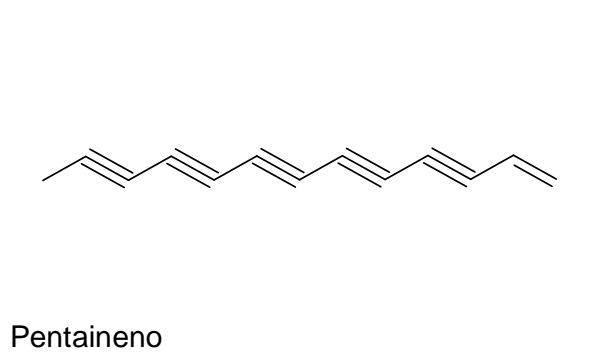
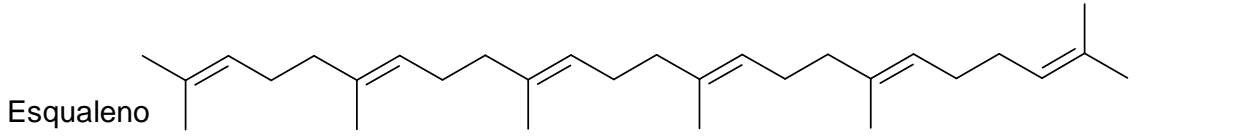
Figura 1-Foto de *Verbesina macrophylla* (Cass.) S. F. Blake. Detalhe da inflorescência.



(J. F. TAVARES, 2011)

Em levantamento bibliográfico realizado no Chemical Abstract, Scifinder e Web of Science não foi encontrado nenhum estudo farmacológico e apenas um estudo fitoquímico, no qual Bohlmann e colaboradores (1980) relatam o isolamento a partir das partes aéreas de nove substâncias. (Quadro 2, pág. 37)

Quadro 2-Substâncias de *Verbesina macrophylla* isoladas por Bohlmann e colaboradores (1980)

 <p>6β-cinamoiloxi-germacra -1(10)-4-dieno</p>	 <p>6β-feruloxi-germacra -1(10)-4-dieno</p>
 <p>Germacreno D</p>	 <p>Humuleno</p>
 <p>Borneolferulato</p>	 <p>6β-cumaroiloxi-4β-hidroxiudesmano</p>
 <p>6β-feruroiloxi-4β-hidroxiudesmano</p>	 <p>Pentaínenno</p>
 <p>Esqualeno</p>	

2.5 Tribo Eupatorieae.

A família Asteraceae é subdividida em 17 tribos, dentre estas tribos destaca-se a Eupatorieae com 170 gêneros. Os membros da tribo Eupatorieae normalmente são arbustos e está, a maior parte da família, na região Neotropical, naturalmente ocorrendo entre o norte da América, Canadá e região nordeste do hemisfério norte (KING; ROBINSON, 1987).

Envenenamentos causados por algumas espécies de Asteraceae são devidos a benzofuranos encontrados na tribo Eupatorieae e raros em outras tribos (KING; ROBINSON, 1987). Os metabólitos secundários majoritários em Eupatorieae são: flavonoides, sesquiterpenoides (lactonas sesquiterpênicas dos tipos germacranolídeos, eudesmanolídeos e guaianolídeos), diterpenóides e cumarinas (KING; ROBINSON, 1987).

2.6 Considerações sobre a espécie *Praxelis clematidea* R.M. King & Robinson.

Praxelis clematidea pertence à tribo Eupatorieae (HSU et al, 2006). Essa espécie possui como sinônimas: *Eupatorium clematideum* Griseb. e *Eupatorium urtifolium* var. *clematideum* (Griseb.) Hieron ex. Kuntze. É um pequeno arbusto perene, que apresenta entre 40-80 cm de altura, podendo chegar a 1 m. Seus talos são pilosos e frágeis, as folhas são opostas e triangulares com ápices agudos; as flores são agrupadas no final dos talos e possuem coloração que variam de lilás a azul (POLLOCK; SMITH, 2004) (Figura 2).

Figura 2-Foto de *Praxelis clematidea* (Griseb.) R.M. King & Robinson. Detalhe da inflorescência.

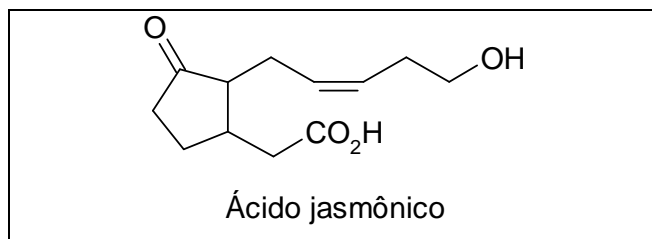


(H. S. FALCÃO, 2007)

Praxelis clematidea é nativa da América do Sul, existindo relatos de sua distribuição na Bolívia, Peru e Argentina. No Brasil é encontrada principalmente nos estados da Bahia, Alagoas, Pernambuco, Paraíba, Amazonas e Mato Grosso (POLLOCK; SMITH, 2004).

A literatura dispõe de poucos dados a respeito da constituição química e atividade biológica de *P. clematidea*. Em estudo fitoquímico realizado com esta espécie, Bolhmann e colaboradores (1984) isolaram o ácido jasmônico (Figura 3 p. 39). Através da análise por cromatografia gasosa foi relatada a presença de sesquiterpenos e monoterpenos no óleo essencial extraído de *P. clematidae*, que também apresenta efeito inibitório sobre o crescimento de duas espécies vegetais, *Lactuca sativa* e *Brassica campestris*, e sobre o crescimento de colônias fúngicas, *Fusarium oxysporum* e *Phytophthora capsici* (WANG et al, 2006). Estudo farmacológico realizado com as partes aéreas desta espécie demonstrou significativa atividade gastroprotetora frente à úlcera gástrica induzida em animais com etanol, estresse e antiinflamatório não esteroideal (FALCÃO, 2007).

Figura 3- Substância isolada por Bolhmann e colaboradores (1984) de *Praxelis celmatidea*



Esta espécie não apresenta indicação popular mas devido a suas características físicas, é facilmente confundida com espécies do gênero *Ageratum*, as quais são usadas pela população para tratamento de febre, dores articulares, inflamações, úlcera péptica e diarreia (CORLETT; SHAW, 1995; NOUMI; DIBAKTO, 2000; QUEENSLAND GOVERNMENT, 2001; POLLOCK; SMITH, 2004).

O fato de a família Asteraceae ter como marcador taxonômico os flavonóides e dos poucos estudos químicos realizados com a espécie até então não relatarem isolamento de representantes de tal classe, motivou o estudo fitoquímico das partes aéreas de *Praxelis clematidea*.

2.7 Produtos naturais como agentes modificadores de atividade antibiótica.

A pesquisa em produtos naturais a tempos colabora com a melhora da saúde humana através da descoberta de moléculas capazes de prevenir, tratar e/ou curar diversas enfermidades.

Dentre os problemas relacionados à saúde humana destacam-se as doenças infecciosas, especialmente as causadas por bactérias. A resistência aos antibióticos tem dificultado o tratamento de patologias bacterianas e diminuído o valor terapêutico dos agentes antimicrobianos existentes no mercado. Diante disso, novas alternativas tem sido buscadas para minimizar este problema (SILVEIRA et al., 2006; CHOPRA; HESSE; O'NEIL, 2002). A pesquisa de agentes que atuem em novos alvos do patógeno e não sejam afetados pelo mecanismo de resistência aos antibióticos usuais, além da busca por inibidores desses mecanismos tem sido a primeira alternativa. Entretanto, à medida que surgem novas classes de antibióticos aumenta também as possibilidades de mecanismos de resistência. Como exemplo temos a nova classe de antibióticos oxazolidinonas, na qual o representante mais conhecido é o linezolid que foi aprovado para uso clínico em 2000 nas linhagens resistentes a vancomicina, porém já foram descritas linhagens resistentes a esse novo antibiótico (GONZALES et al., 2001; ANDEREGG et al., 2005).

Uma alternativa mais apropriada das novas terapias antibacterianas são os inibidores de resistência, também chamados modificadores de atividade antibiótica ou adjuvantes de antibióticos (VAN BAMBEKE; PAGES, 2006; LYNCH, 2006). A estratégia dos inibidores pode estar envolvida com antibióticos que são inativados por enzimas, como os bem sucedidos inibidores de α -lactamase; e pelo sistema de efluxo.

Bombas de efluxo são proteínas transmembrana envolvidas no transporte de substratos tóxicos, incluindo todas as classes de antibióticos clinicamente relevantes, do interior da célula para o ambiente extracelular, diminuindo, portanto, a concentração intracelular do substrato antimicrobiano e tornando a célula menos susceptível ao agente (VAN BAMBEKE et al., 2003).

A procura por compostos que interagem com os sistemas de efluxo inibindo-os foi iniciada na década passada, focando principalmente *S. aureus* (PIDDOCK, 2006). Os mecanismos pelos quais os inibidores de bomba de efluxo podem atuar não estão claramente compreendidos, mas têm sido propostas algumas formas de ação, como: ligar-se diretamente a um ou mais sítios de ligação na proteína de

efluxo, de maneira competitiva ou não-competitiva; apresentar afinidade pelo substrato transportado pela bomba, formando um complexo que poderá não ser mais reconhecido pela bomba de efluxo; interferir no gradiente de próton; interagir com a membrana plasmática modificando a conformação da proteína de efluxo ou inibir a expressão do gene de efluxo. Todos esses mecanismos interferem no efluxo do substrato da bomba. Assim, a aplicação desses inibidores em associação com antibióticos convencionais poderá aumentar a concentração intracelular desses antibióticos, restaurando sua eficiência. Além de reduzir o emergente desenvolvimento da resistência bacteriana (LOMOVSKAYA; BOSTIAN, 2006; ZLOH et al., 2004; POOLE; LOMOVSKAYA, 2006; MARKHAM et al., 1999).

Baseados nos fatos de que as plantas produzem uma grande quantidade de metabólitos secundários e parte significativa dessa diversidade química serve para protegê-la contra patógenos microbianos, os produtos naturais tem sido alvo de investigação na busca de agentes que atuam como inibidores de bomba de efluxo. Como embasamento para essa nova linha de pesquisa, Stermitz et al. (2000) verificou que em plantas do gênero *Berberis*, o alcalóide berberina aparentemente não possuía efeito antimicrobiano, por ser substrato para certas bombas de efluxo, como a NorA. Sendo assim, a berberina é transportada para o meio extracelular. Da mesma planta também foram isolados agentes que atuam como inibidores do sistema de efluxo em bactérias. Avaliaram que a combinação do inibidor isolado mais a berberina atua de maneira sinérgica como potente antimicrobiano. De acordo com as observações, sugeriu-se que as plantas desenvolvem inibidores contra o sistema de efluxo dos seus patógenos, sendo, portanto, uma rica fonte de inibidores que poderiam restaurar a atividade dos substratos das bombas, como os antibióticos convencionais e os compostos vegetais isolados que aparentemente não possuem efeito antimicrobiano (TEGOS; STERMITZ; KIM, 2002; LEWIS, 2001; LEWIS; AUSUBEL, 2006).

A escassez de inibidores de efluxo efetivos na prática clínica leva a constante procura pela identificação e desenvolvimento de novos inibidores, tanto contra os sistemas de efluxo em microrganismos como em células tumorais resistentes a múltiplas drogas (DICKSON et al., 2006; KAATZ et al., 2003). A procura por novos agentes tem focado os produtos naturais como moduladores da atividade antibiótica. De acordo com essa perspectiva trabalhos tem caracterizado produtos naturais como modificadores da resistência por bombas de efluxo.

Extratos de planta demonstraram atividade contra os sistemas de efluxo MDR, são eles: *Rosmarinus officinalis* L. (OLUWATUYI; KAATZ; GIBBSONS, 2004), *Lycopus europaeus* L. (GIBBONS et al., 2003), *Jatropha elliptica* Pohl. (MARQUEZ et al., 2005) *Dalea spinosa* A. Grey (BELOFSKY et al., 2006), *Geranium caespitosum* Gray & James (STERMITZ et al., 2003), *Chamaecyparis lawsoniana* Murr. (SMITH et al., 2007), *Mezoneuron benthamianum* Baill., *Securinega virosa* Roxb. & Willd (DICKSON et al., 2006) e *Pinus nigra* Arnoul (SMITH et al., 2005).

Alguns grupos de metabólitos secundários também foram caracterizados como modificadores da resistência por bomba de efluxo em *S. aureus*, os quais se destacam diversos compostos como flavonas (GUZ et al, 2001; STERMITZ et al., 2002), flavolignananas (STERMITZ et al., 2000) e isoflavonas. Muitos flavonóides também foram reconhecidos por atuarem inibindo proteínas de efluxo em eucariotos (MORRIS; ZHANG, 2006).

Nessa perspectiva fica clara a importância de pesquisas que visem a obtenção de substâncias capazes de inibir a bomba de efluxo e assim contribuir com a promoção da saúde, sendo os flavonóides fortes candidatos para tal função.

OBJETIVOS



3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Contribuir para o estudo quimiotaxonômico da família Asteraceae através do estudo fitoquímico de *Praxelis clematidea* R.M. King & Robinson e *Verbesina macrophylla* (Cass.) S.F.Blake e desta forma cooperar para o conhecimento da flora brasileira, especialmente a nordestina.

3.2 Objetivos específicos

- Extrair, Identificar e/ou elucidar as estruturas os constituintes químicos das espécies em estudo, através de técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais.
- Integrar estudos farmacológicos ao estudo químico das espécies através da realização de teste de modelagem da resistência bactéria a drogas com os flavonóides isolados.

MATERIAL E MÉTODOS



4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Métodos cromatográficos

Visando o isolamento químico, foi utilizada a cromatografia de adsorção em coluna (CC), constituída por um tubo de vidro, em posição vertical. O adsorvente empregado foi a gel de sílica 60, ART 7734 da MERCK, de partículas com dimensões entre 0,063-0,200 mm. As dimensões da coluna dependeram da quantidade de material que foi cromatografado.

Para a análise e separação dos componentes de uma mistura, foi utilizada a cromatografia em camada delgada (CCD). Para as cromatografias em camada delgada analítica (CCDA) e preparativa (CCDP), foram usadas a gel de sílica 60 PF₂₅₄, ART 7749 da MERCK, em placas de vidro (20 x 20, 10 x 20, 5 x 20 cm).

As revelações das substâncias nas cromatoplasas analíticas foram executadas pela exposição a lâmpada de irradiação ultravioleta em aparelho Mineralight, modelo UVGL-58 em dois comprimentos de onda (254 e 366nm) e/ou câmara saturada com vapores de iodo.

Os solventes empregados foram das marcas MERCK, VETEC e solventes comerciais destilados no LTF/UFPB.

4.2 Métodos espectroscópicos

Os espectros de absorção na região do infravermelho (IV) foram obtidos em espectrômetro BOMEM serie 100 MB na faixa de 4000 a 400 cm⁻¹, utilizando-se pastilhas de KBr.

Os espectros de RMN foram registrados em espectrômetros VARIAN, modelo MERCURY, operando a 200 MHz (RMN ¹H) e 50 MHz (RMN ¹³C) e VARIAN modelo SYSTEM operando a 500 MHz (RMN ¹H) e 125 MHz (RMN ¹³C). Os solventes utilizados na dissolução das amostras foram clorofórmio deuterado (CDCl₃), Dimetil sulfoxido deuterado (DMSO-*d*₆) e metanol deuterado (CD₃OD). Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento em Hz. As multiplicidades dos sinais em RMN ¹H foram indicadas segundo a convenção: *s* (simpleto), *s/l* (simpleto largo), *d* (duplete), *dd* (duploduplete), *t* (triplete) e *m* (multiplete).

4.3 Pontos de fusão

Os pontos de fusão foram determinados sem correção de valores em aparelho com bloco de platina em microscópio óptico tipo “Kofler”, marca REICHERT, modelo R3279, com temperatura que varia de 0-350°C

4.4 Rotação específica

A rotação específica das amostras foi realizada no polarímetro *Jossen* série P-2000.

4.5 Coleta do material botânico

As partes aéreas de *Praxelis clematidea* R.M. King & Robinson foram coletadas no município de Santa Rita, na Lagoa do Paturi, no estado da Paraíba, em maio de 2008 e as partes aéreas de *Verbesina macrophylla* (Cass.) S.F.Blake foram coletadas no município de Maturéia-PB.

A identificação do material botânico foi realizada pela Prof. Dra. Maria de Fátima Agra, do Setor de Botânica do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica “Professor Delby Fernandes de Medeiros” /UFPB; exsicatas das plantas estão depositadas no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB), da Universidade Federal da Paraíba, sob código M. F. Agra et al. 6894 (JPB), para *Praxelis clematidea* e M. F. Agra et al. 5630 (JPB) para *V. macrophylla*.

4.6 Processamento do material botânico

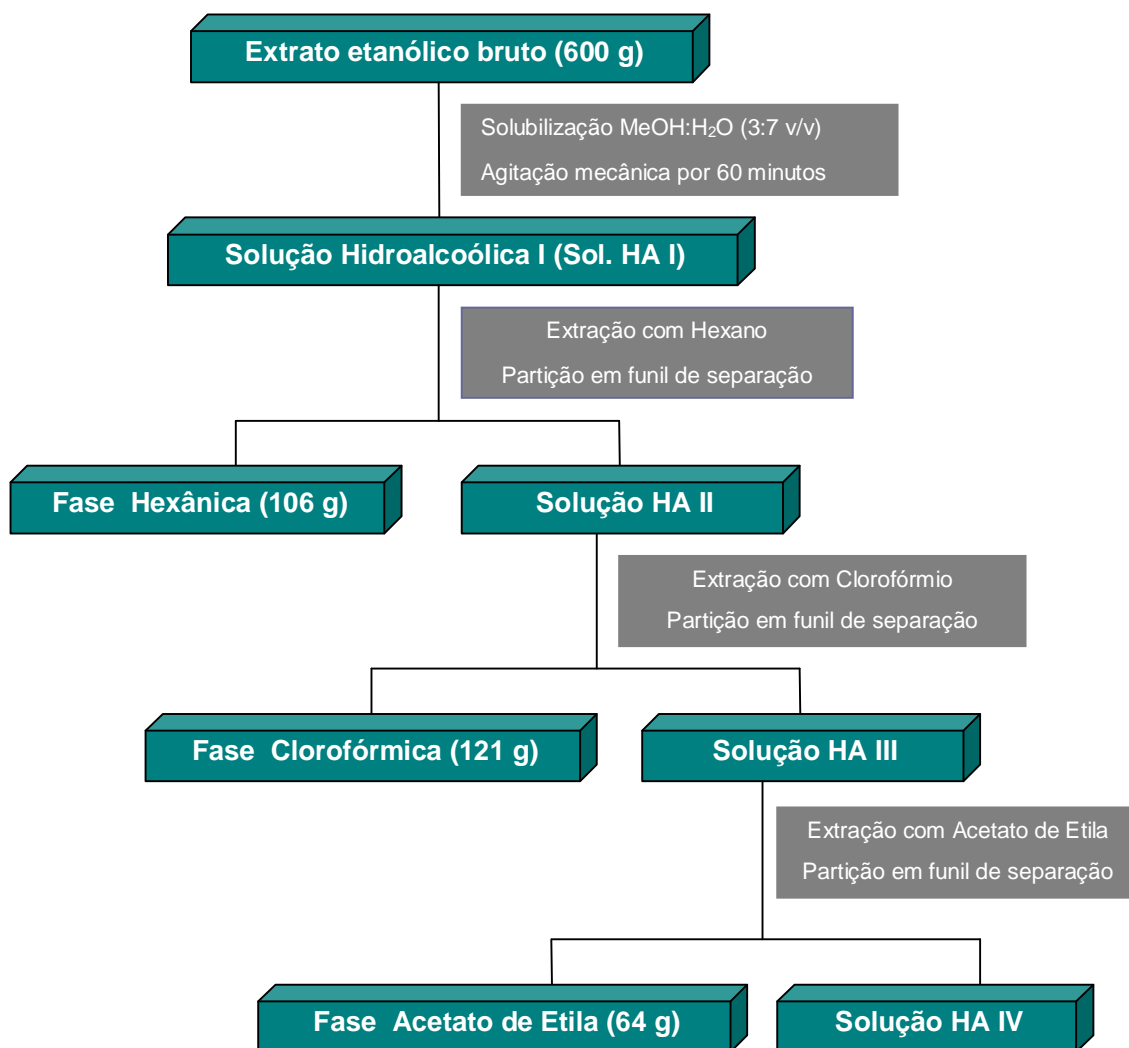
A parte utilizada de cada espécie vegetal foi separadamente dessecada em estufa com ar circulante, à temperatura média de 40 °C, por cerca de 72-96 horas. Após a completa secagem, o material foi pulverizado em moinho de lâminas cortantes. O material vegetal seco e pulverizado proveniente de *Praxelis clematidea* pesou 8 kg e de *Verbesina macrophylla* pesou 3 Kg.

4.7 Preparação do extrato

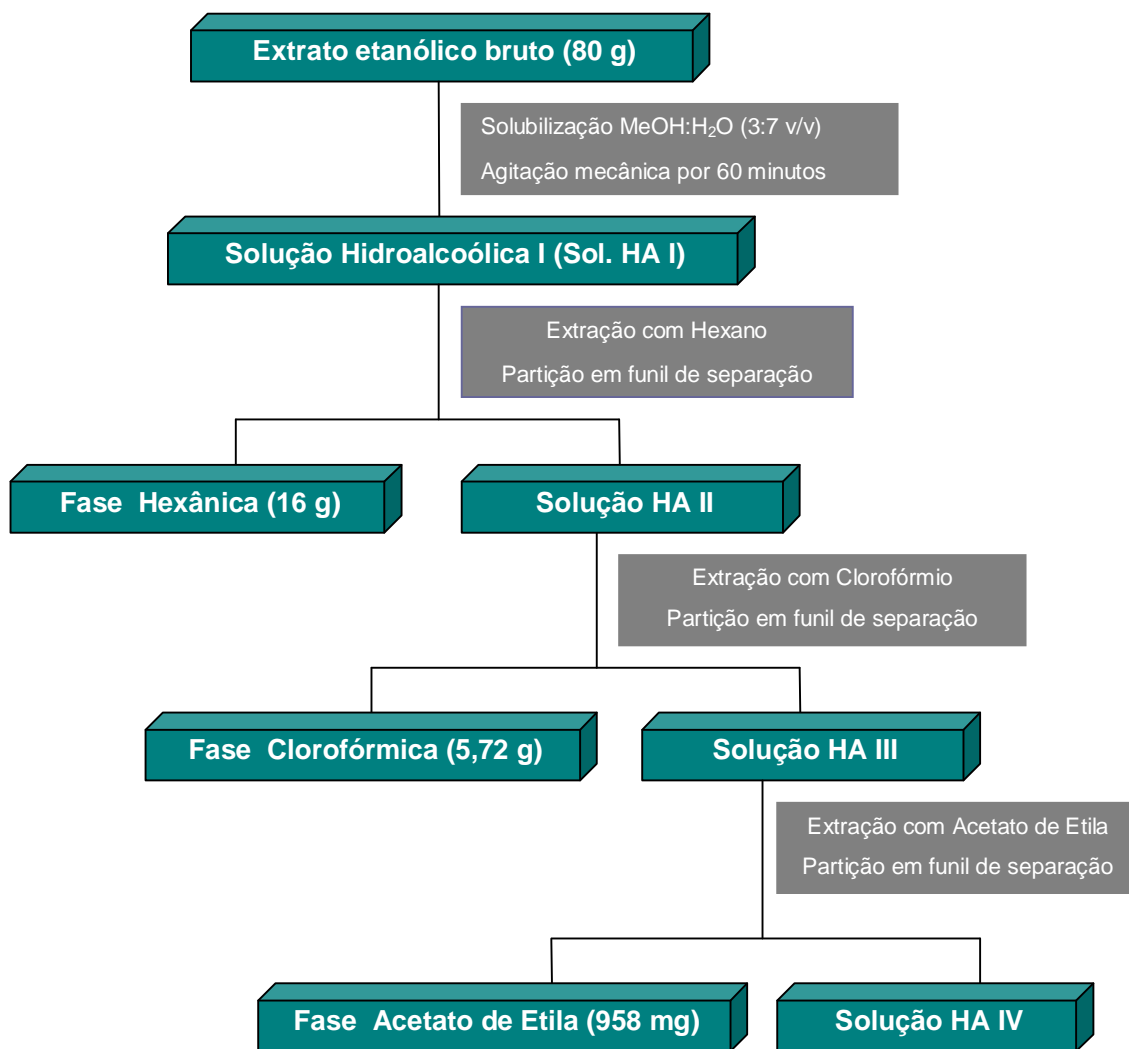
O material vegetal seco e pulverizado das duas espécies foram submetidos a mesma metodologia, sendo macerados com etanol (EtOH) a 95 %, em um recipiente de aço inoxidável. Foram feitos vários processos de extração num intervalo de 72 horas. Essa solução etanólica foi filtrada, fazendo-se em seguida, a evaporação do solvente com o auxílio de um rota-evaporador a uma temperatura média de 50 °C. Assim, os extratos etanólicos bruto obtidos (*P. clematidea*: 600 g – 7,7% e *V.*

macrophylla: 80 g- 2,6%), foram solubilizados em uma mistura de MeOH:H₂O (3:7) através de um agitador mecânico por 60 minutos, obtendo-se as soluções hidroalcoólicas, as quais foram submetidas a um processo de partição líquido-líquido (Fluxograma 1, p. 49) com solventes de polaridades crescentes como hexano, clorofórmio e acetato de etila, visando um pré-fracionamento das substâncias através de suas polaridades. Nesse processo foram obtidas de *Praxelis clematidea* a Fase hexânica (106 g), Fase CHCl₃ (121 g) e Fase AcOEt (64 g) (Fluxograma 1, p. 49), assim como de *Verbesina macrophylla* obteve-se Fase hexânica (16 g), Fase CHCl₃ (5,72 g) e Fase AcOEt (958 mg) (Fluxograma 2, p. 50),

Fluxograma 1- Fracionamento do extrato etanólico bruto das partes aéreas de *Praxelis clematidea*.



Fluxograma 2- Fracionamento do extrato etanólico bruto das partes aéreas de *Verbesina macrophylla*.



4.8 Fracionamento cromatográfico da fase hexânica das partes aéreas de *Verbesina macrophylla*

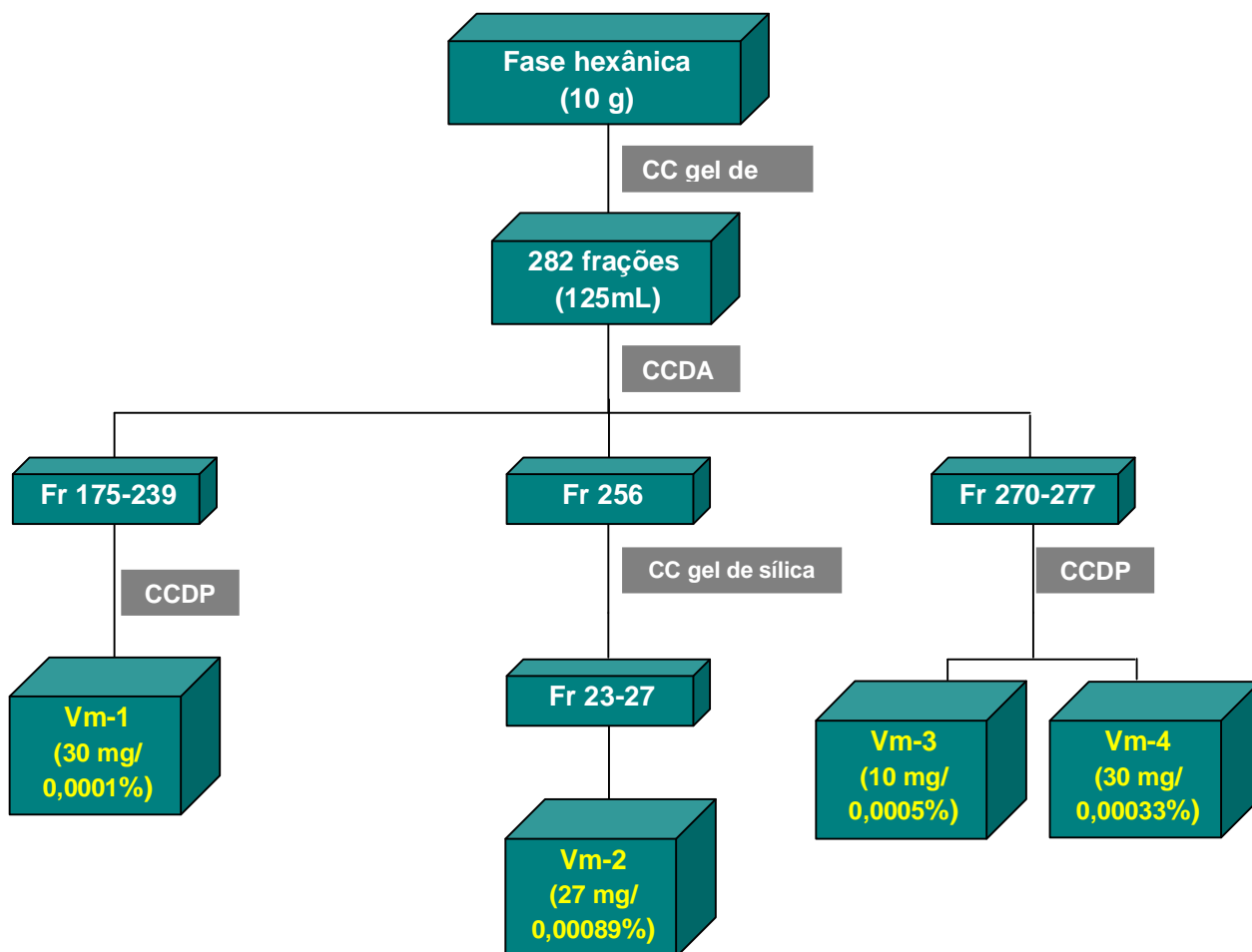
Uma alíquota da fase hexânica (10 g) foi submetida à cromatografia de adsorção em coluna (CC) sendo utilizada como fase estacionária gel de sílica e como fase móvel hexano, clorofórmio e acetato de etila, obedecendo à ordem crescente de polaridade. Foram obtidas 282 frações de 125 mL e concentradas em evaporador rotativo. Estas amostras foram analisadas através de CCDA e reunidas de acordo com seus perfis cromatográficos originando 26 grupos.

A fração 175-239, obtida em CHCl_3 :AcOEt (80:20), apresentou-se como sólido amarelo, sendo submetida a CCDA usando como eluente a mistura de hexano e acetato de etila na proporção de 90 para 10. Foi obtida uma substância que codificamos como Vm-1 (Fluxograma 3, p. 52).

A fração 256, obtida em CHCl_3 : AcOEt (68:32), após análise em CCDA foi submetida à nova cromatografia em coluna com gel de sílica tendo como eluente HEX: AcOEt. Foram obtidas 30 frações, destas a fração 23-27 após análise em CCDA foi codificada como Vm-2.

A fração, 270-277 obtida em CHCl_3 : AcOEt (60:40), apresentou-se impura em CCDA e foi submetida a CCDA Hex:AcOEt (70:30), sendo obtida duas substâncias codificadas como Vm-3 e Vm-4. Todas as substâncias isoladas foram encaminhadas para análise espectroscópica.

Fluxograma 3 - Fracionamento cromatográfico da fase hexânica das partes aéreas de *Verbesina macrophylla*.

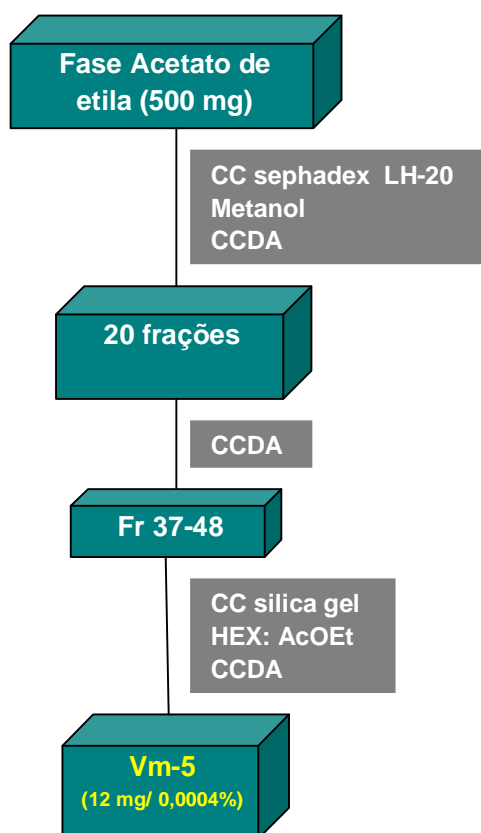


4.9 Fracionamento cromatográfico da fase acetato de etila de *Verbesina macrophylla*

A fase acetato de etila (900 mg) foi submetida à cromatografia em coluna (CC), utilizando Sephadex LH-20 e como eluente metanol, obtendo-se 70 frações de 10 mL, que foram reunidas após CCDA de acordo com seu perfil cromatográfico. (Fluxograma 4, p. 53).

A fração 37-48 foi reunida e cromatografada em coluna de gel de sílica tipo flash com hexano e acetato de etila, resultando em 20 frações. A fração 39 se apresentou como uma única mancha após análise de CCDA, sendo codificada como Vm-4.

Fluxograma 4 - Fracionamento cromatográfico da fase Acetato de etila de *Verbesina macrophylla*.



4.10 Fracionamento cromatográfico da fase clorofórmica das partes aéreas de *Praxelis clematidea*

Uma alíquota de fase clorofórmica (10 g) foi submetida à cromatografia de adsorção em coluna (CC) sendo utilizada como fase estacionária gel de sílica e como fase móvel clorofórmio e metanol, isoladamente ou em misturas binárias, obedecendo à ordem crescente de polaridade. Foram obtidas 187 frações de 125 mL. Estas amostras foram analisadas através de CCDA e reunidas de acordo com seus perfis cromatográficos originando 25 grupos.

A fração 10-18, obtida em CHCl_3 (100%), apresentou-se como sólido amarelo, sendo submetida a sucessivas recristalizações com hexano e gotas de clorofórmio (Fluxograma 5, p. 55). E após análise por CCDA mostrou-se como única mancha sendo codificada como Pc-1.

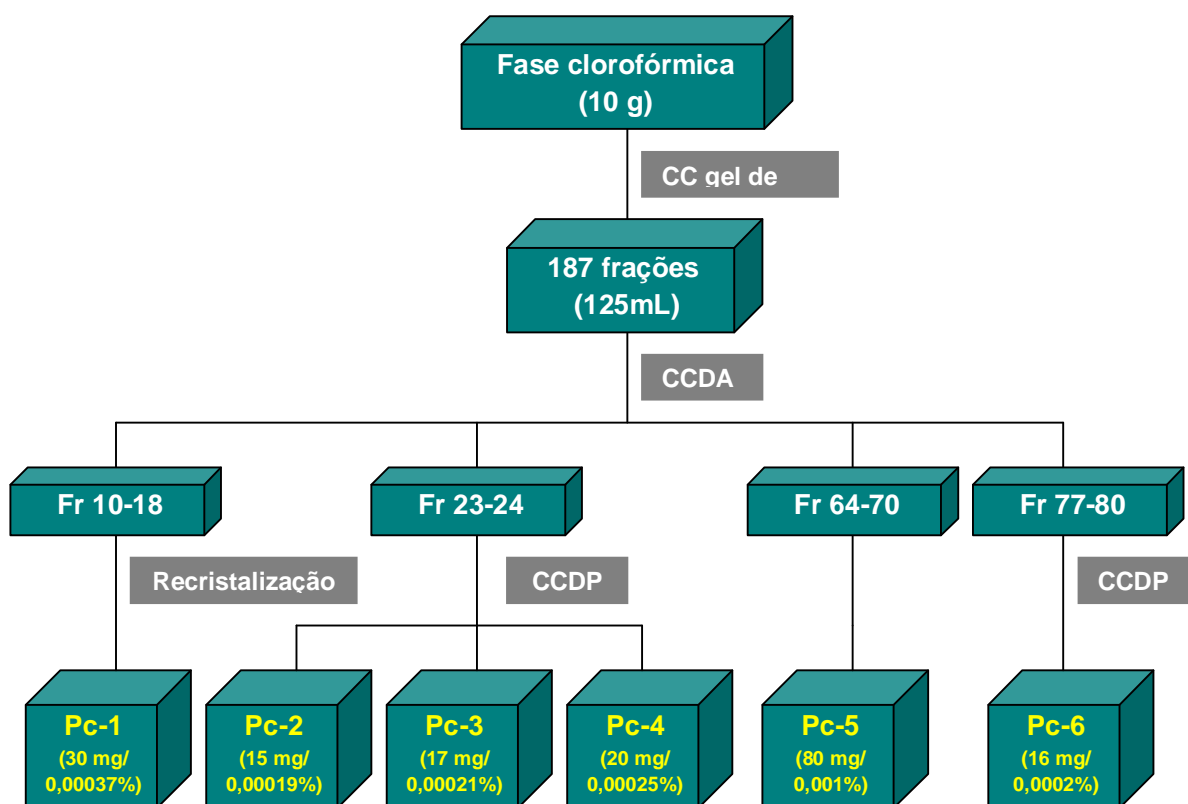
A fração 23-24, obtida em CHCl_3 :MeOH (98:2), após análise em CCDA foi submetida a CCDP, usando como eluente CHCl_3 :MeOH (99:1). Foram obtidas 3 faixas, as quais após filtração e evaporação do solvente foram codificadas respectivamente como Pc-2, Pc-3 e Pc-4.

Na análise em CCDA a fração 64-70, obtida em CHCl_3 :MeOH (95:5), mostrou-se após exposição à irradiação ultravioleta (comprimentos de onda 254 e 366 nm), como uma única mancha, sendo codificada como Pc-5.

A fração 77-80, obtida em CHCl_3 :MeOH (93:7), apresentou-se impura na placa analítica e foi submetida a CCDP em CHCl_3 :MeOH (97:3), sendo obtida uma substância codificada como Pc-6.

Todas as substâncias isoladas foram encaminhadas para análises espectroscópicas.

Fluxograma 5 - Fracionamento cromatográfico da fase clorofórmica de *Praxelis clematidea*.

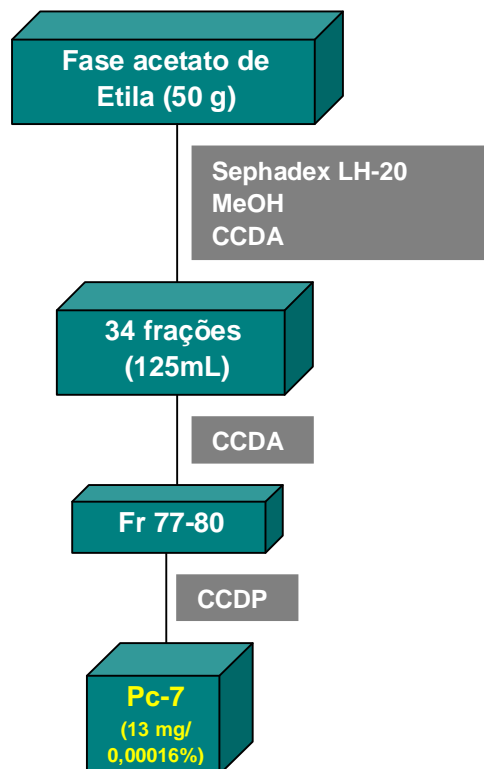


4.11 Fracionamento cromatográfico da fase acetato de etila das partes aéreas de *Praxelis clematidea*

Uma alíquota da fase acetato de etila (50 g) foi submetida à CC, utilizando como fase estacionária Sephadex LH 20 e como fase móvel metanol. Obtendo-se um total de 34 frações.

Todas as frações foram submetidas à CCDA, sendo analisadas e reunidas as frações que possuíam mesmo perfil cromatográfico (Fr. 01 -02, Fr. 03- 04, Fr. 05 - 09, Fr. 10 -12, Fr. 14-21, Fr. 22- 26, Fr. 27-30, Fr.28-34). O grupo 10-12, após análise em CCDA, foi submetido à CCDP, utilizando-se acetato de etila e metanol (9:1) como eluentes, obtendo-se duas frações: 10-12.1 e 10-12.2. A fração 10-12.1, apresentou-se como sólido marrom, que após análise por CCDA mostrou-se como única mancha, resultando na substância codificada como Pc-7, que foi encaminhada para análise espectral (Fluxograma 6, p. 56).

Fluxograma 6 - Fracionamento cromatográfico da fase acetato de etila de *Praxelis clematidea*.



4.12 Linhagens de *Staphylococcus aureus*

Foram utilizadas a linhagem SA-1199B, que superexpressa o gene *norA* que codifica a proteína de efluxo NorA, responsável pelo efluxo de fluorquinolonas e outras substâncias (KAATZ et al., 1993; KAATZ; SEO, 1997). A linhagem bacteriana é mantida em meio de cultura agar sangue (Blood agar base – Difco) inclinado. Antes de serem utilizadas, as células crescem em caldo nutritivo de infusão (Brain heart infusion - BHI, Difco) por 18-24hs a 37°C. Estas linhagens foram cedidas pelo Dr. Simon Gibbons (University of London) ao Laboratório de Genética de Microorganismos, Departamento de Biologia Molecular, Universidade Federal da Paraíba.

4.13 Antibióticos

Norfloxacin, pefloxacin and brometo de etídio foram obtidos da Sigma Aldrich Co. Ltd.

4.14 Soluções das drogas

As soluções estoque dos flavonóides foram preparadas em DMSO, e a maior concentração após a diluição em caldo nutritivo (4%) não causou inibição no crescimento bacteriano.

4.15 Avaliação da atividade antimicrobiana

Esse teste foi realizado no Laboratório de Genética de Microrganismos, Departamento de Biologia Molecular, Universidade Federal da Paraíba sob a orientação do Professor José Pinto de Siqueira Júnior.

Os valores das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) dos flavonóides e dos antibióticos, foram determinadas em caldo nutritivo (BHI) através da técnica de microdiluição, usando uma suspensão de c.a. 105 ufc/mL e com concentrações variando de 256µg/mL a 0,25 µg/mL ou 128 µg/mL a 0,125 µg/mL (diluições seriadas 1/2) (SMITH et al., 2005). A CIM foi definida como a menor concentração que inibiu completamente o crescimento bacteriano. Para a melhor visualização do crescimento bacteriano após 24 hs, foi feito uso da solução (0,01%) do corante resazurina (Sigma-Aldrich).

4.16 Avaliação da atividade moduladora da resistência a drogas

Para avaliar a atividade dos flavonóides como agentes modificadores de atividade antibiótica (inibidores putativos de bomba de efluxo), foram determinadas a CIM de antibióticos (substratos da proteína de efluxo), na presença e na ausência dos flavonóides (GIBBONS et al., 2003). A concentração dos flavonóides utilizada foi aquela correspondente a um quarto da sua CIM (concentração subinibitória) (STAVRI et al., 2007). Para a melhor visualização do crescimento bacteriano após 24 hs, foi feito uso da solução (0,01%) do indicador resazurina (Sigma-Aldrich).

4.17 Estimação do LogP

As estruturas foram desenhadas utilizando o programa ChemDraw Ultra® 10.0 (CambridgeSoft, 1986-2005), o qual faz uma estimativa do logP das mesmas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO



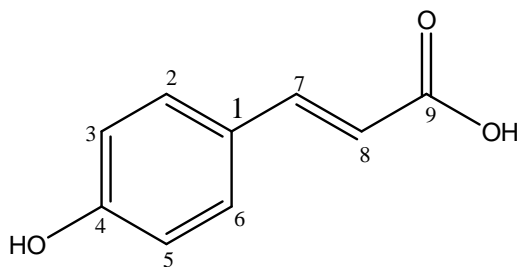
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinação estrutural de Vm-1

A substância Vm-1 apresentou-se como sólido polimorfo branco solúvel em metanol, pesando 30 mg e apresentando ponto de fusão 210-213 °C.

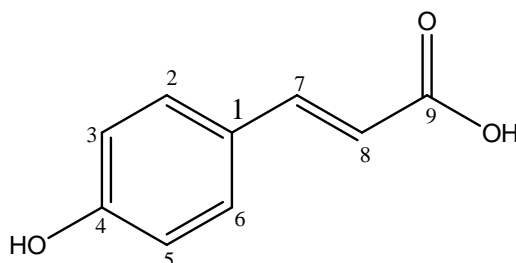
No espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) (Figura 4, p. 61) na região de hidrogênios ligados a carbonos aromáticos observou-se em δ_{H} 7,44 e 6,80 dois dupletos integrados para dois hidrogênios cada, cujos valores de $J = 8,5$ Hz sugerem acoplamento *orto* entre os dois pares de hidrogênios caracterizando a presença de um sistema AA'BB' de anel aromático. A expansão do espectro de RMN ^1H (Figura 4 p. 61) mostrou também dois dubletos em δ_{H} 7,59 e 6,27 com acoplando *trans* ($J = 16$ Hz) referentes aos hidrogênios H-7 e H-8, respectivamente. O espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) (Figura 5, p.61) apresentou sinal em δ_{C} 171,2 para carbonila de ácido, em δ_{C} 161,0 para carbono oxigenado e dois sinais para quatro carbonos de anel aromático em δ_{C} 131,0 e 116,8 que confirmam a presença do sistema AA'BB' proposto.

Comparações entre os dados de RMN ^1H e ^{13}C de Vm-1 com os dados da literatura (MIHARA et al; 2004) (Tabela 1, p. 60) foram suficientes para identificar Vm-1 como sendo o ácido *p*-cumárico.



O ácido *p*-cumárico é um composto fenólico encontrado em vários vegetais, mas este é o primeiro estudo que relata seu isolamento em *Verbesina macrophylla*. Essa substância apresenta comprovada atividade antioxidante e tuberculostática (DOFF, 1953).

Tabela 1 – Deslocamentos químicos para os núcleos de hidrogênio e carbono treze de Vm-1, verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais (500 e 125 MHz, respectivamente) em CD_3OD , bem como, os deslocamentos químicos dos hidrogênios (δ_{H}^*) apresentados por Mihara et al. (2004) para a mesma substância (200 MHz) em CD_3OD (δ em ppm e J em Hz).



VM-1	HMQC		HMBC		
C	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{H}^*
1	127,3	-	-	-	-
2/6	131,0	7,44 ($J=8,5$, 2H, d)	C-1	C-4, C-6	7,45 (d, $J=8,6,2\text{H}$)
3/5	116,8	6,80 ($J=8,5$, 2H, d)	-	C-1	6,81 (d, $J=8,6,2\text{H}$)
4	161,0	-	-	-	-
7	146,6	7,59 ($J=16$, 1H, d)	-	C-9, C-2, C-6	7,53 (d, $J=15,8,1\text{H}$)
8	115,7	6,27 ($J=16,1\text{H}$, d)	C-9	C-1	6,28 (d, $J=15,8,1\text{H}$)
9	171,2	-	-	-	-



Figura 4- Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de Vm-1.

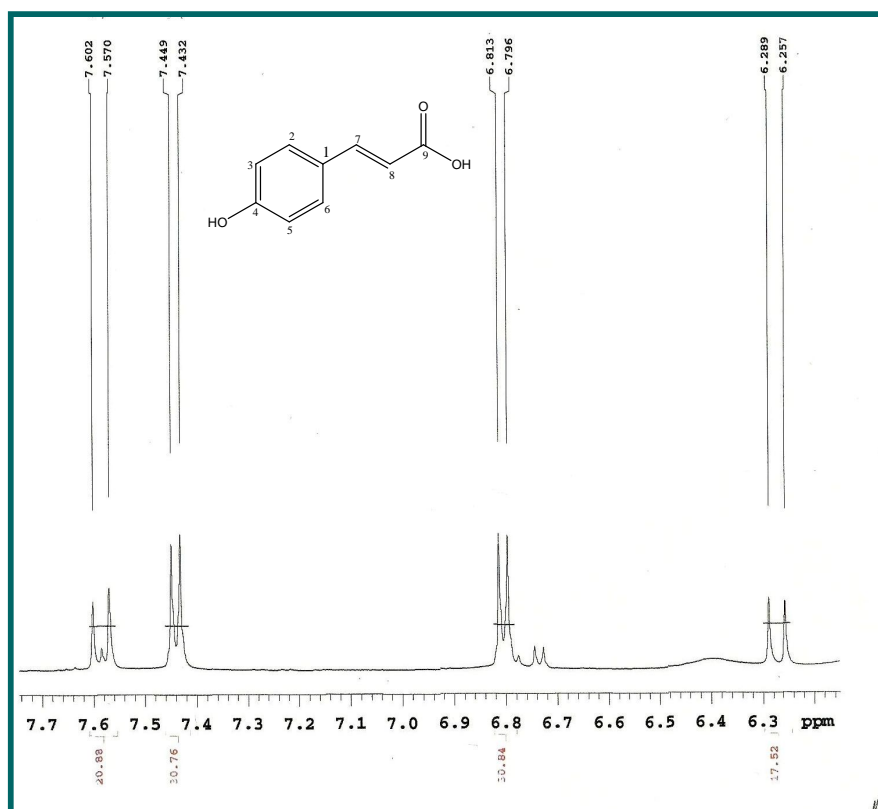


Figura 5- Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de Vm-1 na região de 7,7-6,3 ppm.

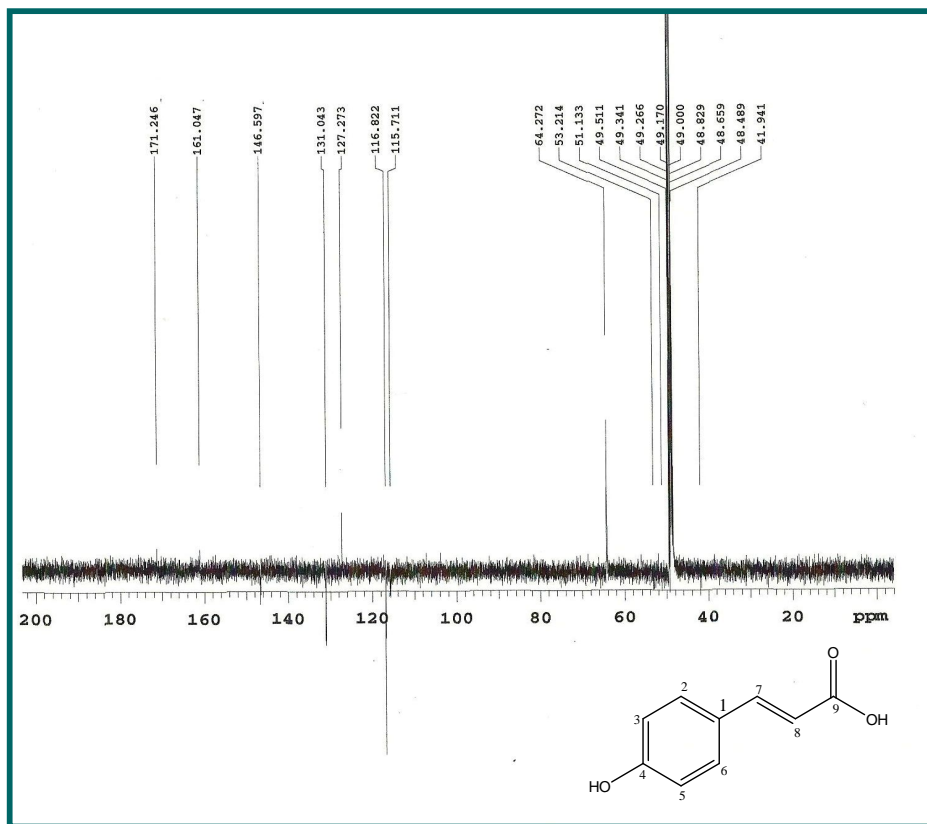


Figura 6- Espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CD_3OD) de Vm-1.

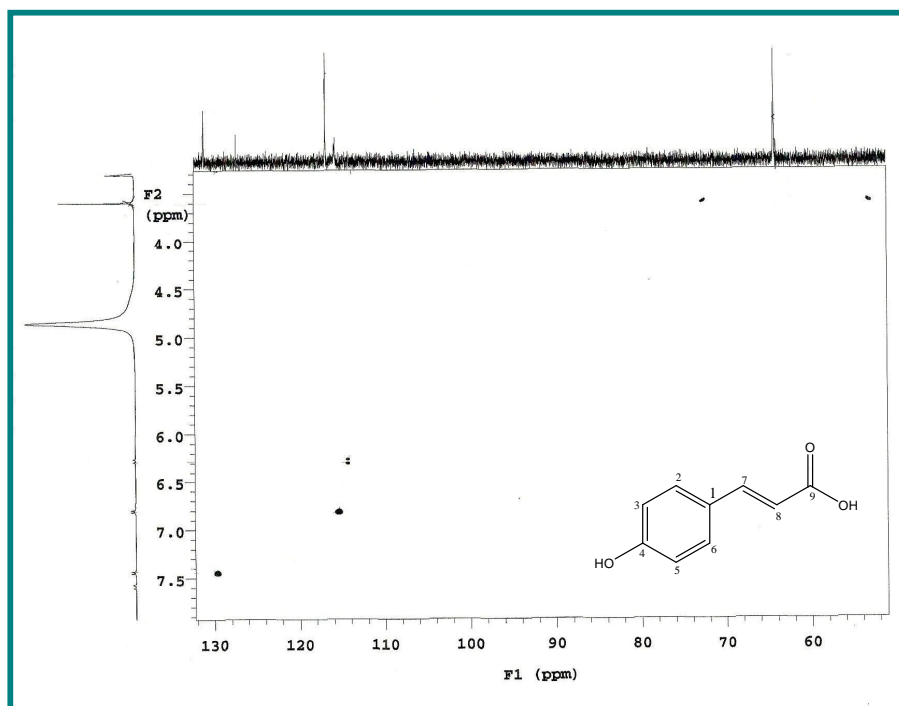


Figura 7- Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMQC (500 e 125 MHz, CD_3OD) de Vm-1 na região de (5,5-9,0 ppm) x (90-165ppm).

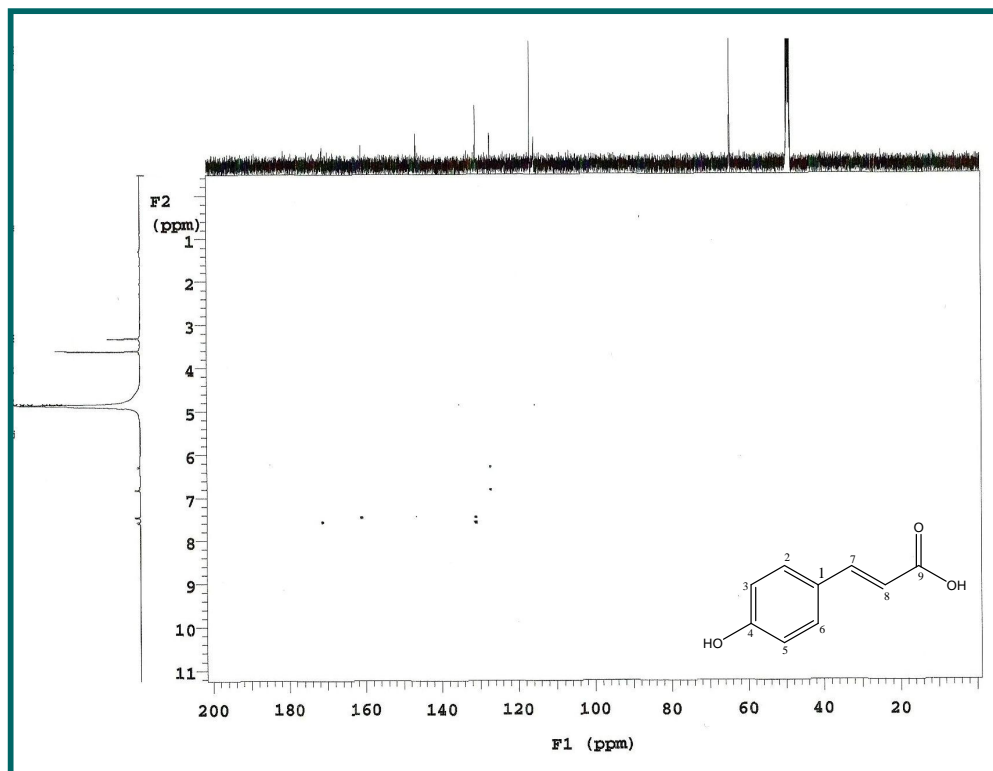


Figura 8- Espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (500 e 125 MHz, CD_3OD) de Vm-1.

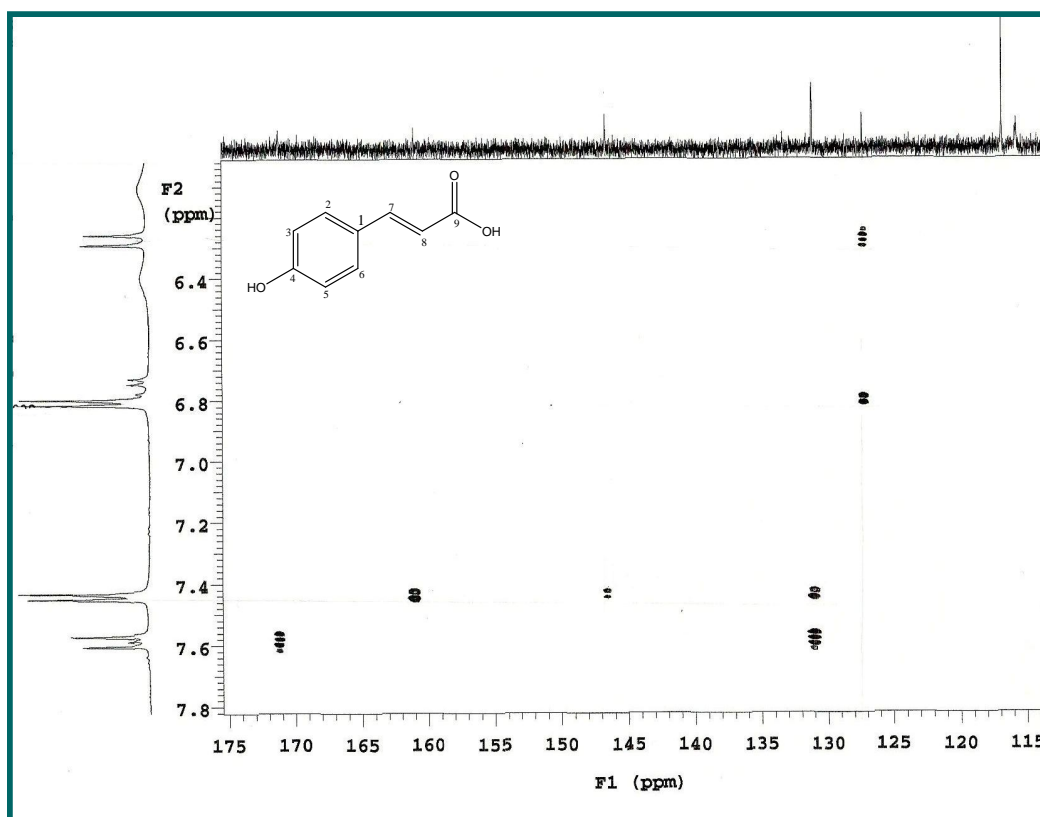
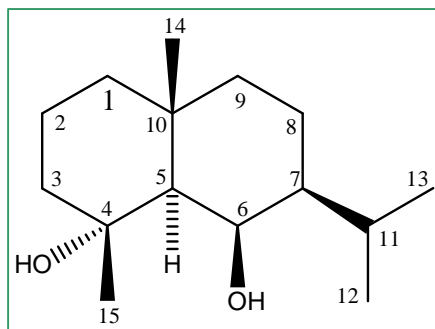


Figura 9- Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (500 e 125 MHz, CD_3OD) de Vm-1 na região de (6,0-7,8ppm) x (115-175ppm).

5.2 Determinação estrutural de Vm-2.

A substância Vm-2 apresentou-se como um óleo incolor com o peso de 27 mg. No espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) (Figura 11, p. 71) observou-se um envelope de sinais na região de δ_{H} 0,8 a 2,0 característicos de terpenóides. Observaram-se também sinais na região de hidrogênios aromáticos (Figura 13, p. 73) sendo os deslocamentos químicos em δ_{H} 6,27 (d, $J=16,0$ Hz), 6,84 (d, $J=8,5$ Hz), 7,41 (d, $J=8,5$ Hz) e 7,63 (d, $J=16,0$ Hz) atribuídos a unidade *trans-p*-cumárica. Também foram observados deslocamentos em δ_{H} 5,77 (d, $J=12,5$ Hz), 6,81 (d, $J=8,5$ Hz), 6,85 (d, $J=12,5$) e 7,71 (d, $J=8,5$) que foram atribuídos à unidade *cis-p*-cumárica.

No espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) (Figura 14, p. 74) foi possível observar a presença de 38 sinais, a maioria deles presentes aos pares e com intensidades diferentes apontando possível presença de mistura de dois compostos. Ainda nesse espectro foram observados 15 sinais para carbonos sp^3 . A presença de 15 sinais corrobora com esqueleto sesquiterpênico e os deslocamentos químicos em δ_{C} 56,9; 49,9 e 28,7 por comparação com a literatura (HERZ; KUMAR, 1981) foram atribuídos a C-5, C-7 e C-11 de sesquiterpeno do tipo Eudesmano.



Também no espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) e em suas expansões (Figura 15-16, p. 75) foi possível observar sinais em δ_{C} 169,0; 159,0; 145,9; 130,2; 126,1; 116,0 e 114,8 característico de unidade *trans-p*-cumárica. Os deslocamentos químicos em δ_{C} 169,0 e 69,2, juntamente com a absorção em 1683 cm^{-1} no Infravermelho (Figura 10, p. 70) inferiram que a unidade *p*-cumárica estava esterificando um sesquiterpeno eudesmano. Além destes foram observados deslocamentos químicos em δ_{C} 167,7; 158,0; 145,7; 132,9; 126,4; 115,9 e 115,2 com menores intensidades que são característicos de unidade *cis-p*-cumárica. Com

esses deslocamentos químicos foi reforçada a proposta de uma mistura de compostos formada por um sesquiterpeno eudesmano esterificado por uma unidade *trans-p*-cumárica (majoritário) e um sesquiterpeno eudesmano esterificado por uma unidade *cis-p*-cumárica (minoritário). Os deslocamentos químicos dos demais carbonos estão na tabela 2, p. 67 e tabela 3, p. 68.

Após análises desses dados e por comparação da literatura foi possível sugerir a mistura como sendo o 6-O- β -*E-p*-cumaroil-4 α -hidroxieudesmano e Vm-2b como 6-O- β -*Z-p*-cumaroil-4 α -hidroxieudesmano. Através dos cálculos das integrais dos sinais em δ_H 6,27 (d, H-8' A) e 5,76 (d, H-8' B) foi possível determinar que Vm-2a estava presente em 54,4% e que Vm-2b em 45,61% na mistura.

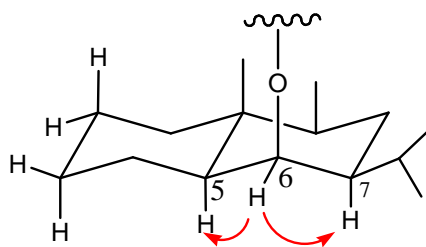
No espectro HMQC (500 e 125 MHz, CDCl₃) e suas expansões (Figura 17-18, p.76) foi possível observar a correlação direta do sinal em δ_C 56,8 com o δ_H 1,41 que foi atribuído a H-5. Correlação do sinal em δ_C 49,9 com δ_H 1,09 que foi atribuído a H-7 e correlação do sinal em δ_C 28,7 com δ_H 1,40 que foi atribuído a H-11. Observou-se uma correlação do sinal em δ_C 69,2 (C-6) com δ_H 5,85 corroborando com o deslocamento químico de hidrogênio oximetínico quando o oxigênio sofre uma esterificação. As demais correlações estão compiladas na tabela 2 p. 67 e tabela 3, p. 68.

No espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl₃) e suas expansões (Figura 22-24, p. 79-81) observou-se uma correlação do sinal em δ_C 5,85 (H-6) com δ_H 169,0 (C-9') confirmando a esterificação da unidade *p*-cumárica com o sesquiterpeno eudesmano. Observou-se correlação desse sinal com δ_C 72,4; 56,9; 49,9 e 34,8 que foram atribuídos a C-4, C-5, C-7 e C-10 respectivamente. Ainda por meio destas correlações confirmou-se inserção da unidade *p*-cumárica em C-6. As demais correlações são mostradas na tabela 2 p. 67 e tabela 3, p. 68.

No espectro de COSY (500 MHz, CDCl₃) e nas suas expansões (Figura 25-28, p. 82-84) foi possível observar correlações em δ_H 5,77 (H-8'b) com 6,85 (H-7'b) e de δ_H 6,81 (H-3'/H-5'b) com δ_H 7,71 (H-2'/H-6'b) sugerindo a presença de unidade *cis-p*-cumárica. Observou-se ainda correlações do sinal em δ_H 6,27 (H-8'a) com δ_H 7,63 (H-7'a) e de δ_H 7,41 (H-2'/H-6'a) com δ_H 6,84 (H-3'/H-5') sugerindo a presença de unidade *trans-p*-cumárica.

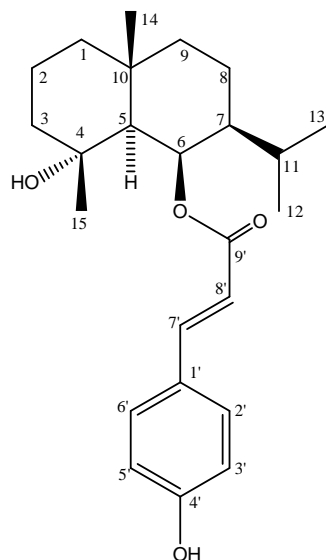
No espectro de correlação NOESY (500 MHz, CDCl₃) e nas suas expansões (Figura 29-30, p. 85-86) foi possível observar correlações dos sinais em δ_H 5,85 (H-

6) com δ_H 1,41 (H-5) e com 1,09 (H-7) através das quais definimos a orientação do grupo cumaroil como 6- β -axial.

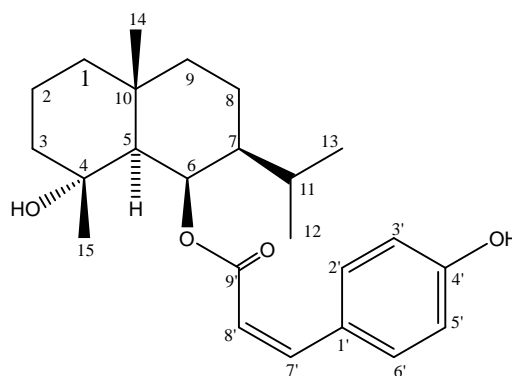


A análise de todos esses dados (tabela 4 p. 69) permitiu identificar os dois compostos em mistura como sendo o 6-O- β -*E*-*p*-cumaroil-4 α -hidroxieudesmano (Vm-2a) e como 6-O- β -*Z*-*p*-cumaroil-4 α -hidroxieudesmano (Vm-2b).

Vm-2a

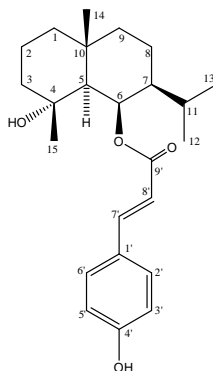


Vm-2b



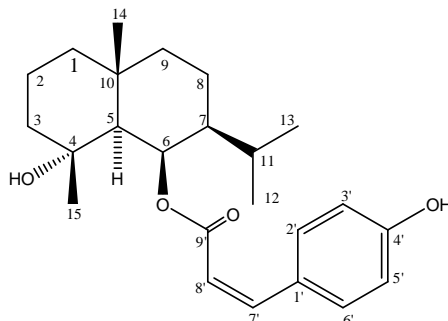
O 6-O- β -*E*-*p*-cumaroil-4 α -hidroxieudesmano já havia sido isolado na espécie em estudo por Bohlmann e colaboradores (1980), mas 6-O- β -*Z*-*p*-cumaroil-4 α -hidroxieudesmano está sendo descrito pela primeira vez em *Verbesina macrophylla*. Anteriormente foi isolado da espécie *Verbesina virginica* (XU et al., 2010) e o nosso trabalho é o segundo relato de seu isolamento na literatura.

Tabela 2 – Deslocamentos químicos para os núcleos de hidrogênio e carbono treze de Vm-2a, verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais (500 e 125 MHz, respectivamente) em CDCl_3 (δ em ppm e J em Hz).



Vm-2a		HMQC	HMBC		COSY	NOESY
C	δ_c	δ_H	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$		
1	45,2	1,56 (m)	C-10			
2	19,8	1,57 (m)				
3	43,7	1,70 (m)				
4	72,4					
5	56,9	1,41 (m)	C-4,C-10	C-3, C-7, C-15		H-7
6	69,2	5,85 (s)	C-5, C-7	C-9',C-4, C-10,C-8		H-5, H-7
7	49,9	1,09				H-6
8	21,1	1,59 (m)				
9	43,1	116,1 (m)				
10	34,8	-				
11	28,7	1,40 (m)				
12	21,3	0,87 ($J=5,5$, d)	C-11	C-7		
13	21,1	0,86 ($J=6,5$, d)	C-11	C-7		
14	20,6	1,13 (s)				
15	24,4	1,17 (s)	C-4			
1'	126,1	-				
2'	130,2	7,41($J=8,5$,d)	C-3'	C-4' , C-6'	H-3'/H-5'	
3'	116,0	6,84($J=8,5$,d)	C-4'		H-6'/H-2'	
4'	159,0	-				
5'	116,0	6,84($J=8,5$, d)	C-4'		H-6'/H-2'	
6'	130,2	7,41 ($J=8,5$,d)	C-5'	C-4', C-2'	H-3'/H-5'	
7'	145,9	7,63 ($J=16$,d)	C-1'	C-9', C-2', C-6'		
8'	114,8	6,27 ($J=16$,d)	C-9'	C-1'	H-7'	
9'	169,0	-				

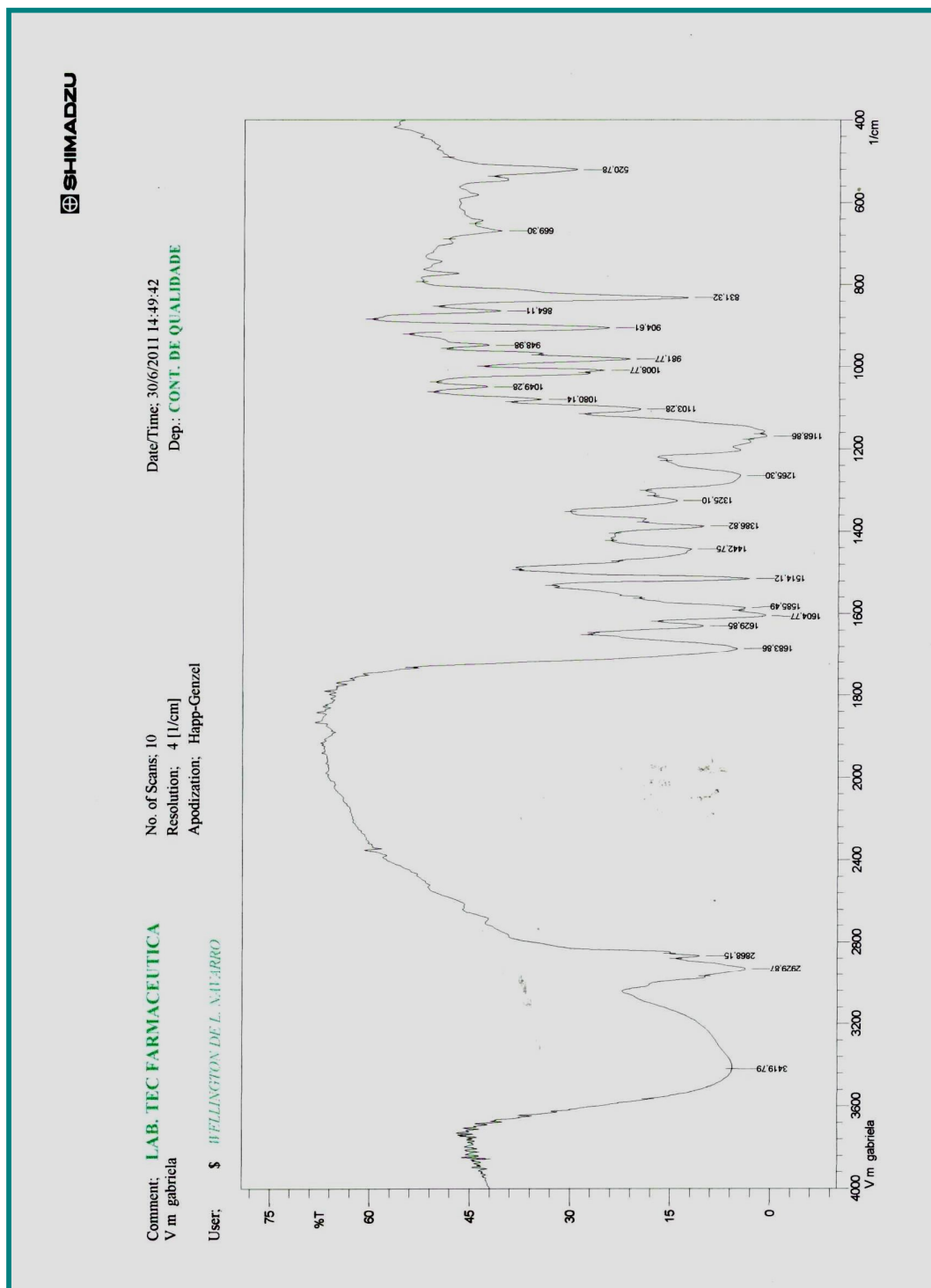
Tabela 3 – Deslocamentos químicos para os núcleos de hidrogênio e carbono treze de Vm-2b, verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais (500 e 125 MHz, respectivamente) em CDCl_3 (δ em ppm e J em Hz)..



Vm-2b	HMQC		HMBC		COSY	NOESY
C	δ_c	δ_H	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$		
1	45,2	1,56 (m)	C-10			
2	19,8	1,57 (m)				
3	43,7	1, 70 (m)				
4	72,6	-				
5	56,8	1,41 (m)	C-4,C-10	C-3, C-7, C-15		H-6, H-7
6	68,7	5,78 (s)	C-5, C-7	C-9',C-4, C-10,C-8		H-5, H-7
7	49,9	1,09				H-6
8	21,0	1,59 (m)				
9	43,1	1,13 (m) 1,42 (m)				
10	34,8	-				
11	28,6	1,40 (m)				
12	21,2	0,87 ($J=5,5$, d)	C-11	C-7		
13	21,1	0,86 ($J=6,5$, d)	C-11	C-7		
14	20,6	1,13 (s)				
15	24,4	1,19 (s)	C-4			
1'	126,4	-				
2'	132,9	7,71 ($J=8,5$, d)	C-3'	C-4', C-6'	H-3'/H-5'	
3'	115,2	6,81 ($J=8,5$, d)	C-4'		H-2'/H6'	
4'	158,0	-				
5'	115,2	6,81 ($J=8,5$, d)	C-4'		H-2'/H6'	
6'	132,9	7,71 ($J=8,5$, d)	C-5'	C-4', C-2'	H-3'/H-5'	
7'	145,7	6,85 ($J=12,5$, d)	C-1'	C-9', C-2', C-6'		
8'	115,9	5,77 ($J=12,5$, d)	C-9'	C-1'	H-7'	
9'	167,7	-				

Tabela 4 – Deslocamentos químicos para os núcleos de hidrogênio e carbono treze de Vm-2a e Vm-2b, verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, respectivamente) em CDCl_3 , bem como, os deslocamentos químicos dos hidrogênios (δ_{H}^*) e carbonos (δ_{C}^*) apresentados por Herz e Kumar (1981) e por Xu et al. (2010) para as mesmas substâncias (200 MHz) em CDCl_3 (δ em ppm e J em Hz).

Vm-2a			6-O- β -E-p-cumaroil-4 α -hidroxieudesmano		Vm-2b		6-O- β -Z-p-cumaroil-4 α -hidroxieudesmano	
C	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}^*	δ_{H}^*	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}^*	δ_{H}^*
1	45,2	1,56 (m)	45,2		45,2	1,56 (m)	45,4	1,53 (m, 1H) 1,54 (m, 1H)
2	19,8	1,57 (m)	19,9		19,8	1,57 (m)	20,1	0,97 (m, 2H)
3	43,7	1, 70 (m)	43,7		43,7	1,70 (m)	43,9	1,66 (m, 1H) 1,69 (m, 1H)
4	72,4	-	72,8		72,6	-	72,7	
5	56,9	1,41 (m)	56,8	1,43 (m)	56,8	1,41 (m)	57,0	1,37 (m, 1H)
6	69,2	5,85 (s)	69,2	5,86 (s)	68,7	5,78 (s)	68,9	5,76 (s, 1H)
7	49,9	1,09 (m)	50,0		49,9	1,09 (m)	50,1	1, 05 (m, 1H)
8	21,1	1,59 (m)	21,4		21,0	1,59 (m)	21,2	1, 02 (m, 2H)
9	43,1	1,13 (m) 1,42 (m)	43,1		43,1	1,13 (m) 1,42 (m)	43,3	1, 46 (m, 2H)
10	34,8	-	34,8		34,8	-	35,0	
11	28,7	1,40 (m)	28,7	1,43 (m)	28,6	1,40 (m)	28,8	1, 31 (m, 1H)
12	21,3	0,87 ($J=5,5$, d)	21,2	0,90 (d)	21,2	0,87 ($J=5,5$, d)	21,5	0,88 ($J=6,4$, 3H, d)
13	21,1	0,86 ($J=6,5$, d)	21,2	0,90 ($J=6,5$, d)	21,1	0,86 ($J=6,5$, d)	21,4	0,85 ($J=6,8$, 3H, d)
14	20,6	1,13 (s)	20,7	1,16 (s)	20,6	1,13 (s)	20,8	1,08 (s, 1H)
15	24,4	1,17 (s)	24,4	1,19 (s)	24,4	1,19 (s)	24,5	1,17 (s, 1H)
1'	126,1	-	126,0		126,4	-	126,4	
2'	130,2	7,41 ($J=8,5$, d)	130,2		132,9	7,71 ($J=8,5$, d)	133,2	7,70 ($J=8,8$, 1H, d)
3'	116,0	6,84 ($J=8,5$, d)	116,1		115,2	6,81 ($J=8,5$, d)	115,4	6,80 ($J=8,4$, 1H, d)
4'	159,0	-	159,0		158,0	-	158,5	
5'	116,0	6,84 ($J=8,5$, d)	116,1		115,2	6,81 ($J=8,5$, d)	115,4	6,80 ($J=8,4$, 1H, d)
6'	130,2	7,41 ($J=8,5$, d)			132,9	7,71 ($J=8,5$, d)	133,2	7,70 ($J=8,8$, 1H, d)
7'	145,9	7,63 ($J=16$, d)			145,7	6,85 ($J=12,5$, d)	146,0	6,84 ($J=12,0$, 1H, d)
8'	114,8	6,27 ($J=16$, d)			115,9	5,77 ($J=12,5$, d)	115,9	5,72 ($J=12,0$, 1H, d)
9'	169,0	-			167,7	-	168,0	

Figura 10- Espectro de IV (KBr, cm⁻¹) de Vm-2.

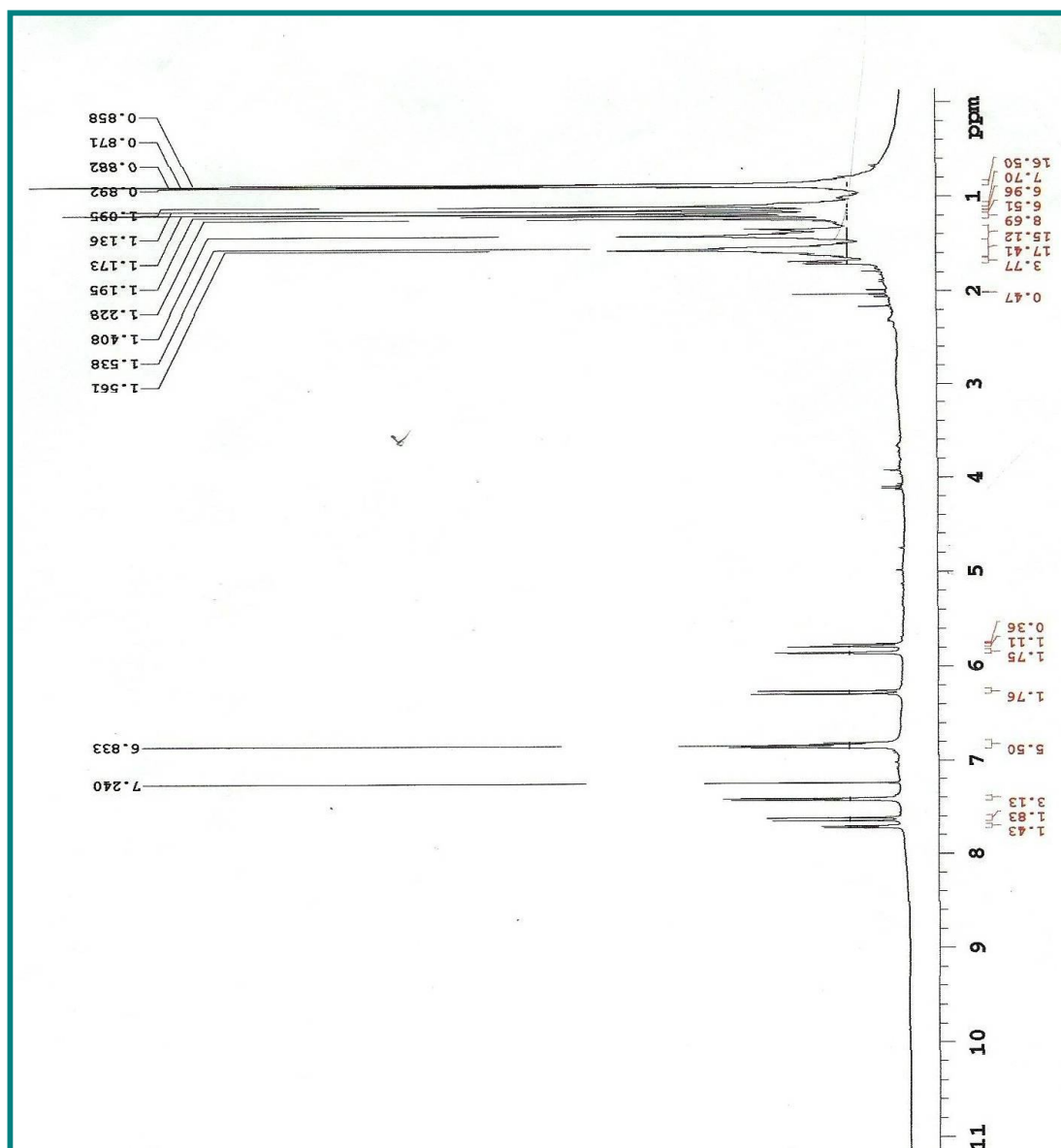


Figura 11- Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Vm-2.

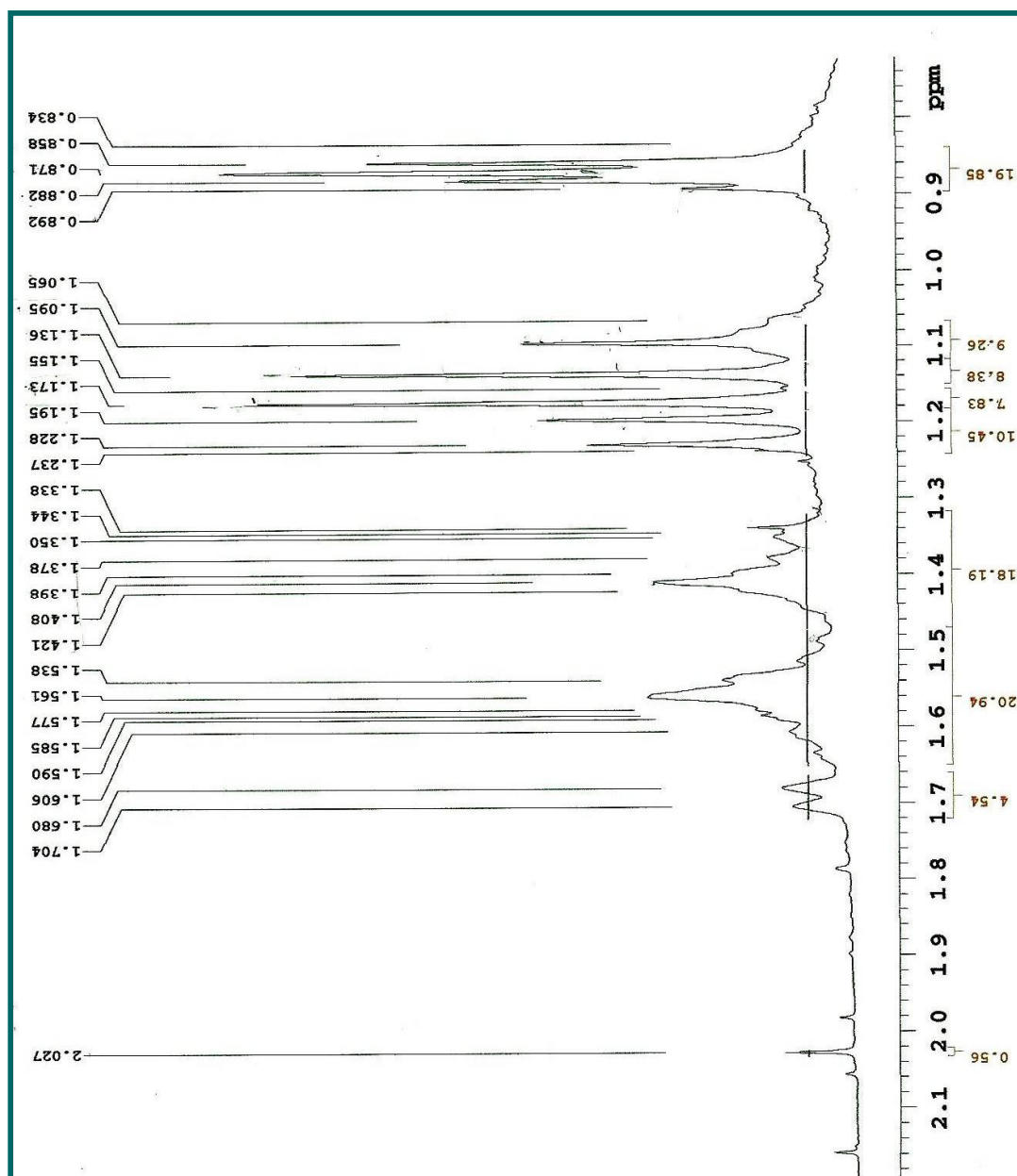


Figura 12- Expansão do espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) de Vm-2 na região de 0,8 a 2,0 ppm.

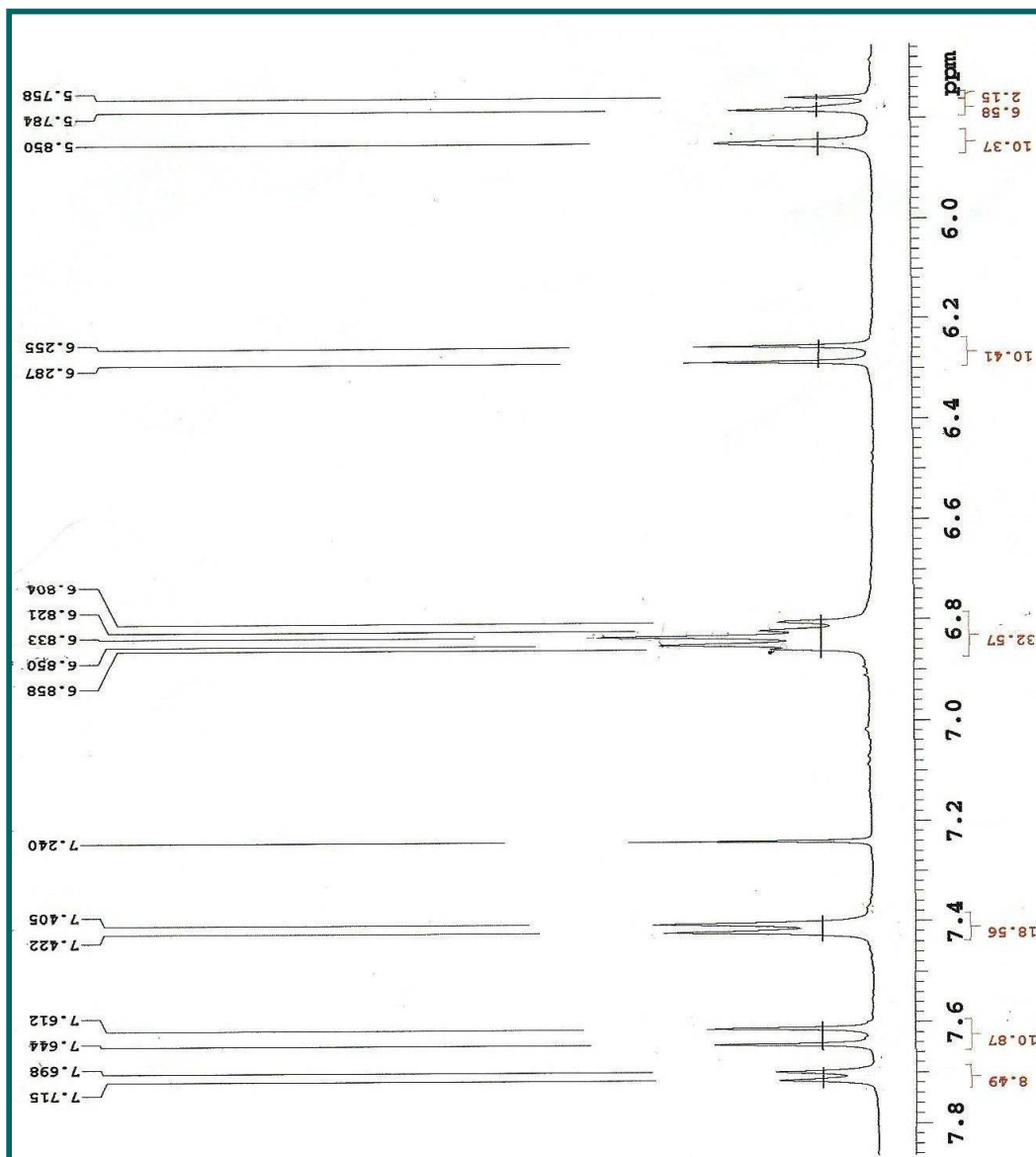


Figura 13- Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Vm-2 na região de 4,5 a 7,8 ppm.

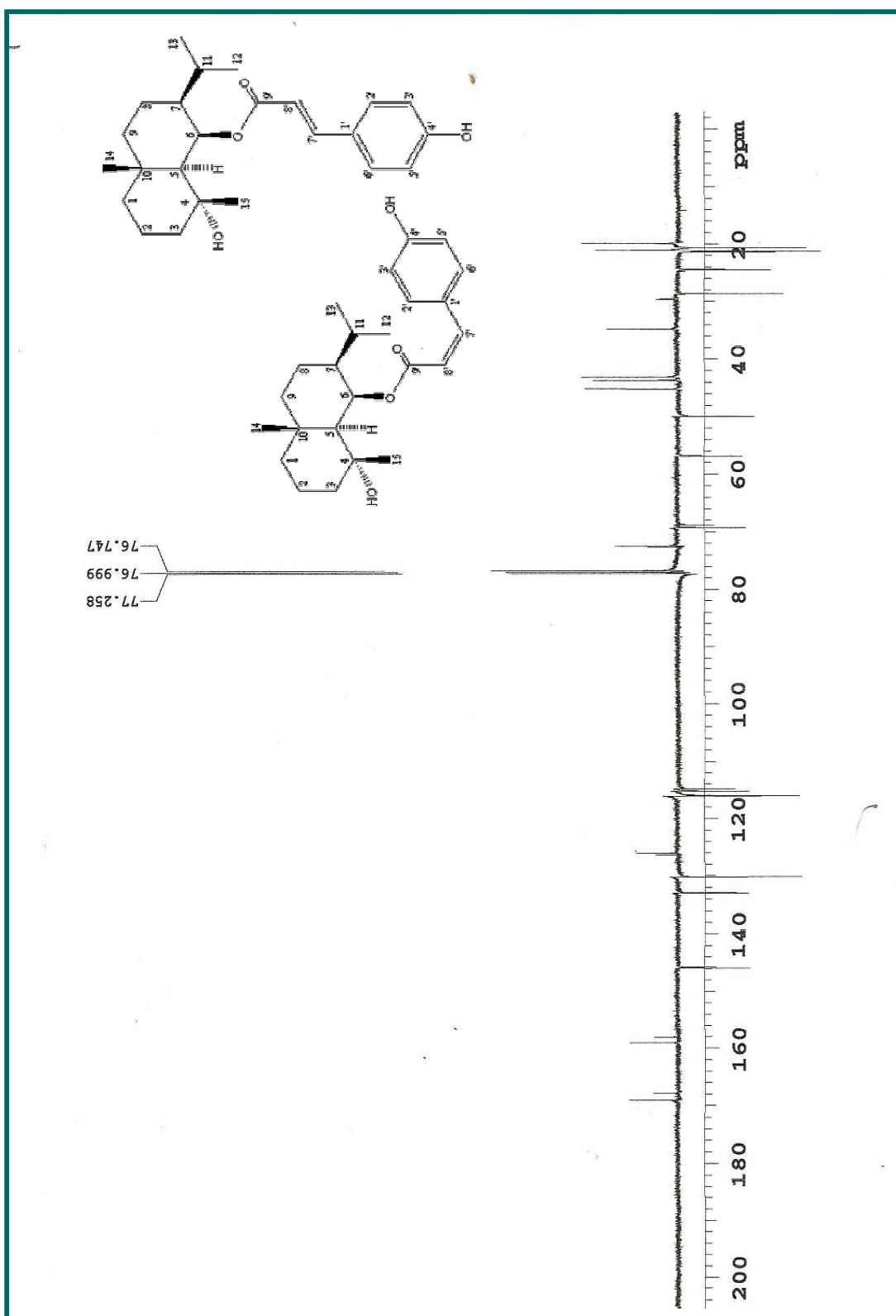


Figura 14- Espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) de Vm-2.

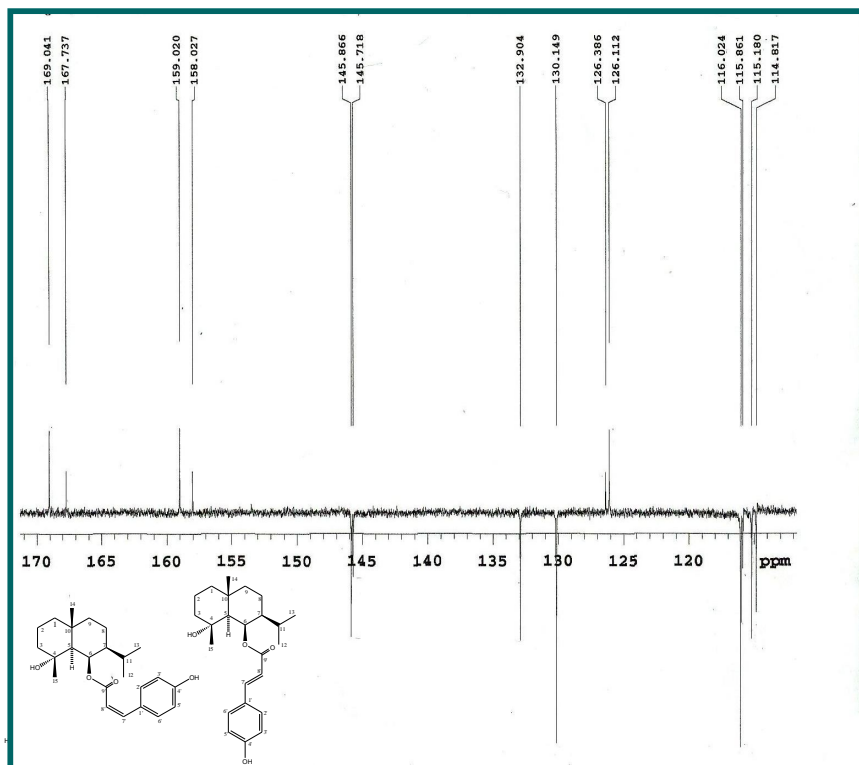


Figura15 - Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) de Vm-2 na região de 105-170 ppm.

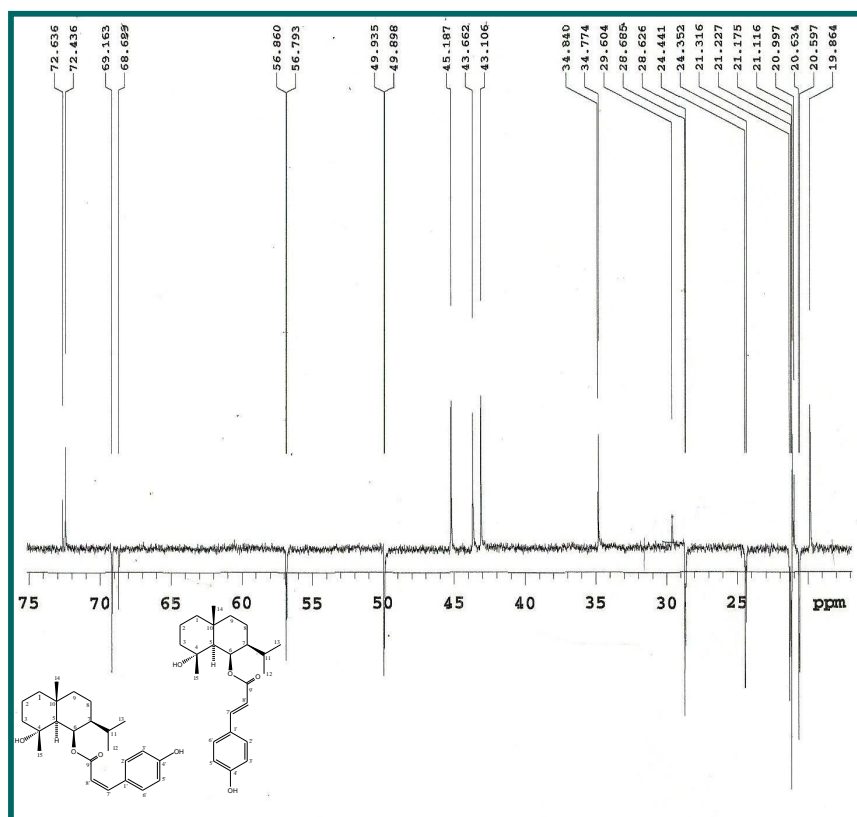


Figura 16- Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT(125 MHz, CDCl_3) de Vm-2 na região de 15-75 ppm.

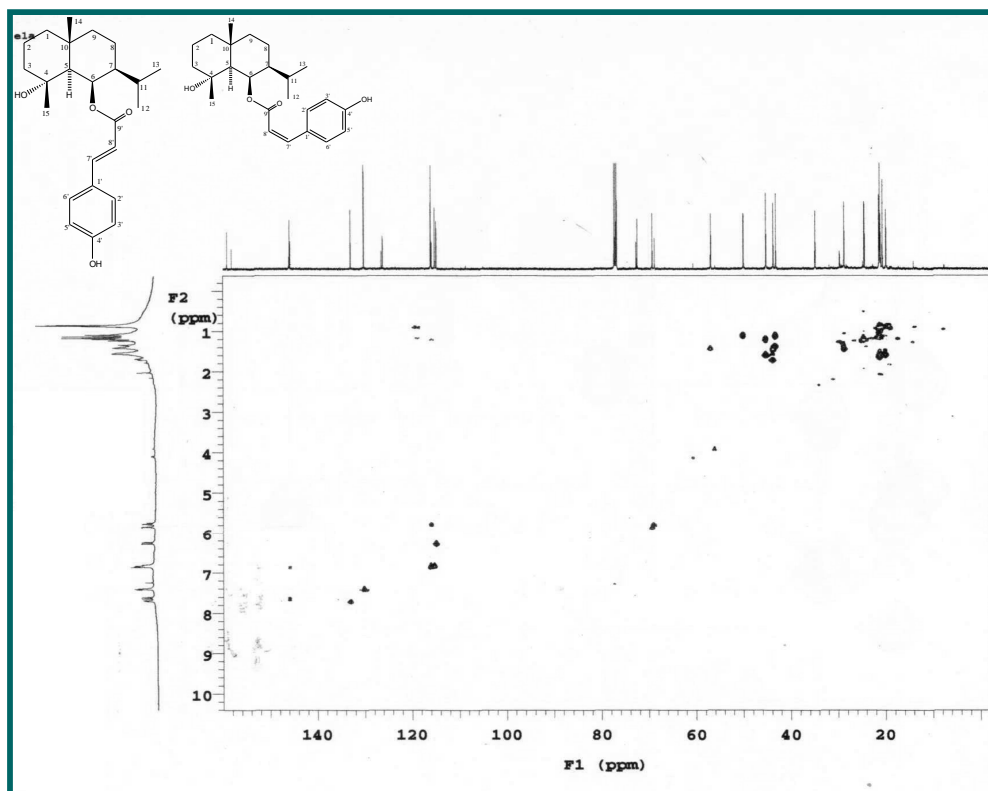


Figura 17- Espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Vm-2.

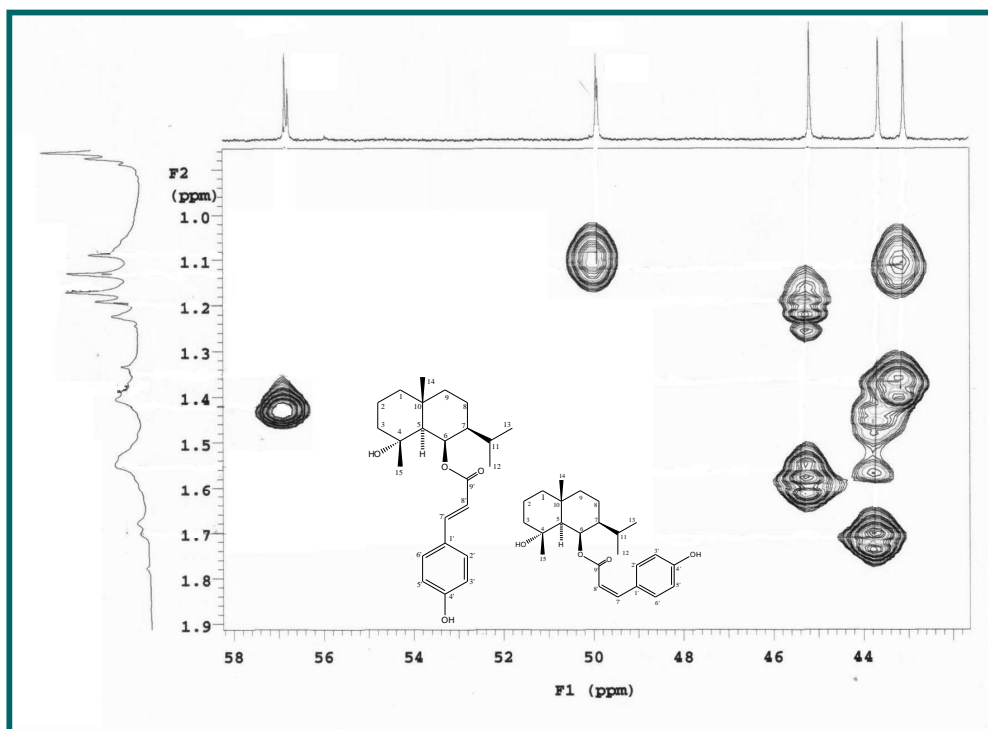


Figura 18- Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Vm-2 na região de (0,0-1,9 ppm) x (58-44 ppm).

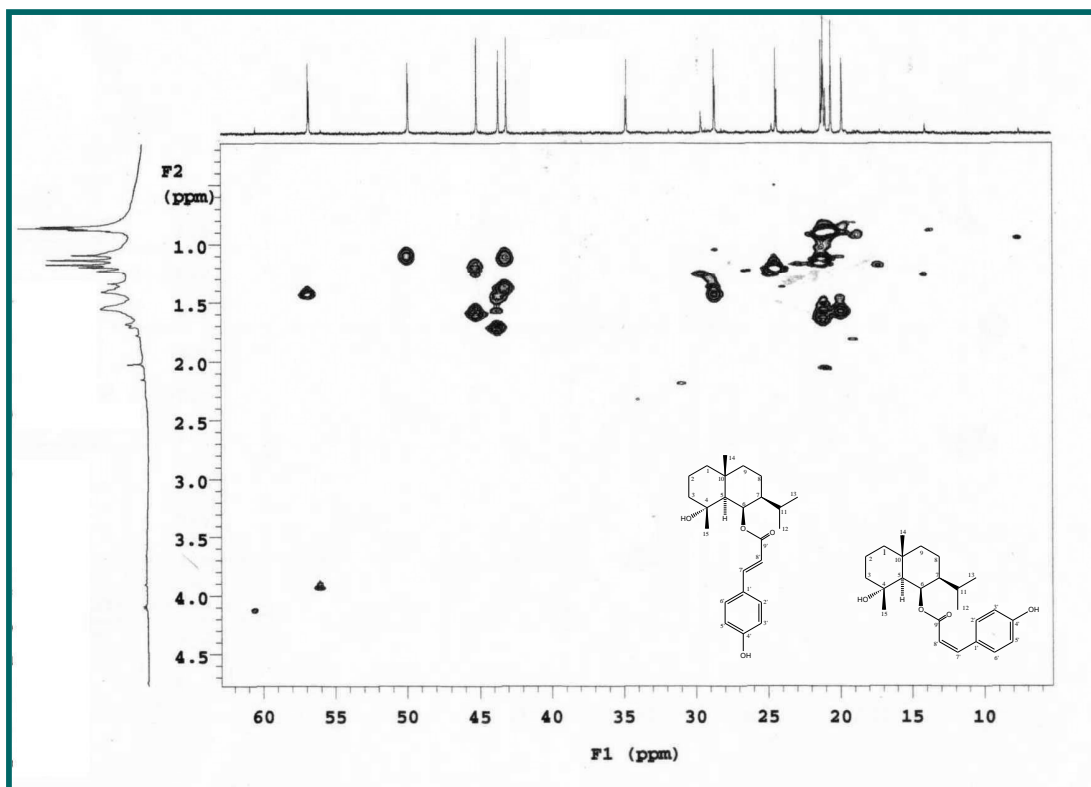


Figura 19- Expansão do espectro de RMN ^1H x ^{13}C HMQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Vm-2 na região de (0,0 – 4,5 ppm) x (65 - 5 ppm).

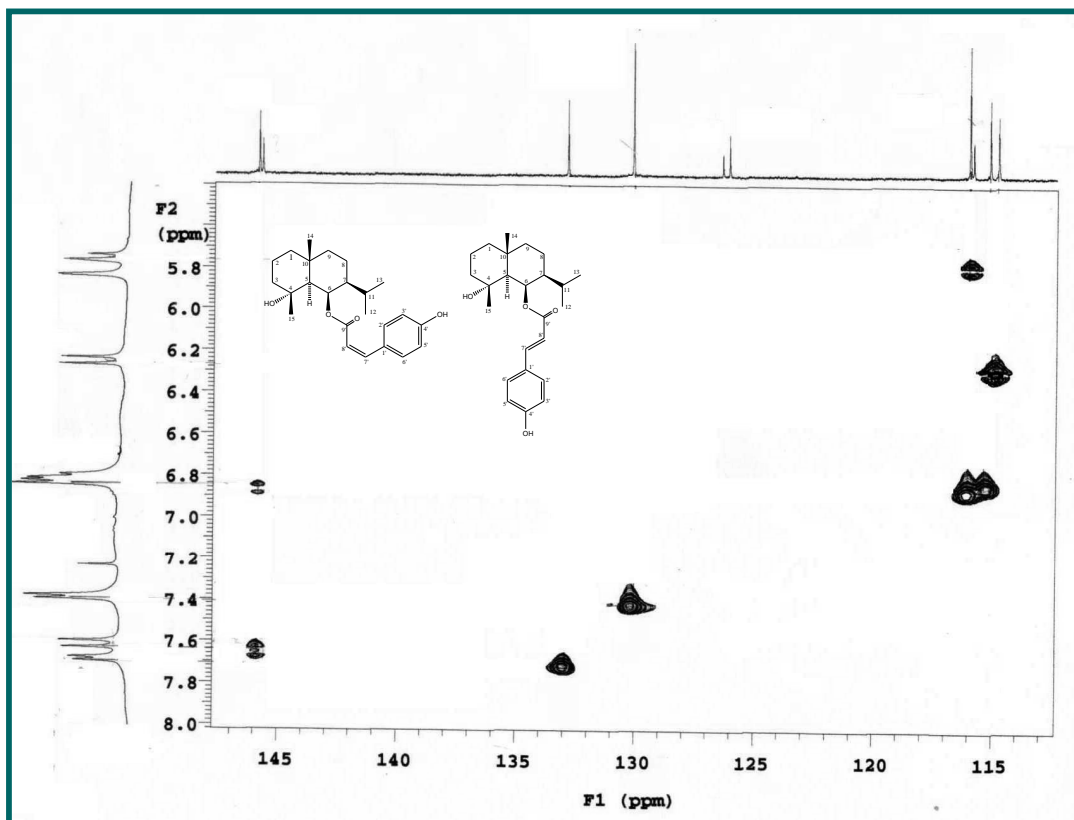


Figura 20- Expansão do espectro de RMN ^1H x ^{13}C HMQC (500 MHz, CDCl_3) de Vm-2 na região de (5,0 – 8,0 ppm) x (110 – 145 ppm).

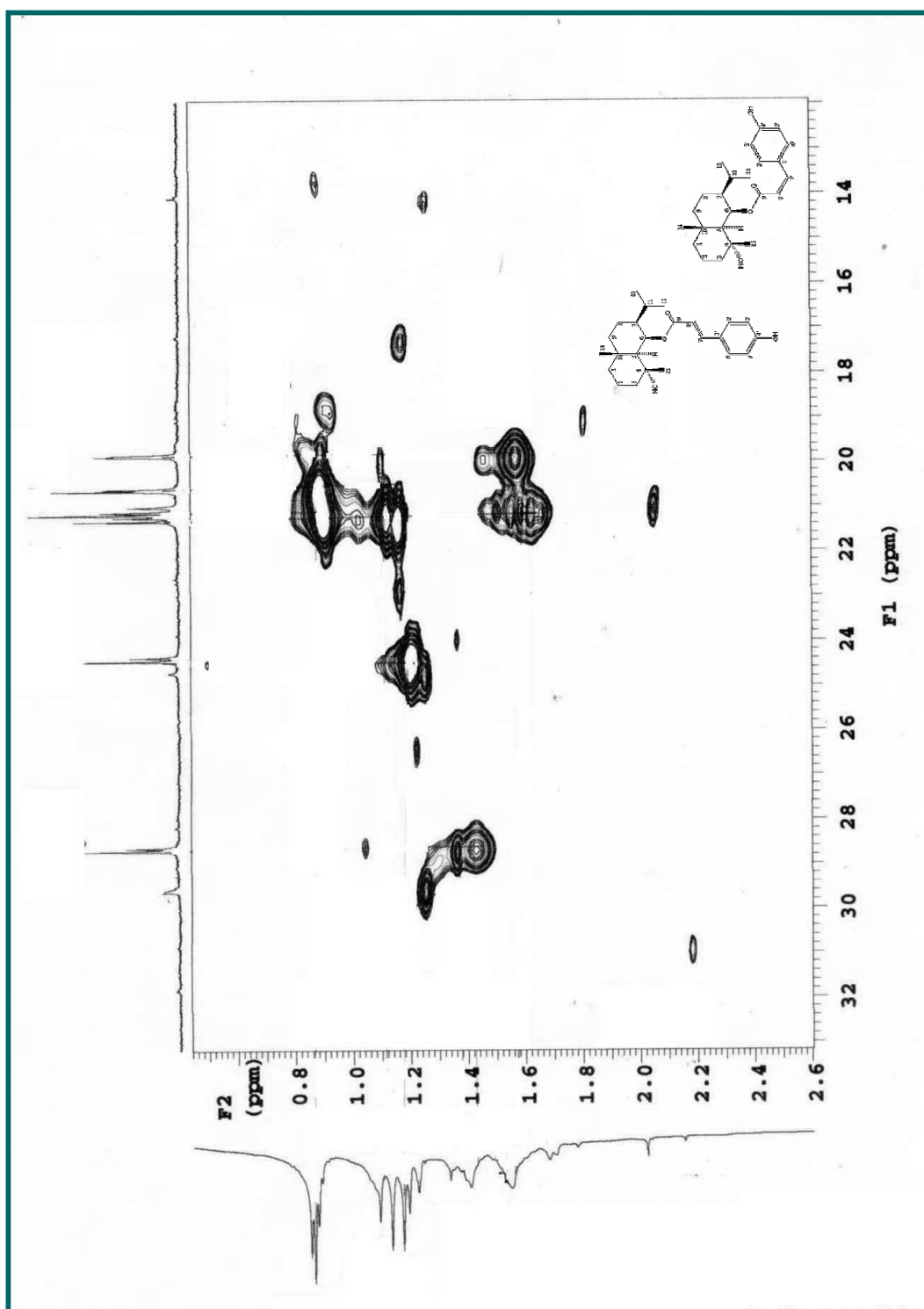


Figura 21- Expansão do espectro de RMN ^1H x ^{13}C HMQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Vm-2 na região de (0,6 - 2,8 ppm) x (12-32 ppm).

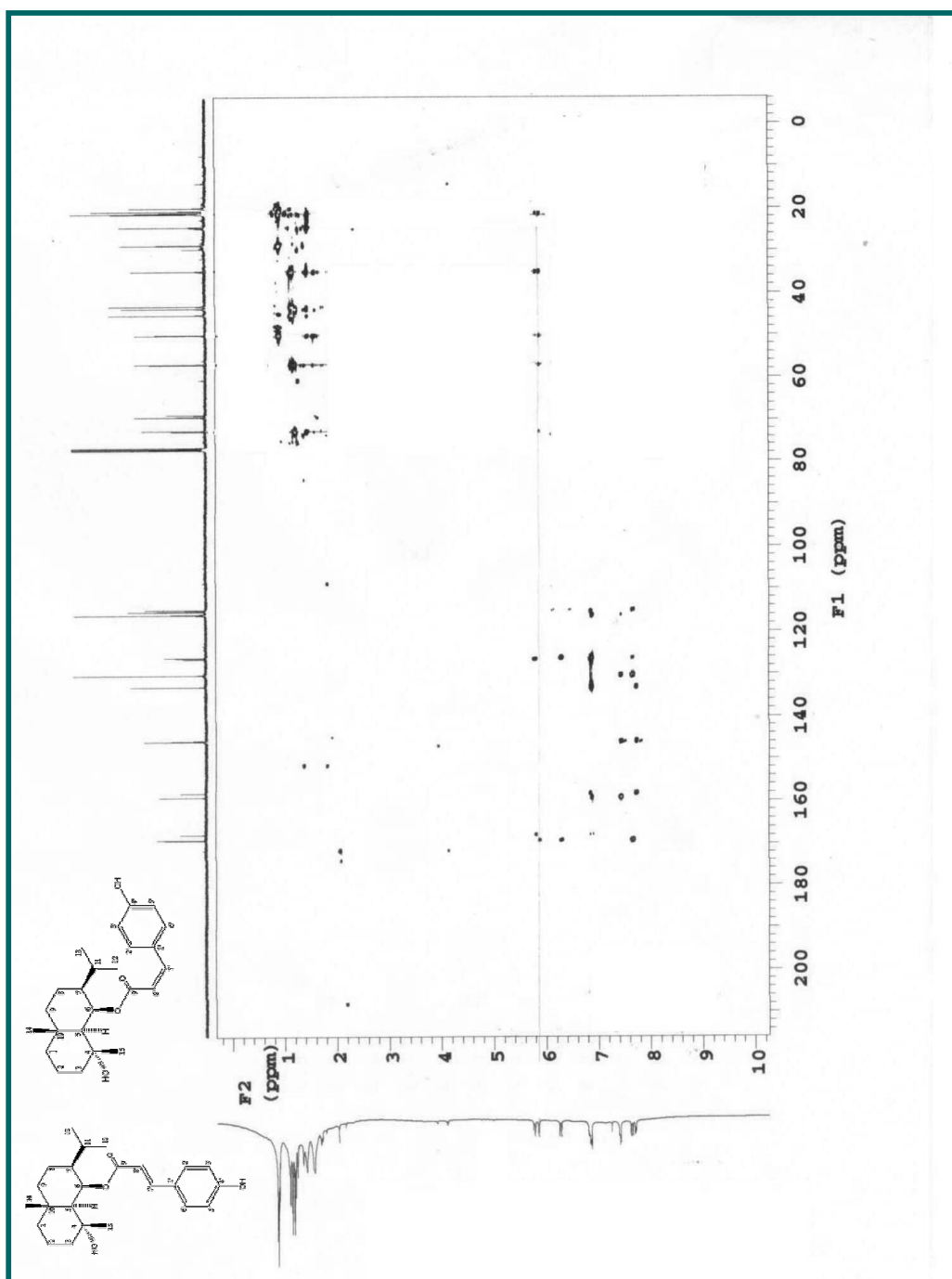


Figura 22- Espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Vm-2

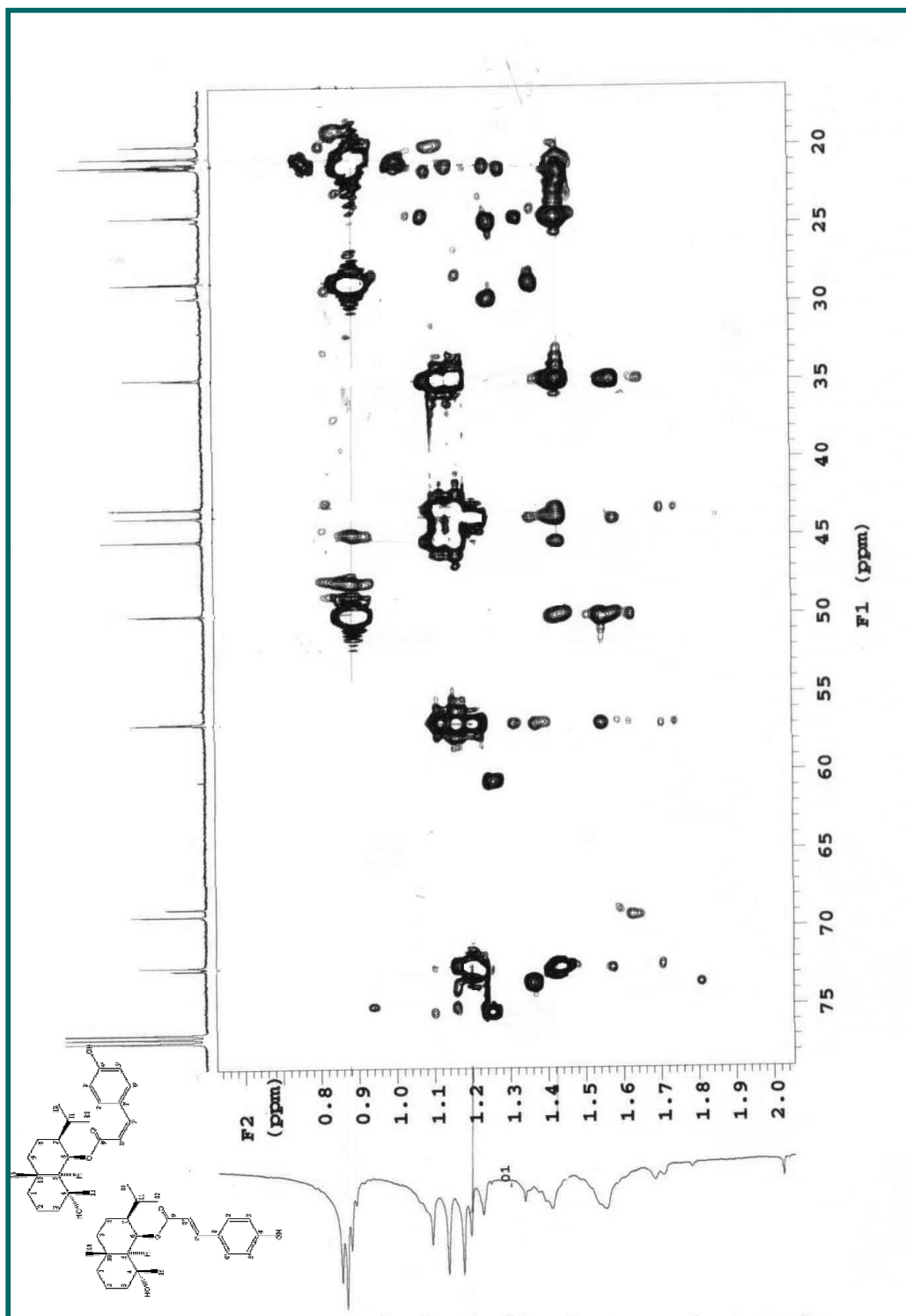


Figura 23- Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBN (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Vm-2 na região de (0,6 - 2,0 ppm) x (15-70 ppm).

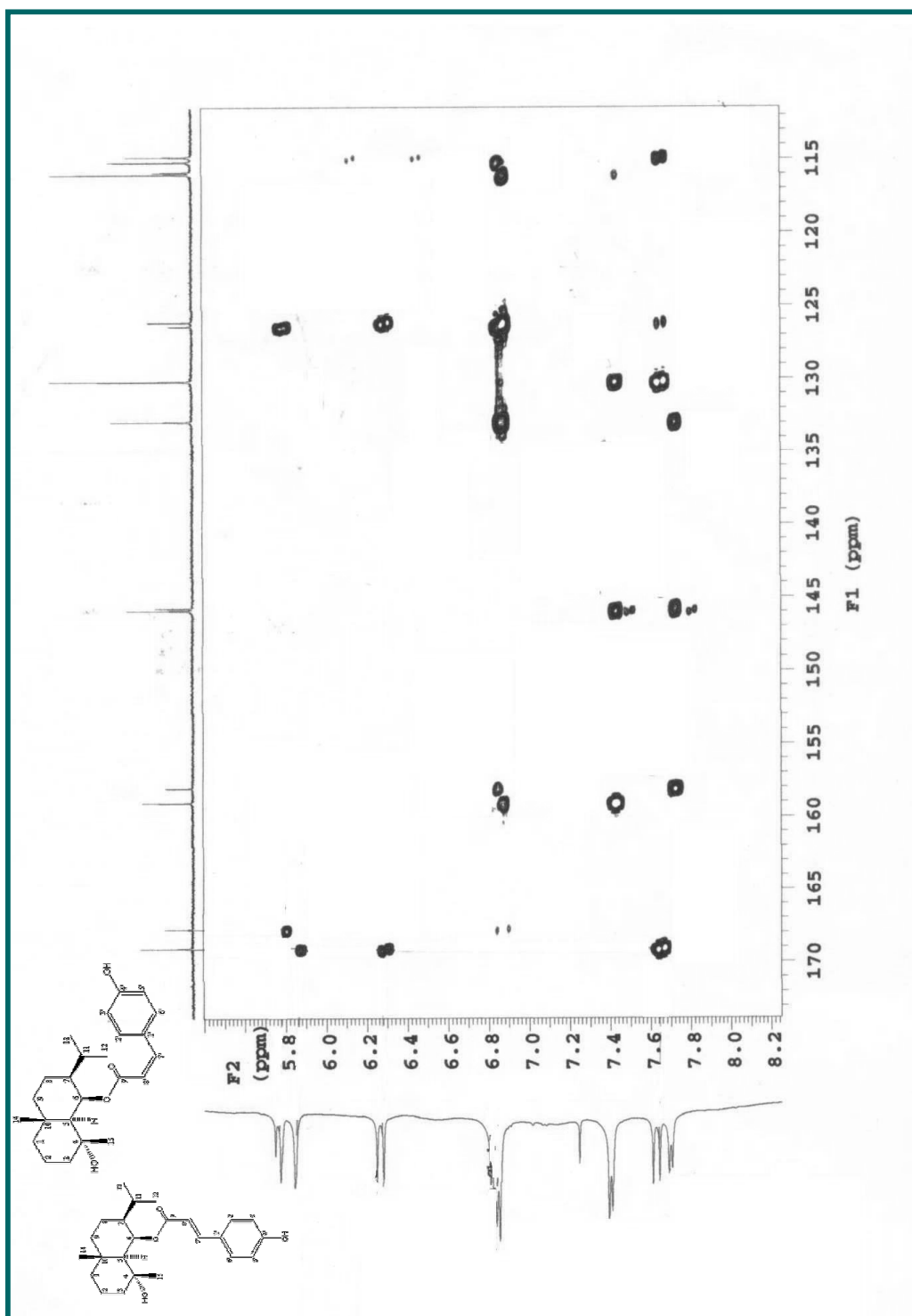


Figura 24- Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Vm-2 na região de (5,6 – 8,2 ppm) x (110-175 ppm).

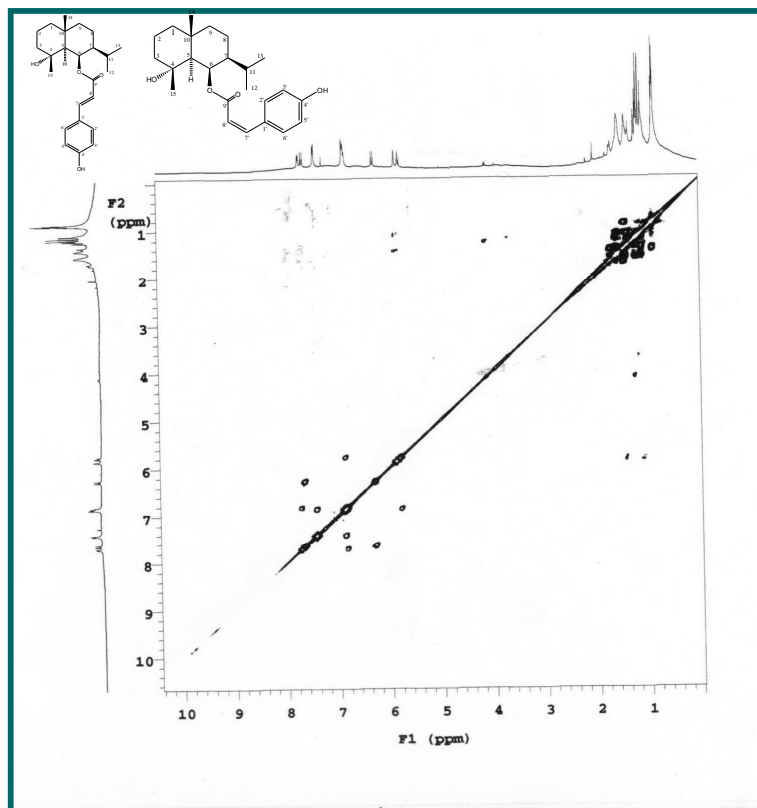


Figura 25 - Espectro de RMN ^1H x ^1H COSY (500 MHz, CDCl_3) de Vm-2.

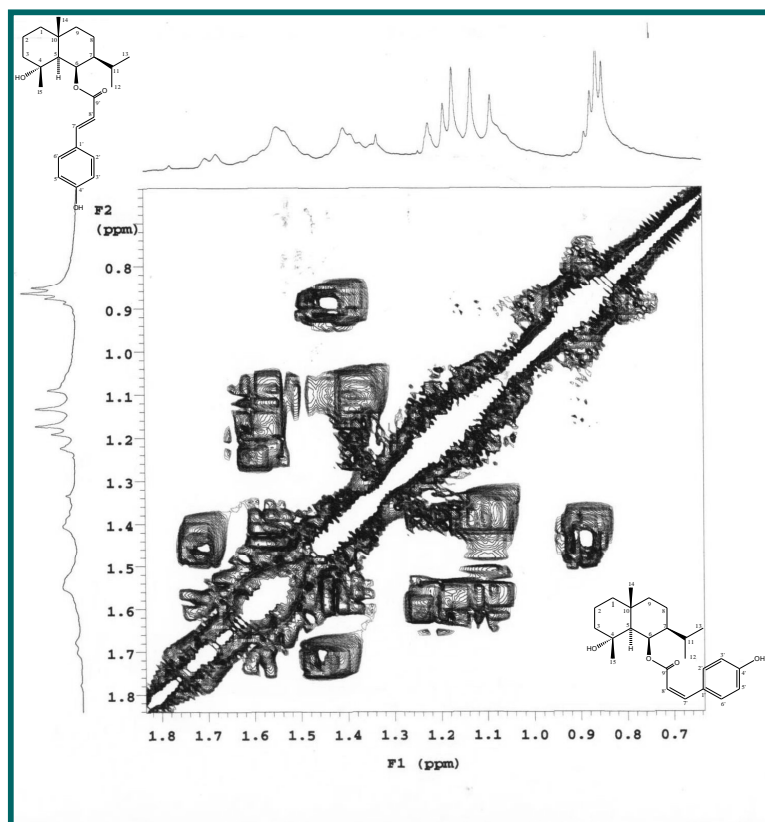


Figura 26- Expansão do espectro de RMN ^1H x ^1H COSY (500 MHz, CDCl_3) de Vm-2

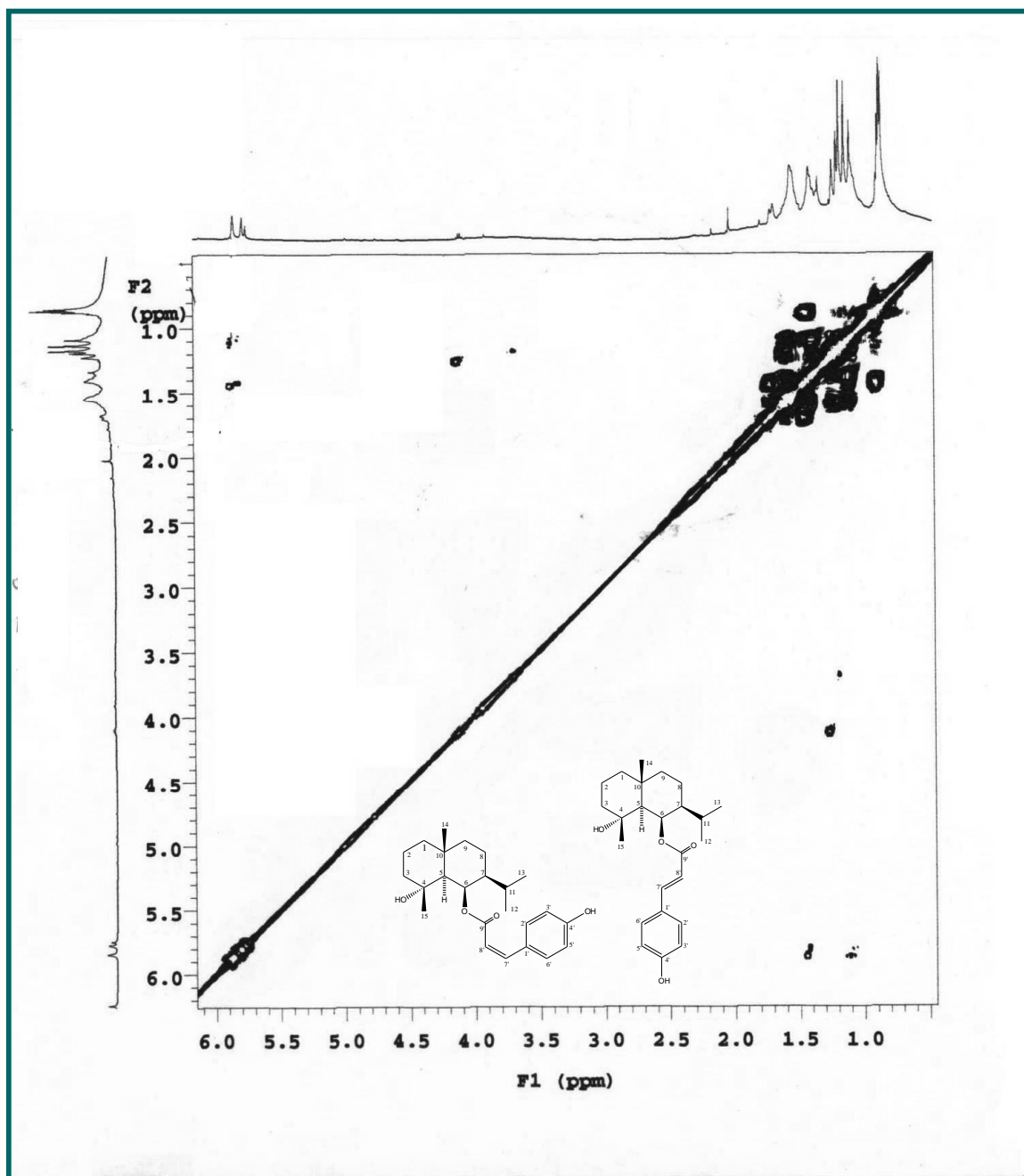


Figura 27- Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY (500 MHz, CDCl_3) de Vm-2 na região de (0,0 – 6,0 ppm).

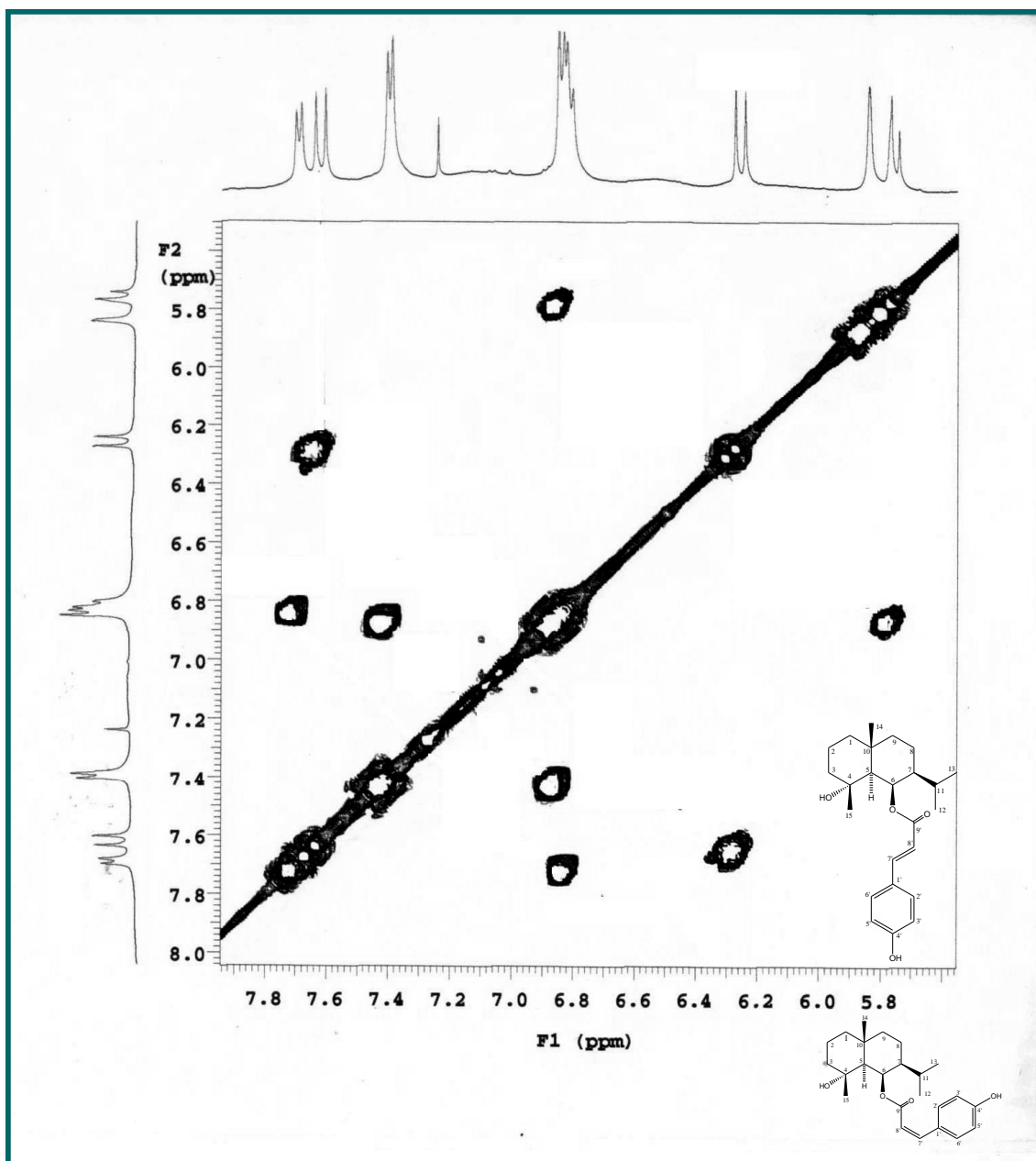


Figura 28 - Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY (500 MHz, CDCl_3) de Vm-2 na região de (5,5- 7,9 ppm).

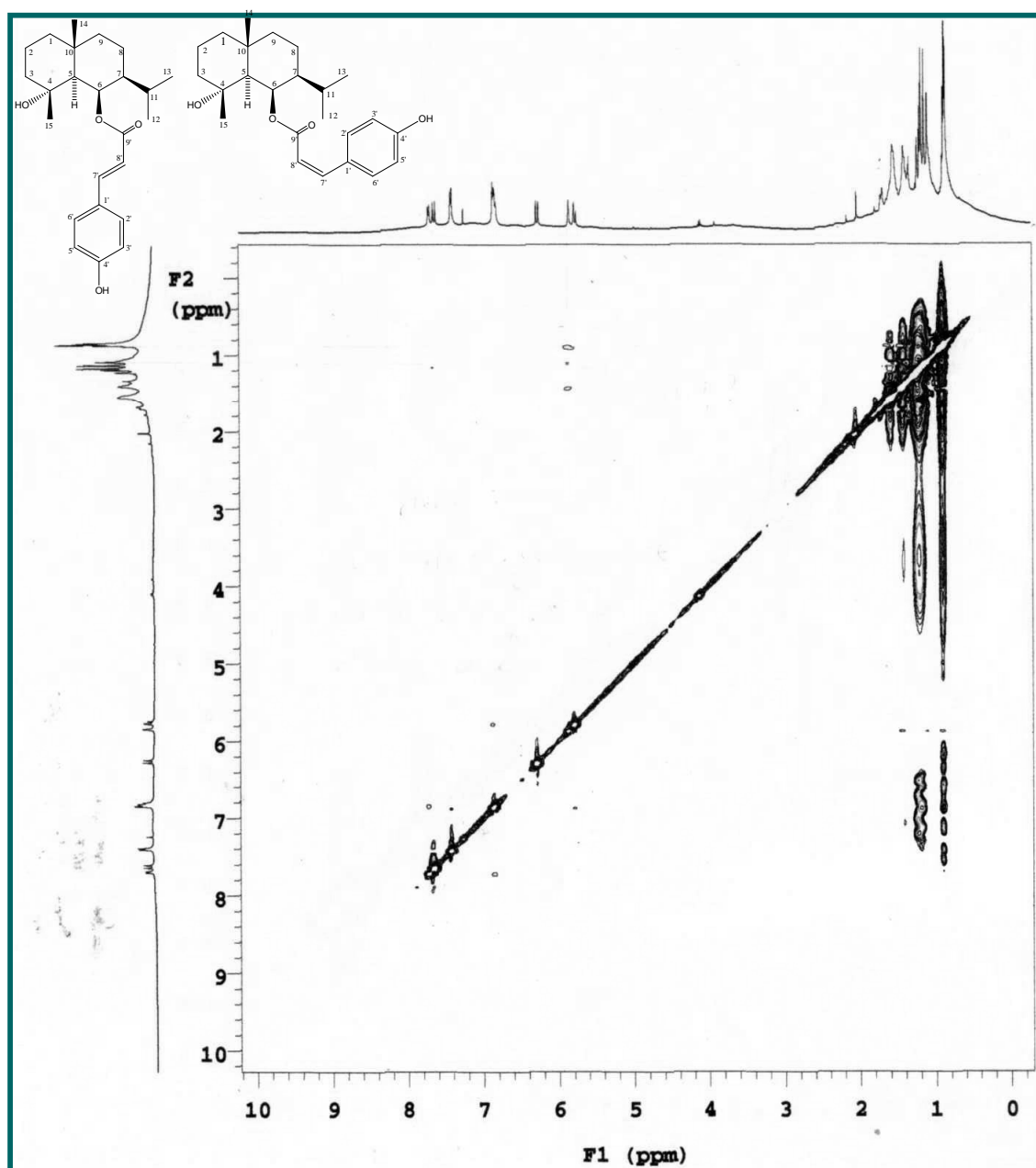


Figura 29- Espectro de RMN $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ NOESY (500 MHz, CDCl_3) de Vm-2.

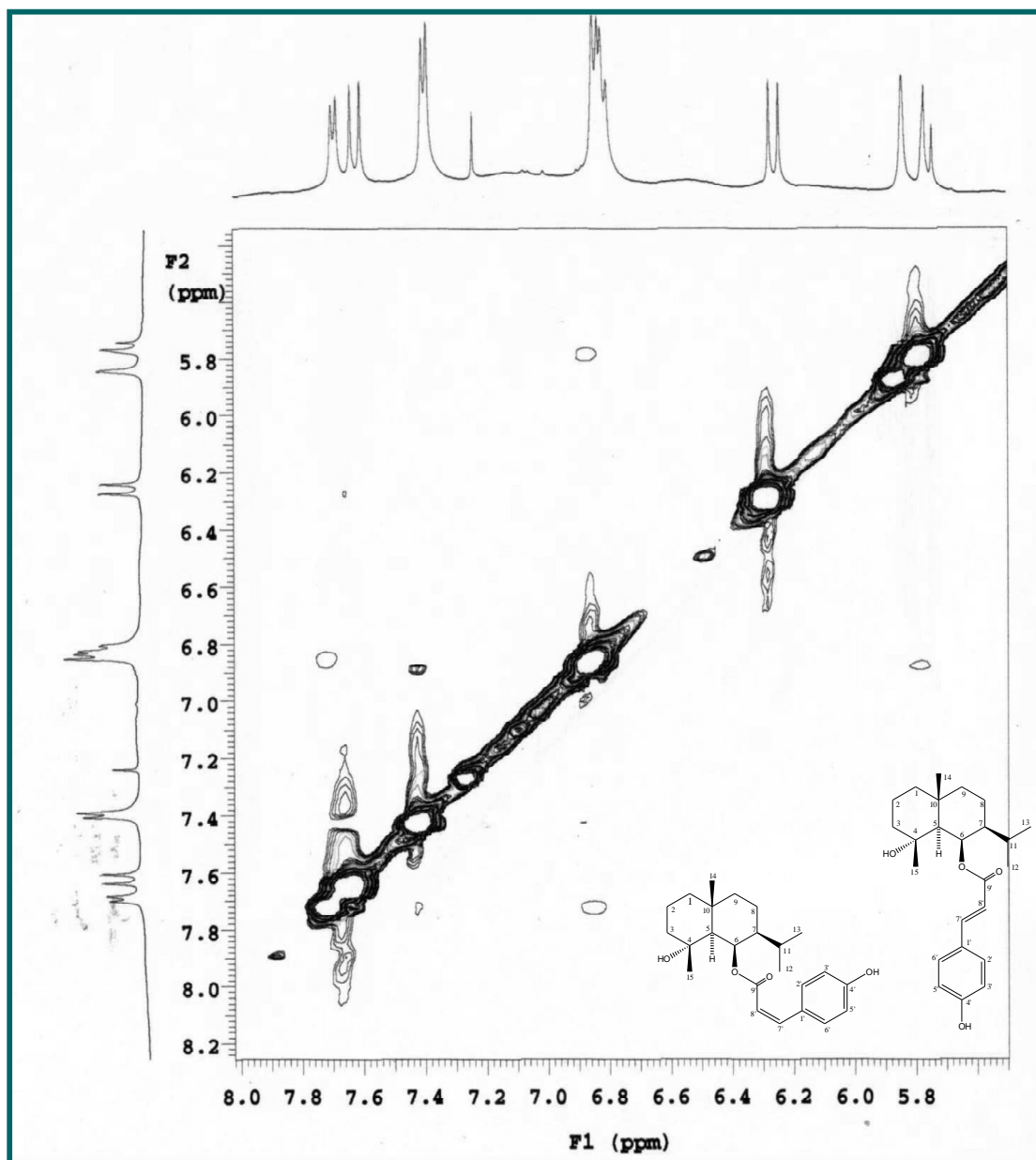
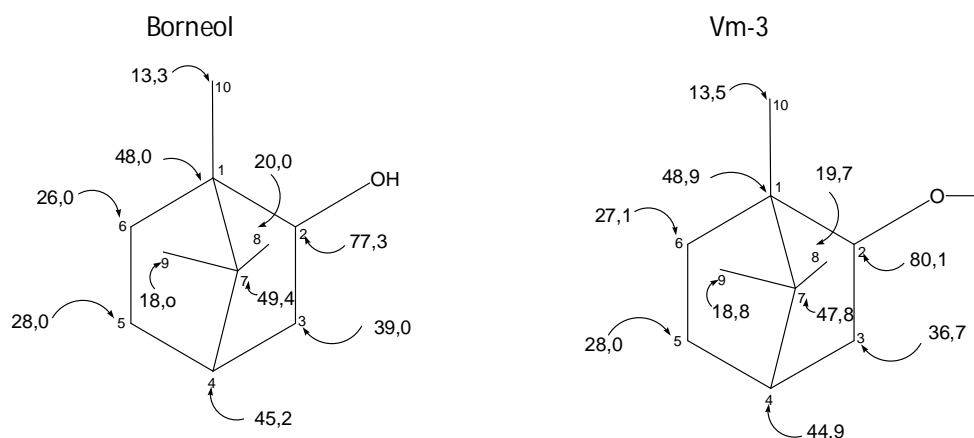


Figura 30 - Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ NOESY (500 MHz, CDCl_3) de Vm-2 na região de (5,6- 8,0 ppm).

5.3 Determinação estrutural de Vm-3.

A substância apresentou-se como um pó branco, pesando 15 mg e com ponto de fusão 154-156°C. Na análise polarimétrica apresentou rotação específica de $[\alpha]_D$: - 20 (c 0,01, CHCl_3).

O espectro RMN ^{13}C -APT (125 MHz) de Vm-3 em CDCl_3 (Figura 31, p. 90) apresentou 17 sinais para 19 carbonos. Neste espectro foram observados 10 sinais para carbonos sp^3 que sugere a presença de esqueleto monoterpênico e os deslocamentos químicos em δ_{C} 48,9; 44,9; 47,8 mais os sinais para três metilas em δ_{C} 19,7, 18,8 e 13,5 são característicos dos deslocamentos químicos para monoterpreno bicíclico como o borneol (JOUD, 2005).



Também no espectro de RMN ^{13}C foi possível observar sinais em δ_{C} 168,0; 157,9; 144,1; 130,0; 127,1; 115,8 e 115,9 característicos de unidade *p*-cumárica. Os deslocamentos químicos em δ_{C} 168,0 e 80,1 inferiram que a unidade *p*-cumárica estava esterificando o monoterpreno bicíclico borneol. Os deslocamentos químicos dos demais carbonos estão na tabela 5, p. 89.

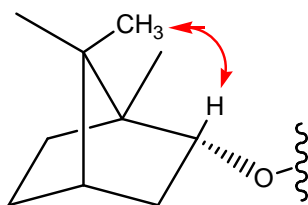
No espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) e em suas expansões (Figura 32-36, p. 91-95) observou-se um envelope de sinais na região de δ_{H} 0,8 a 2,0 característico de terpenóides o que corrobora com o espectro de RMN ^{13}C para a presença de monoterpreno. Observaram-se também sinais na região de hidrogênios aromáticos sendo os deslocamentos químicos em δ_{H} 6,30 (d, J = 16,0 Hz), 6,83 (d, J = 8,5 Hz), 7,41 (d, J = 8,5 Hz) e 7,59 (d, J = 16,0 Hz) atribuídos a unidade *trans-p*-cumárica. Também foi observado um sinal em δ_{H} 4,98 (ddd, J =10, 5,5 e 2,5) e três singletos em δ_{H} 0,86; 0,88; 0,92. Após análises desses dados e por comparação

com a literatura foi possível identificar Vm-3 como sendo o (-)-bornil-*p-trans*-cumarato.

No espectro HMQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) e suas expansões (Figura 37-39, p. 96-97) foi possível observar as correlações diretas do sinal em δ_{C} 36,7 com δ_{H} 1,02 e 2,42 que foi atribuído a H-3''a e H-3''b. Correlação do sinal em δ_{C} 28,0 com δ_{H} 1,28 e 1,80 que foi atribuído a H-5''a e H-5''b. Observou-se uma correlação do sinal em δ_{H} 4,98 com δ_{C} 80,0 (C-2'') corroborando com o deslocamento químico de hidrogênio oximetínico quando o oxigênio sofre uma esterificação. As demais correlações estão compiladas na tabela 5, p. 89

No espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) e nas suas expansões (Figura 40-42, p. 98-100) observou-se uma correlação do sinal em δ_{H} 1,68 (H-4'') com δ_{C} 80,0 (C-2'') e de δ_{H} 0,86 (H-10'') com δ_{C} 80,0 (C-2'') confirmando a esterificação em C-2'' e o assinalamento de C-10''. As demais correlações são mostradas na tabela 5, p. 89.

No espectro de correlação COSY (500 MHz, CDCl_3) e em suas expansões (Figura 43-45, p. 101-102) foi possível observar correlações dos sinais em δ_{H} 4,98 (H-2'') com δ_{H} 1,02 (H-3''a) e deste com 1,68 (H-4''). Para definir a configuração usamos os dados do espectro NOESY (500 MHz, CDCl_3) e suas expansões (Figura 46-49, p. 103-106) que mostrou correlação de δ_{H} 4,98 (H-2'') e com δ_{H} 0,92 (H-8'') confirmando C-2'' como endo.



A análise de todos esses dados mais comparação com a literatura (AKENDENGUÉ et al., 2009) permitiu identificar Vm-3 como (-)-Bornil-*p-trans*-cumarato. Essa substância está sendo descrita pela primeira vez na espécie em estudo.

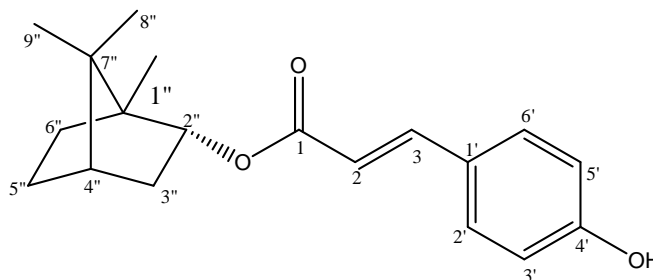
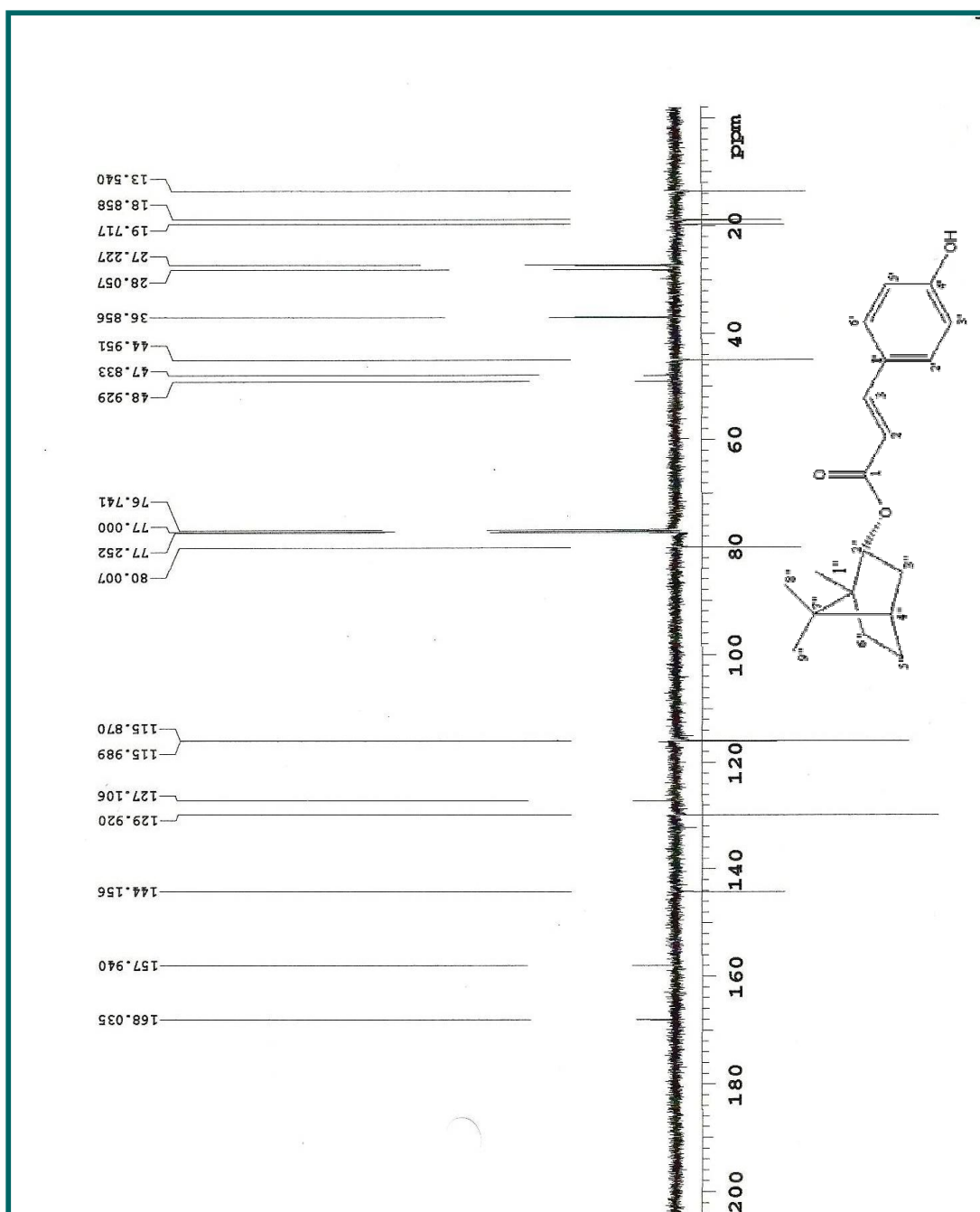


Tabela 5 – Deslocamentos químicos para os núcleos de hidrogênio e carbono treze de Vm-3, verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais (500 e 125 MHz, respectivamente) em CDCl_3 (δ em ppm e J em Hz).

Vm-3		HMBC			COSY	NOESY
C	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$		
1	168,0	-				
2	115,9	6,30 (d, $J=16$)	C-1	C-1'	H-3	H-3, H-2'/6'
3	144,1	7,59 (d, $J=16$)		C-1, C-2'/6'		H-2'/6', H-2
1'	127,1	-				
2'/4'	130,0	7,41 (d, $J=8,5$)		C-4'	H-5'/3'	H-3, H-2
3'/5'	115,8	6,83 (d, $J=8,5$)	C-4'	C-1'	H-2'/6'	H-2'
4'	157,9	-				
1''	48,9	-				
2''	80,1	4,98 (ddd, $J=10, 5,5$ e 2,5)			H-3''b	H-8''
3''a	36,7	1,02 (dd, $J=14,0$ e 3,5)	C-2''	C-5'', C-7''		H-3''b
3''b		2,42 (m)			H-4'', H-2''	H-2'', H-3''a, H-8''
4''	44,9	1,68 (t, $J=5,0$)		C-2''		H-5''a
5''a	28,0	1,28 (m)		C-1''		H-4''
5''b		1,80 (m)	C-4''		H-6a''	
6''a	27,1	1,32 (m)			H-5''b	H-6''b
6''b		2,04 (m)				H-6''a
7''	47,8	-				
8''	18,8	0,92 (s)		C-4''		H-2'', H-3''
9''	19,7	0,88 (s)				
10''	13,5	0,86 (s)		C-2'', C-6''		



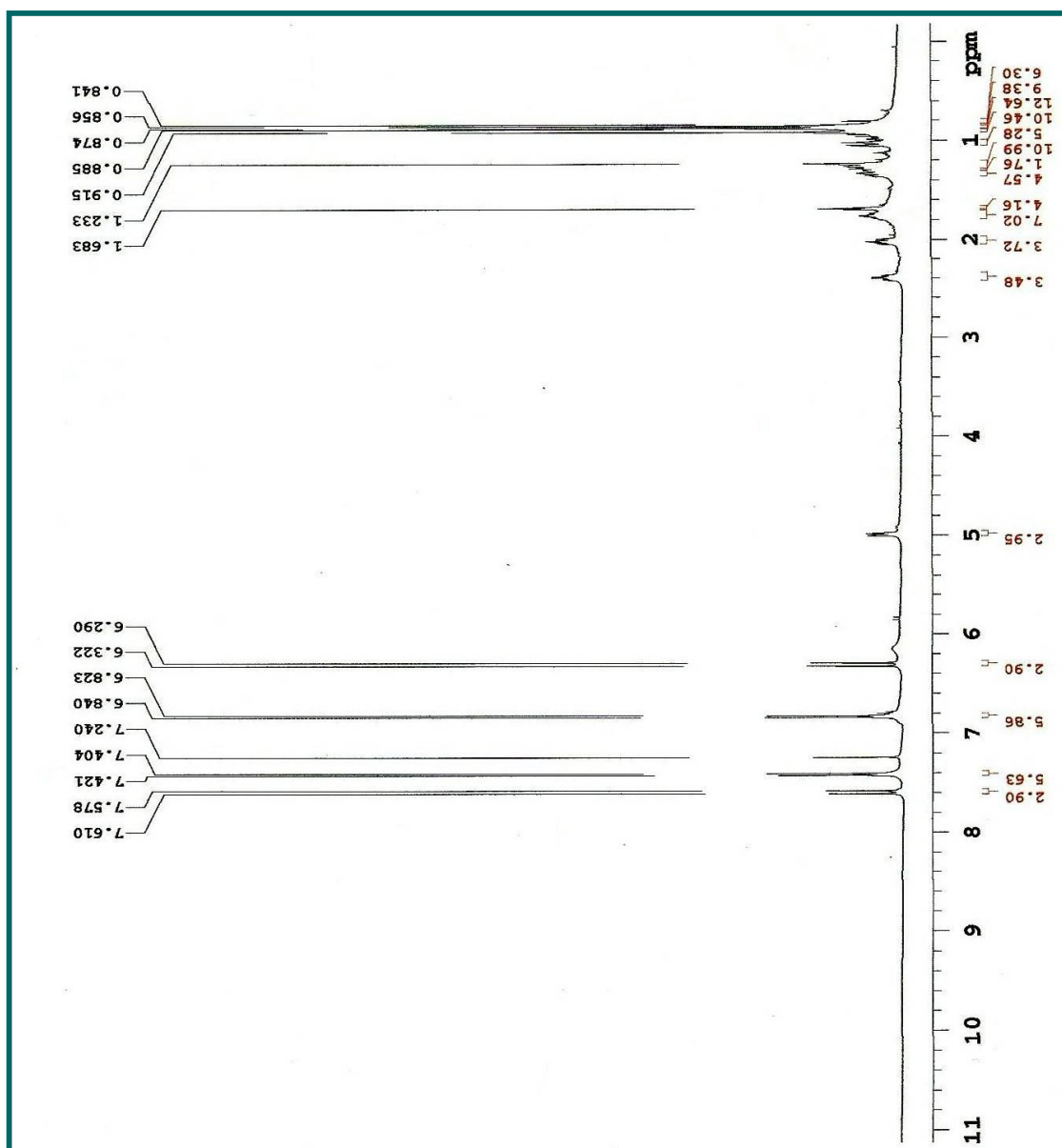


Figura 32- E spectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Vm-3 .

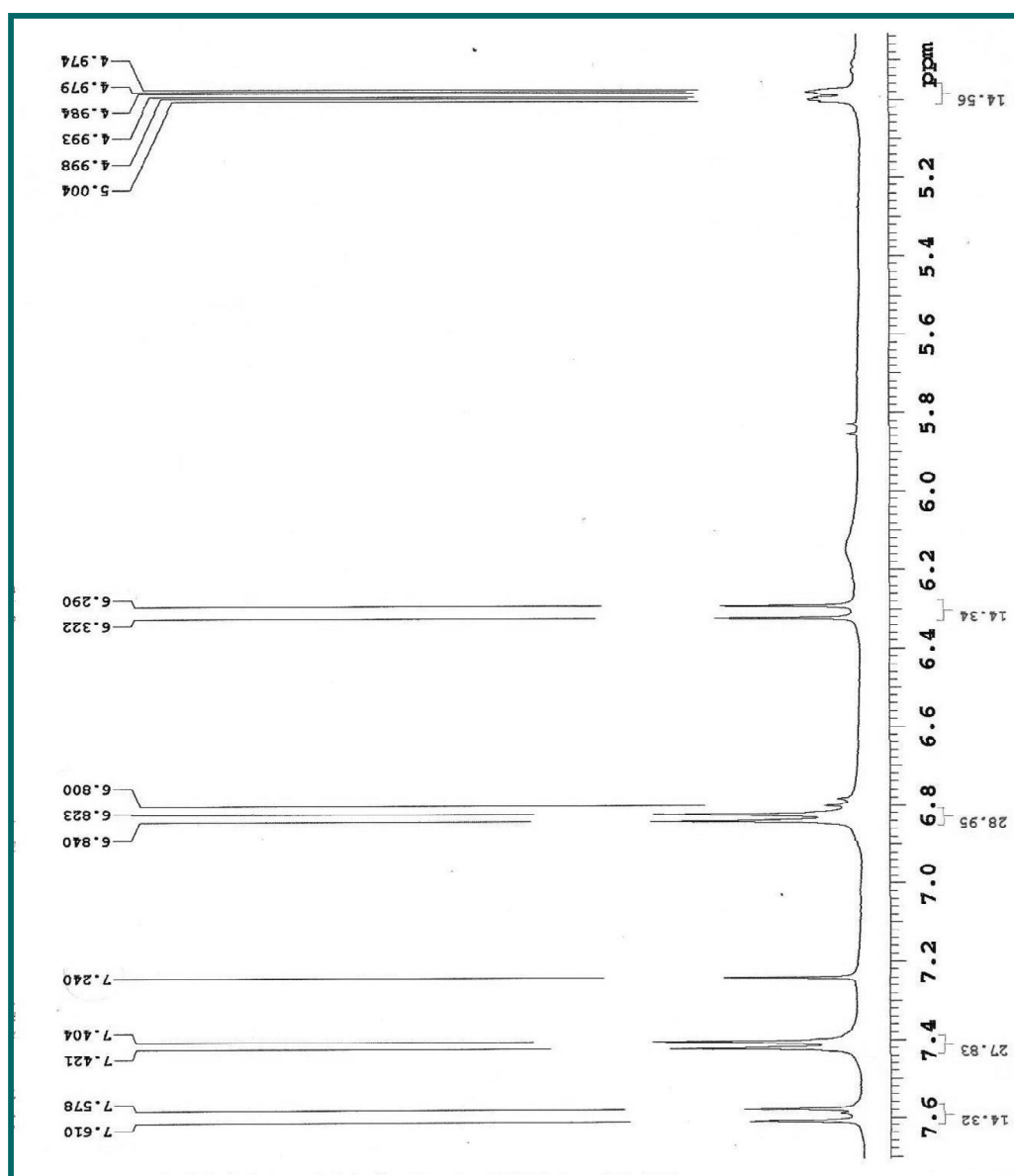


Figura 33- Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Vm-3 na região de 7, a 5,0 ppm. .

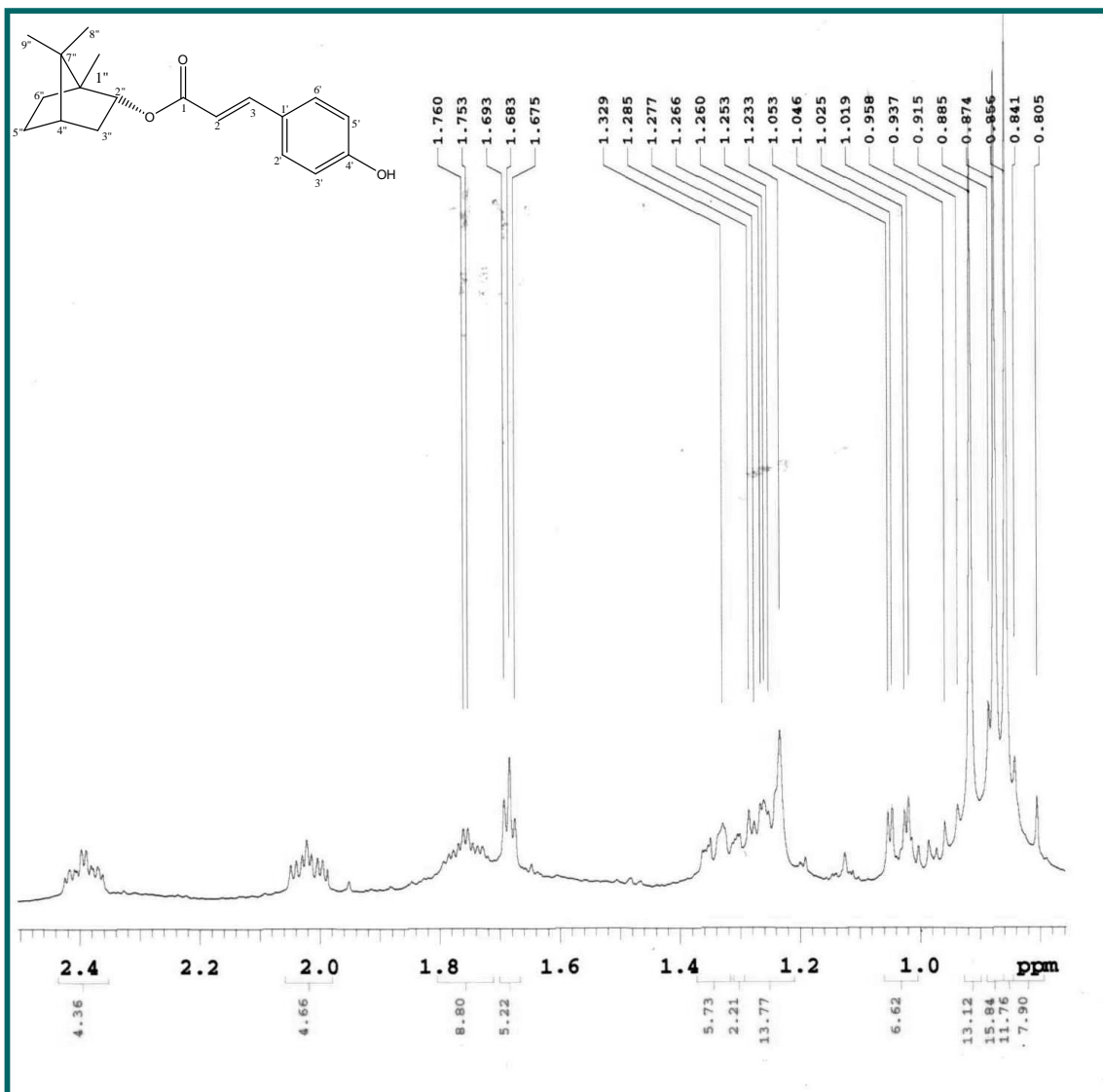


Figura 34- Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Vm-3 na região de 0,0 a 2,4 ppm.

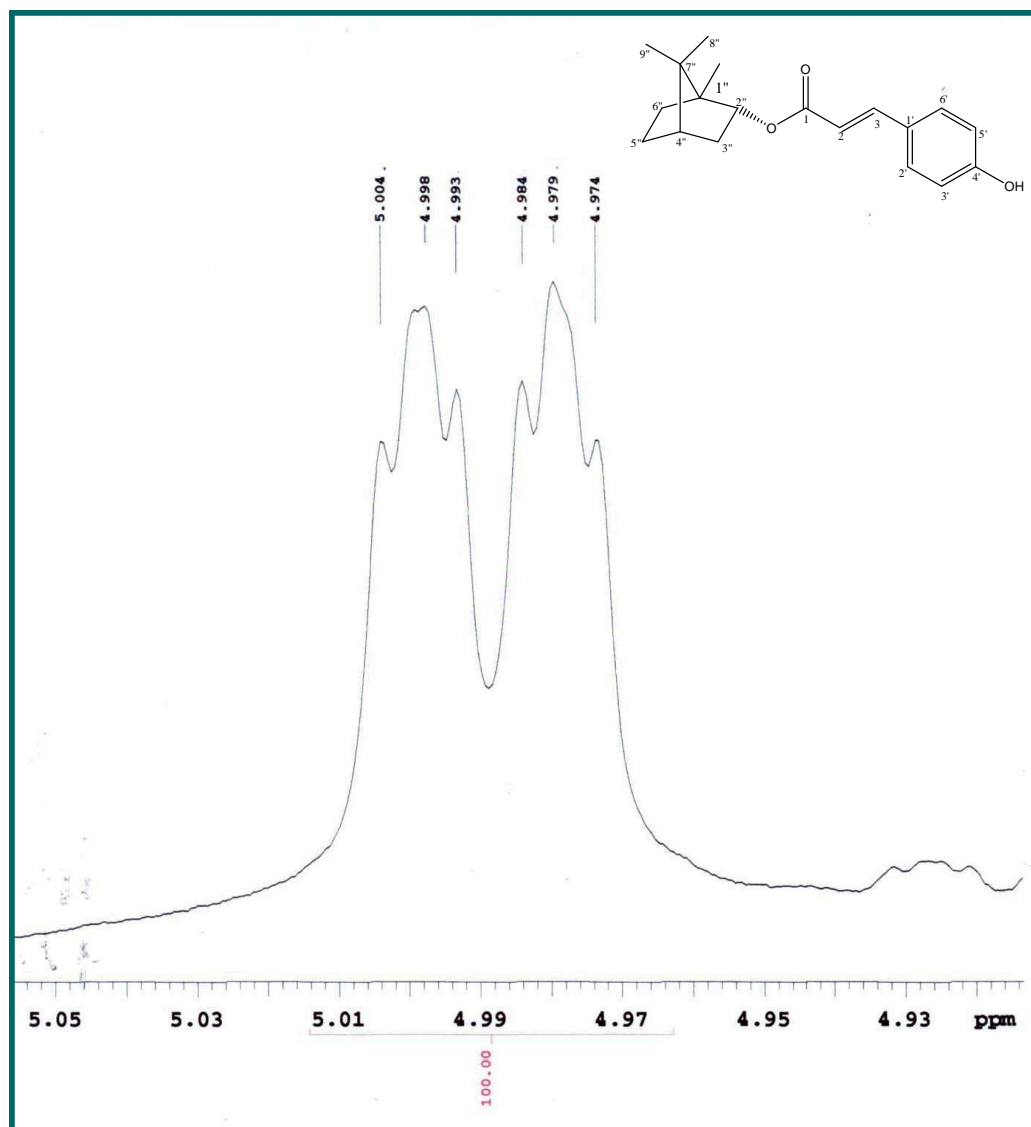


Figura 35- Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Vm-3 na região de 4,93-5,05 ppm.

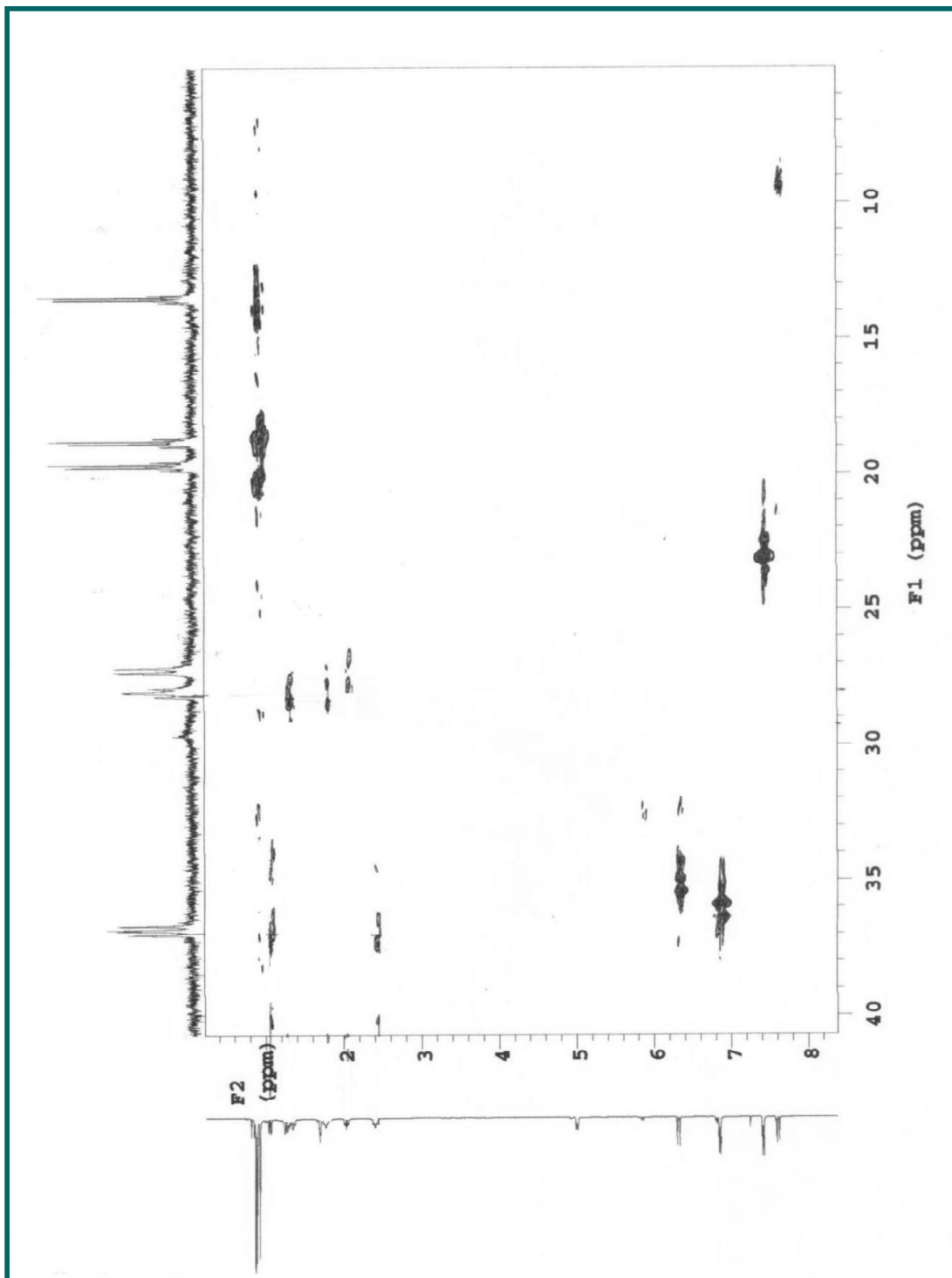


Figura 36- Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Vm-3 na região de (1,0-8,0 ppm) x (5,0-40 ppm).

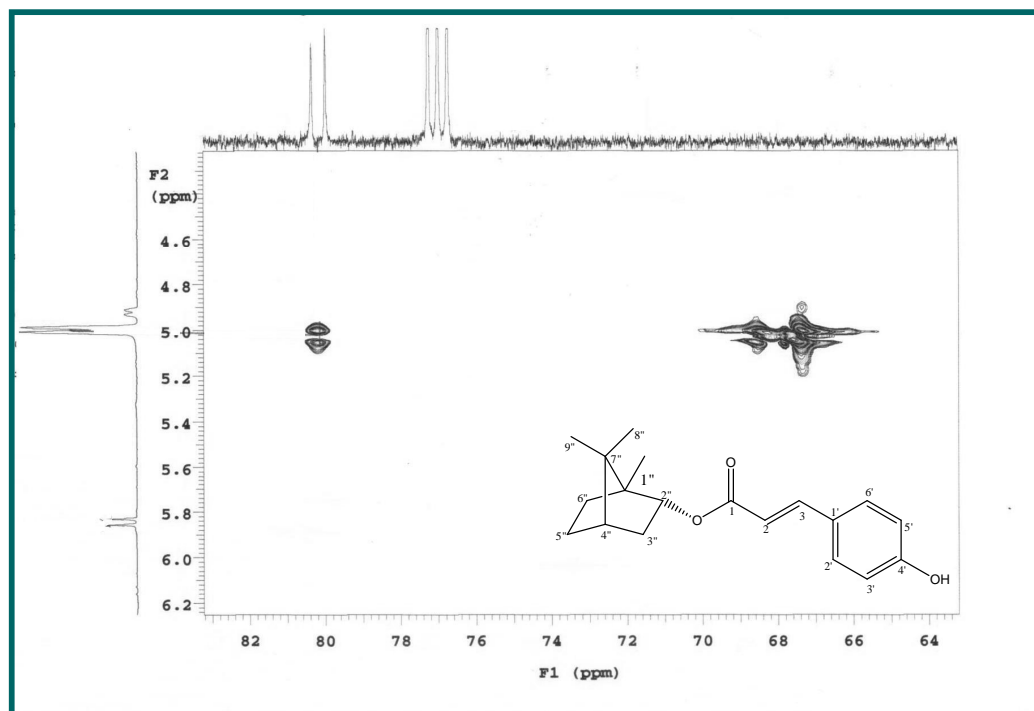


Figura 37- Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Vm-3 na região de 4,5- 6,2 ppm) x (64-82 ppm).

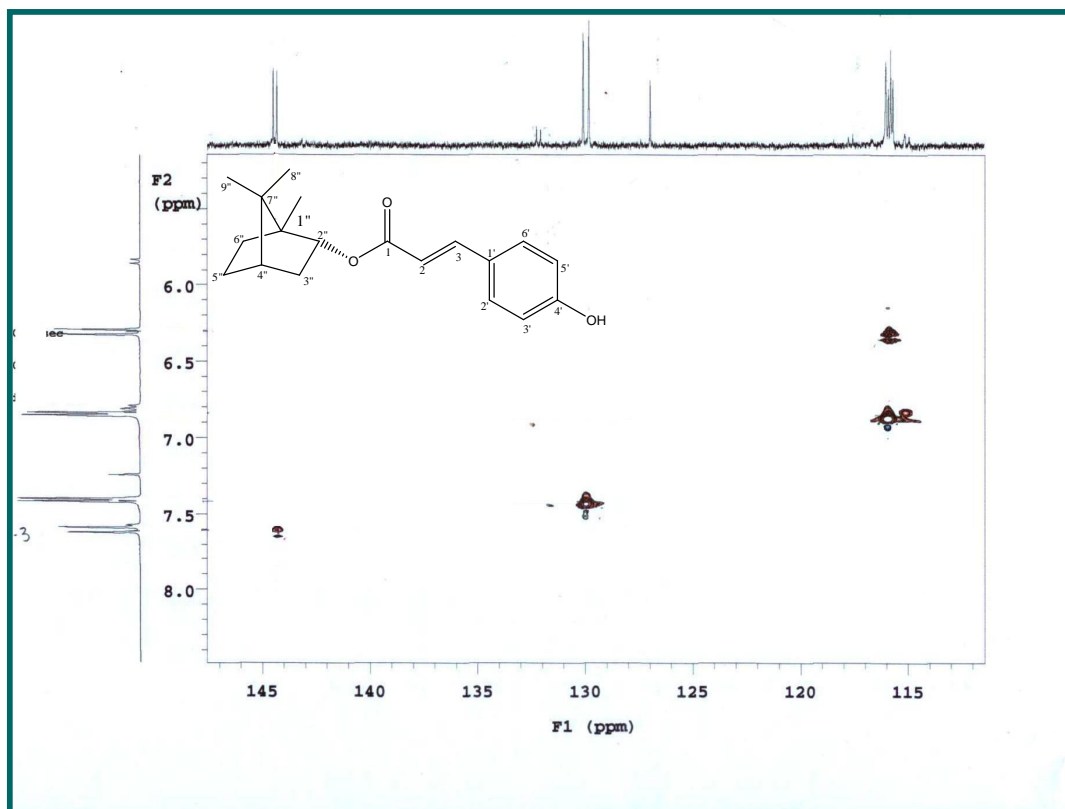


Figura 38- Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Vm-3 na região de (5,0-8,0 ppm) x (110-145 ppm).

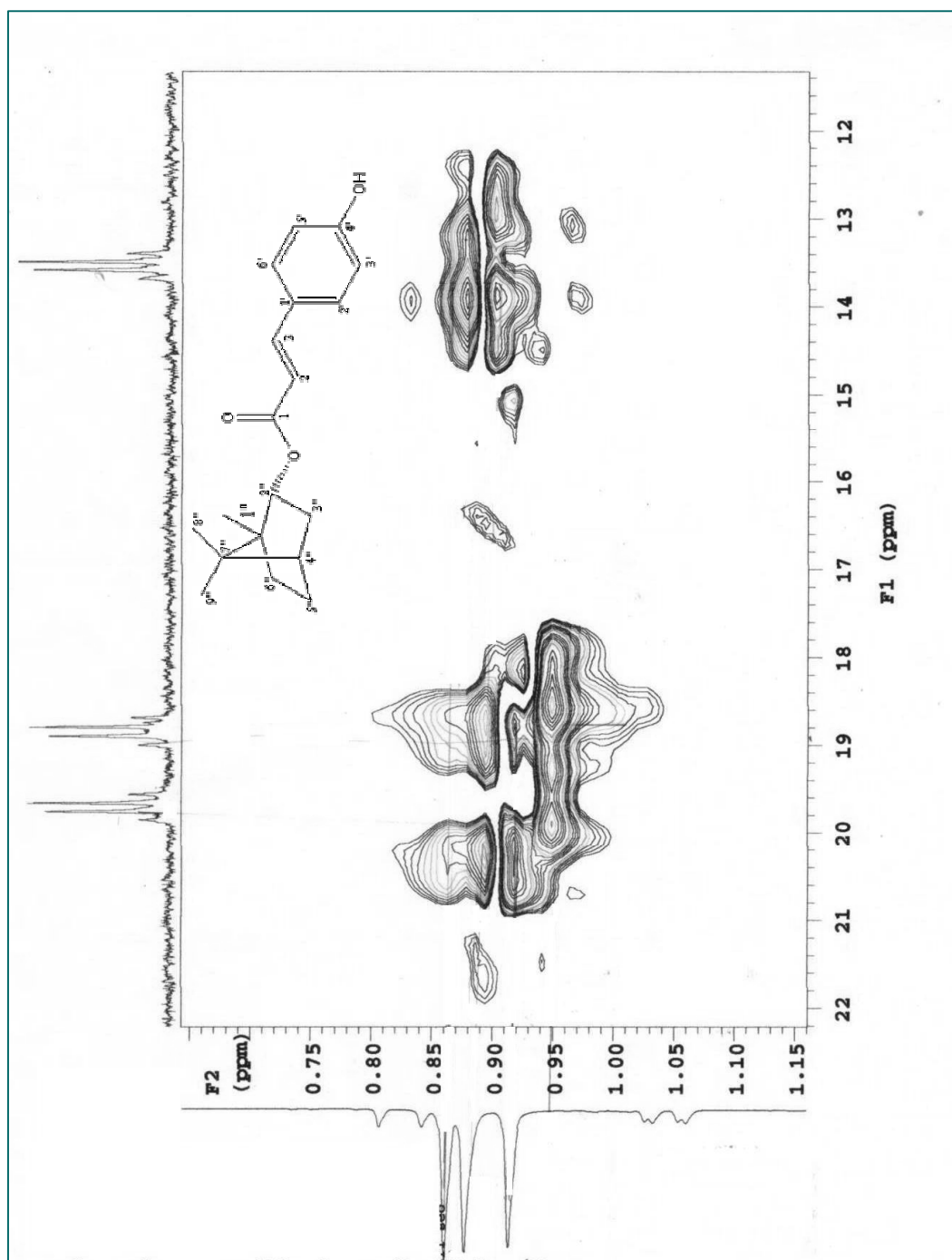
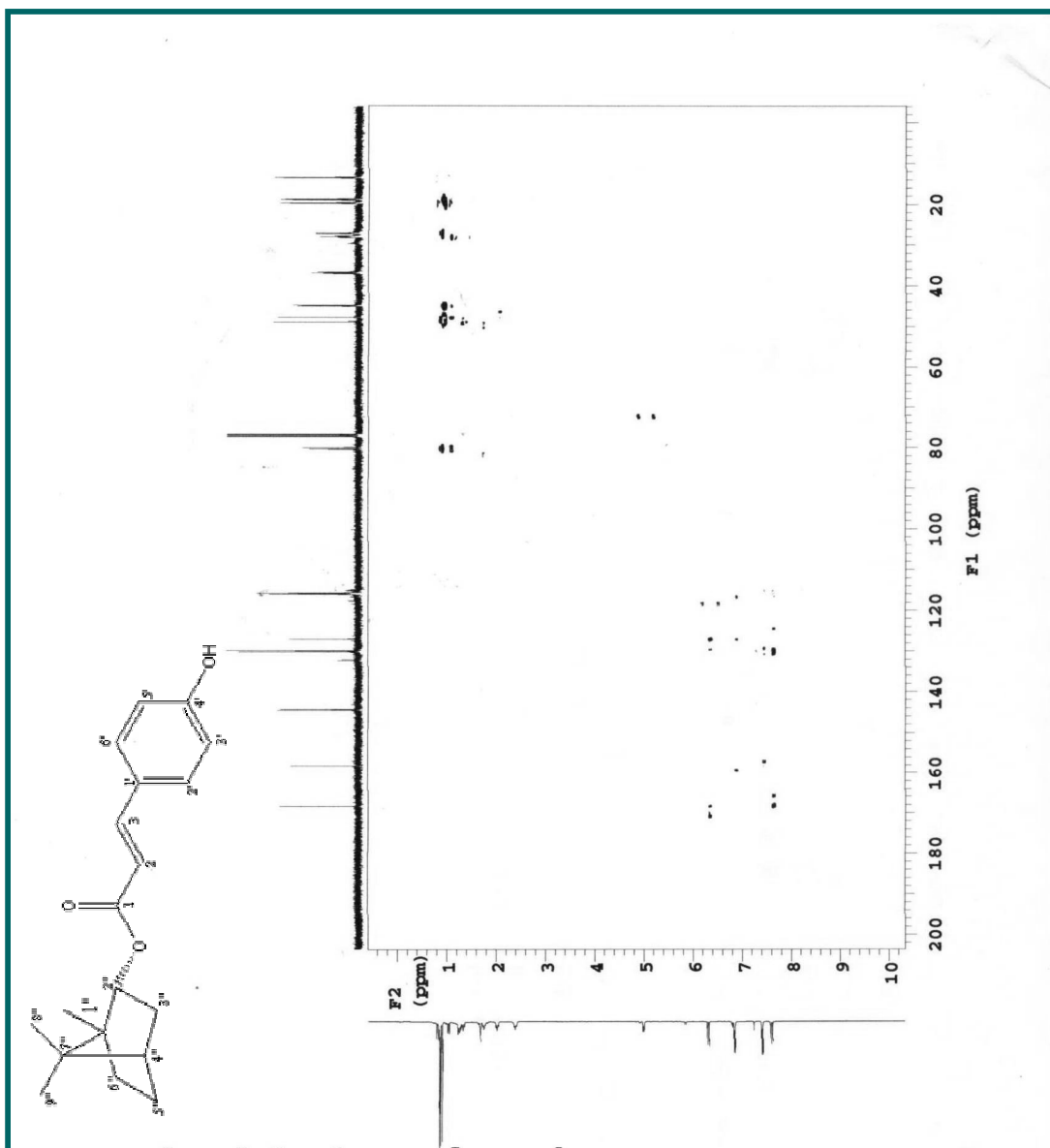


Figura 39- Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Vm-3 na região de (0,6- 1,15 ppm) x (12-22 ppm).

**Figura 40-** Espectro de RMN ^1H x ^{13}C HMQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Vm-3

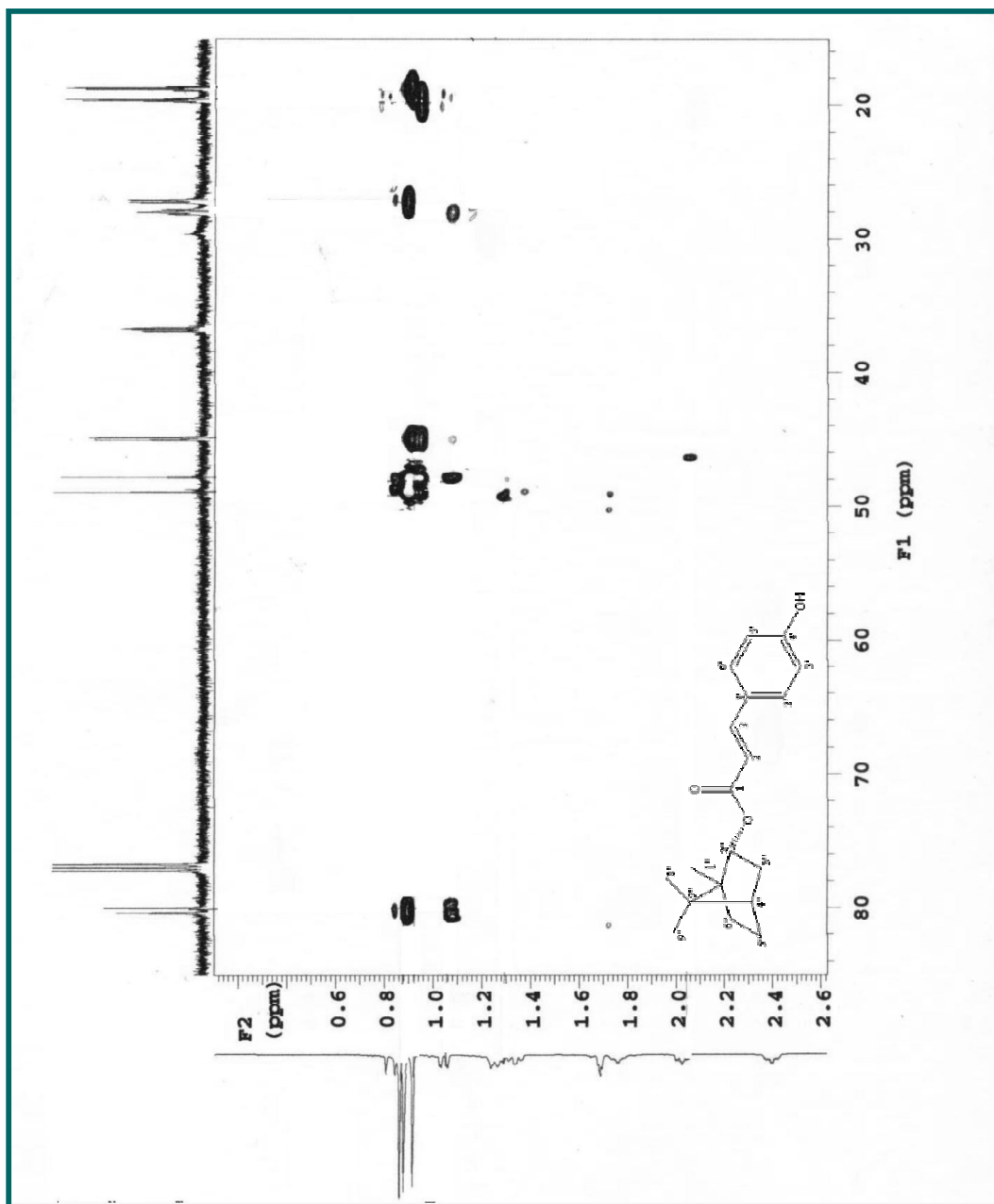


Figura 41- Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Vm-3 na região de (0,5- 2,6 ppm) x (20-80ppm).

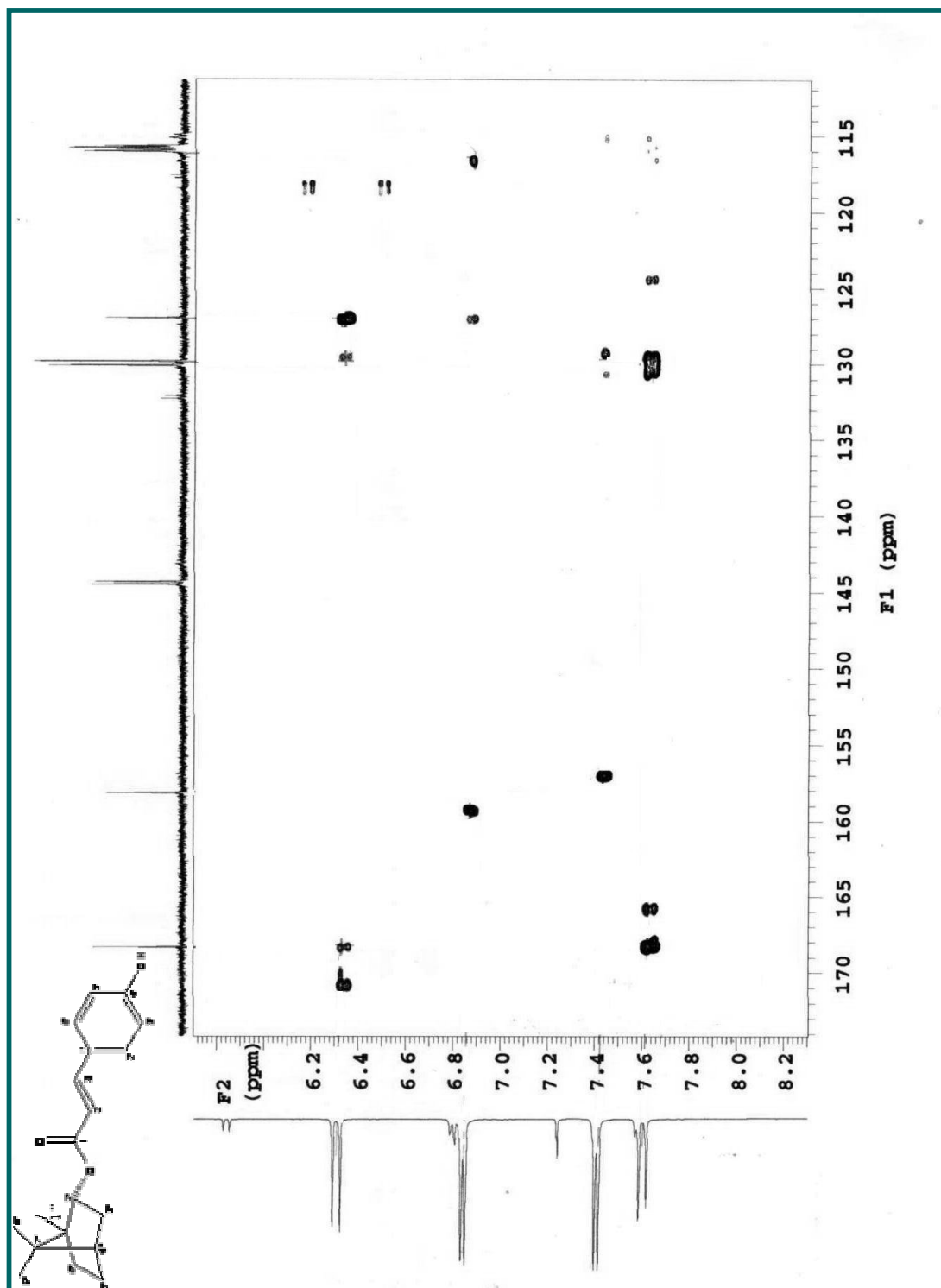


Figura 42- Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBN (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Vm-3 na região de (6,0- 8,2 ppm) x (170-115 ppm).

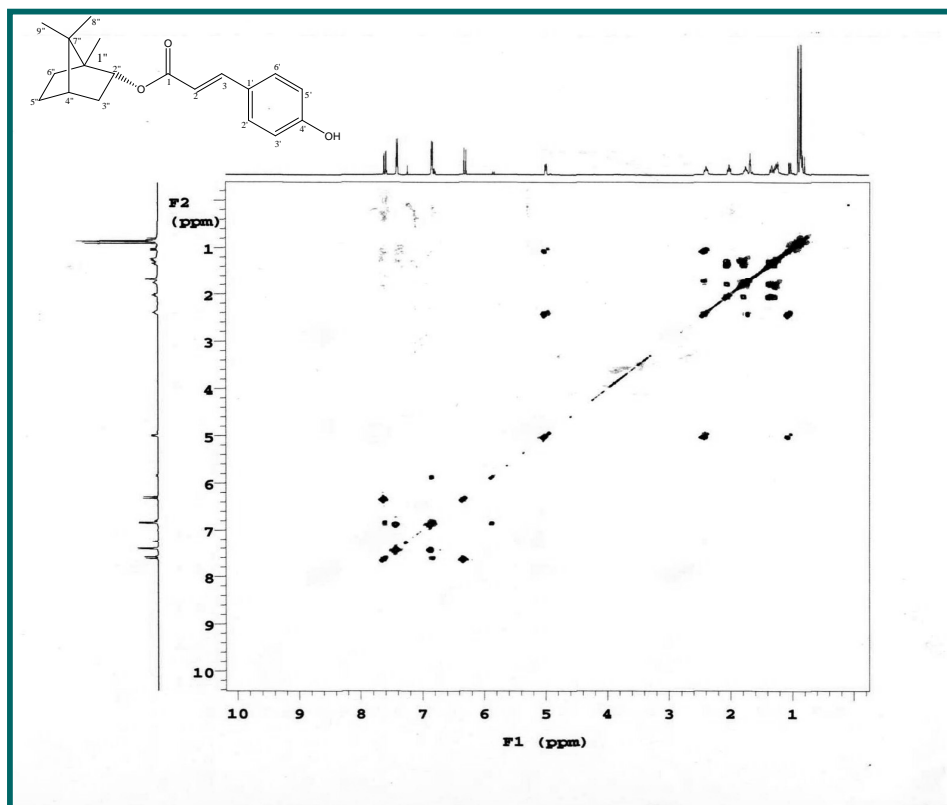


Figura 43- Espectro de RMN $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY (500 MHz, CDCl_3) de Vm-3.

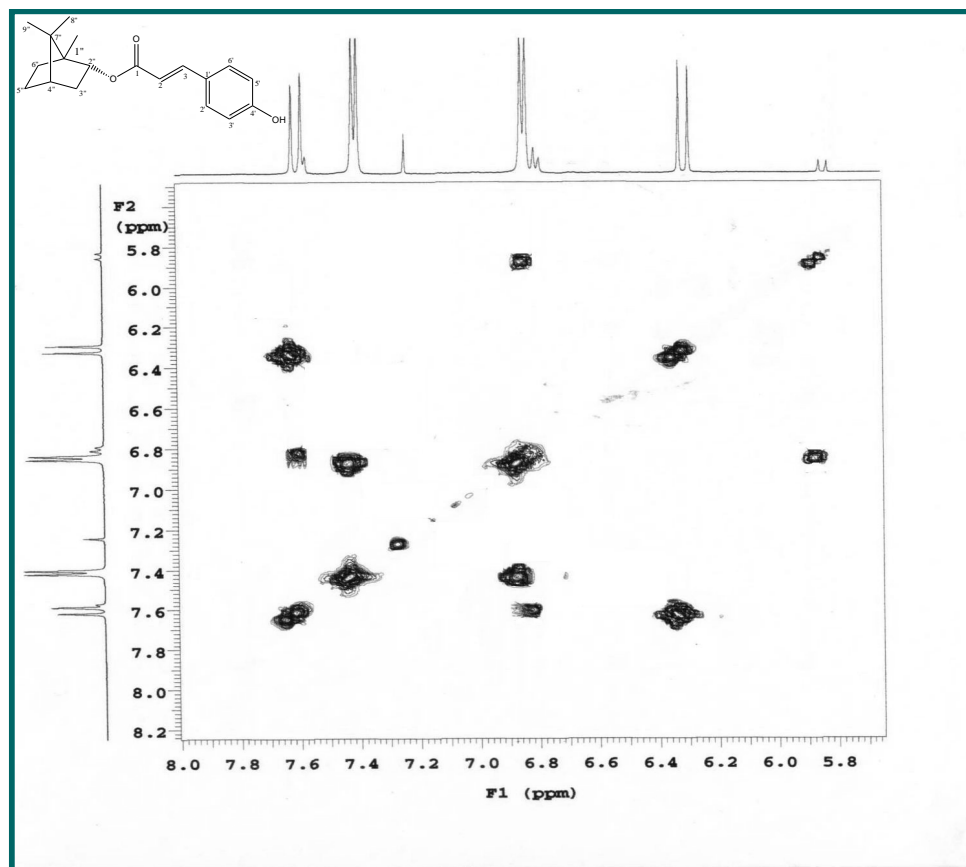


Figura 44- Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY (500 MHz, CDCl_3) de Vm-3 na região de (5,8-8,0 ppm).

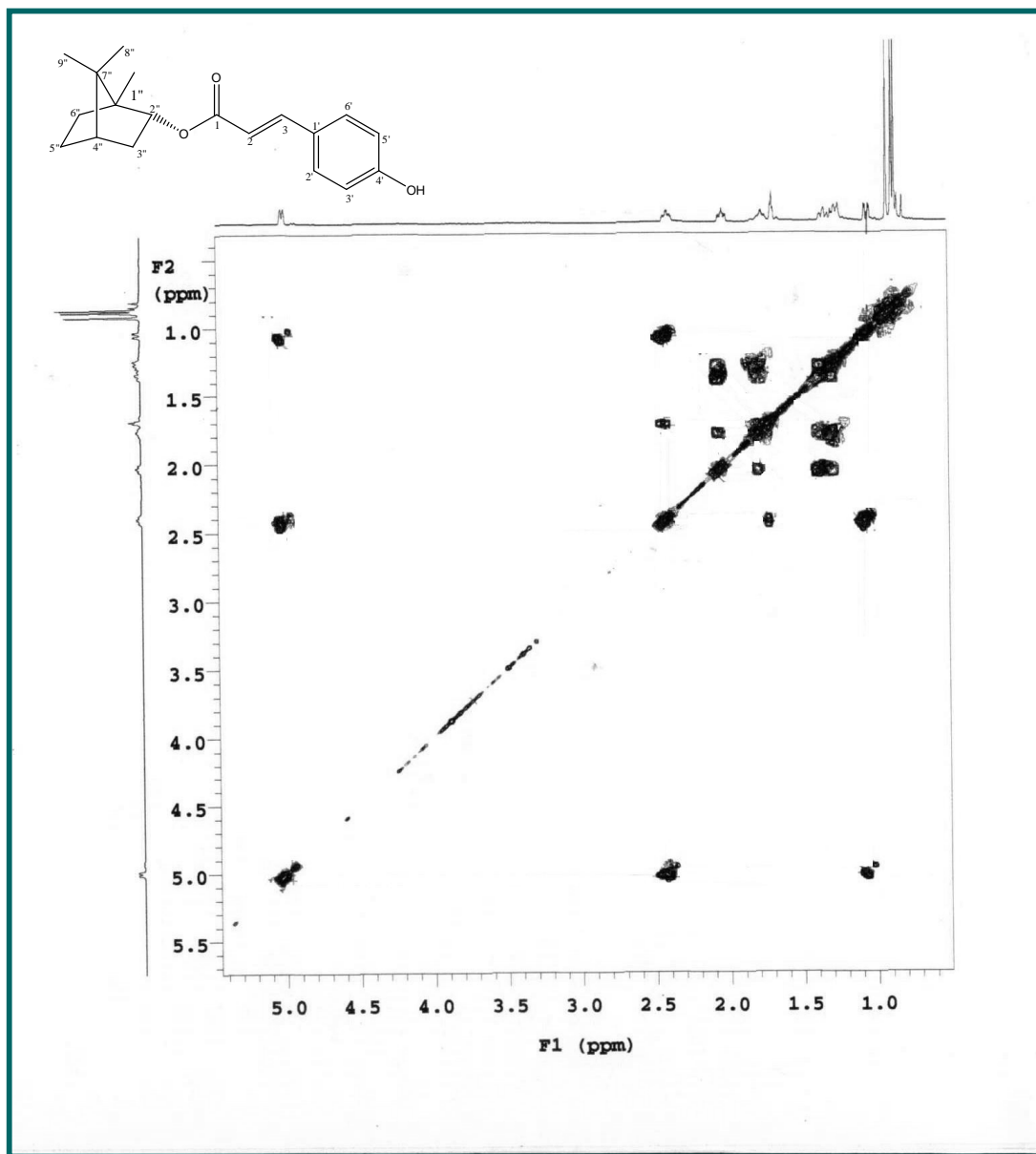


Figura 45- Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY (500 MHz, CDCl_3) de Vm-3 na região de (1,0-5,0 ppm).

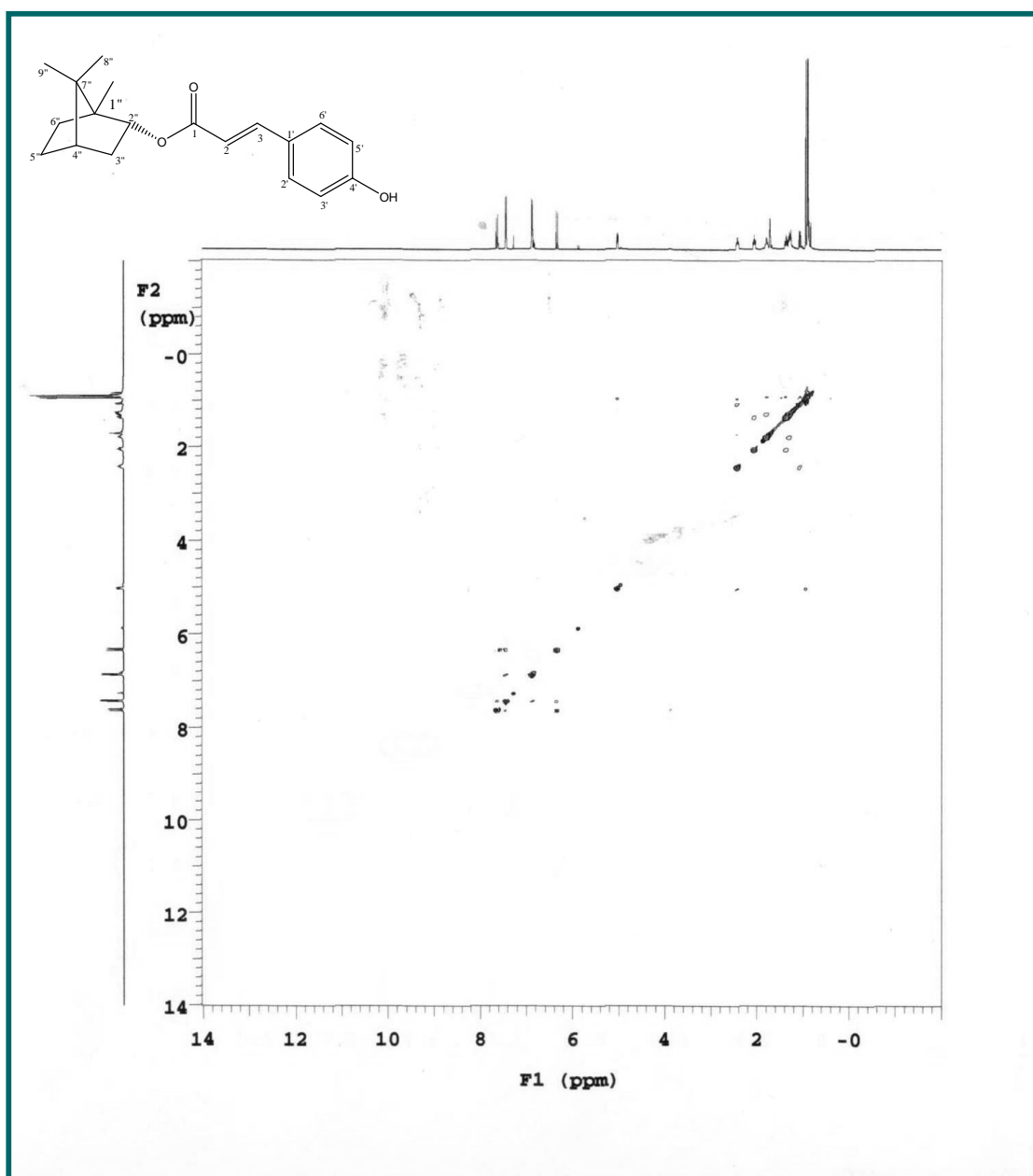


Figura 46- Espectro de RMN ^1H x ^1H NOESY (500 MHz, CDCl_3) de Vm-3.

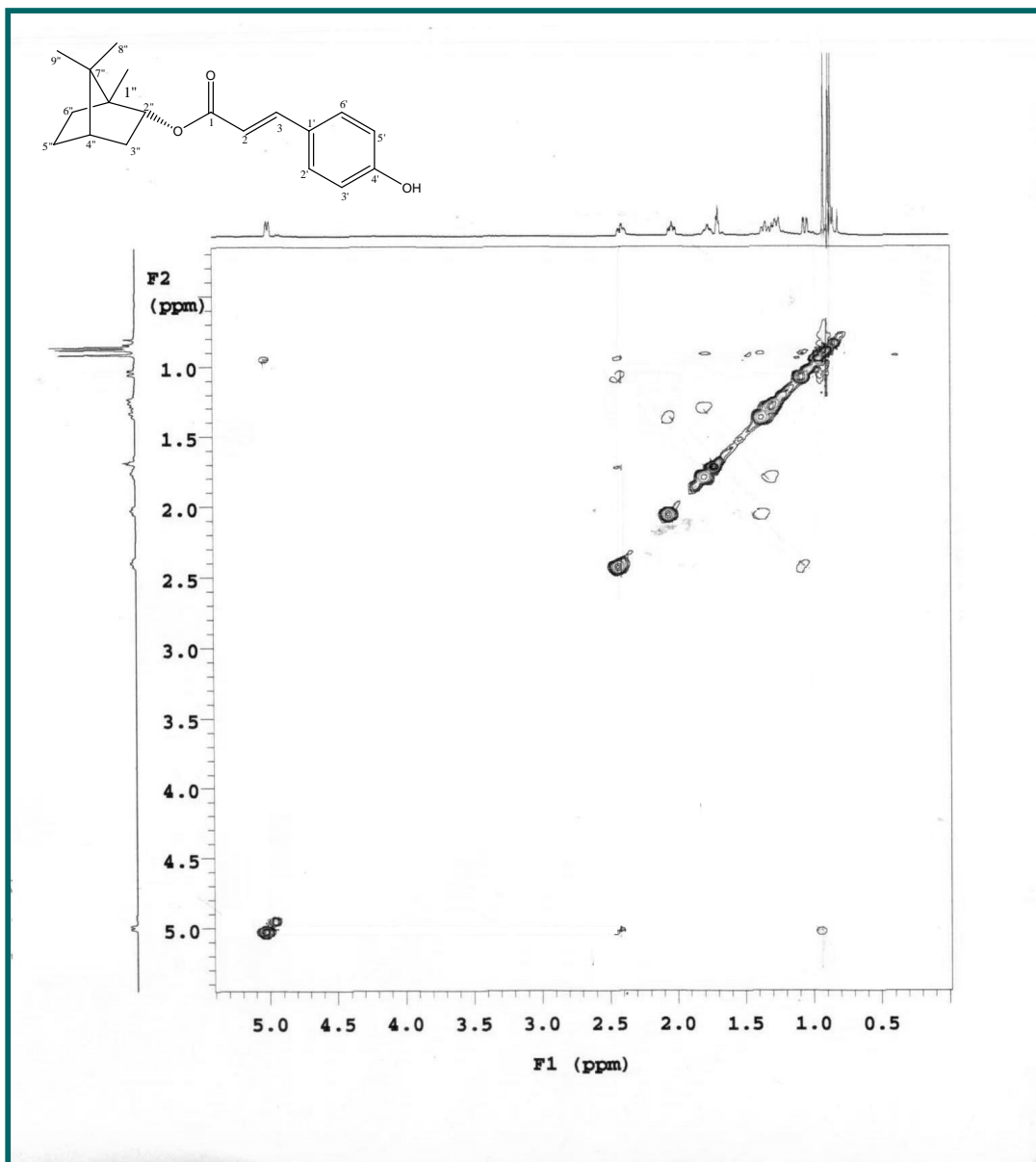


Figura 47-Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ NOESY (500 MHz, CDCl_3) de Vm-3 na região de (0,5-5,0 ppm).

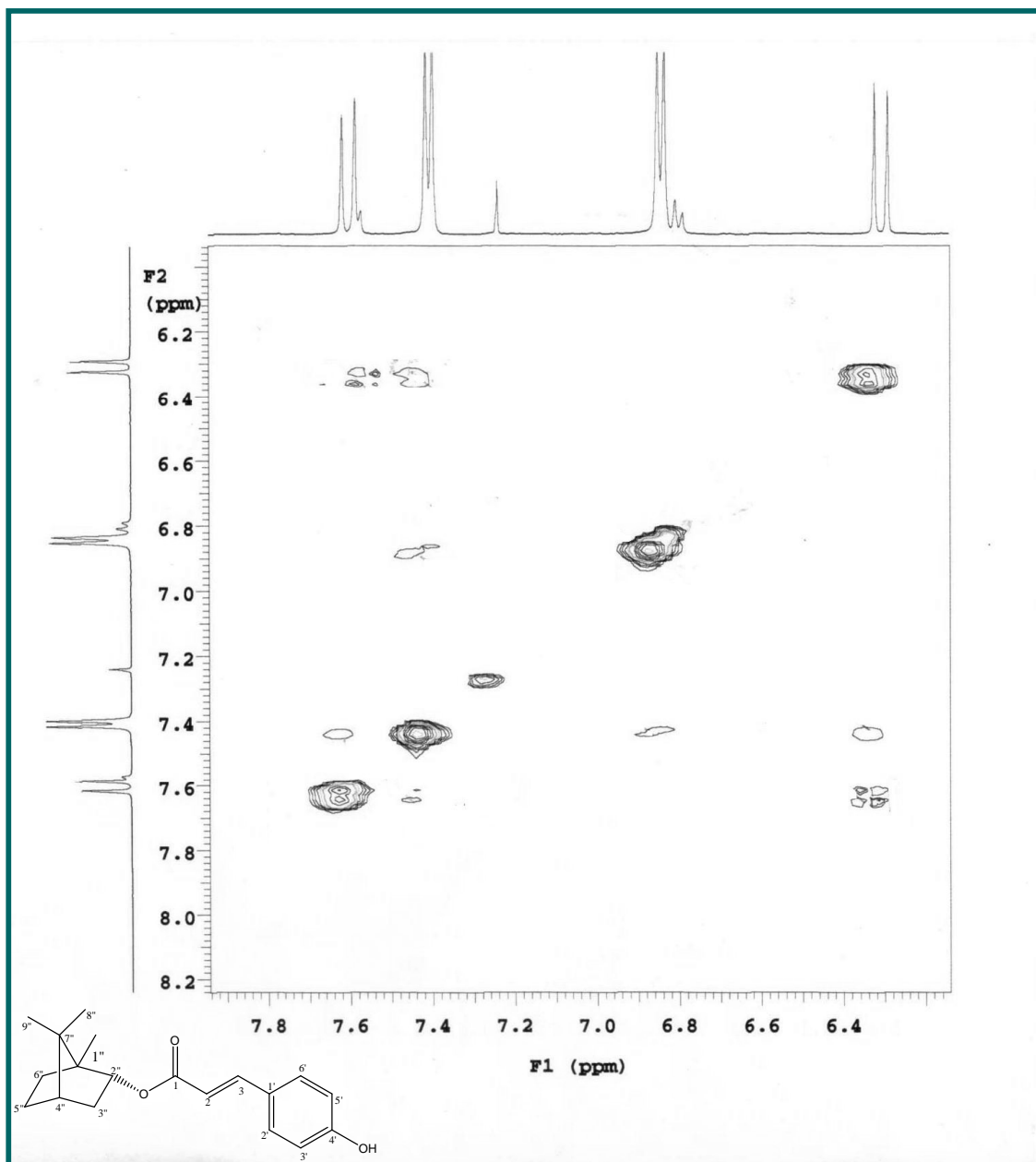


Figura 48- Expansão do espectro de RMN ¹H x ¹H NOESY (500 MHz, CDCl₃) de Vm-3 na região de (6,4-7,8 ppm).

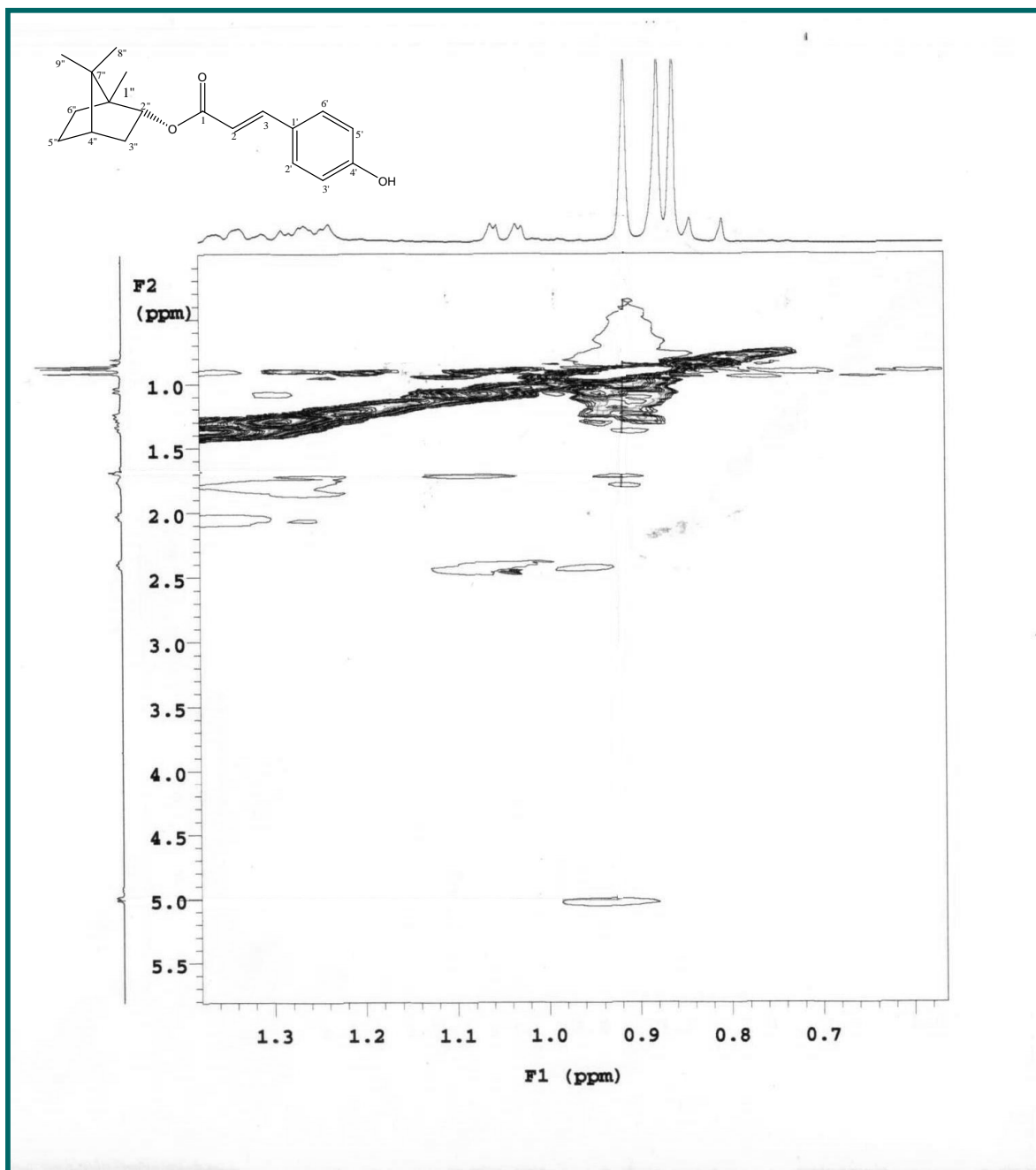


Figura 49- Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ NOESY (500 MHz, CDCl_3) de Vm-3 na região de 0,6 -1,3 ppm).

5.4 Determinação estrutural de Vm-4.

A substância apresentou-se como um pó branco, pesando 10 mg e com ponto de fusão 154-156 °C. Na análise polarimétrica a amostra apresentou rotação específica de $[\alpha]_D$: - 20 (c 0, 01, CHCl_3).

O espectro RMN ^{13}C -APT (125 MHz) de Vm-4 em CDCl_3 (Figura 50, p. 110) é muito semelhante ao de Vm-3, apresentando 17 sinais para 19 carbonos. Neste espectro foram observados 10 sinais para carbonos sp^3 com deslocamentos químicos característicos de esqueleto monoterpênico e os deslocamentos químicos em δ_{C} 48,7; 44,9; 47,8 mais os sinais para três metilas em δ_{C} 19, 6, 18,8 e 13,5 são compatíveis com os deslocamentos químicos do borneol (JOUD, 2005).

Também no espectro de RMN ^{13}C (Figura 50, p. 110) foi possível observar sinais característicos de unidade *p*-cumárica. Os deslocamentos químicos em δ_{C} 167,4 e 80,1 inferiram que a unidade *p*-cumárica estava esterificando o borneol. Os deslocamentos químicos dos demais carbonos estão na tabela 6, p. 109.

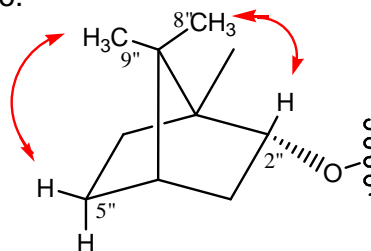
No espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) e suas expansões (Figura 51-54, p. 111-113) observou-se um envelope de sinais na região de δ_{H} 0,8 a 2,0 que corrobora com o espectro de RMN ^{13}C para a presença de monoterpreno. Observaram-se também sinais na região de hidrogênios aromáticos sendo os deslocamentos químicos em δ_{H} 5,84 (d, $J=12,5$ Hz) 6,82 (d, $J=13,0$ Hz), 7,57 (d, $J=9,0$ Hz), 6,76 (d, $J=9,0$ Hz) e atribuídos à unidade *p*-cumárica, mas que de acordo com as constantes de acoplamento entre H-2 e H-3 ($J=12,5$ Hz) é diferente da unidade presente em Vm-3, tratando-se de unidade *cis-p*-cumárica. Também foram observado um sinal em 4,92 (ddd, $J=10, 5,5$ e $2,5$) e três singletos em 0,81; 0,84; 0,89, corroborando com o espectro de carbono treze para presença do borneol.

No espectro HMQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) e suas expansões (Figura 55-57, p. 114-115) foi possível observar a correlações diretas entre os carbonos e seus hidrogênios. As correlações estão compiladas na tabela 6. p. 109.

No espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) (Figura 58-61, p. 116-118) observou-se correlações a duas e três ligações entre carbonos e hidrogênios. As correlações são mostradas na tabela 6, p. 109.

No espectro de correlação COSY (500 MHz, CDCl_3) (Figura 62-65, p. 119-120) foi possível observar correlações dos sinais em δ_{H} 4,92 (H-2'') com δ_{H} 1,02 (H-3'a) e deste com 1,65 (H-4''). Para analisar a configuração usamos os dados do espectro NOESY (500 MHz, CDCl_3) (Figura 66-68, p. 121-122) que mostrou

correlação de δ_H 4,98 (H-2'') com δ_H 0,89 (H-8'') e de δ_H 1,70 (H-5''b) com δ_H 0,84 (H-9'') definindo C-2'' como endo.



A análise de todos esses dados mais comparação com a literatura (AKENDENGUÉ et al., 2009) permitiu identificar Vm-4 como (-)-bornil-*p*-cis-cumarato, isolado pela primeira vez na espécie.

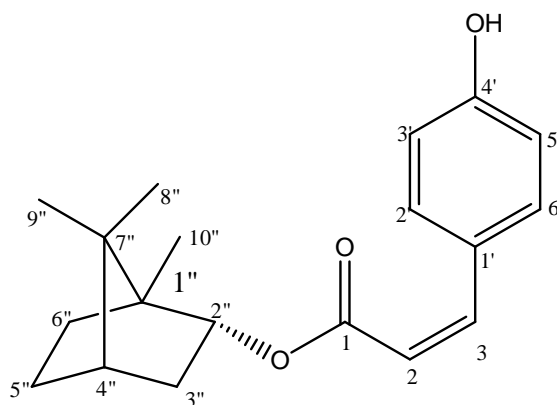


Tabela 6 – Deslocamentos químicos para os núcleos de hidrogênio e carbono treze de Vm-4, verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais (500 e 125 MHz, respectivamente) em CDCl_3 (δ em ppm e J em Hz).

Vm-4	HMQC		HMBC		COSY	NOESY
C	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$		
1	167,4	-				
2	117,5	5,84 (d, $J=12,5$)	C-1	C-1'	H-3	H-3
3	143,3	6,82 (d, $J=13$)		C-1, C-2'/6'	H-2	H-2',H-2
1'	127,2	-				
2'/6'	132,1	7,57 (d, $J=9$)		C-3, C-4'	H-5'/3'	H-3
3'/5'	115,1	6,76 (d, $J=9$)	C-4'	C-1', C-2'/6'	H-2'/6'	
4'	156,9	-				
1''	48,7	-				
2''	80,1	4,92 (ddd, $J=10, 5,5$ e 2,5)			H-3''a,H-3''b	H-8''
3''a	36,8	1.02 (dd, $J = 14,0$ e 3.5)	C-2''	C-5''a	H-4''	H-3''b
3''b		2,40 (m)			H-2''	H-3''a
4''	44,9	1,65 (t, $J=4,5$)		C-2'',C-6''	H-3''a	
5''a	27,9	1,18 (m)			H-6''b	
5''b		1,70 (m)			H-6''a	H-9''
6''a	27,0	1,26 (m)			H-5''b	
6''b		1,82 (m)			H-5''a	
7''	47,8	-				
8''	18,8	0,89 (s)		C-4''		H-2''
9''	19,6	0,84 (s)	C-7''	C-1'',C-4''		H-5''b
10'	13,5	0,81 (s)		C-2'',C-6''		

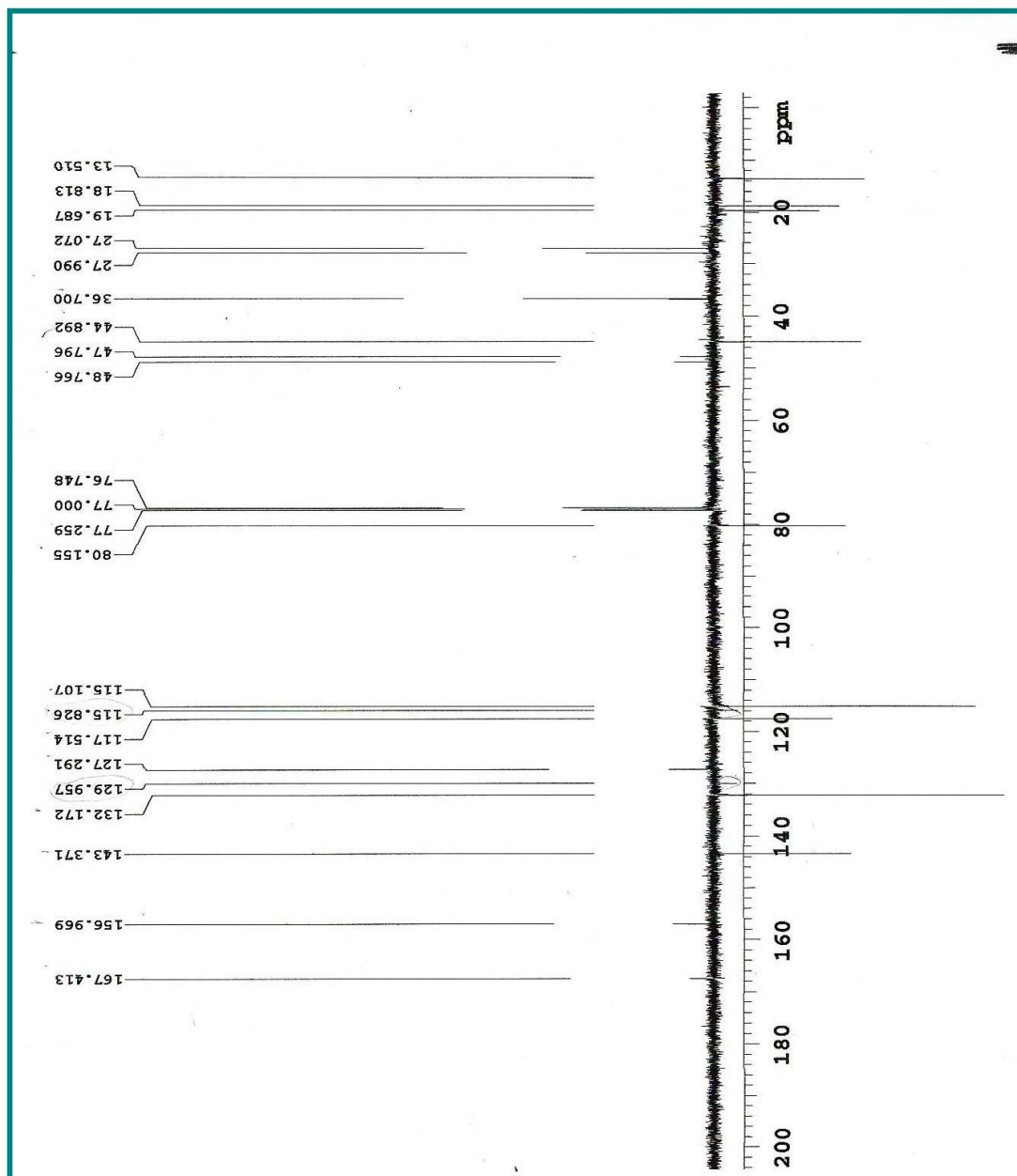


Figura 50- Espectro de RMN ¹³C-APT (125 MHz, CDCl₃) de Vm-4.

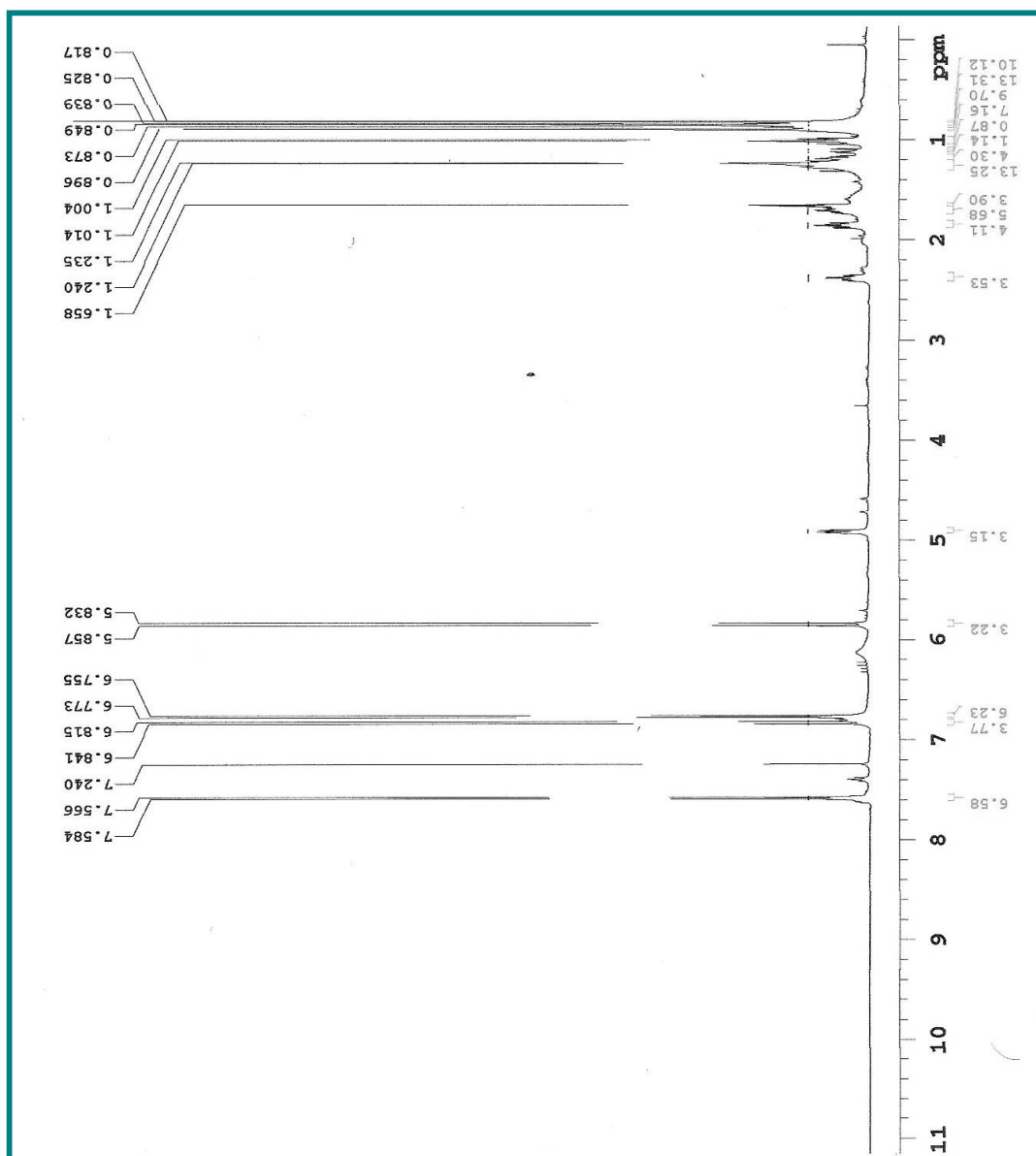


Figura 51 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Vm-4.

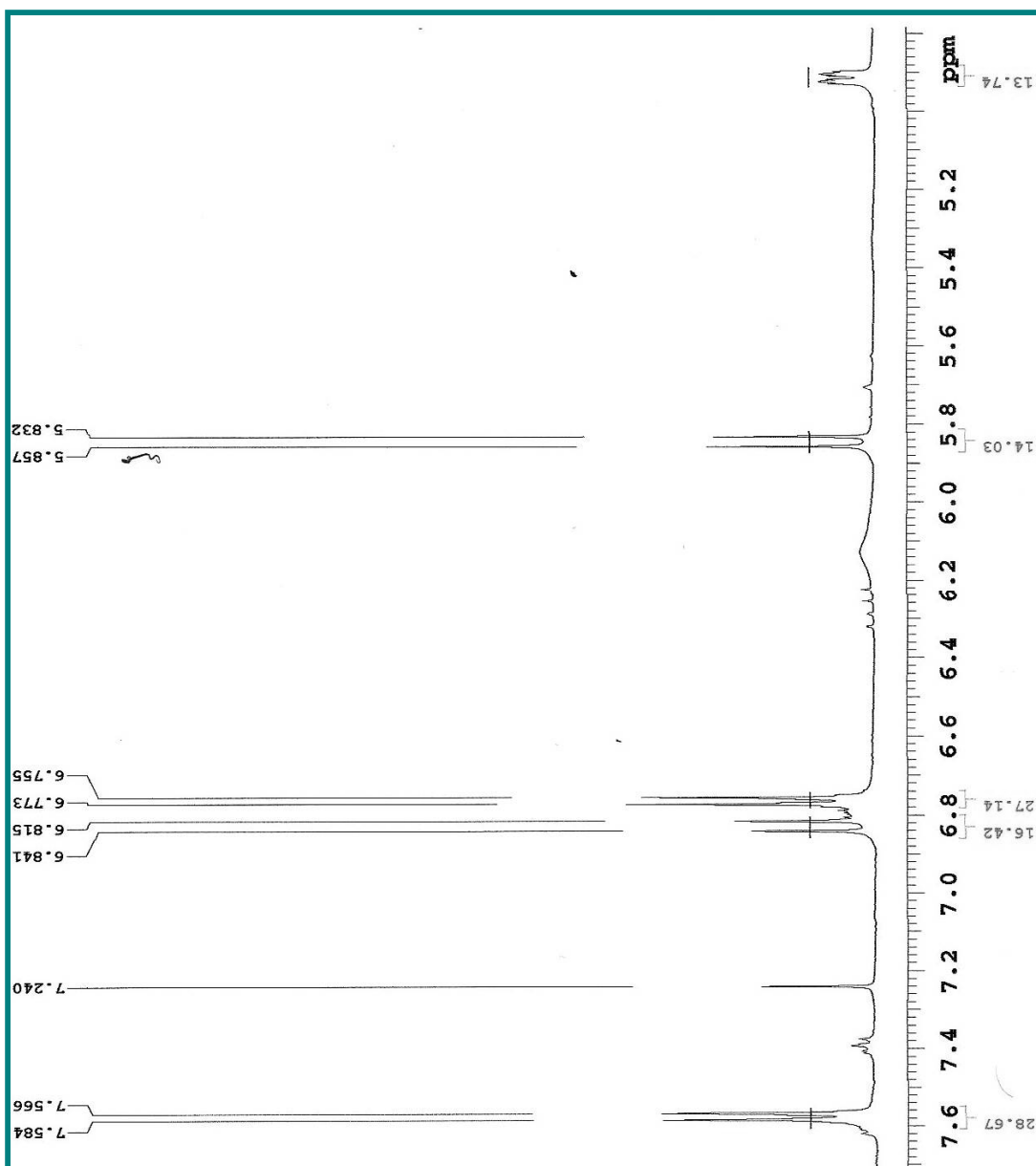


Figura 52- Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Vm-4 na região de (7,6-5,0).

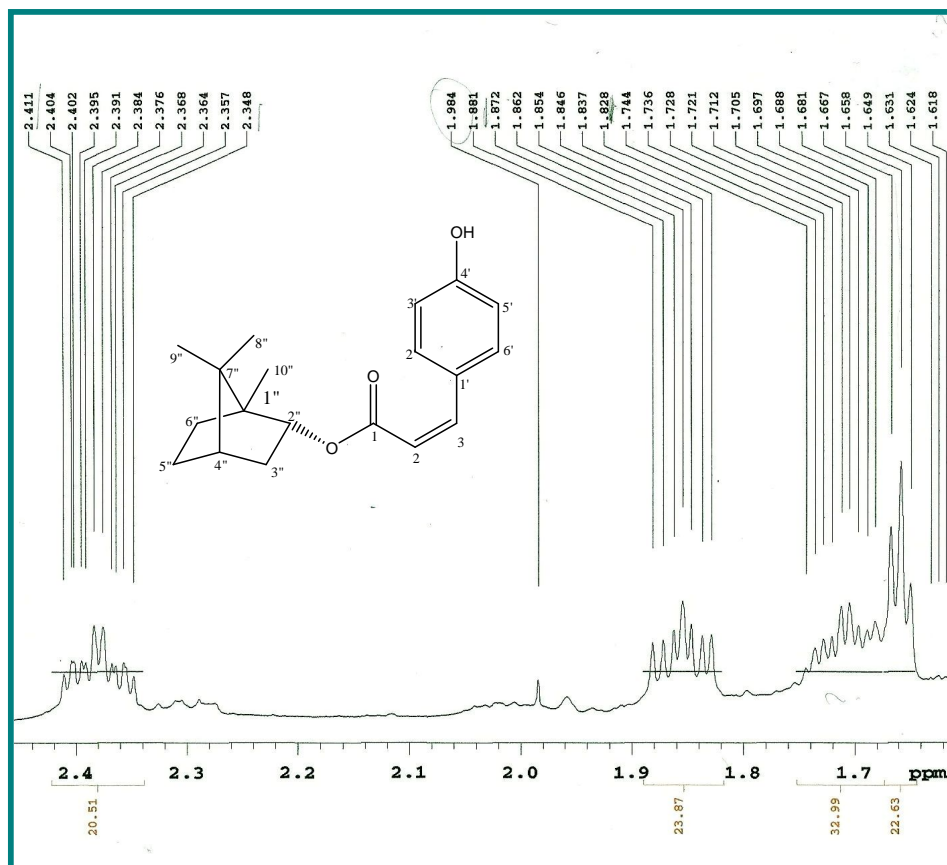


Figura 53 - Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Vm-4 na região de (1,7-2,4 ppm).

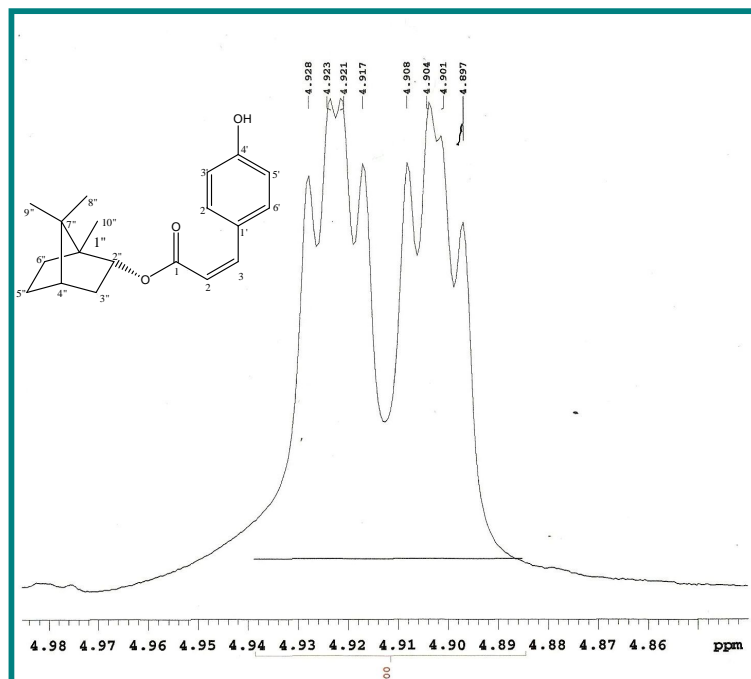


Figura 54-Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Vm-4 na região de (4,86-4,98 ppm).

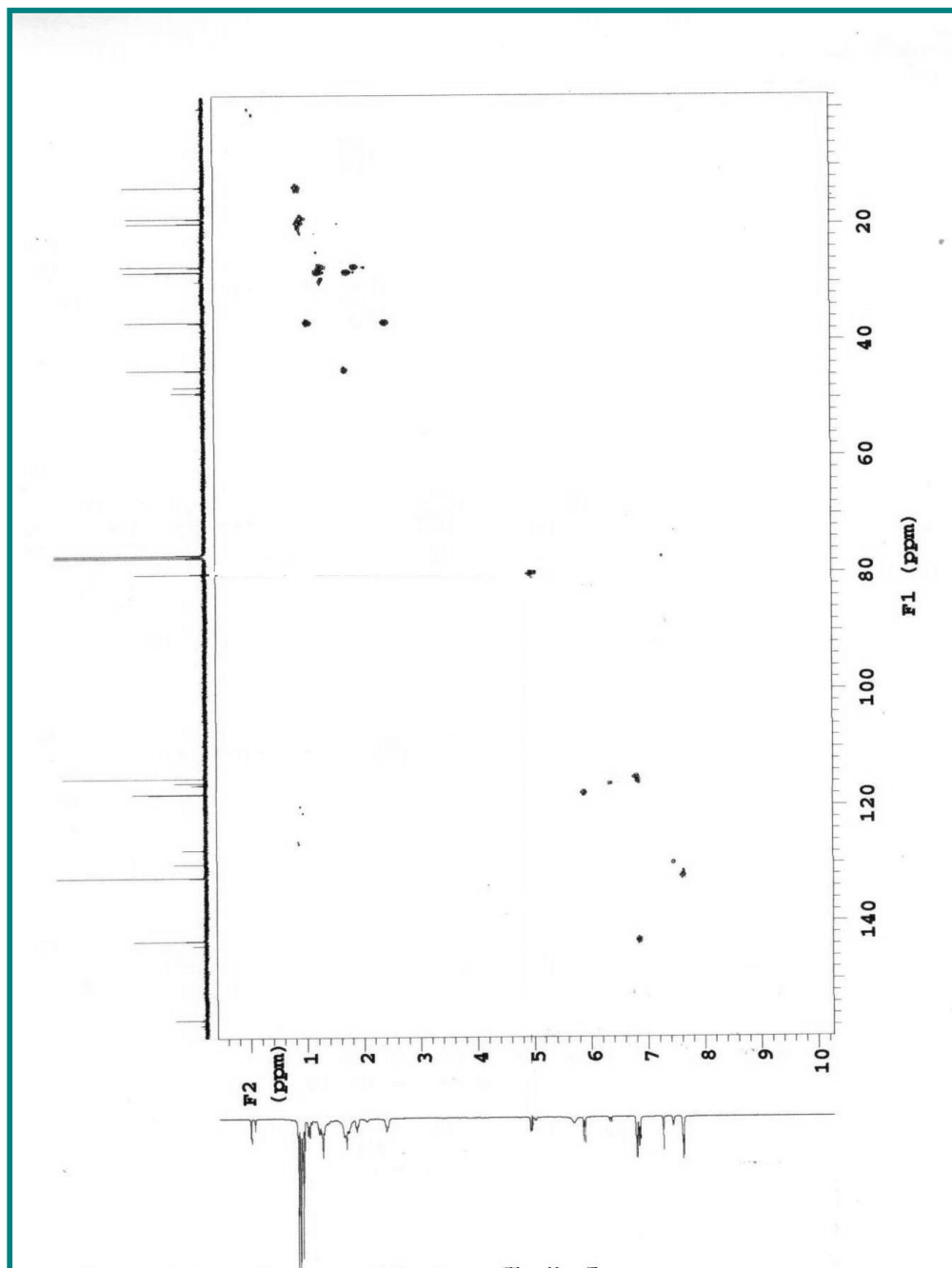
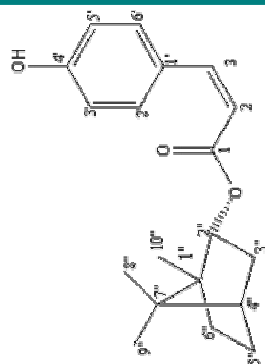


Figura 55- Espectro de RMN $1\text{H} \times {}^{13}\text{C}$ HMQC(500 e 125 MHz, CDCl_3) de Vm-4 .



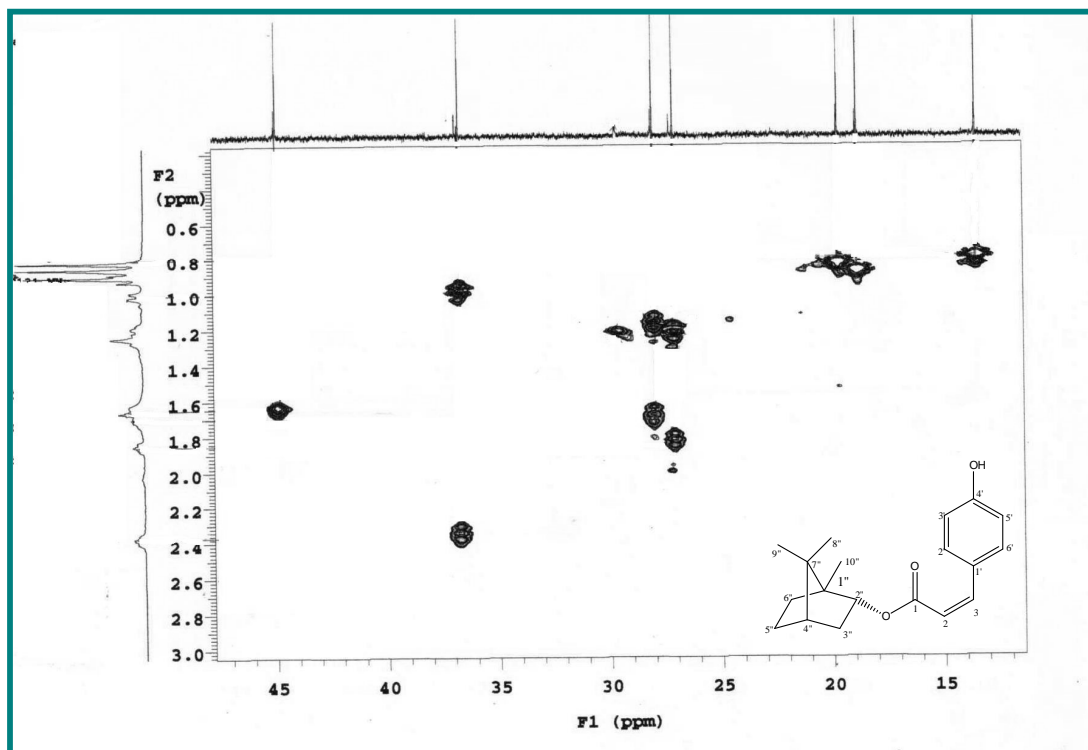


Figura 56- Expansão do espectro de RMN ^1H x ^{13}C -HMQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Vm-4 na região de (0,6-3,0 ppm) x (10-50 ppm).

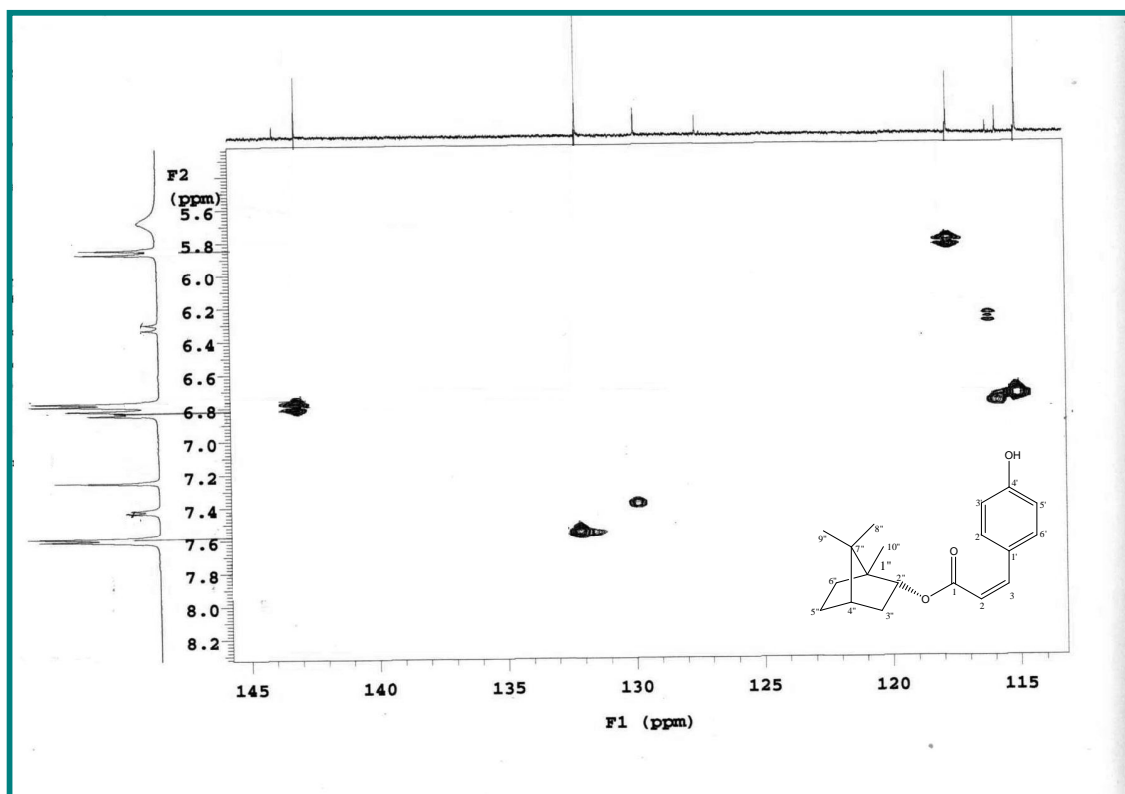


Figura 57- Expansão do espectro de RMN ^1H x ^{13}C -HMQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Vm-4 na região de (5,6-8,2 ppm) x (145-115 ppm).

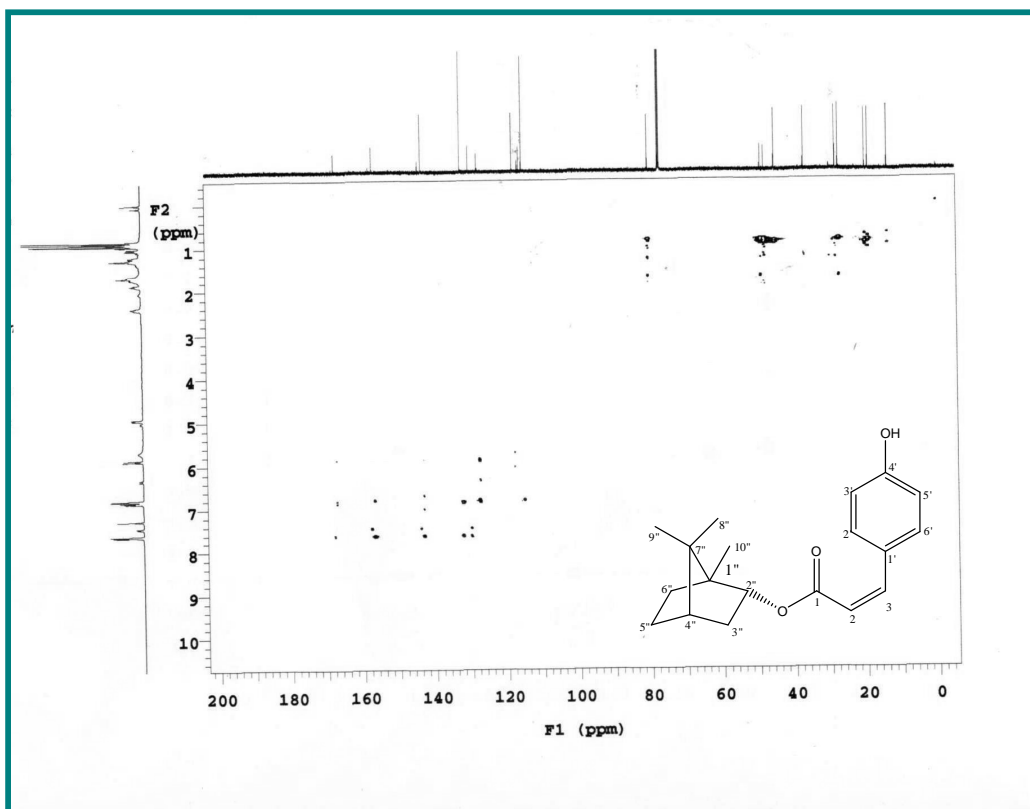


Figura 58- Espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Vm-4.

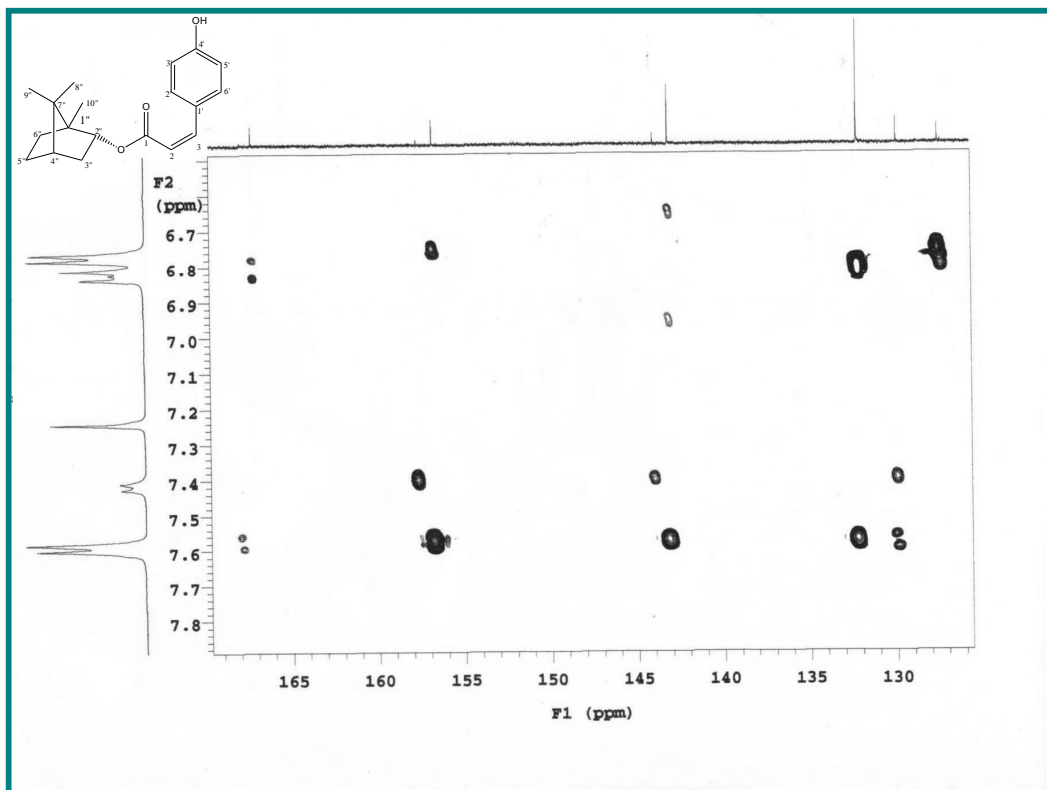


Figura 59- Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Vm-4 na região de (6,7-7,8 ppm) x (125-170 ppm).

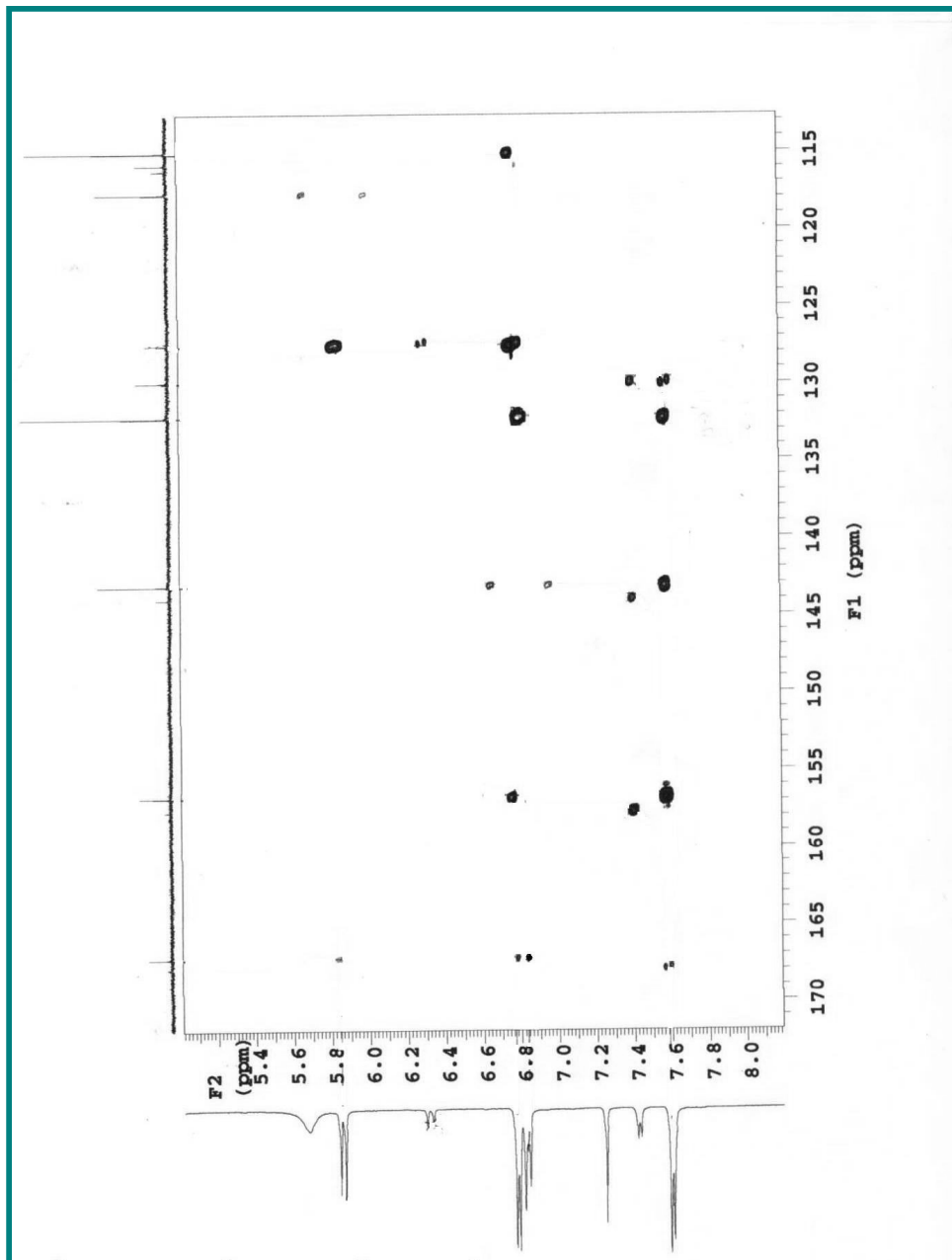


Figura 60- Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBN(500 e 125 MHz, CDCl_3) de Vm-4 na região de (5,4-8,0 ppm) e (170-115ppm). .

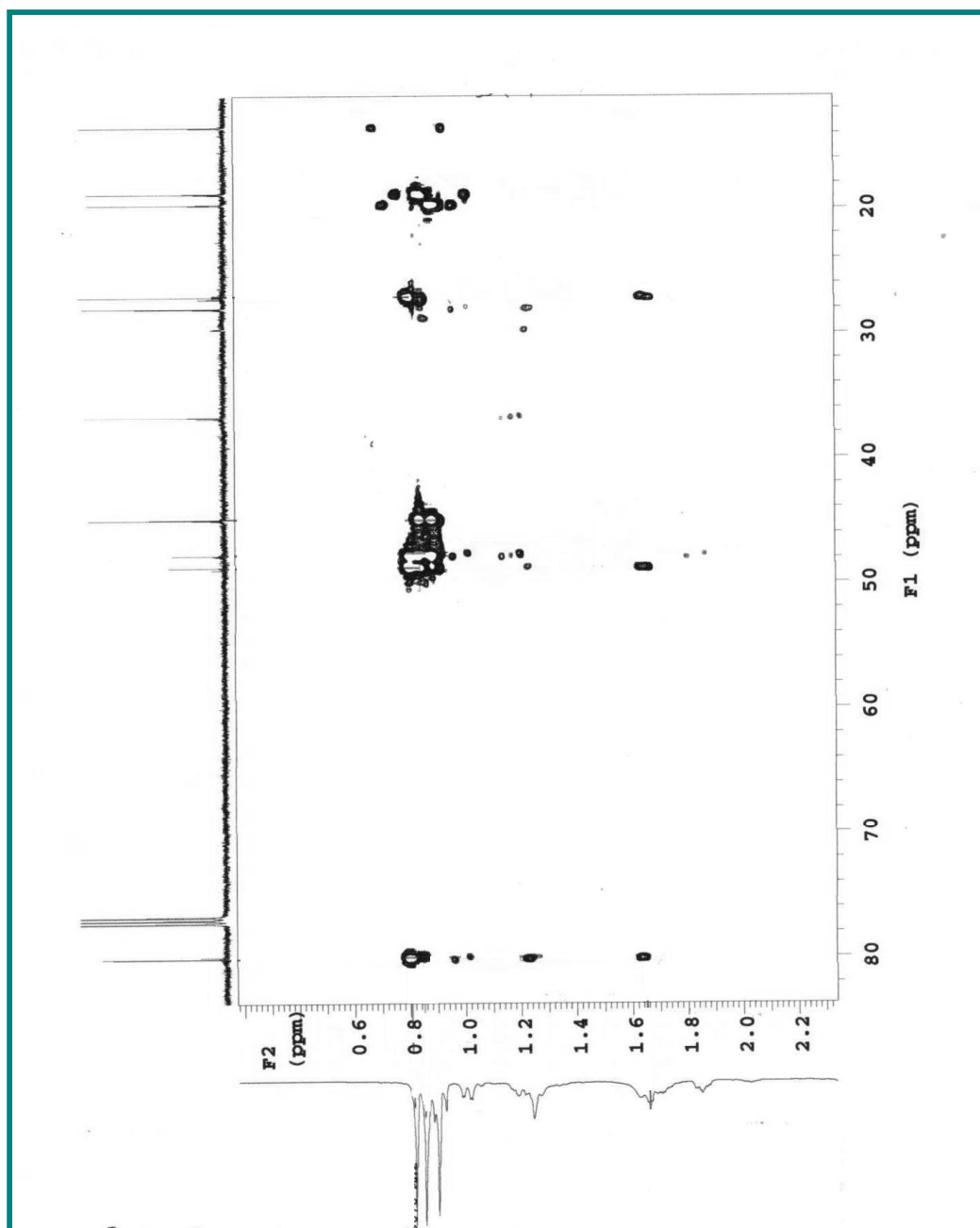
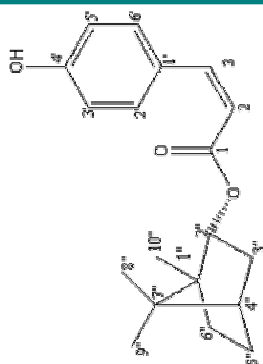


Figura 61 - Expansão do espectro de RMN $1\text{H} \times {}^{13}\text{C}$ HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Vm-4 na região de (0,6-2,2ppm) e (25-80 ppm) .



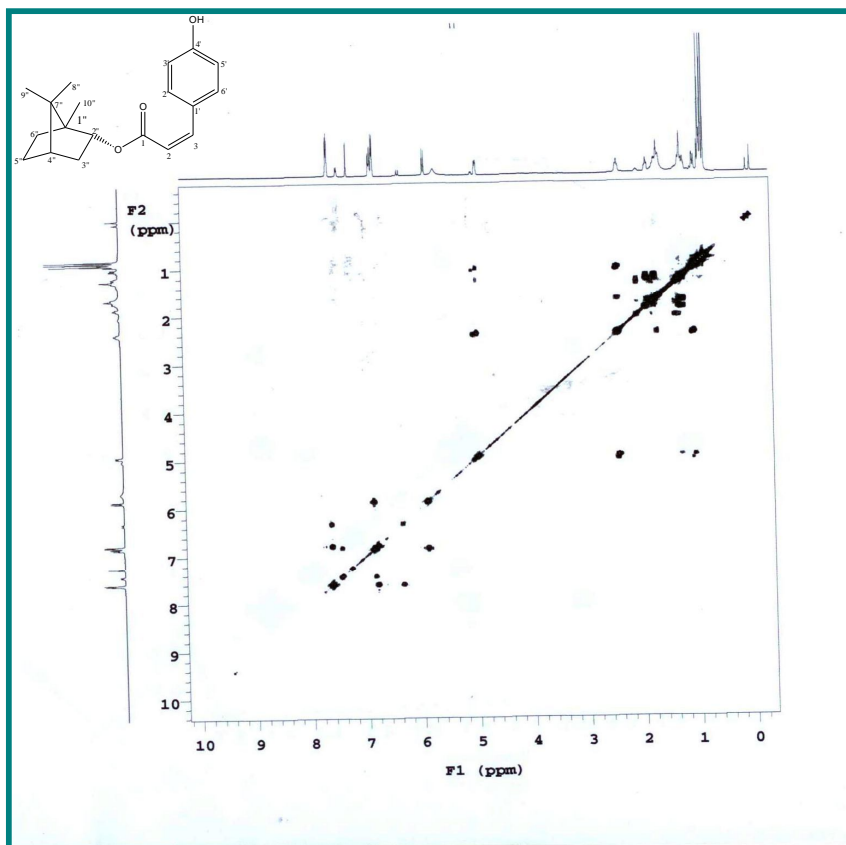


Figura 62- Espectro de RMN $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY (500 MHz, CDCl_3) de Vm-4.

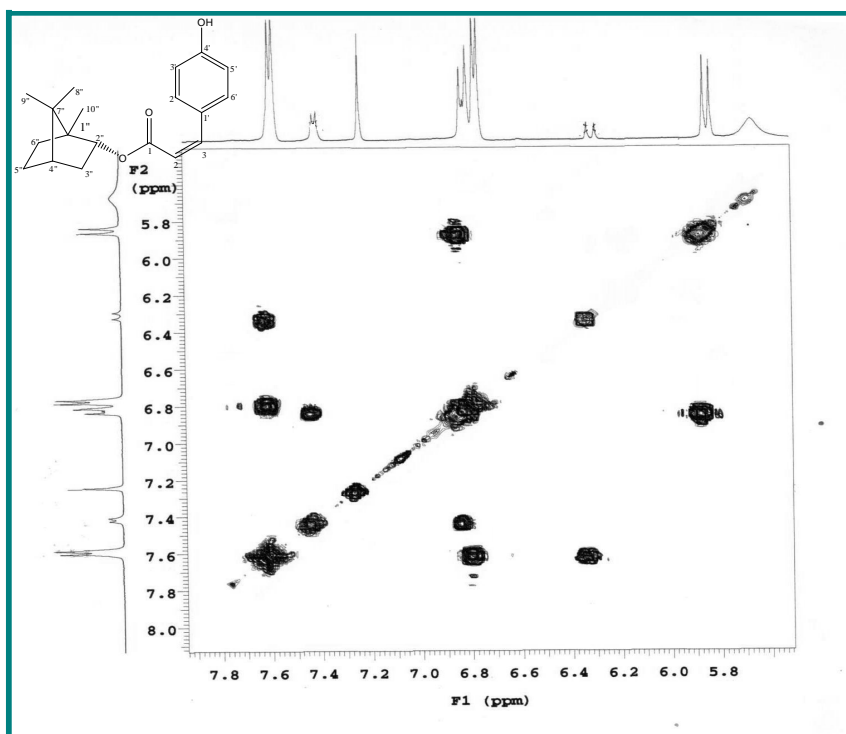


Figura 63- Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY (500 MHz, CDCl_3) de Vm-4 na região de (5,8-7,8 ppm).

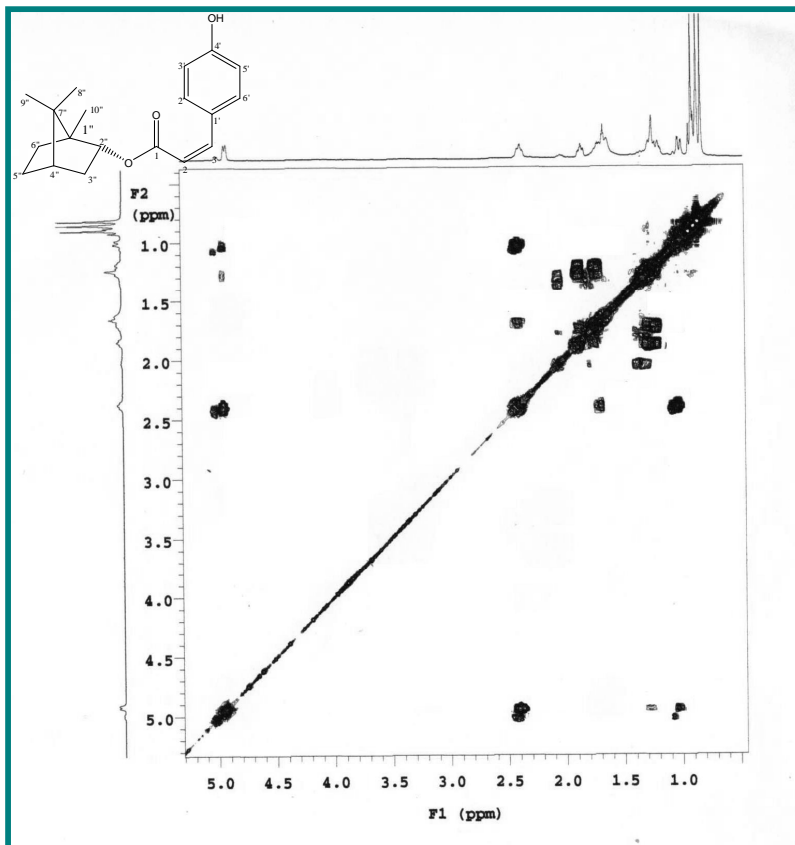


Figura 64- Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY (500 MHz, CDCl_3) de Vm-4 na região de (1,0-5,0 ppm).

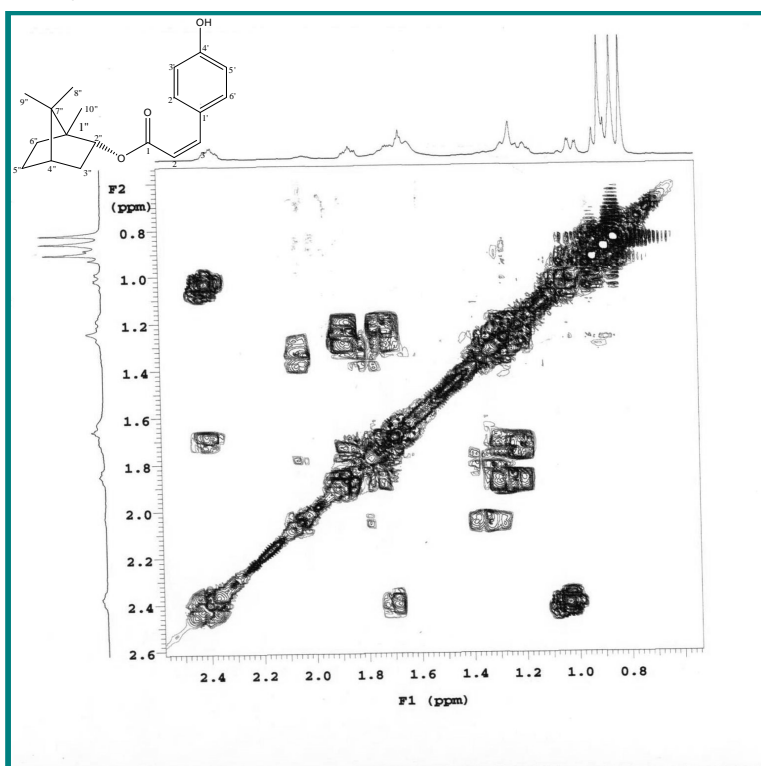


Figura 65- Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY (500 MHz, CDCl_3) de Vm-4 na região de (0,8-2,4 ppm).

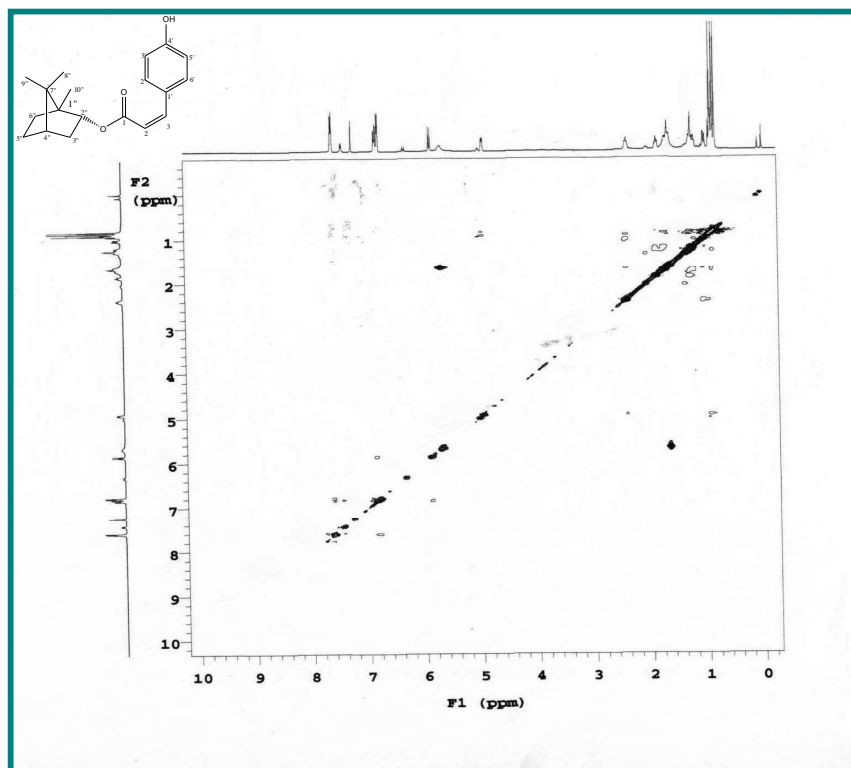


Figura 66- Espectro de RMN $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -NOESY (500 MHz, CDCl_3) de Vm-4.

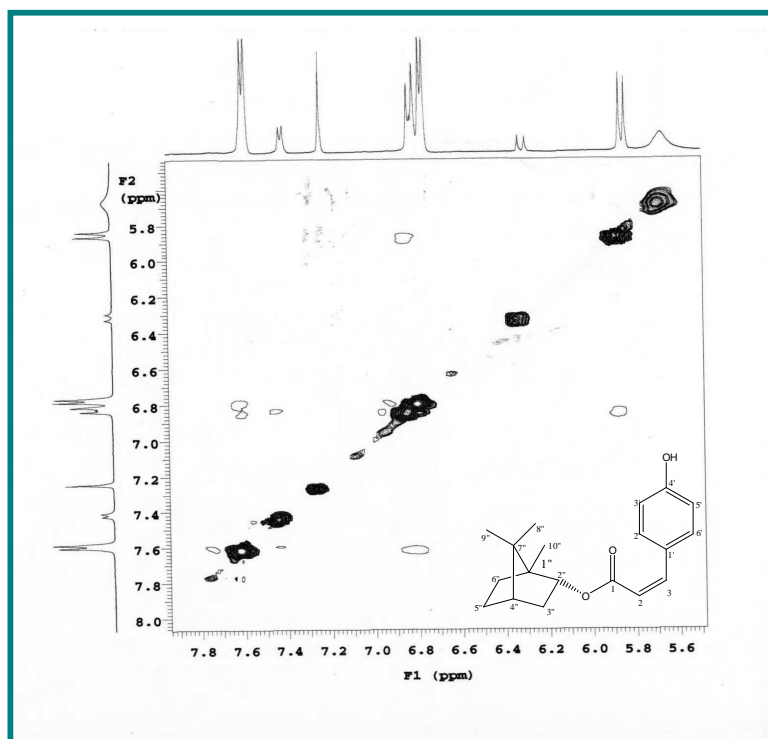


Figura 67- Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -NOESY (500 MHz, CDCl_3) de Vm-4 na região de (5,6-7,9 ppm).

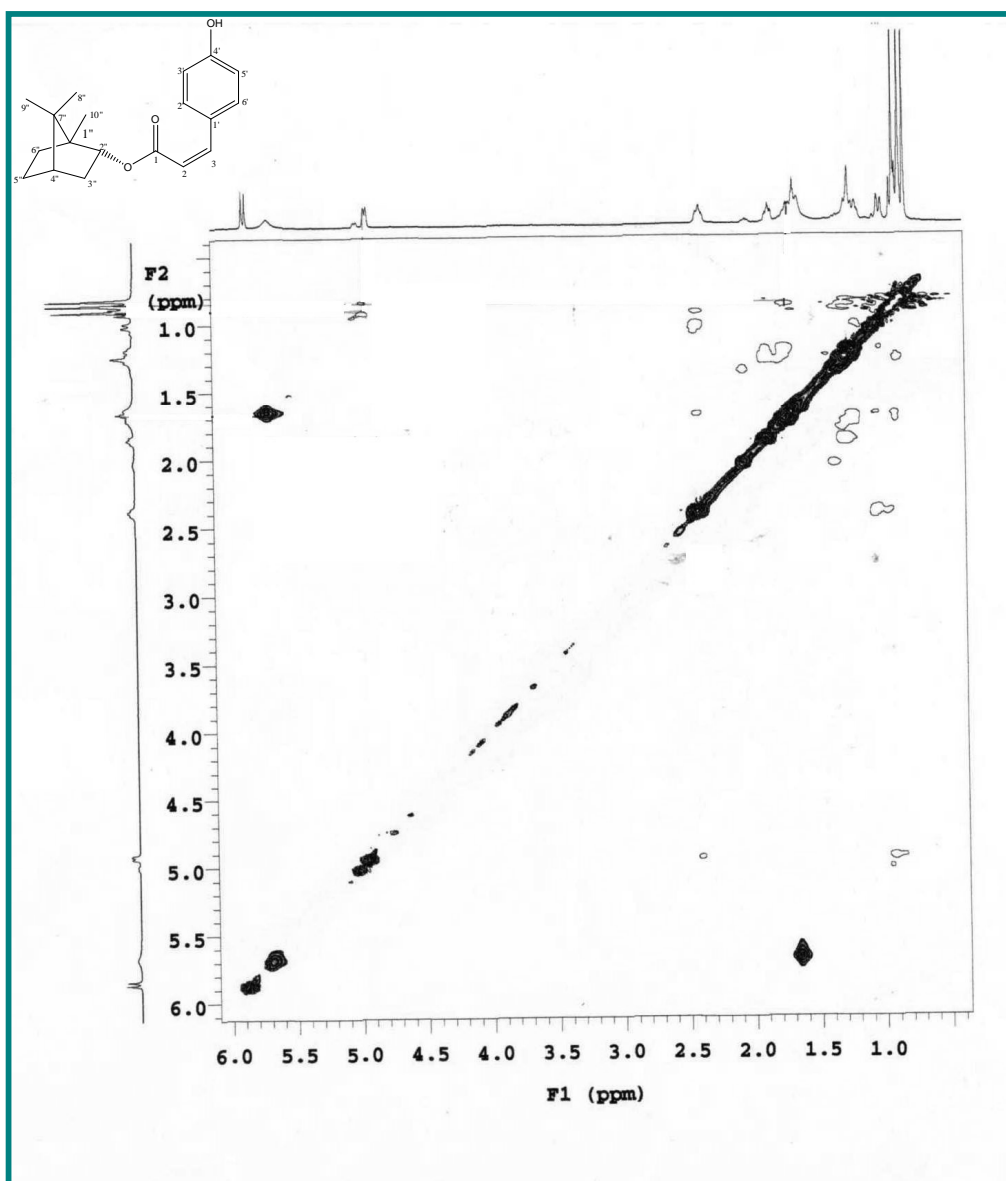


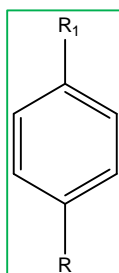
Figura 68- Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -NOESY (500 MHz, CDCl_3) de Vm-4 na região de (1,0-6,0 ppm).

5.5 Determinação estrutural Vm-5

A substância Vm-5 foi isolada como um sólido branco pesando 12 mg e com ponto de fusão 214-216°C.

A análise do espectro de RMN ^1H e expansões (500 MHz, CD_3OD) (Figura 69-70, p. 125) mostrou a presença de dois dupletos, um em δ_{H} 7,86 ($J=8,5$) e outro em δ_{H} 6,80 ($J=8,5$), acoplado orto característico do sistema AA'BB' de anel aromático.

O espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) (Figura 71, p. 126) apresentou sinais intensos em δ_{C} 133,0 e 116,0 que junto com os dados do espectro de ^1H inferem a presença de um sistema AA'BB' de anel aromático.



O sinal em δ_{C} 170,1 indica a presença de uma carbonila de ácido e a ausência de sinais característicos de metoxilas corroborou para a indicação de hidroxila na molécula.

Por meio destes dados mais os dados de espectros bidimensionais e por comparação da literatura (*The Sadtler Standard Spectra*, 1973.) (tabela 7, p. 124) Vm-5 foi identificado com um derivado do ácido benzóico, o ácido *p*-hidroxibenzoico.

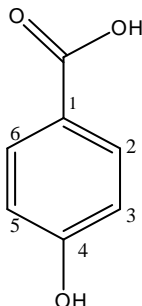
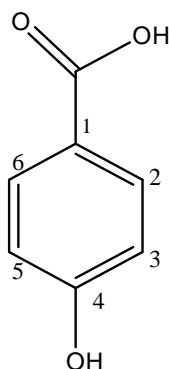


Tabela 7 – Deslocamentos químicos para os núcleos de hidrogênio e carbono treze de Vm-5, verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais (500 e 125 MHz, respectivamente) em CDCl_3 e comparação com dados da literatura (δ^*) (*The Sadtler Standard Spectra*, 1973.) (δ em ppm e J em Hz).



Vm-5	HMQC		HMBC		δ_{C}^*
	C	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$ $^3J_{\text{CH}}$	
1		122,9	-	- -	122,0
2		133,0	7,86 (<i>d</i> , $J=8,5,1\text{H}$)	- C-4, COOH	131,7
3		116,0	6,80 (<i>d</i> , $J=8,5,1\text{H}$)	- C-1	115,8
4		163,3	-	- -	163,7
5		116,0	6,80 (<i>d</i> , $J=8,5,1\text{H}$)	- C-1	115,8
6		133,0	7,86 (<i>d</i> , $J=8,5,1\text{H}$)	- C-4, COOH	131,7
COOH		170,1	-	- -	169,4

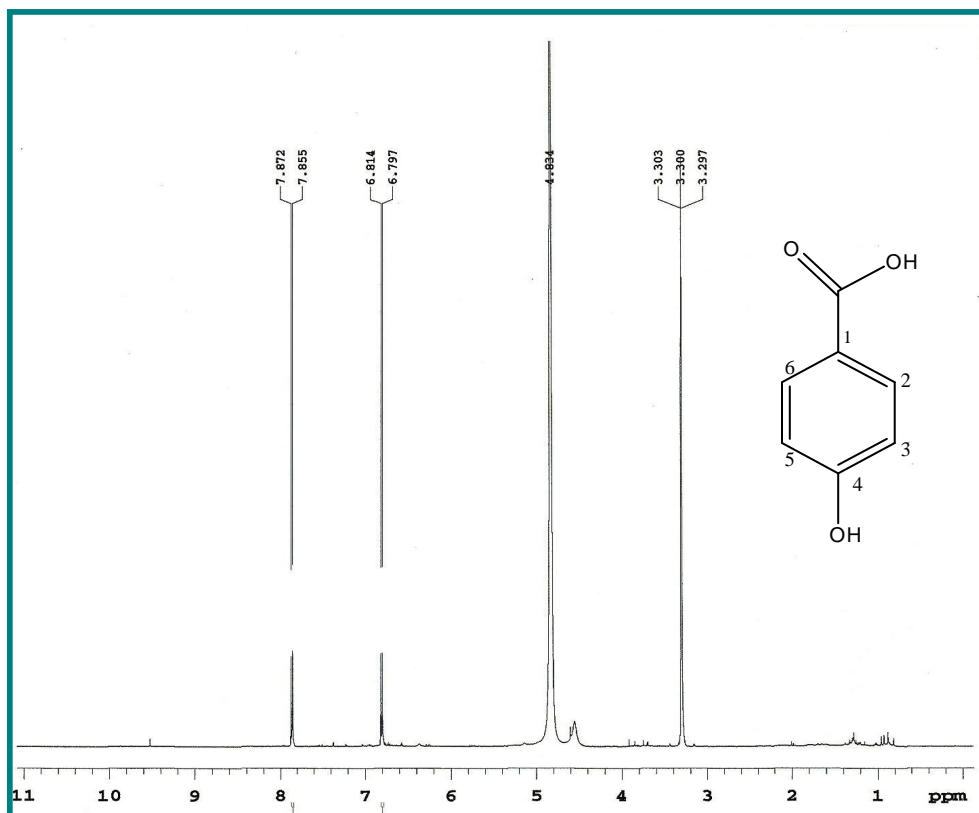


Figura 69- Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de Vm-5.

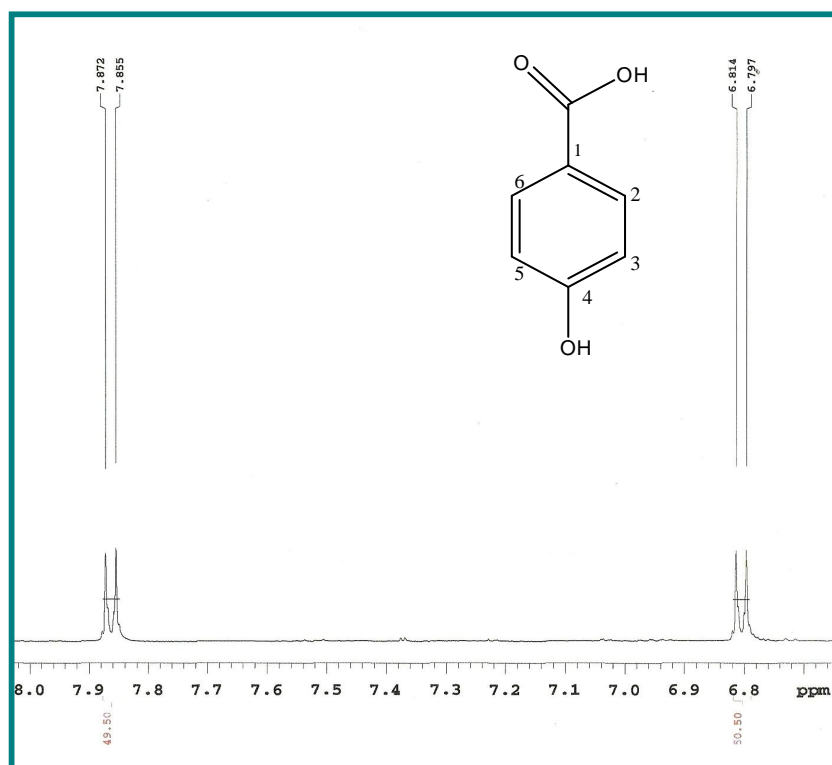


Figura 70- Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de Vm-5 na região de 6,8-8,0 ppm.

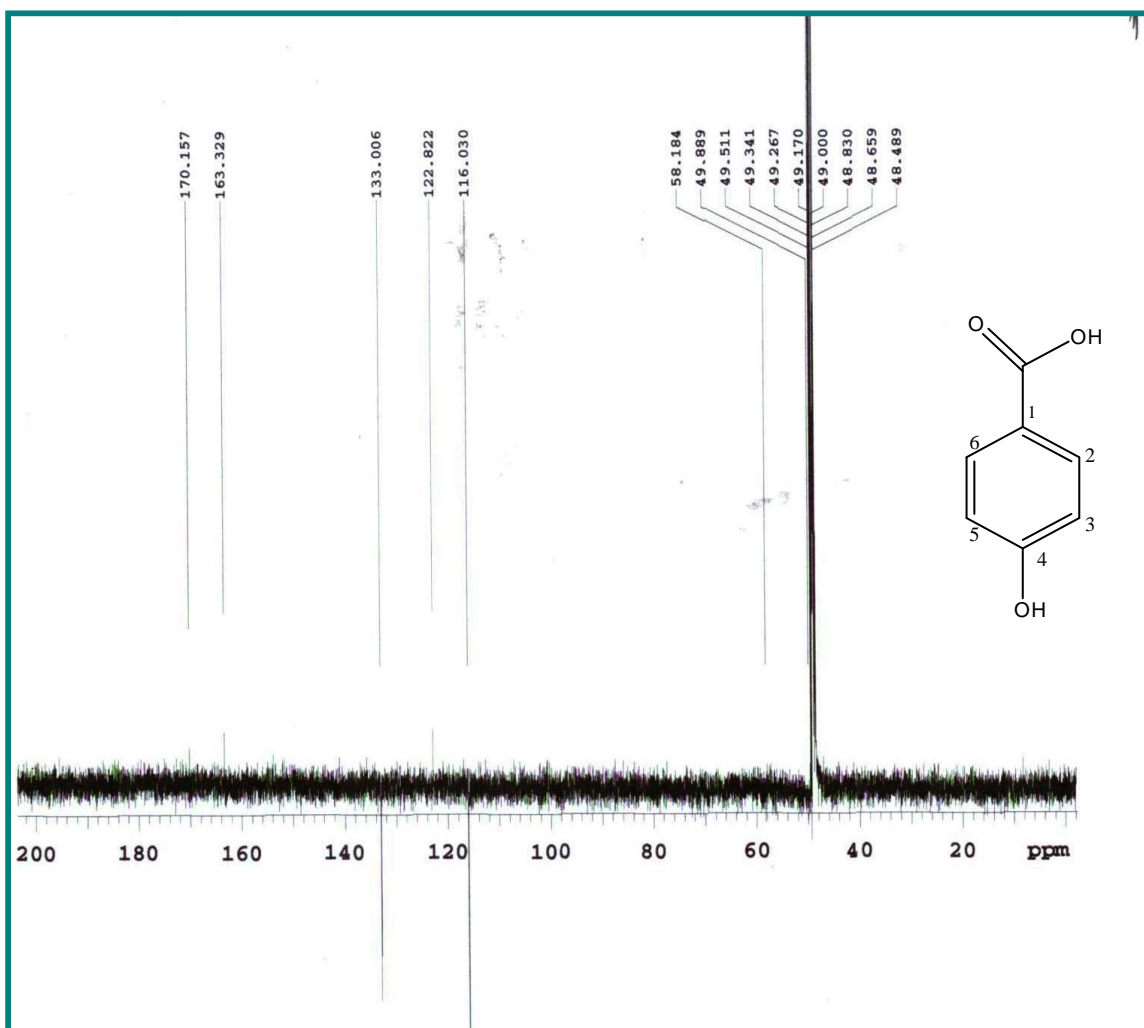


Figura 71- Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de Vm-5

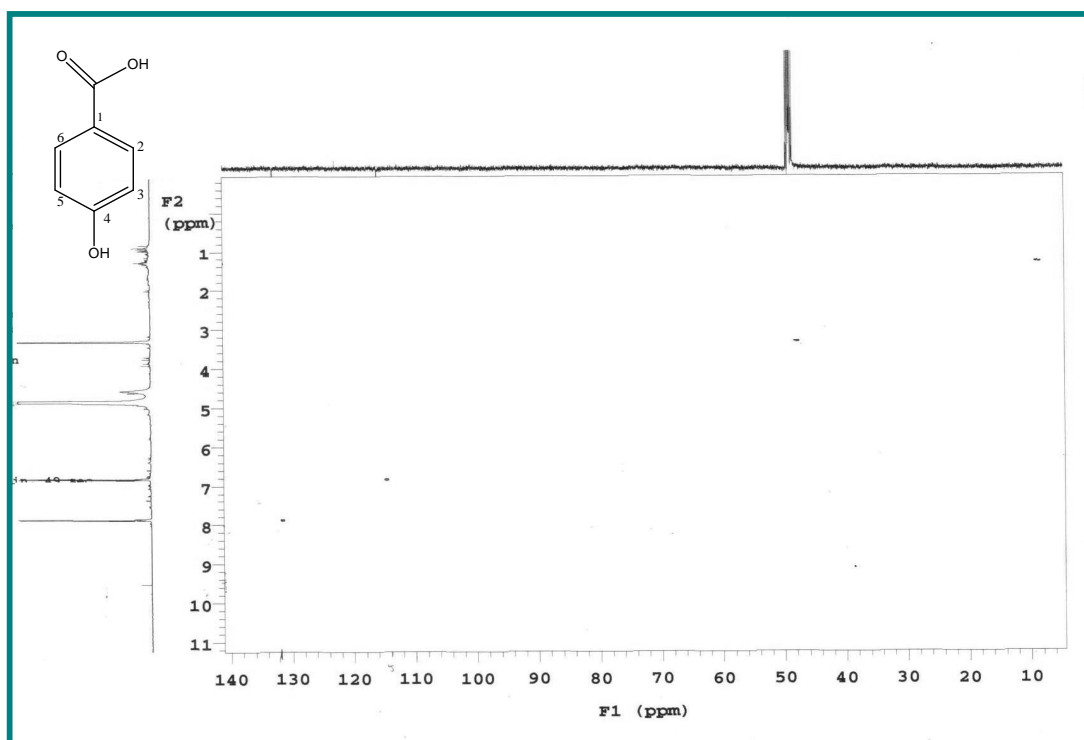


Figura 72- Espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC (500 e 125 MHz, CD_3OD) de Vm-5 .

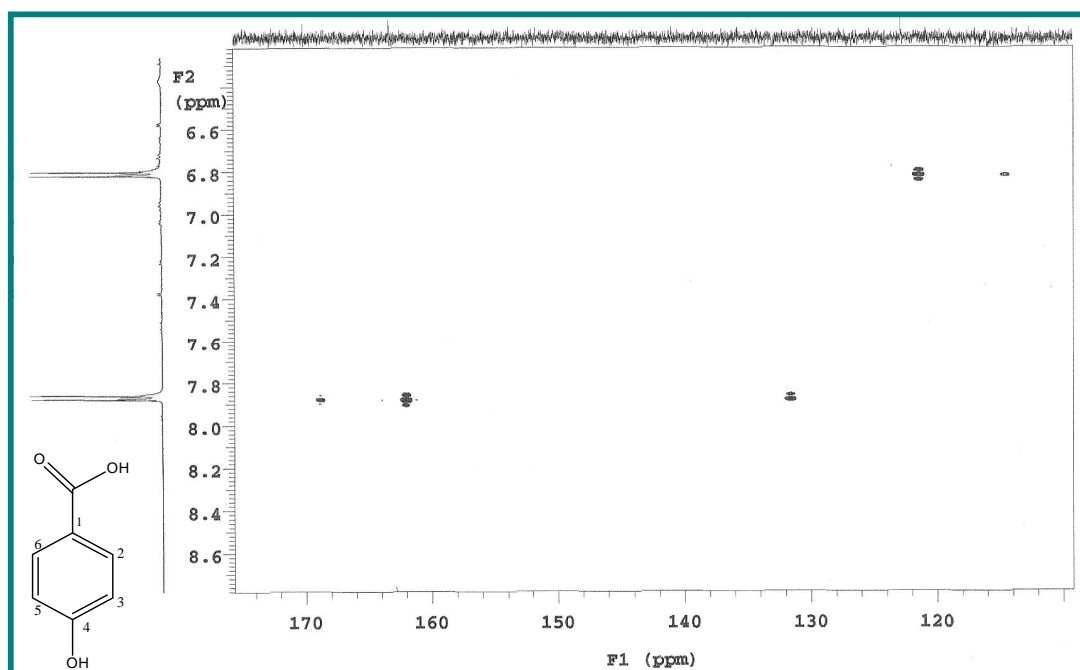
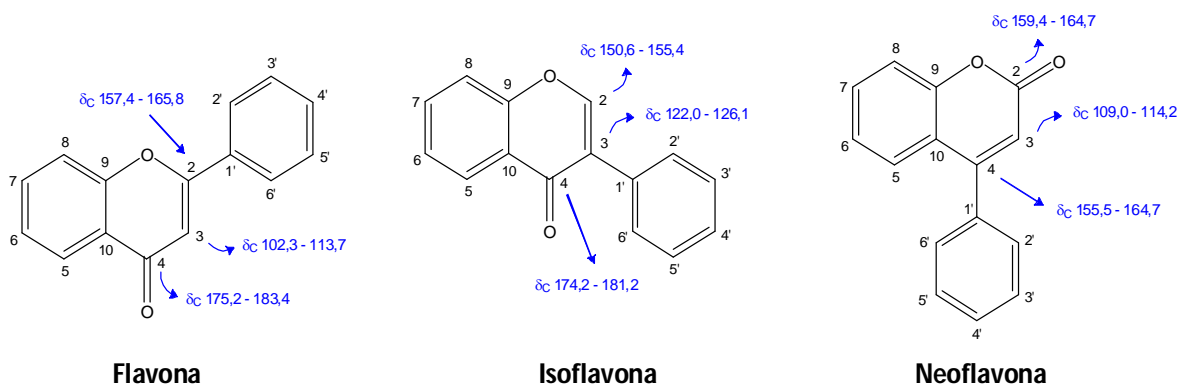


Figura 73- Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (500 e 125 MHz, CD_3OD) de Vm-5 na região de (6,6-8,6 ppm) x (110-170 ppm).

5.6 Determinação estrutural de Pc-1

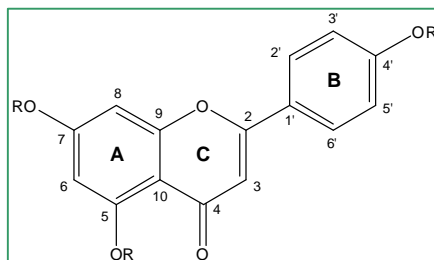
O composto codificado como Pc-1 apresentou-se como cristais amarelos, pesando 30 mg e com ponto de fusão 119-121°C.

O espectro de RMN ^{13}C - APT (50 MHz, DMSO- d_6) (Figura 74, p. 132) apresentou 15 sinais para carbonos sp^2 que são compatíveis com a unidade $\text{C}_6\text{C}_3\text{C}_6$ característica de flavonóides (ALBUQUERQUE et al., 2007). O tipo de flavonóide foi determinado por análise dos dados de RMN ^{13}C para diferentes flavonóides compilados por Agrawal (1989) e Pelter e colaboradores (1976) e mostrado abaixo:



Os sinais para carbonos sp^2 em δ_{C} 162,5 e 103,7 indicam a presença de dupla ligação em C-2 e C-3, respectivamente; bem como, o sinal em δ_{C} 182,0 é característico de carbonila em C-4, sugerindo que o flavonóide correspondia a uma flavona.

Ainda no espectro de RMN ^{13}C (Figura 74, p. 132) sinais para carbonos metínicos sp^2 em δ_{C} 98,1 (C-6) e 92,8 (C-8) inferem a presença de um anel A 5,7-dissubstituído e sinais intensos em δ_{C} 128,4 (C-2'/6') e 114,6 (C-3'/5') foram indicativos de um sistema AA'BB' de anel B com substituinte em C-4'. Indicando que Pc-1 teria o sistema de substituinte mostrado abaixo (ALBUQUERQUE et al., 2007).



O espectro de RMN de ^{13}C também apresentou dois sinais em δ_{C} 56,1 e δ_{C} 55,6, os quais foram atribuídos a duas metoxilas, não impedidas estericamente.

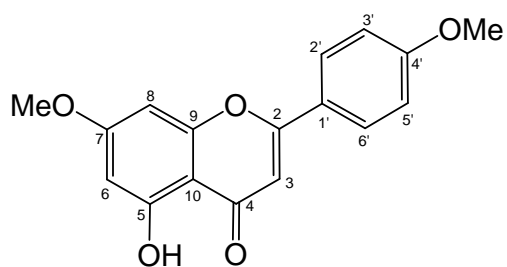
O espectro de RMN ^1H (200 MHz, DMSO- d_6) e a expansão (Figura 75 e 76, p. 133-134) apresentou deslocamentos químicos que corroboraram com a proposta do espectro de RMN ^{13}C para a presença de um esqueleto flavonoídico com o padrão de substituição em questão: dois dupletos com integral para dois hidrogênios cada, acoplando *orto* entre si, em δ_{H} 7,98 ($J = 8,6$ Hz) e 7,04 ($J = 8,6$ Hz) compatíveis com os hidrogênios H-2'/6' e H-3'/5', respectivamente, do sistema AA'BB' de anel B de flavonóide; e outros dois dubletos integrando para um hidrogênio cada, acoplando *meta* entre si, em 6,30 ($J = 2,0$ Hz) δ_{H} 6,70 ($J = 1,6$ Hz), característicos de flavonóides que possuem anel A 5,7-dissubstituído, sendo estes sinais atribuídos aos hidrogênios H-6 e H-8, respectivamente (PIZZOLATTI et al., 2003).

Um simpleto em δ_{H} 6,83 (1H) atribuído ao H-3 do anel C do flavonóide corroborou com a proposta de flavona para Pc-1. Um simpleto em δ_{H} 3,80 com integral para 6 hidrogênios permitiu confirmar a presença de duas metoxilas para a molécula. O sinal em δ_{C} 12,84 no espectro de RMN de ^1H , corroborou com a presença de hidroxila na posição 5, em ponte com a carbonila (C-4), com isso as metoxilas puderam ser inseridas em C-4' e C-7.

No espectro bidimensional HMQC (200 e 50 MHz, DMSO- d_6) e em suas expansões (Figura 77-79, p. 135-136) foi possível observar as correlações diretas entre o duplete em δ_{H} 7,98 e o carbono em δ_{C} 128,4 e entre o hidrogênio em δ_{H} 7,04 e o carbono em δ_{C} 114,6 confirmando os deslocamentos dos mesmos. As demais correlações estão descritas na tabela 8, p.131.

A análise dos dados de RMN ^{13}C citados por Agrawal (1989) e Almeida et al (2006) permitiu atribuir os demais sinais apresentados por Pc-1 (Tabela 1, p.60)

Desta forma, os dados dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (tabela 8, p. 131), bem como, comparações com os dados apresentados na literatura permitiram identificar Pc-1 como sendo 5-hidroxi- 4', 7-dimetoxiflavona, também chamado de 7,4'-dimetilapigenina, relatado pela primeira vez em *Praxelis clematidea*.



Esse flavonóide é comum na família Asteraceae e apresenta comprovada atividade gastroprotetora (BABU et al., 2010) e antiinflamatória em ratos (SALAMA; AVENDANO, 2005)

Tabela 8 – Deslocamentos químicos para os núcleos de hidrogênio e carbono treze de Pc-1, verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (200 e 50 MHz, respectivamente) em DMSO- d_6 , bem como, os deslocamentos químicos dos carbonos (δ_{C}^*) apresentados por Almeida et al (2006) para a mesma substância (50 MHz) em CDCl_3 . (δ em ppm e J em Hz).

Pc-1		HMQC	
C	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}^*
2	162,5	-	162,5
3	103,7	6,83 (s, 1H)	104,2
4	182,0	-	182,3
5	157,3	-	157,6
6	98,1	6.30 (d, $J=2.0$, 1H)	98,0
7	165,2	-	165,3
8	92,8	6.70 (d, $J=1.6$, 1H)	92,6
9	161,2	-	162,1
10	104,8	-	105,5
1'	122,7	-	123,5
2'/6'	128,4	7,98 (d, $J = 8,6$, 2H)	128,0
3'/5'	114,6	7,04 (d, $J = 8,6$, 2H)	114,4
4'	163.7	-	163,4
5-OH	-	12,84 (s, 1H)	-
7-MeOH	56,1	3,80 (s)	55,8
4'-MeOH	55,6	3,80 (s)	55,3

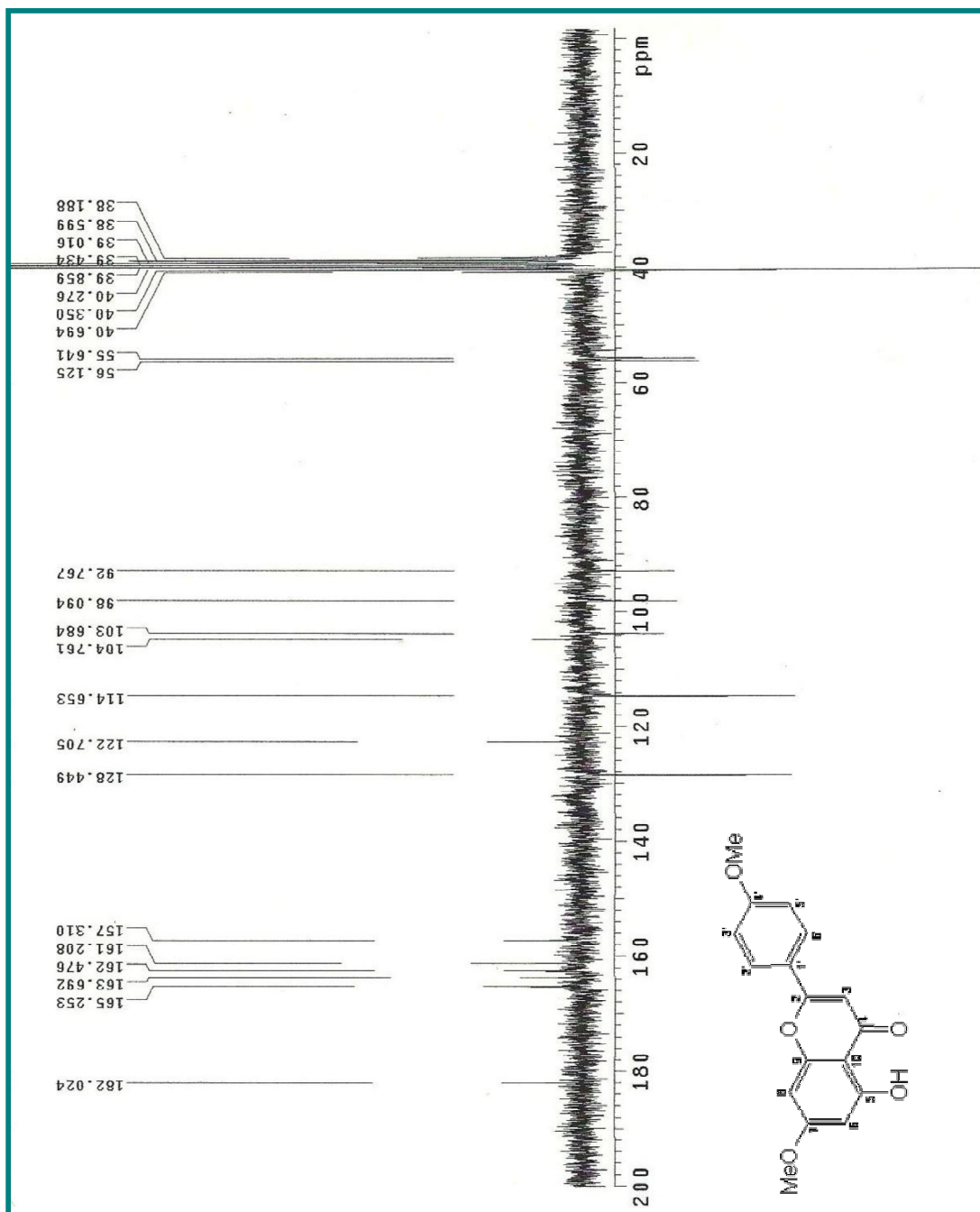


Figura 74- Espectro de RMN ^{13}C – APT (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Pc-1 .

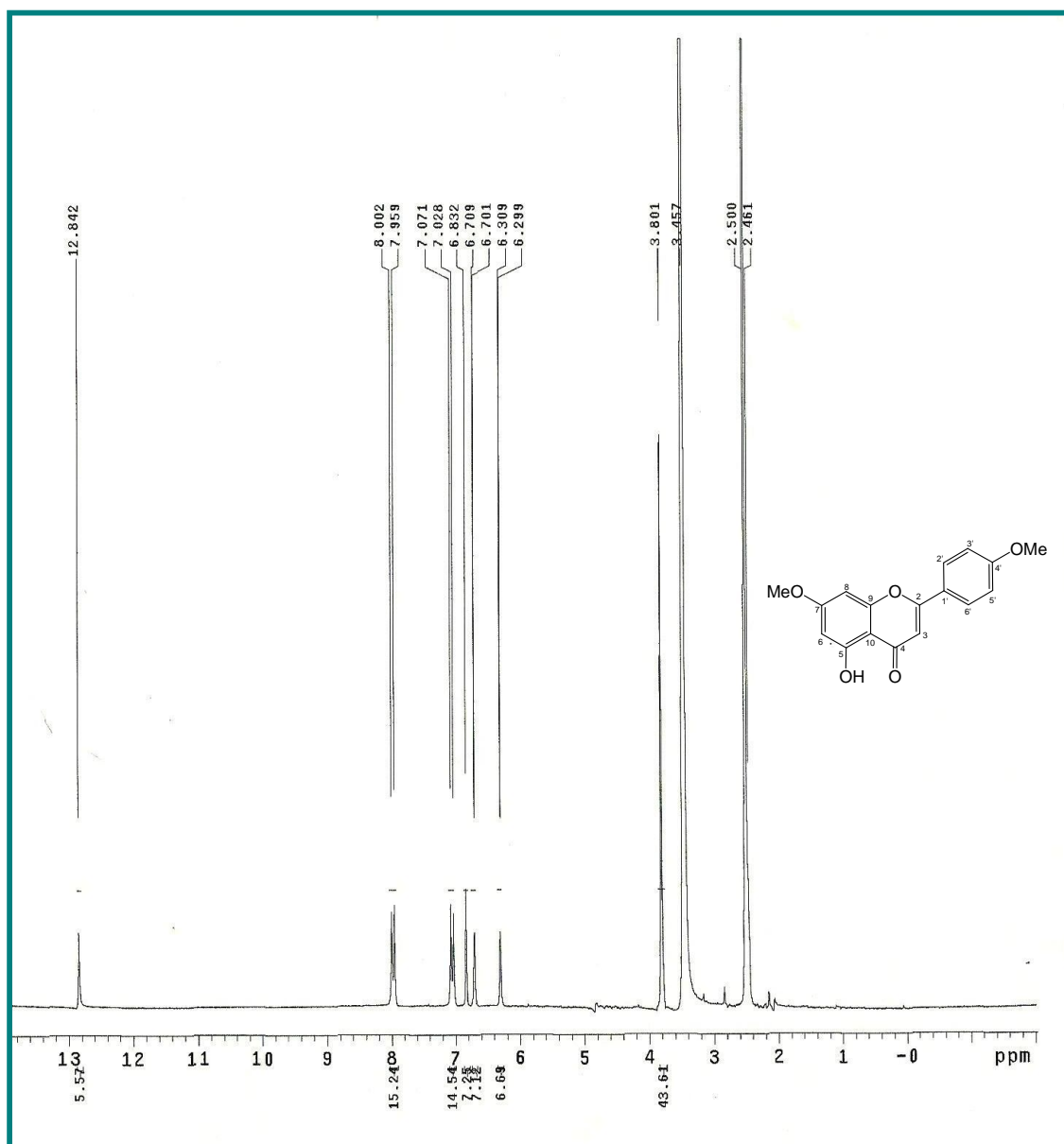


Figura 75- Espectro de RMN ^1H (200 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Pc-1.

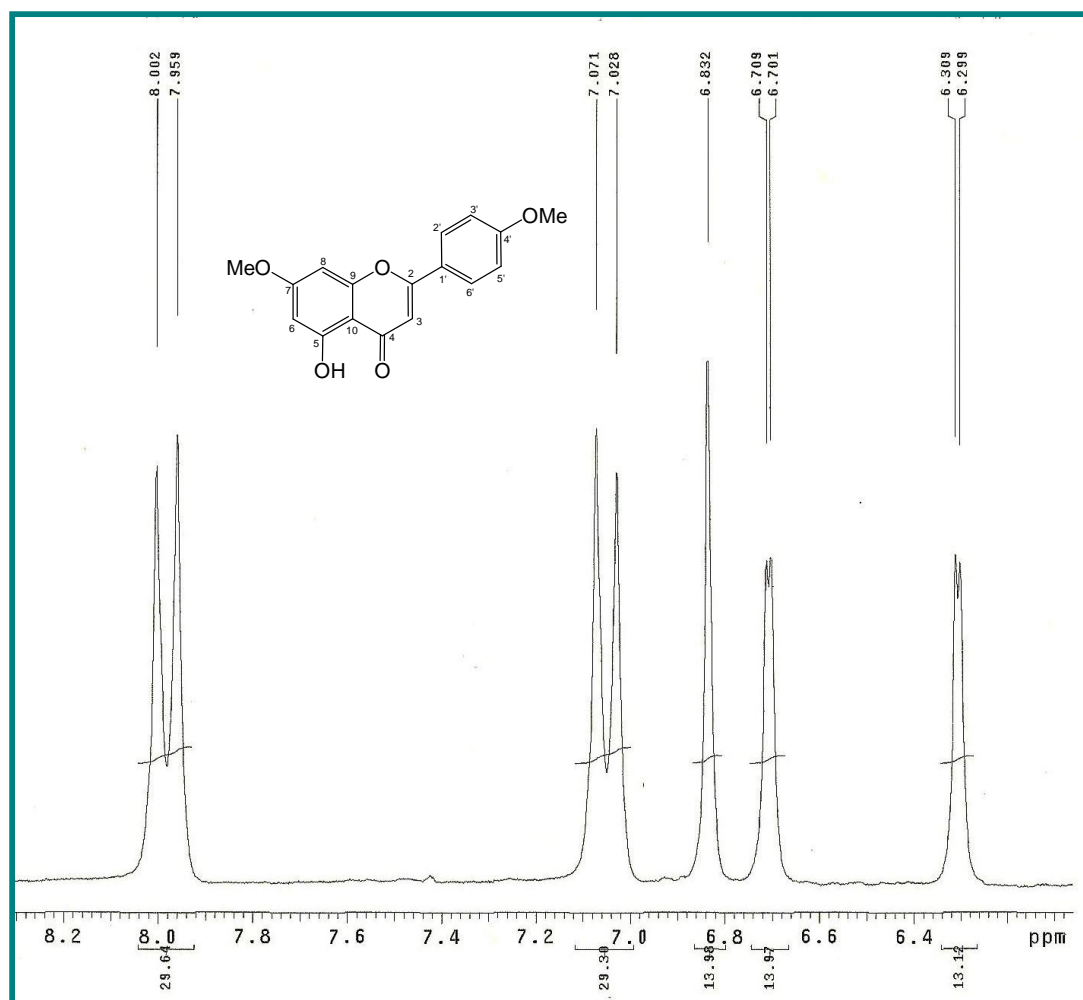


Figura 76- Expansão do espectro de RMN ^1H (200 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Pc-1.

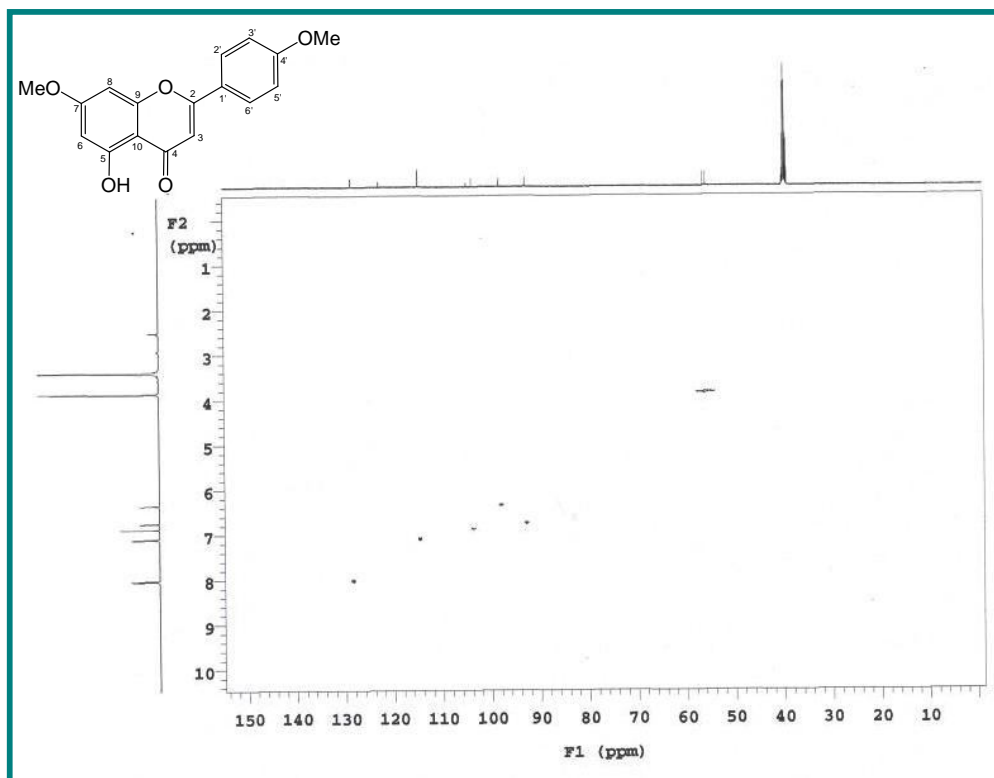


Figura 77- Espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMQC (500 e 125 MHz, DMSO- d_6) de Pc-1.

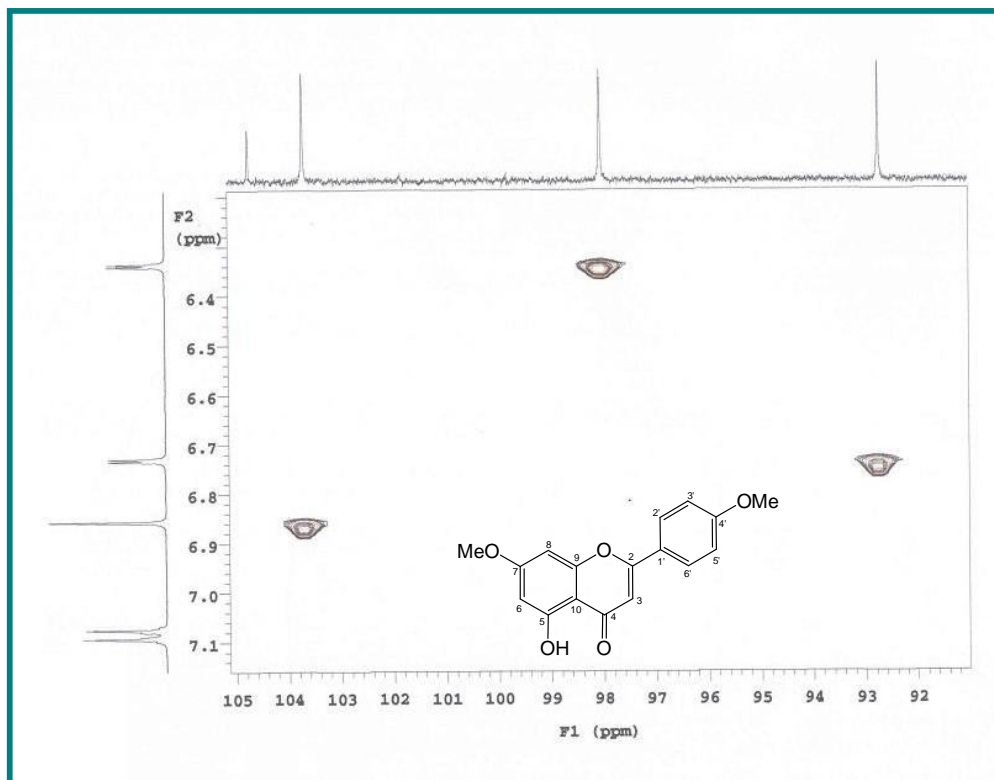


Figura 78- Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMQC (500 e 125 MHz, DMSO- d_6) de Pc-1 na região de (6,2-7,1 ppm) x (92-103 ppm).

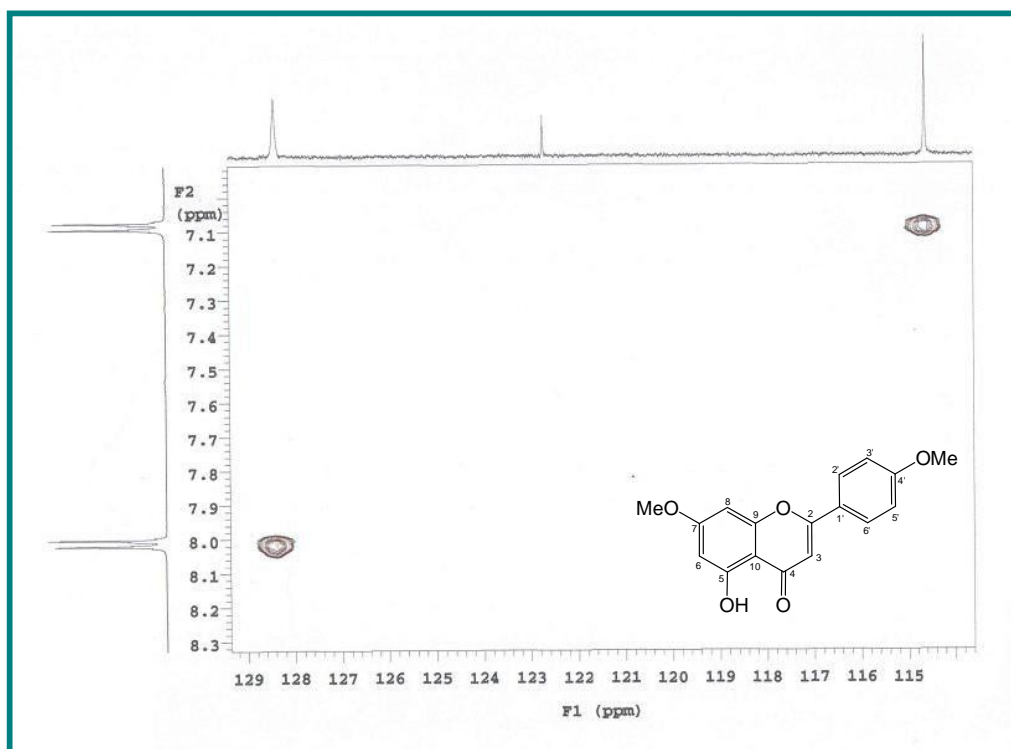
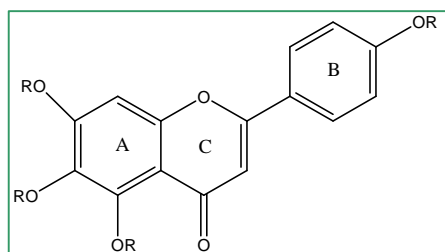


Figura 79- Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMQC (500 e 125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Pc-1 na região de (7,0-8,3 ppm) x (115-129 ppm).

5.7 Determinação estrutural de Pc-2

A substância Pc-2 também apresentou-se como cristais amarelos claros, com massa de 15,0 mg e ponto de fusão 120-124°C.

Da mesma forma que Pc-1, o espectro de RMN ^{13}C - APT (125 MHz, CDCl_3) de Pc-2 e as suas expansões (Figura 81-83, p.140-141) também apresentaram 15 sinais para carbonos sp^2 , sendo os sinais em δ_{C} 177,1 (C-4), 162,3 (C-2) e 106,4 (C-3) compatíveis com flavonóides do tipo flavona (ALBUQUERQUE et al., 2007). Ainda no espectro de RMN ^{13}C , sinais intensos em δ_{C} 127,8 (C-2'/6') e 114,4 (C-3'/5') também foram indicativos de um sistema AA'BB' de anel B com substituinte em C-4', mas diferente de Pc-1, que apresentou dois sinais para carbonos metínicos sp^2 , em Pc-2 observou-se a presença de apenas dois sinais em 106,4 (C-3) e δ_{C} 96,2 (C-8) o que permitiu sugerir um substituinte em C-6 e um anel A 5,6,7-trissubstituído (ALBUQUERQUE et al., 2007).



Ainda no espectro de RMN ^{13}C observou-se quatro sinais em δ_{C} 61,4; 62,1; 55,4 e 56,3 os quais foram atribuídos a quatro metoxilas. Os sinais em δ_{C} 61,4; 62,1 são característicos de metoxilas impedidas estericamente. O sinal em δ_{C} 177,1 (C-4), indicativo de carbonila não quelada, inferiu sobre a inexistência de hidroxila em C-5, logo uma das metoxilas estaria no C-5. (AGRAWAL, 1989).

O espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) e as expansões (Figura 84-85, p.142) apresentaram deslocamentos químicos que corroboraram com a proposta do espectro de RMN ^{13}C mostrando dois dupletos com integral para dois hidrogênios cada, acoplando *orto* entre si, em 7,81 ($J = 9,0$ Hz) e δ_{H} 6,97 ($J = 9,0$ Hz) compatíveis com os hidrogênios H-2'/6' e H-3'/5', respectivamente, do sistema AA'BB' de anel B de flavonóide; e um simpleto integrando para um hidrogênio em δ_{H} 6,92 característico de flavonóide que possuem anel A 5,6,7-trissubstituído, sendo este sinal atribuído ao hidrogênio H-8 (PIZZOLATTI et al., 2003).

Outro simpleto em δ_{H} 6,72 (1H) atribuído ao H-3 do anel C do flavonóide corroborou com a proposta de flavona para Pc-2. Três simpletos em δ_{H} 3,95 (6H),

3,88 (3H) e 3,85 (3H) permitiram inferir a presença de quatro metoxilas.

O espectro de HMQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) e suas expansões (Figura 86-89, p. 143-144) mostraram correlação direta entre os hidrogênios em δ_{H} 7,81 e o carbono em δ_{C} 127,8 e dos hidrogênios em δ_{H} 6,97 e o carbono em δ_{C} 114,4 confirmando o deslocamento dos hidrogênios e carbonos do sistema AA'BB' do anel B. Observou-se ainda as correlações dos hidrogênios em δ_{H} 3,85 com o carbono em δ_{C} 55,4, em δ_{H} 3,88 com o carbono em δ_{C} 61,4 e de δ_{H} 3,95 com os carbonos em δ_{C} 56,3 e δ_{C} 62,1, confirmando os deslocamentos das metoxilas.

No espectro de HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) e suas expansões (Figura 90-93, p. 145-146) foi possível observar a correlação a duas ligações de δ_{H} 6,78 com δ_{C} 154,5 e 157,9 e a três ligações com δ_{C} 140,1 confirmando que o sinal em δ_{C} 96,2 é referente ao carbono na posição 8.

Sendo assim, a análise dos dados de RMN ^1H e ^{13}C citados por Almeida et al (2006) permitiram atribuir os demais sinais apresentados por Pc-2 (Tabela 9, p. 139) e afirmar a mesma como sendo 4',5,6,7 tetrametoxiflavona, mais conhecido como tetrametilescutellerina relatado pela primeira vez em *Praxelis clematidea*.

O tetrametilescutellerina ocorre naturalmente em várias plantas e apresenta várias atividades dentre elas atividade antiproliferativa de células cancerosas. (DU; CHEN, 2010)

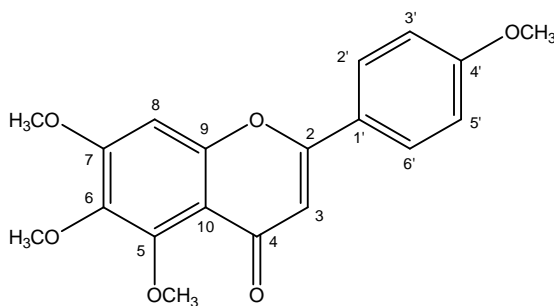
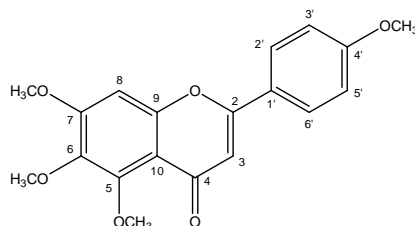


Tabela 9 – Deslocamentos químicos para os núcleos de hidrogênio e carbono treze de Pc-2, verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, respectivamente) em CDCl_3 , bem como, os deslocamentos químicos dos carbonos (δ_{C}^*) apresentados por Almeida et al (2006) para as mesmas substâncias (50 MHz) em CDCl_3 . (δ em ppm e J em Hz).



Pc-2					
HMQC			HMBC		δ_{C}^*
C	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	
2	162,3	-			162,0
3	106,4	6,72 (s, 1H)		C-10, C-1'	106,7
4	177,1	-			177,0
5	152,4	-			152,3
6	140,1	-			140,2
7	157,9	-			157,5
8	96,2	6,78 (s, 1H)	C-7, C-9	C-6	96,2
9	154,5	-			155,0
10	112,4	-			112,5
1'	123,5	-			123,6
2'/6'	127,8	7,81 (d, $J = 9,0$, 2H)	C-1'		127,5
3'/5'	114,4	6,97 (d, $J = 9,0$, 2H)		C-1'	114,3
4'	161,7	-			161,1
4'-OCH ₃	55,4	3,85 (s, 3H)			55,4
5-OCH ₃	56,3	3,95 (s, 3H)			56,2
6-OCH ₃	61,4	3,88 (s, 3H)			61,5
7-OCH ₃	62,1	3,95 (s, 3H)	C-7		62,1

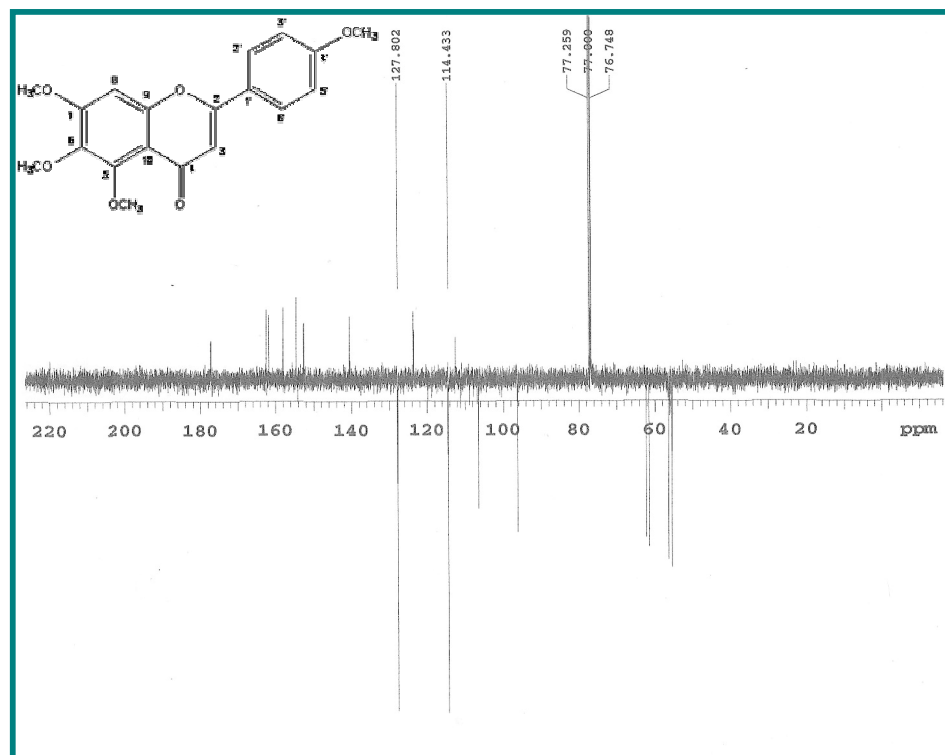


Figura 80- Espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) de Pc-2 .

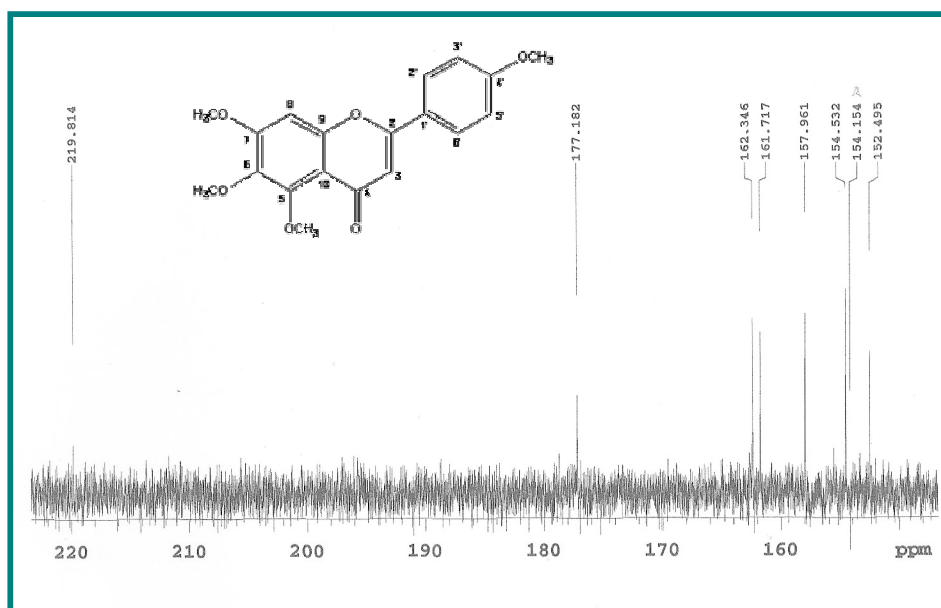


Figura 81- Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) de Pc-2 na região de 150-220 ppm.

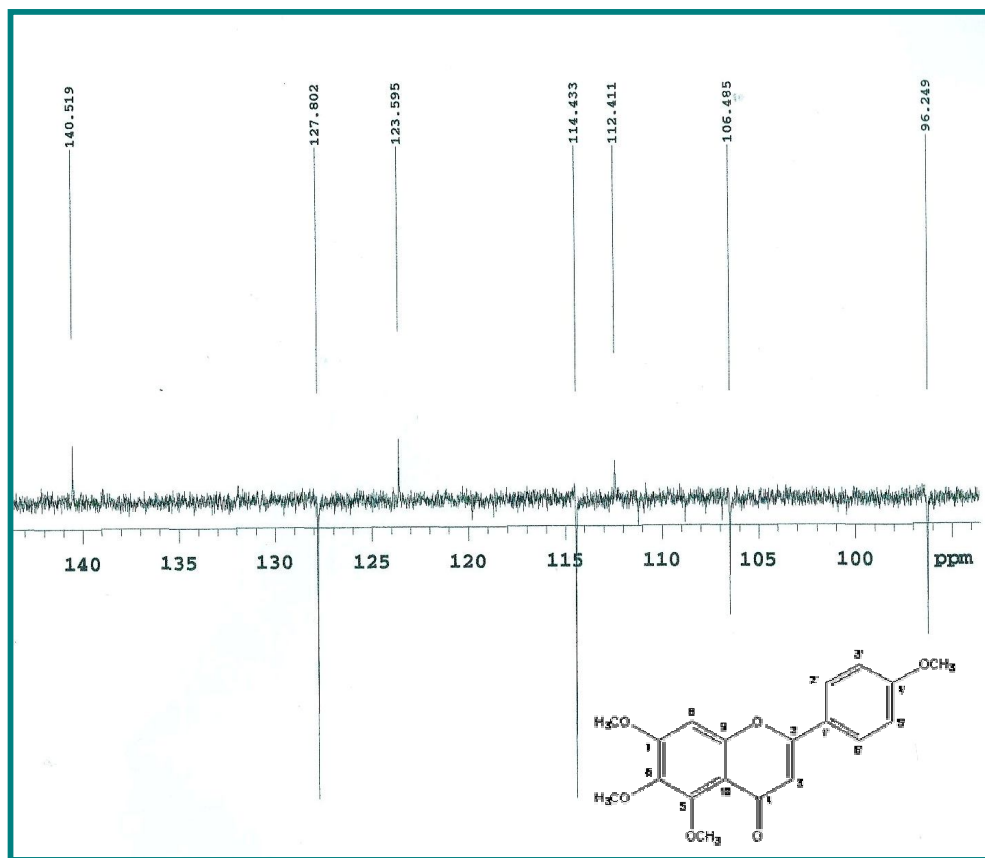


Figura 82- Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) de Pc-2 na região de 100-140 ppm.

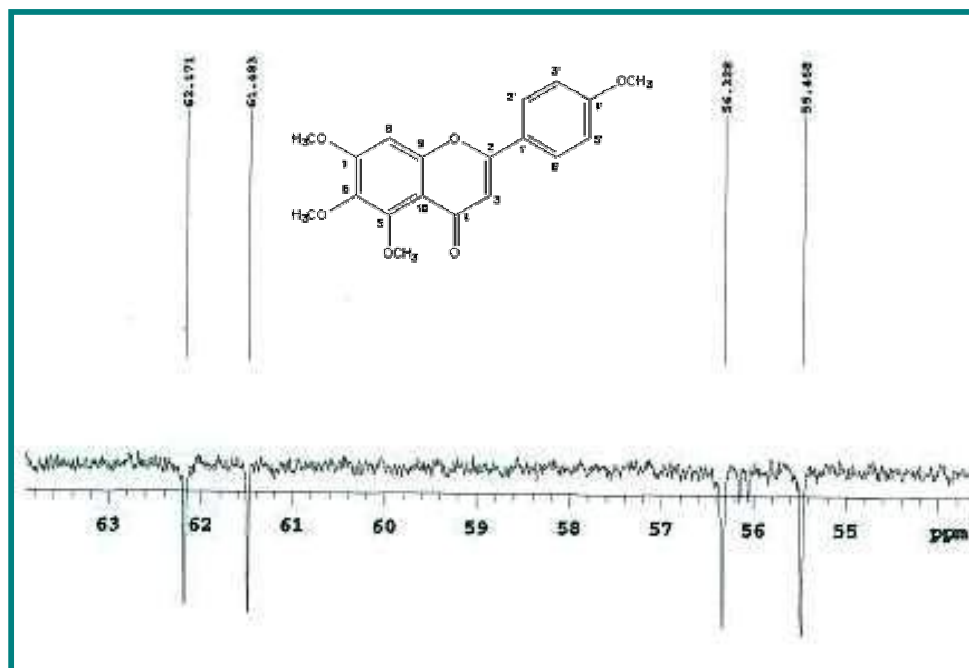


Figura 83- Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) de Pc-2 na região de 55-63 ppm.

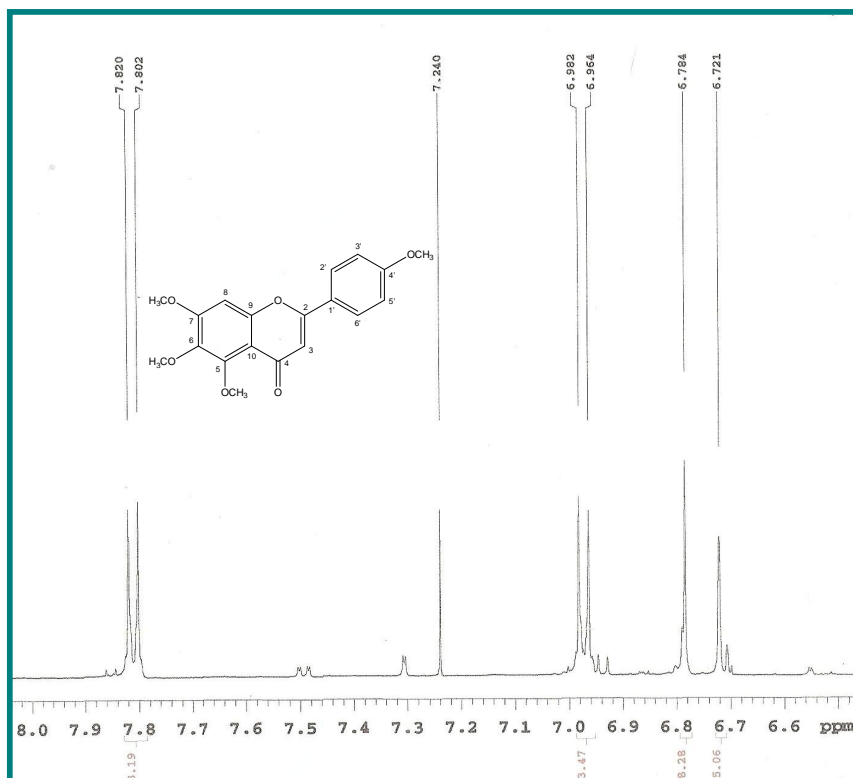


Figura 84- Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Pc-2 na região de 3,4-4,8 ppm.

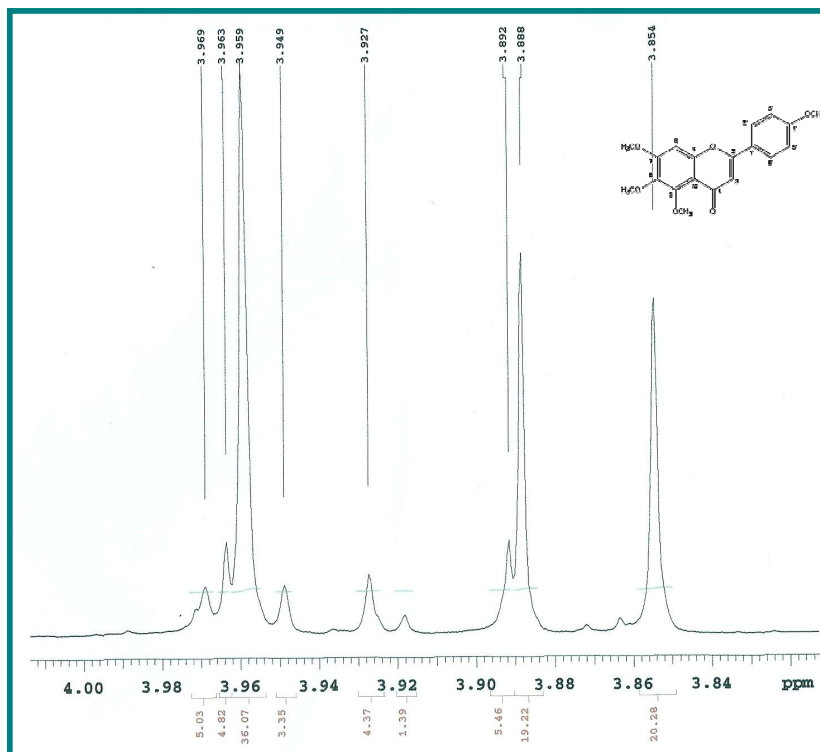


Figura 85- Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Pc-2 na região de 6,6-7,8 ppm.

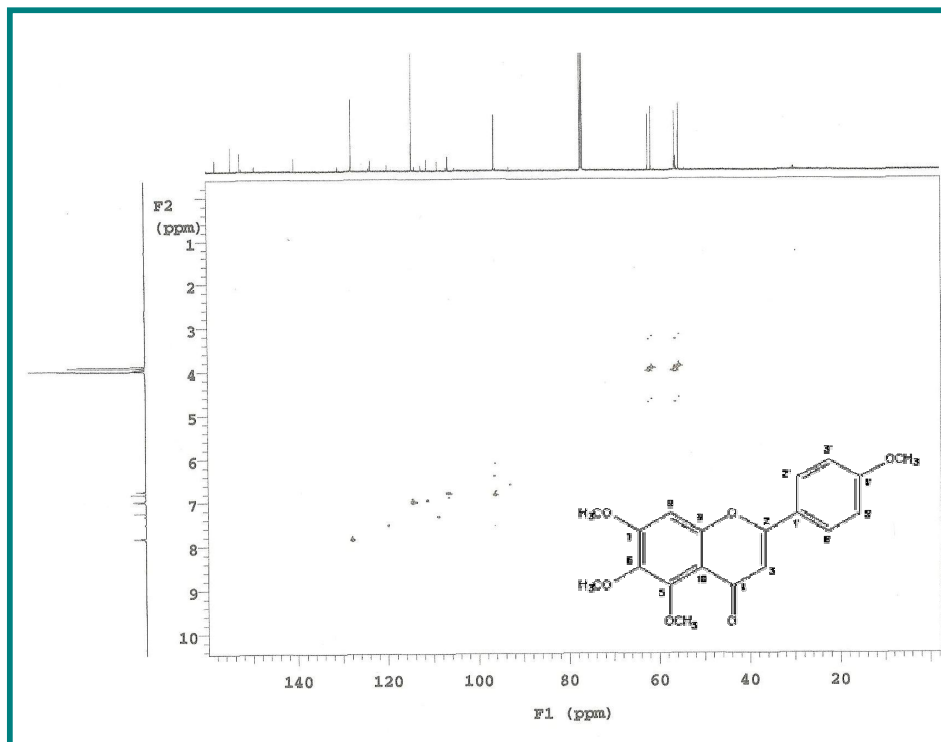


Figura 86-Espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Pc-2 na região de (1,0-10 ppm) x (20-140 ppm).

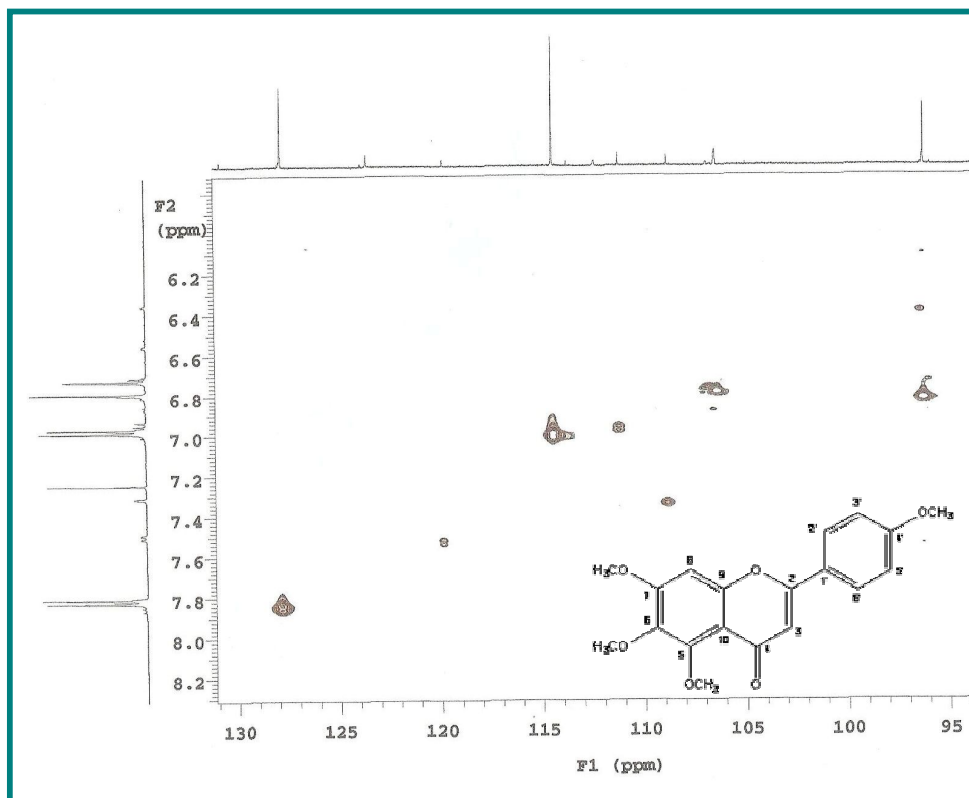


Figura 87-Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Pc-2 na região de (6,0-8,2 ppm) x (95-130 ppm).

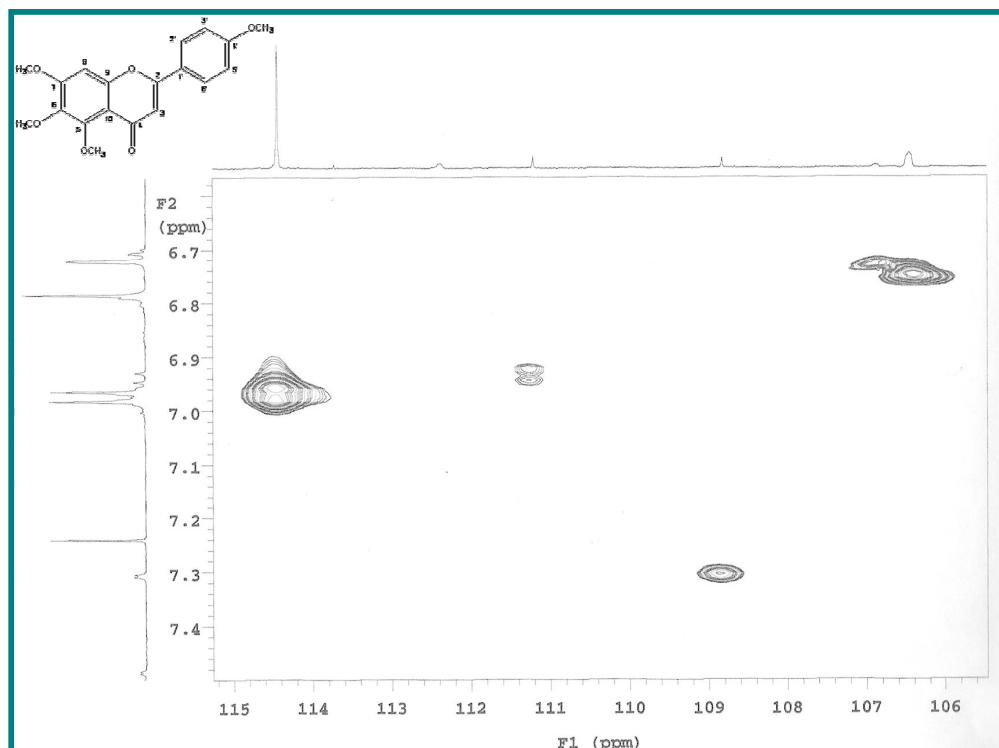


Figura 88-Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Pc-2 na região de (6,7-7,4 ppm) x (106-115 ppm).

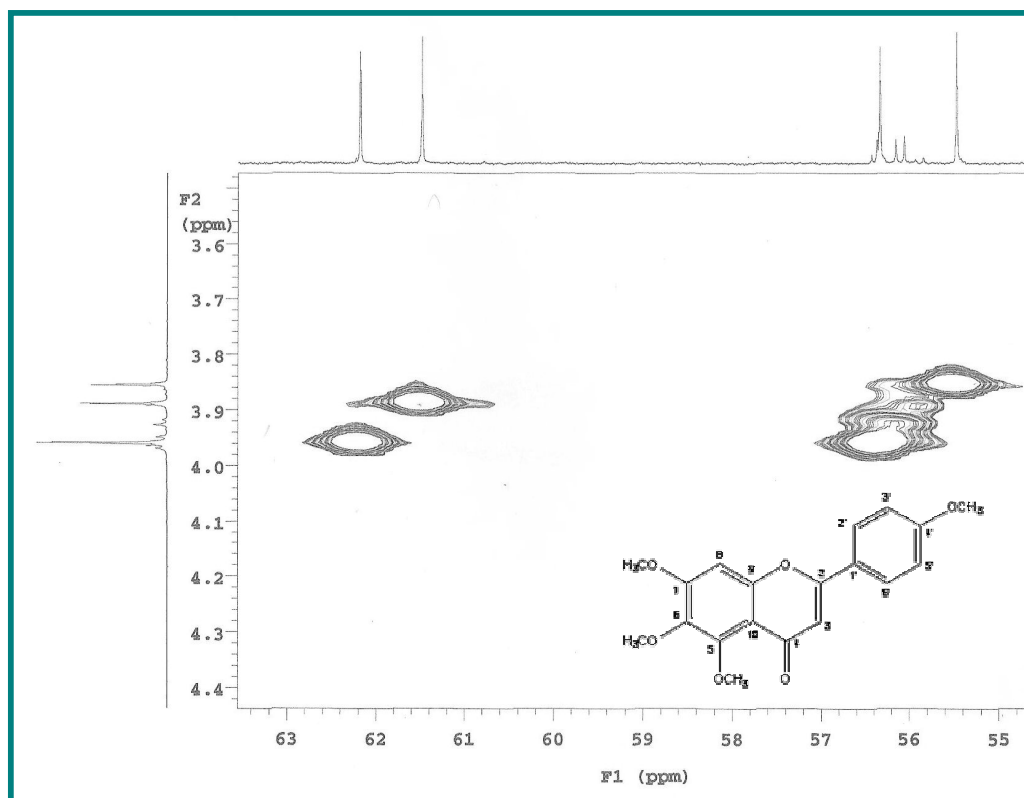


Figura 89-Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Pc-2 na região de (3,6-4,4 ppm) x (55-63 ppm).

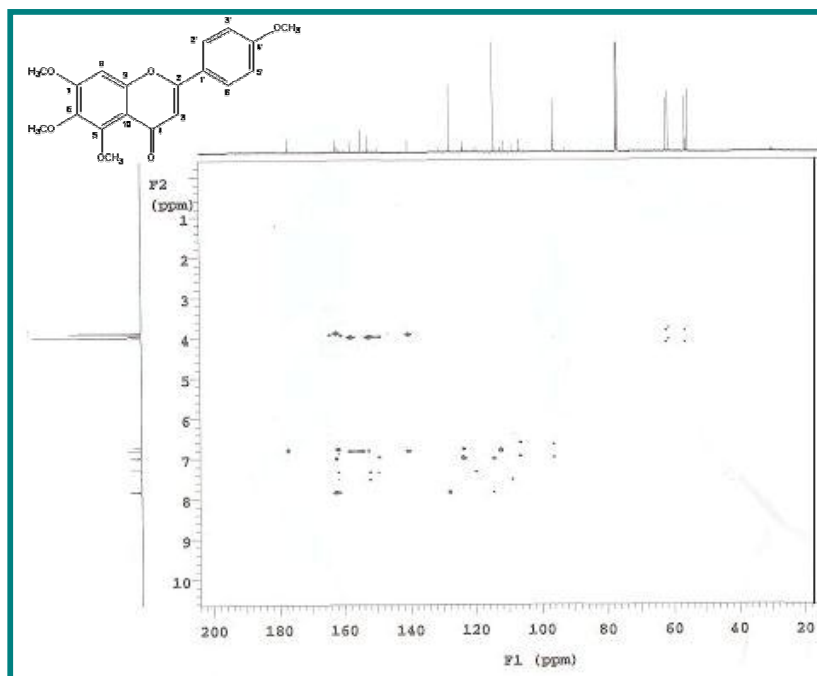


Figura 90-Espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Pc-2).

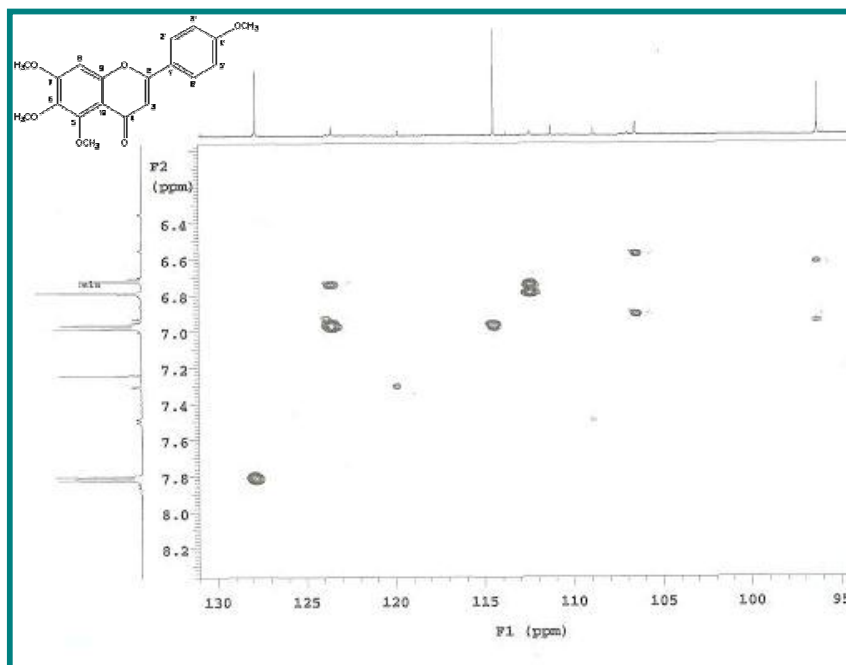


Figura 91-Expansão do e espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Pc-2 na região de (6,0-8,2 ppm) x (95-130 ppm).

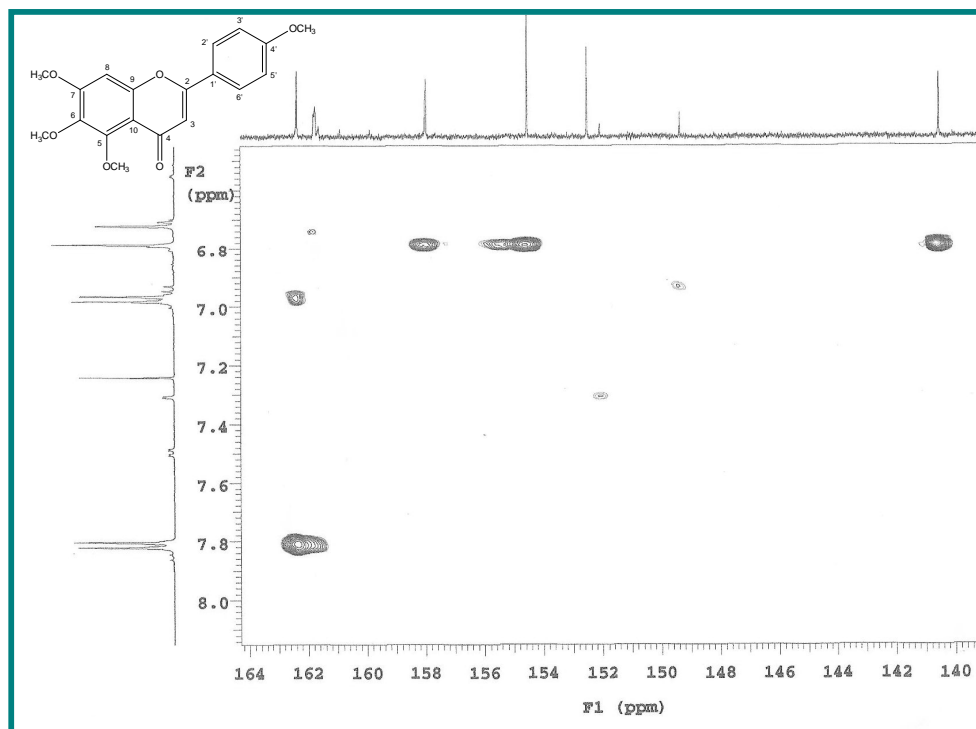


Figura 92-Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Pc-2 na região de (6,6-8,0 ppm) x (140-160 ppm).

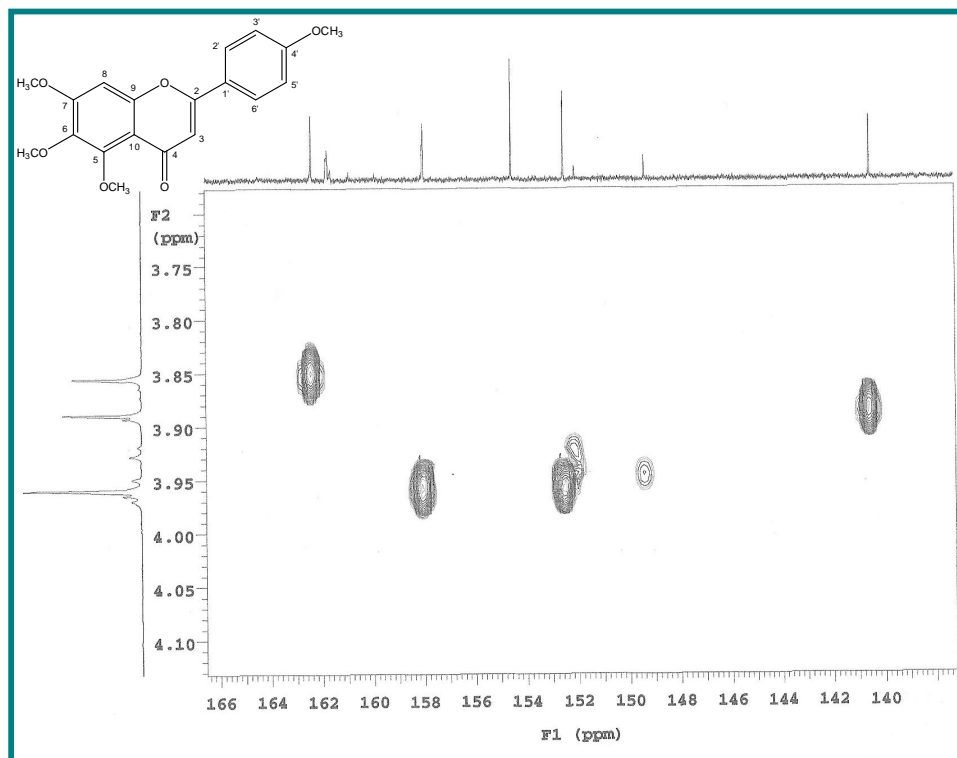
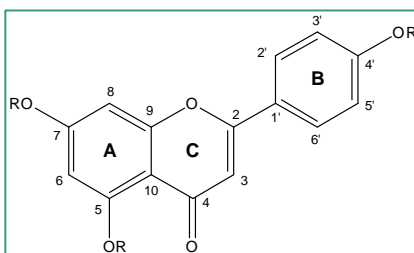


Figura 93-Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Pc-2 na região de (3,6-4,1 ppm) x (140-166 ppm).

5.8 Determinação estrutural de Pc-3.

A substância Pc-3 apresentou-se como cristais amarelos, com massa de 17,0 mg e ponto de fusão 120-122°C.

Semelhantemente as substâncias anteriores, o espectro de RMN ^{13}C - APT (125 MHz, CDCl_3) e a expansão (Figura 94, p. 150) de Pc-3 também apresentaram 15 sinais para carbonos sp^2 , com sinais indicativos de esqueleto flavonoídico do tipo flavona [δ_{C} 177,6 (C-4), 162,0 (C-2) e 107,5 (C-3)] e de sistema AA'BB' no anel B substituído em C-4' [δ_{C} 127,5 (C-2'/6') e 114,3 (C-3'/5')]. Da mesma forma que Pc-1 o anel A apresentou padrão de 5,7-dissubstituição [δ_{C} 92,8 (C-8), 96,0 (C-6)] (Figura abaixo).



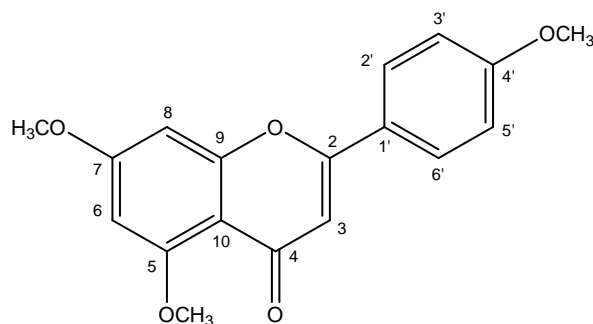
Observou-se também no espectro de RMN ^{13}C sinais indicativos da presença de três metoxilas [δ_{C} 55,4 (MeO-4'), 55,7 (MeO-7), 56,3 (MeO-5)].

O espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) e as expansões (Figura 95-97, p.151-152) apresentaram deslocamentos químicos que corroboram com os dados do espectro de RMN ^{13}C através dos deslocamentos para dois dupletos com integrais e constantes de acoplamento 7,76 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H, H2'/6') e 6,94 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H, H3'/5') que confirmam o sistema AA'BB' de anel B de flavonóide e outros dois dupletos [δ_{H} 6,31 ($J=2,5$, 1H, H-8), 6,50 ($J=2,5$, 1H, H-6)], caracterizando flavonóide com anel A 5,7-dissubstituído (PIZZOLATTI et al., 2003).

Além destes foram observados um simpleto em δ_{H} 6,54 (1H) atribuído ao H-3 do anel C do flavonóide que corroborou com a proposta de flavona para Pc-3 e sinais que confirmam a presença de três metoxilas [δ_{H} 3,83 (s, 3H, MeO-4'), 3,86 (s, 3H, MeO-5), 3,90 (s, 3H, MeO-7)].

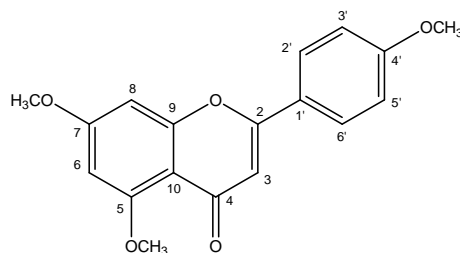
As correlações diretas entre hidrogênios e carbonos observadas no espectro de HMQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) (Figura 98-99, p. 153) permitiram confirmar os deslocamentos dos carbonos e seus respectivos hidrogênios (Tabela 10, p.149).

Por meio destes dados e por comparação com a literatura (tabela 10, p. 149) pudemos identificar Pc-3 como sendo 5,7, 4'-trimetoxiflavona conhecido como trimetilapigenina isolada pela primeira vez em *Praxelis clematidea*.



A trimetilapigenina além de ser antioxidante (JEONG et al, 2007) apresenta atividade plasmodial contra o *Plasmodium falciparum* (YENJAI et al, 2004) e atividade anti-helmintica *in vitro* (AYERS et al.; 2008)

Tabela 10 – Deslocamentos químicos para os núcleos de hidrogênio e carbono treze de Pc-3, verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, respectivamente) em CDCl_3 , bem como, os deslocamentos químicos dos carbonos (δ_{C}^*) apresentados por Almeida et al (2006) para as mesmas substâncias (50 MHz) em CDCl_3 (δ em ppm e J em Hz).



Pc-3		HMQC	
C	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}^*
2	162,0	-	161,9
3	107,5	6,54 (s, 1H)	107,2
4	177,6	-	177,4
5	159,8	-	159,6
6	96,0	6,50 (d, $J=2,5$, 1H)-	95,9
7	163,9	-	163,8
8	92,8	6,31 (d, $J=2,5$, 1H)	92,6
9	160,7	-	160,6
10	109,1	-	108,0
1'	123,7	-	123,5
2'/6'	127,5	7,76 (d, $J = 9,0$, 2H)	127,4
3'/5'	114,3	6,94 (d, $J = 9,0$, 2H)	114,2
4'	160,8	-	159,6
5-OCH ₃	56,3	3,90 (s, 3H)	56,3
7-OCH ₃	55,7	3,86 (s, 3H)	55,7
4'-OCH ₃	55,4	3,83 (s, 3H)	55,4

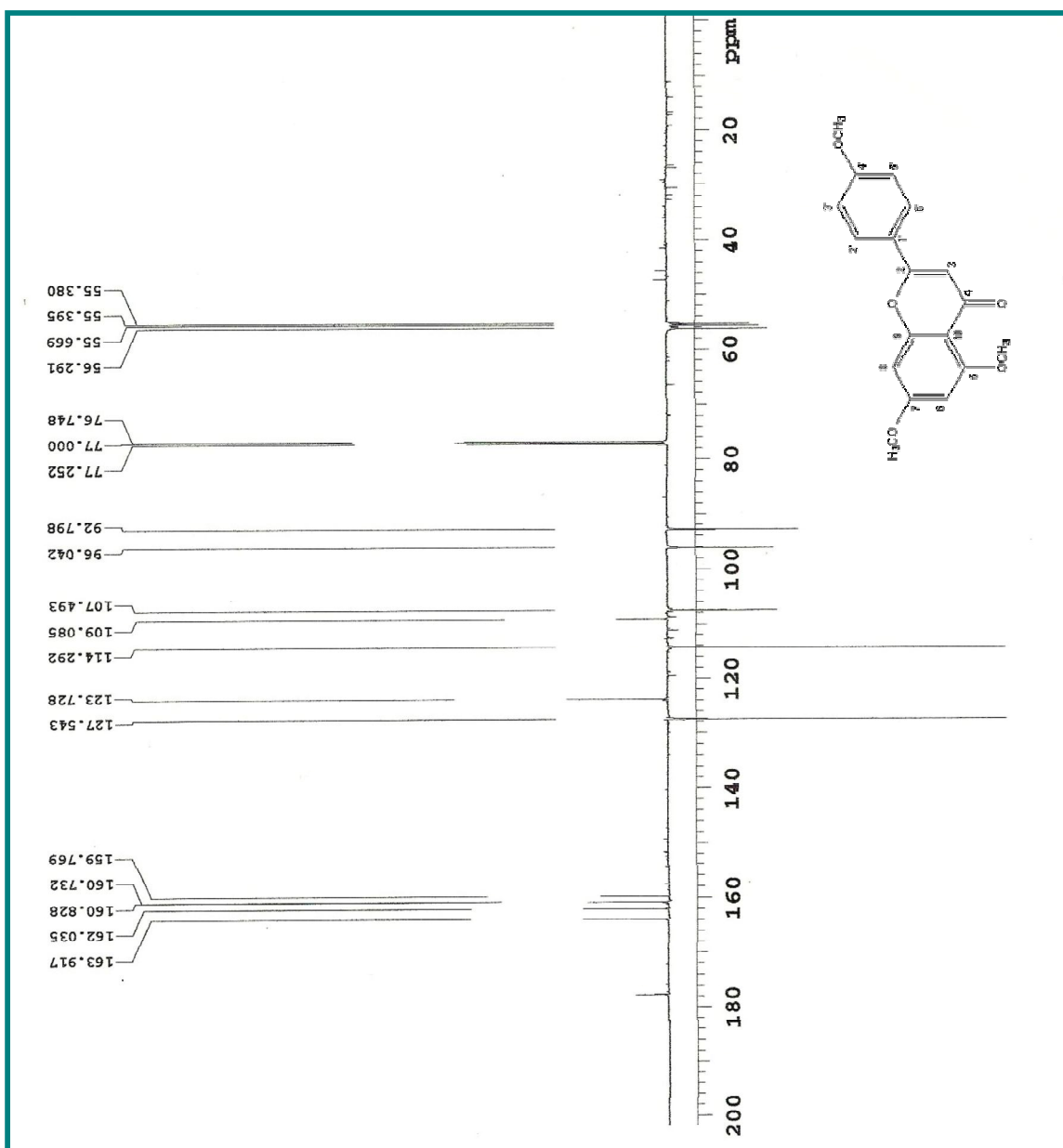


Figura 94- Espectro de RMN de ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) de Pc-3.

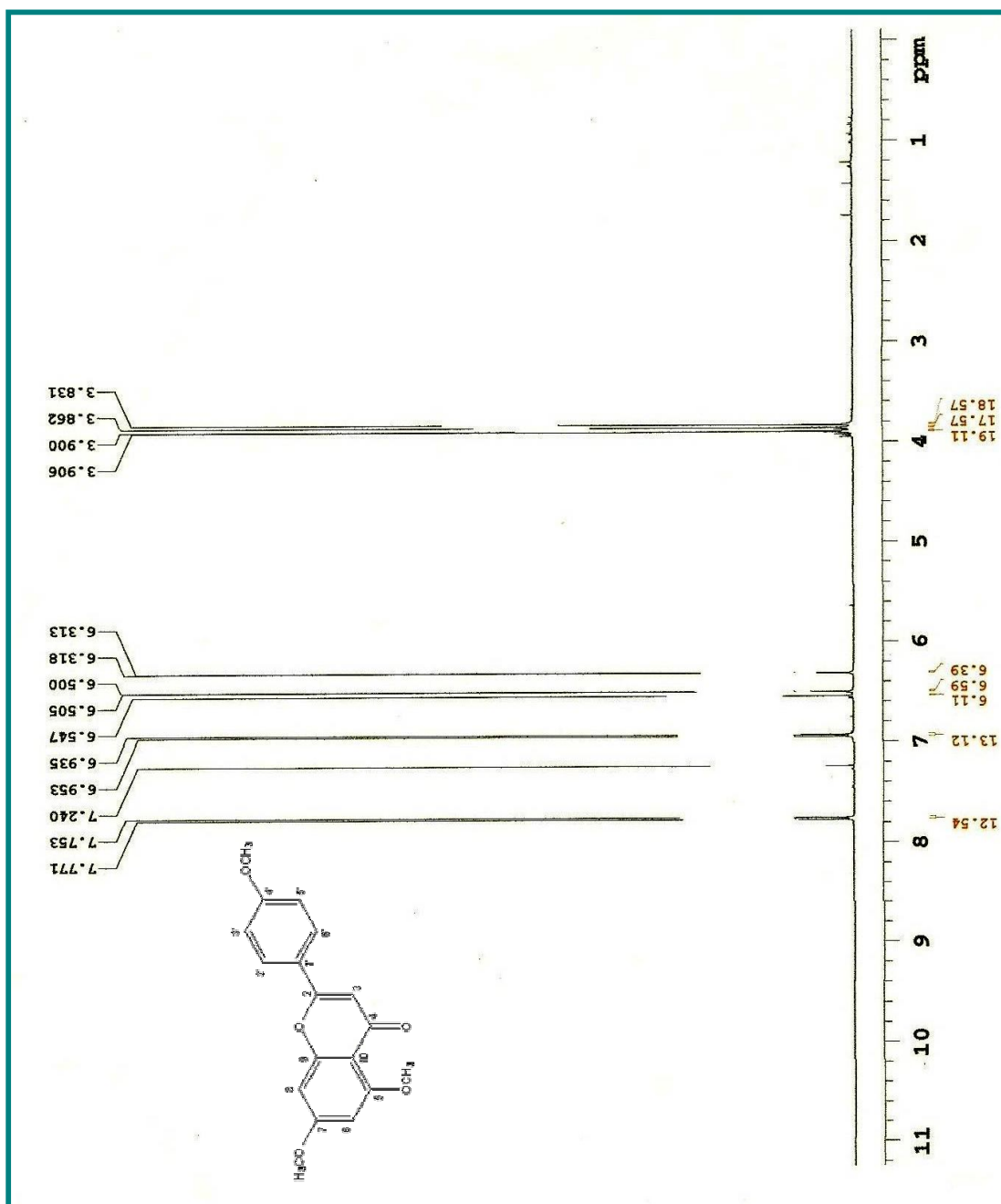


Figura 95- Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Pc-3.

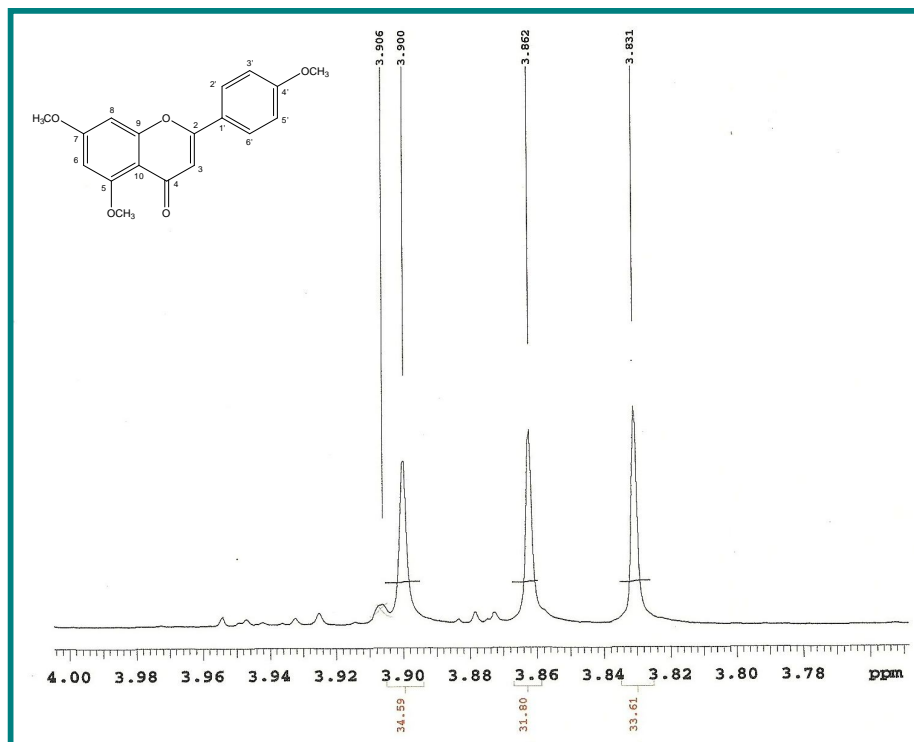


Figura 96-Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Pc-3 na região de 3,78-4,0 ppm.

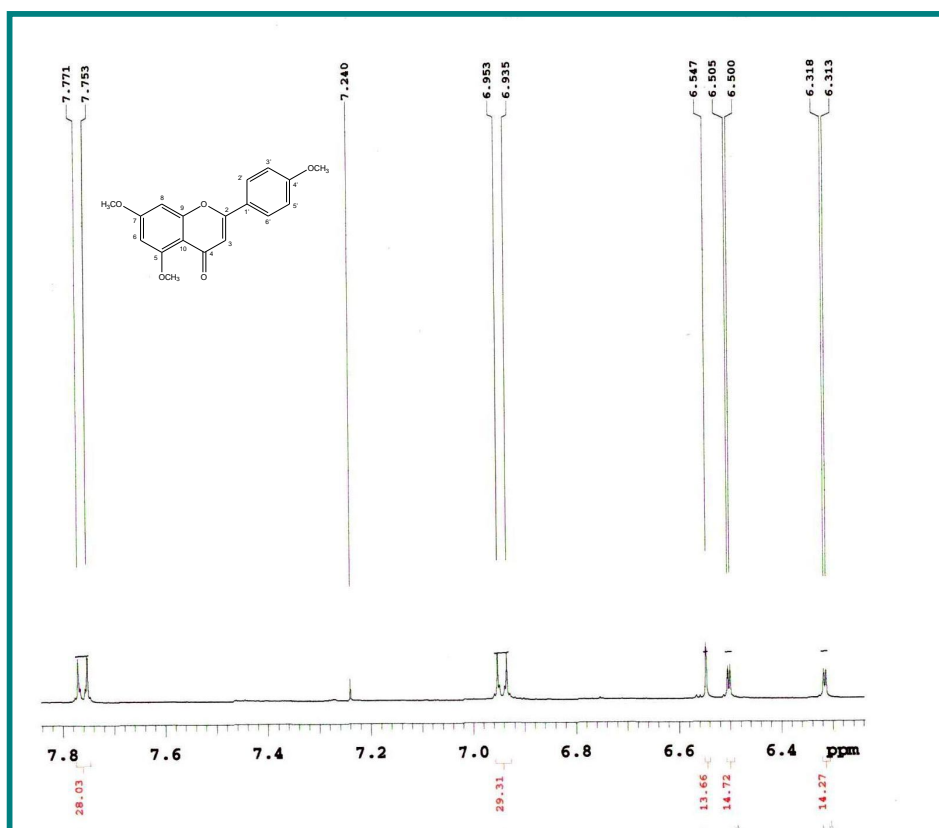


Figura 97- Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Pc-3 na região de 6,4-7,8 ppm.

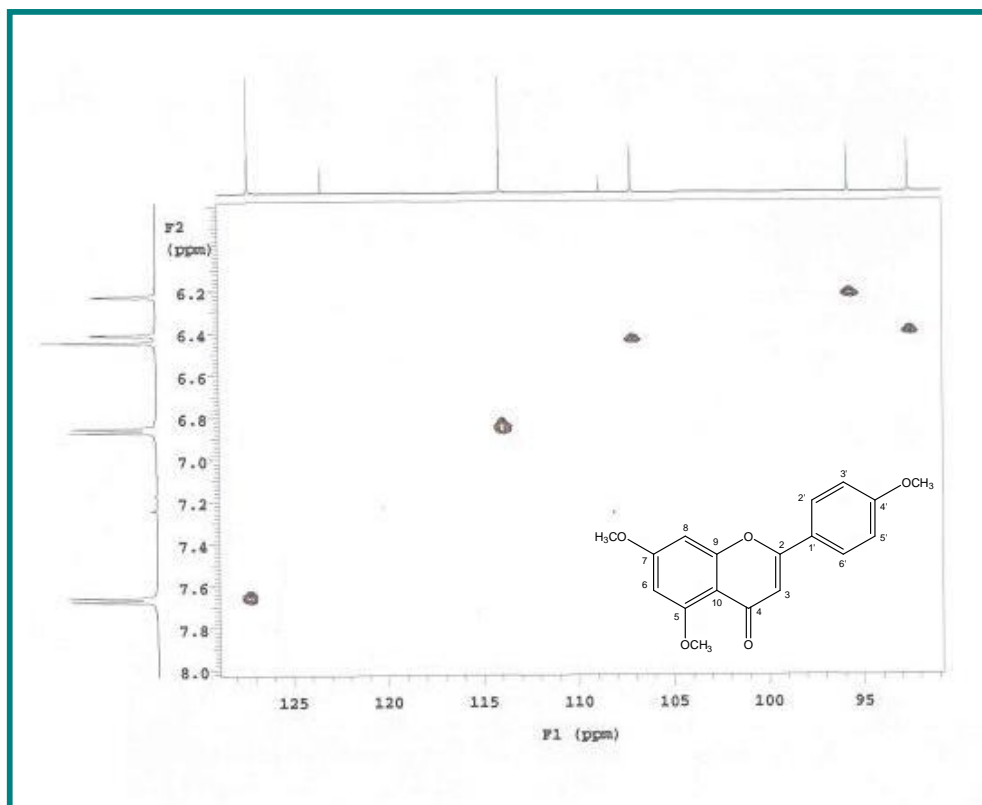


Figura 98- Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Pc-3 na região de (6,1-8,0 ppm) x (95-125 ppm).

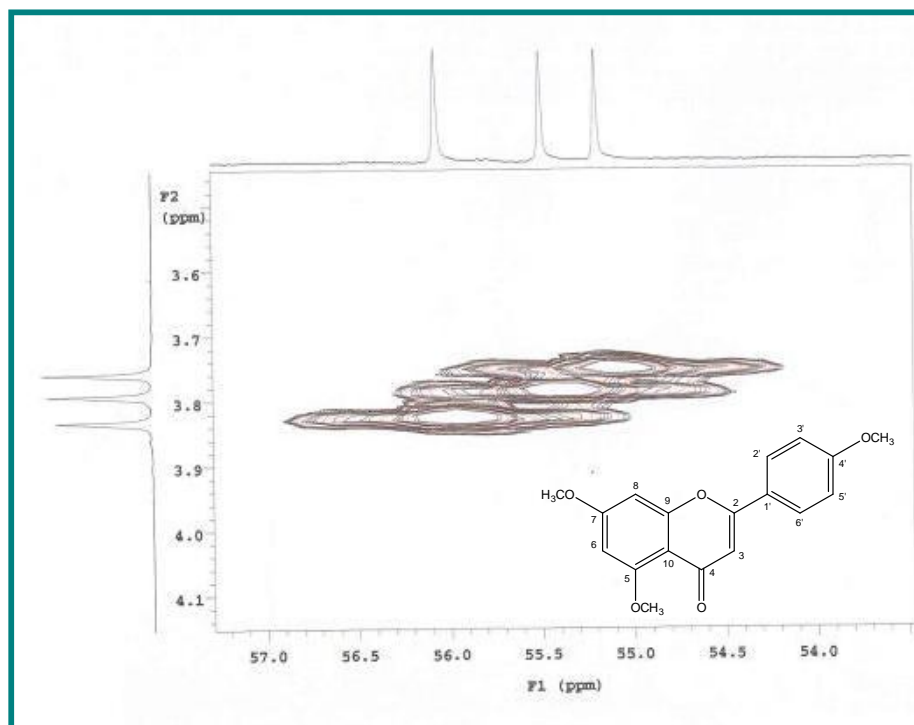


Figura 99- Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Pc-3 na região de (3,5-4,1 ppm) x (54-57 ppm).

5.9 Determinação estrutural de PC-4

O composto codificado como Pc-4 apresentou-se como cristais amarelos, pesando 20 mg e ponto de fusão 267-270°C.

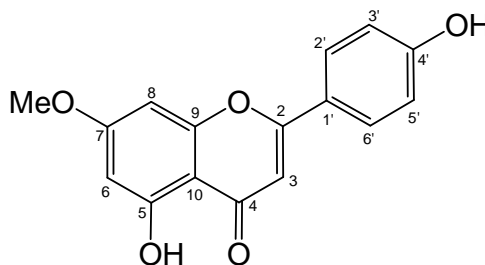
O espectro de RMN ^{13}C - APT (50 MHz, DMSO- d_6) (Figura 100, p.156) apresentou sinais que caracterizaram o composto, assim como os anteriores, como um flavonóide do tipo flavona [δ_{C} 164,0 (C-2), 103,0 (C-3), 182,0 (C-4)], com um anel A 5,7-dissubstituído (δ_{C} 92,7 (C-8) e δ_{C} 98,0 (C-6)] e um sistema AA'BB' de anel B com substituinte em C-4' [δ_{C} 128,5 (C-2'/6') e 116,0 (C-3'/5')] (ALBUQUERQUE et al., 2007).

Ainda no espectro de RMN ^{13}C (Figura 100, p. 156) o sinal em δ_{C} 56,1 é indicativo da presença de uma metoxila.

O espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) e as expansões (Figura 101-102, p. 157) revelaram a presença de dois dupletos acoplando orto [δ_{H} 6.92 ($J=9,0$ Hz, H-3/5') e 7.96 ($J=8,8$ Hz, 1H, H-2'/6')] e outros dois dupletos integrando para um hidrogênio cada, acoplando *meta* entre si, em δ_{H} 6,37 ($J = 2,0$ Hz) e 6,77 ($J = 1,8$ Hz), corroboraram com os dados do espectro de RMN ^{13}C - APT para flavona com o padrão de substituição em questão (PIZZOLATTI et al., 2003). Um simpleto em δ_{H} 3,86 com integral para 3 hidrogênios permitiu confirmar a presença de uma metoxila para a molécula. A observação do deslocamento da carbonila (δ_{C} 182,0) no RMN ^{13}C permitiu inferir a presença de hidroxila em C-5.

A análise dos dados do RMN ^{13}C mais a comparação com dados da literatura [Agrawal (1989) e Almeida et al (2006)] permitiu atribuir os demais sinais apresentados por Pc-4 (Tabela 11, p. 155).

Desta forma, os dados dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C , bem como, comparações com os dados apresentados na literatura permitiram identificar Pc-4 como sendo 4', 5-dihidroxi-7'-metoxiflavona também chamada de genkwanina e relatado pela primeira vez em *Praxelis clematidea*.



A genkwanina apresenta atividade antioxidante (LU et al., 2008) e antimicrobiana (KUETE et al., 2011).

Tabela 11 – Deslocamentos químicos para os núcleos de hidrogênio e carbono treze de Pc-4, verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, respectivamente) em DMSO- d_6 , bem como, os deslocamentos químicos dos carbonos (δ_{C}^*) apresentados por Almeida et al (2006) para as mesmas substâncias (50 MHz) em CDCl_3 (δ em ppm e J em Hz).

Pc-4			
C	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}^*
2	164,1	-	164,8
3	103,0	6,85 (s, 1H)	104,1
4	182,0	-	182,8
5	157,2	-	158,1
6	98,0	6.77 (d, $J=1.8$, 1H)	98,6
7	165,1	-	165,8
8	92,7	6.37 (d, $J=2.0$, 1H)	92,9
9	161,3	-	162,9
10	104,7	-	105,9
1'	121,0	-	122,1
2'/6'	128,6	7,96 (d, $J = 8,8$, 2H)	129,0
3'/5'	116,0	6,92 (d, $J = 9,0$, 2H)	116,9
4'	161.2	-	162,7
7-OCH₃	56,1	3,86 (s, 3H)	56,0

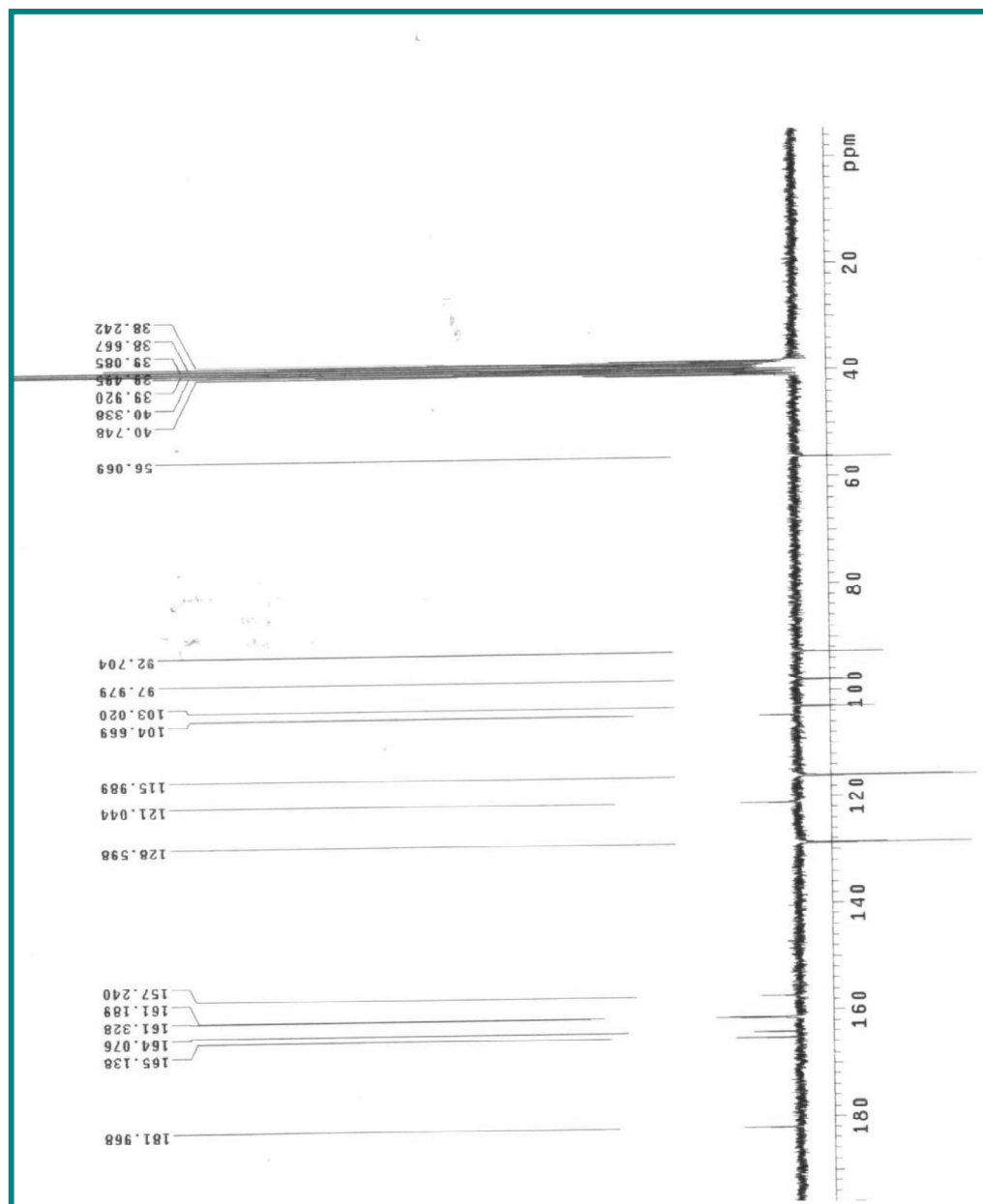


Figura 100- Espectro de RMN ^{13}C -APT (50 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Pc-

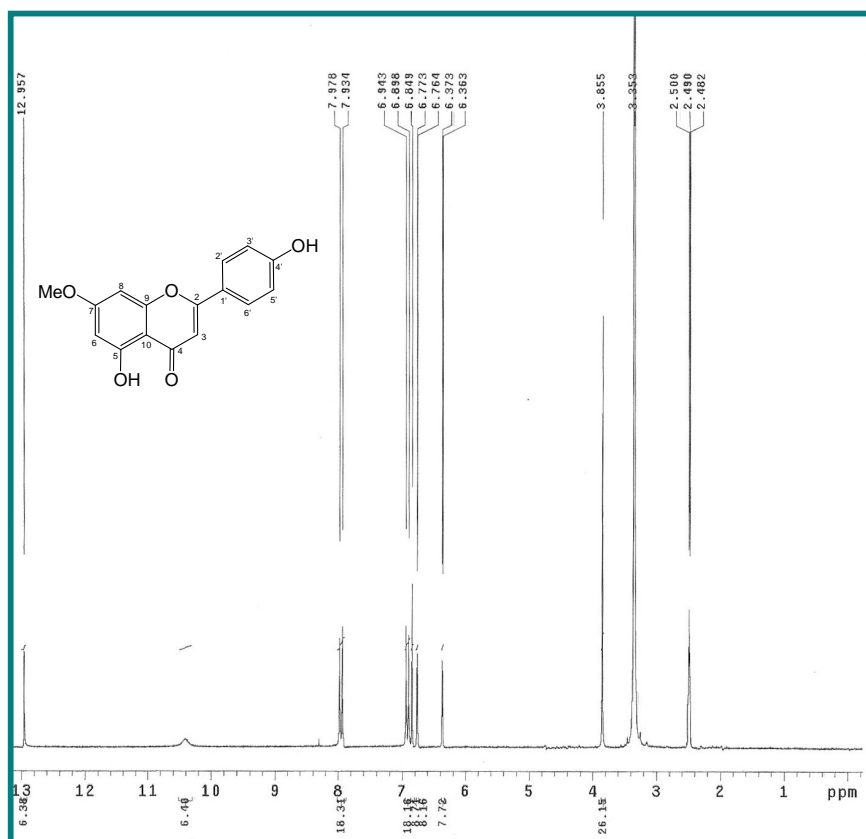


Figura 101- Espectro de RMN ^1H (200 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Pc-4.

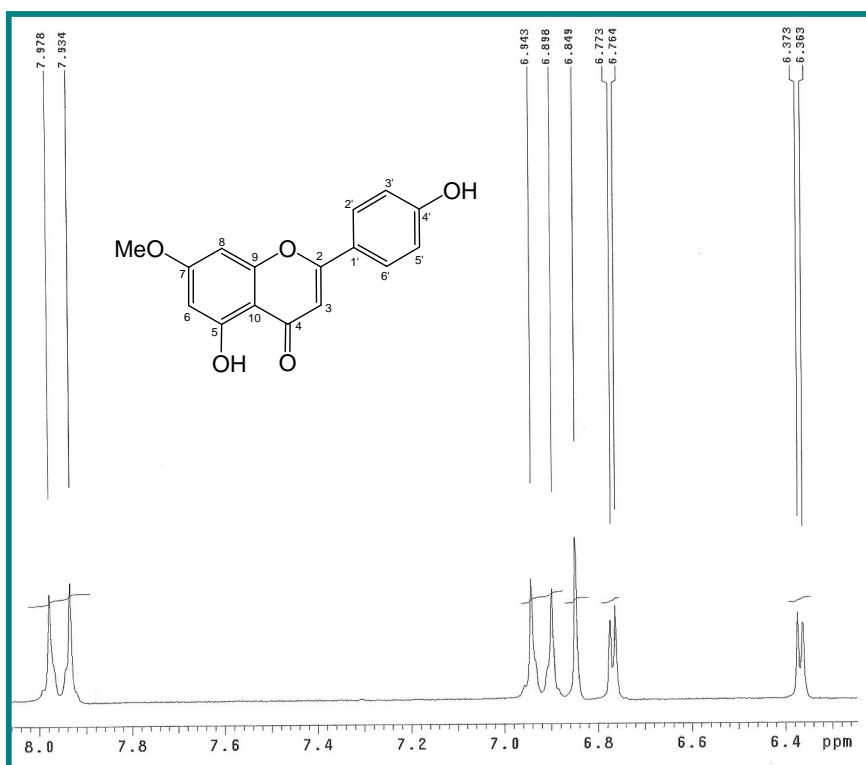
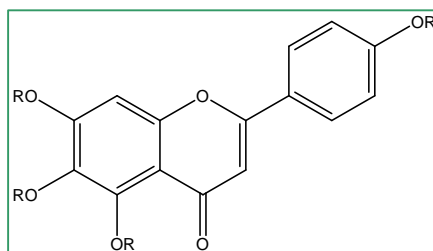


Figura 102- Expansão do espectro de RMN ^1H (200 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Pc-4.

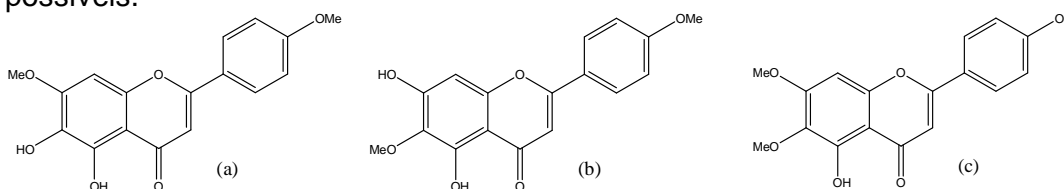
5.10 Determinação estrutural de Pc-5

A substância Pc-5 apresentou-se como cristais amarelos, com massa de 80 mg, com ponto de fusão 258-260 °C

O espectro de RMN ^{13}C - BB (125 MHz, DMSO- d_6) (Figura 103, p. 161) também apresentou sinais compatíveis com flavonóides do tipo flavona [δ_{C} 102.6 (C-3); 164.0 (C-2), 182.1 (C-4)], com sistema AA'BB' de anel B com substituinte em C-4' [δ_{C} 128,4 (C-2'/6') e 115,9 (C-3'/5')]. Semelhante a Pc-2 foi observado apenas um sinal para carbono metínico sp^2 em δ_{C} 91,5 (C-8) que permitiu sugerir a presença de um substituinte em C-6 e um anel A 5,6,7-trissubstituído, como mostrado na figura abaixo (ALBUQUERQUE et al., 2007).



Ainda nesse espectro de RMN ^{13}C observou-se dois sinais em δ_{C} 56,3 e 59,9 os quais foram atribuídos a duas metoxilas. O espectro de RMN de ^1H e suas expansões (Figuras 104-106, p. 162-163) apresentaram deslocamentos químicos que corroboraram com a proposta do espectro de RMN ^{13}C de flavona [δ_{H} 6.78 (s, H-3)] com sistema AA'BB' no anel B (δ_{H} 6.91 (d, $J=8,5$, H-3'/5'), 7.92 (d, $J=9,0$, H-2'/-6') e anel A 5,6,7-trissubstituído [δ_{H} 6.86 (s, H-8)]. Ainda nesse espectro os simples em δ_{H} 3.90 e 3.72 com integral para três hidrogênios cada confirma a presença de duas metoxilas na molécula. O sinal em δ_{C} 182,1 (C-4) de carbonila em ponte inferiu a presença de hidroxila em C-5, que foi corroborado pelo sinal em δ_{H} 12,9 no espectro de RMN de ^1H . Diante disto as três propostas abaixo eram possíveis.



O sinal em δ_c 59,9 atribuído a metoxila indica que este substituinte está estericamente impedido, o que descarta a possibilidade estrutural (a), pois a mesma não apresenta metoxilas impedidas estericamente.

Para decidir entre a estrutura(b) e (c) recorreremos a dados dos espectros bidimensionais. O espectro $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) (Figura 110-112, p.166-167) foi possível observar correlações a duas ligações entre os hidrogênios das metoxila em δ_H 3,90 e o carbono em δ_c 158,5, do hidrogênio em δ_H 6,86 e o carbono em δ_c 158,5. Além de correlações a três ligações entre o hidrogênio δ_H 7,92 (H-2'/6') e carbono em δ_c 164,0 e com o carbono δ_c 161,2. A análise destes dados confirmou que se trata da estrutura **c**.

A comparação dos dados obtidos com os já relatados na literatura (Tabela 12, p. 160) permitiu que Pc-5 fosse identificada como sendo a 5,4'-dihidroxi-6,7-dimetoxiflavona também denominada de cirsimaritina e isolada pela primeira vez na espécie em questão.

A cirsimaritina é um flavonóide de ocorrência comum no reino vegetal e que possui comprovada atividade antioxidante e anticolinesterásica (KOLAK et al., 2009).

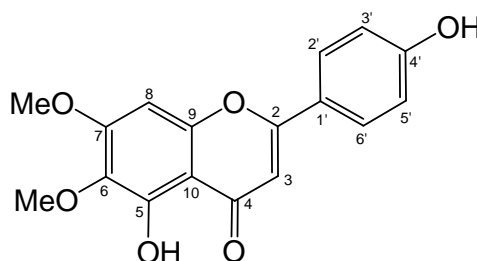


Tabela 12 – Deslocamentos químicos para os núcleos de hidrogênio e carbono treze de Pc-5, verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, respectivamente) em DMSO- d_6 , bem como, os deslocamentos químicos dos carbonos (δ_{C}^*) apresentados por Yim et al. (2003) para as mesmas substâncias (potência não informada) em Piridina (δ em ppm e J em Hz).

Pc-5		HMQC		HMBC	
C	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}^*
2	164,0	-			164,1
3	102,6	6,78 (s, 1H)	C-2		104,1
4	182,1	-			183,1
5	152,5	-			154,2
6	131,8	-			132,2
7	158,5	-			158,9
8	91,5	6,86 (s, 1H)	C-7,C-9		95,3
9	152,0	-			153,7
10	105,0	-			105,4
1'	121,0	-			124,1
2'/6'	128,4	7,92 (d, $J = 9,0$, 2H)		C-2', C-4'	128,6
3'/5'	115,9	6,91 (d, $J = 8,5$, 2H)	C-4'		114,9
4'	161,2	-			162,9
5-OH	-	12,9 (s, 1H)	-	-	-
6-OCH ₃	59,9	3,72 (s, 3H)	C-6	C-7	60,3
7-OCH ₃	56,3	3,90 (s, 3H)	C-7		55,5

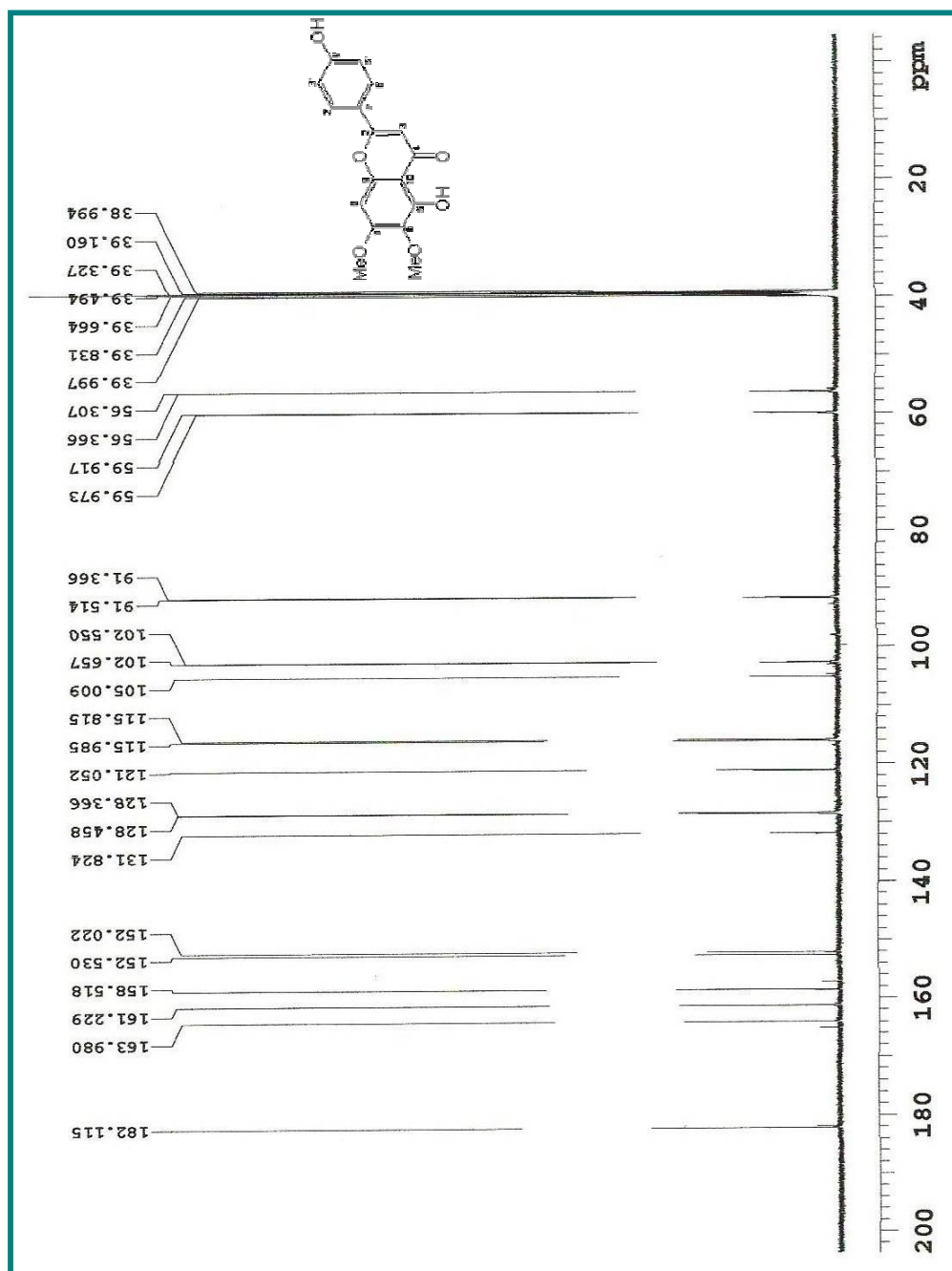


Figura 103- Espectro de RMN ^{13}C -BB (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Pc-5.



Figura 104- Espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Pc-5.

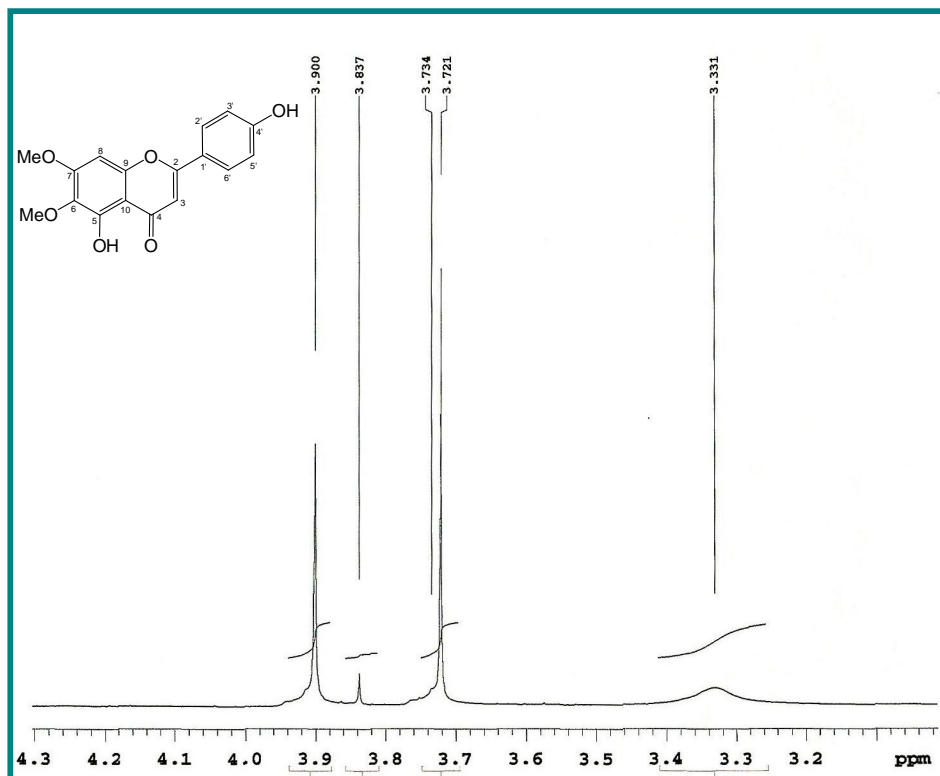


Figura 105-Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) de Pc-5 na região de 3,2-4,3 ppm.

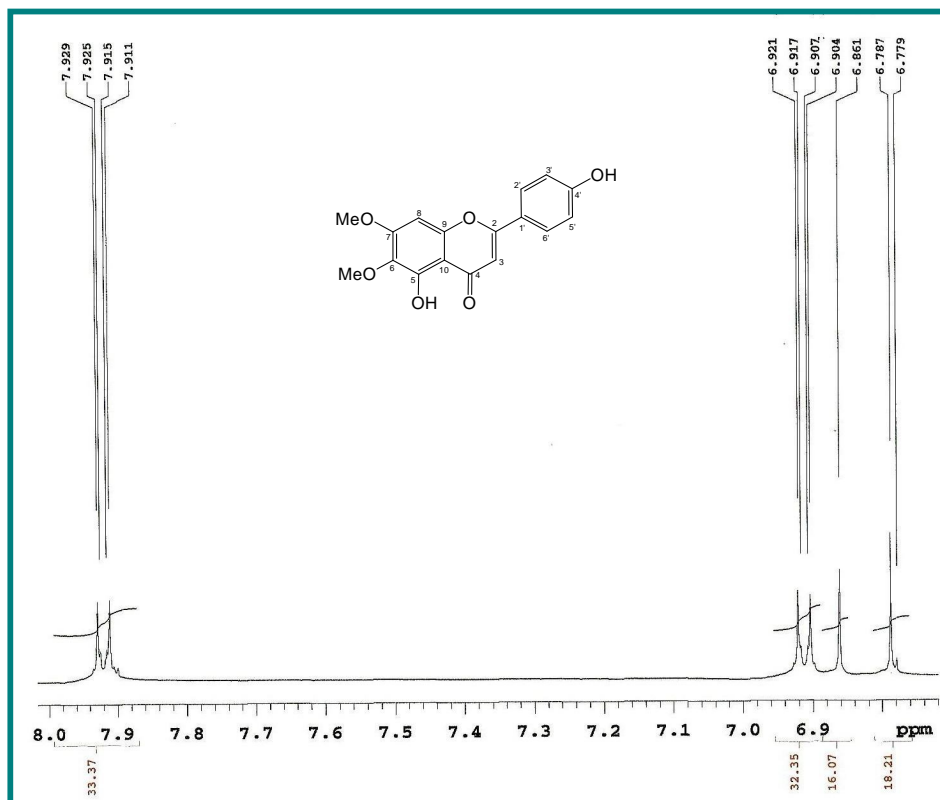


Figura 106-Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) de Pc-5 na região de 6,8-8,0 ppm.

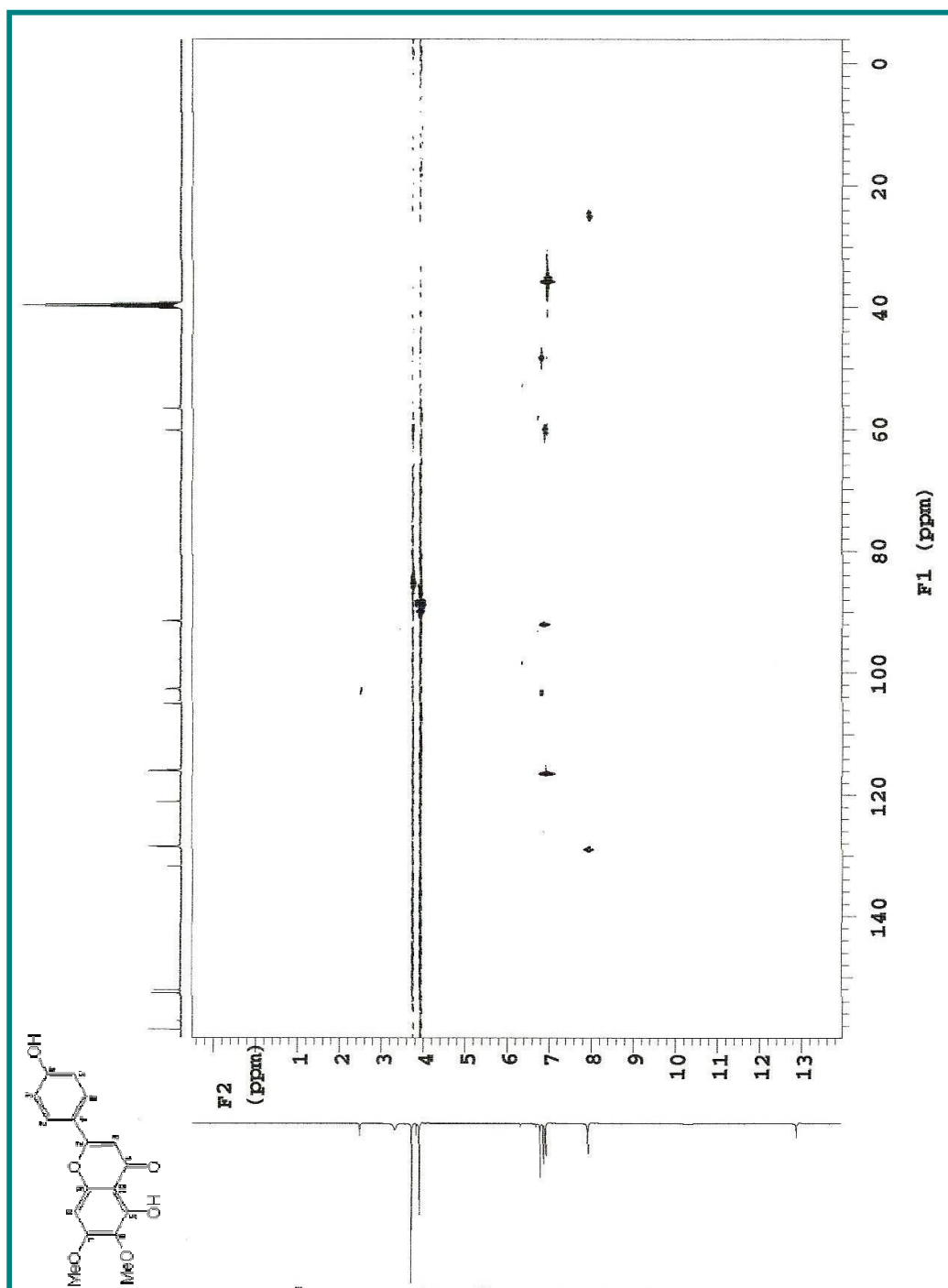


Figura 107- Espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC (500 e 125 MHz, DMSO- d_6) de Pc-5.

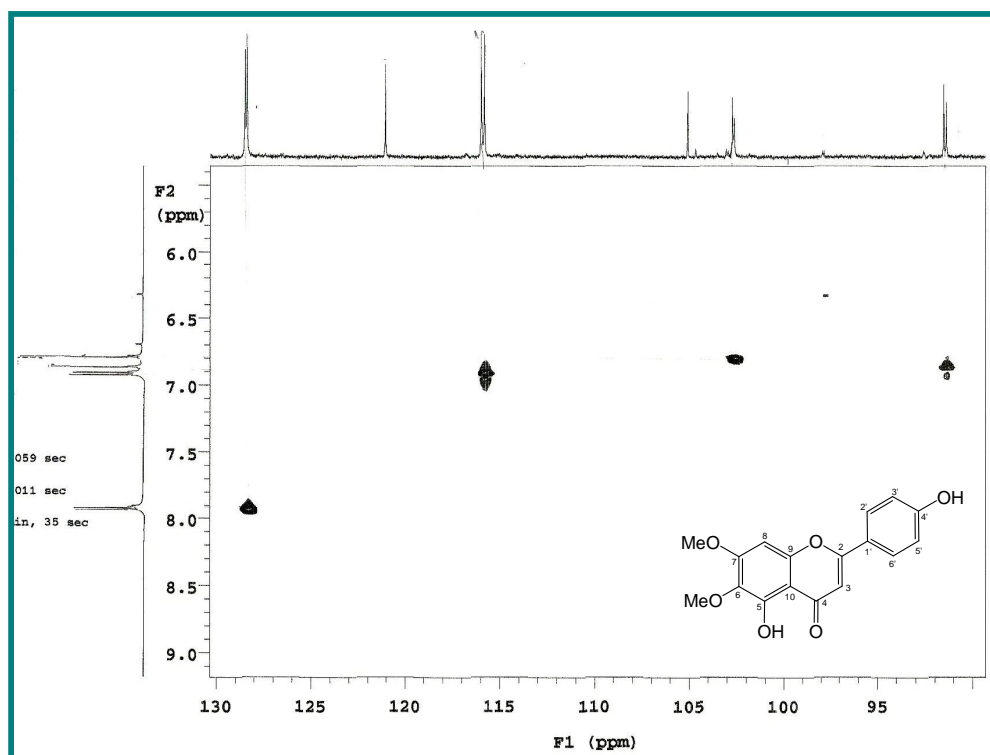


Figura 108- Expansão do espectro de RMN ^1H x ^{13}C -HMQC (500 e 125 MHz, DMSO- d_6) de Pc-5 na região de (6,0-9,0 ppm) x (90-130 ppm).

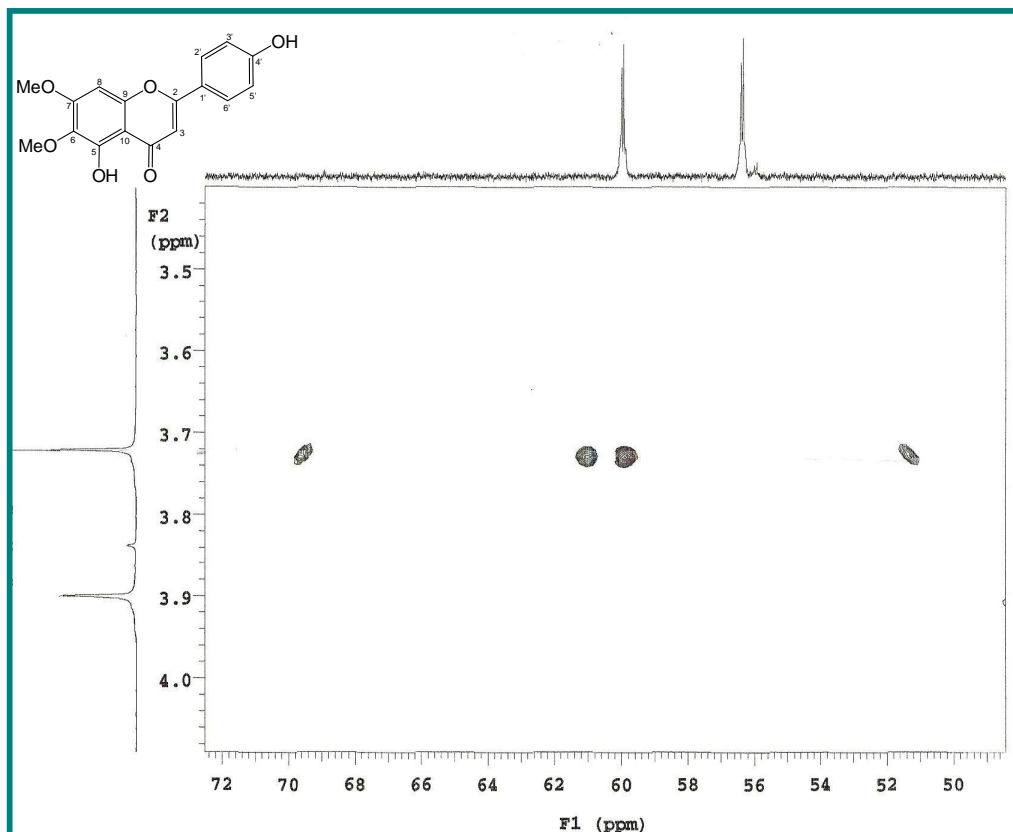


Figura 109- Expansão do espectro de RMN ^1H x ^{13}C -HMQC (500 e 125 MHz, DMSO- d_6) de Pc-5 na região de (3,5-4,0 ppm) x (50-72 ppm).

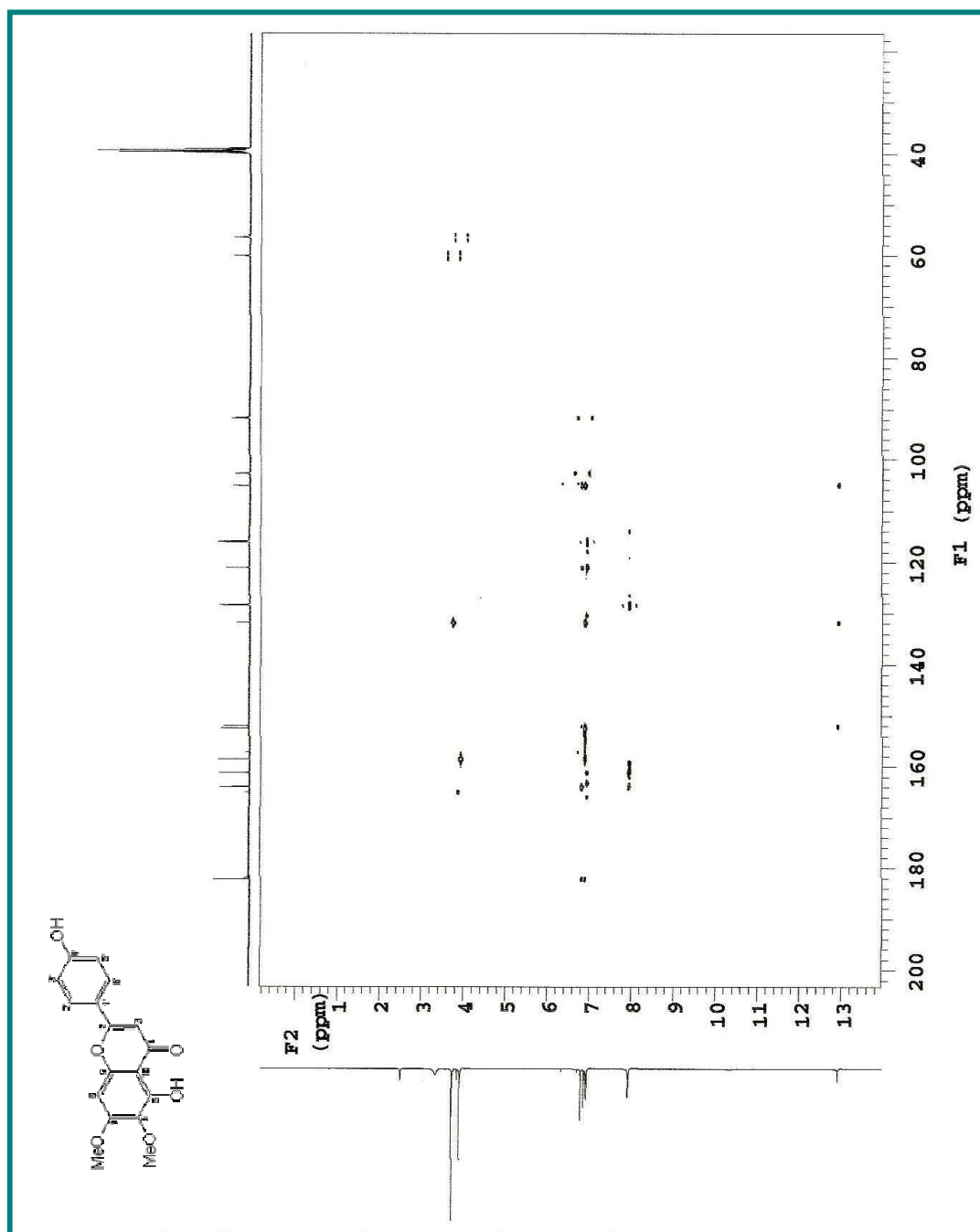


Figura 110- Espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (500 e 125 MHz, DMSO- d_6) de Pc-5.

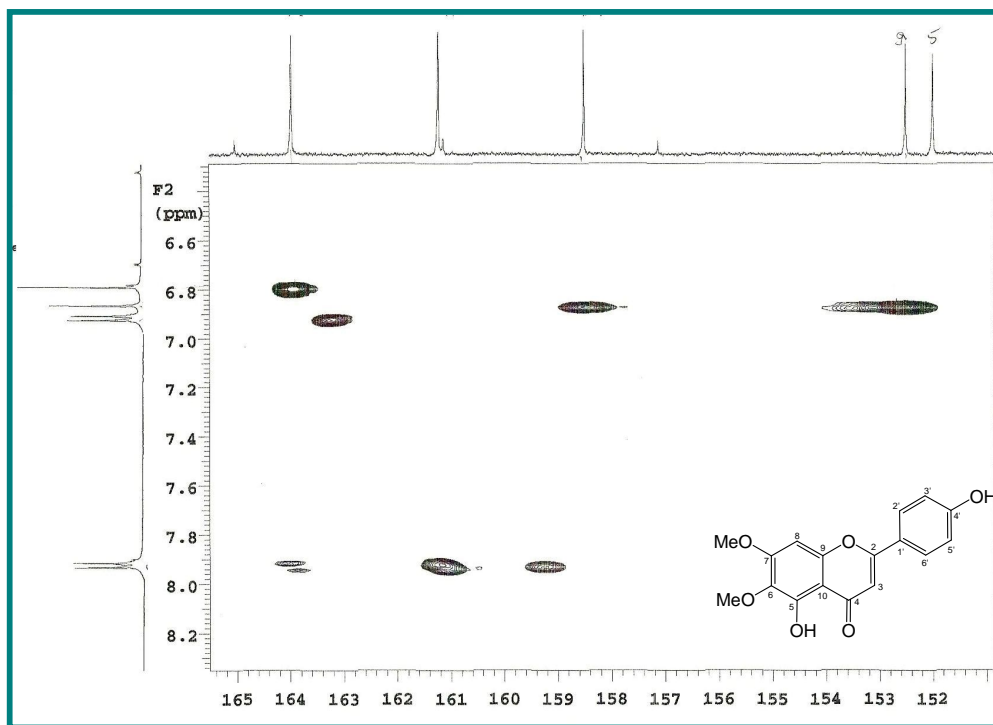


Figura 111-Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (500 e 125 MHz, DMSO- d_6) de Pc-5 na região de (6,6-8,2 ppm) x (152-165 ppm).

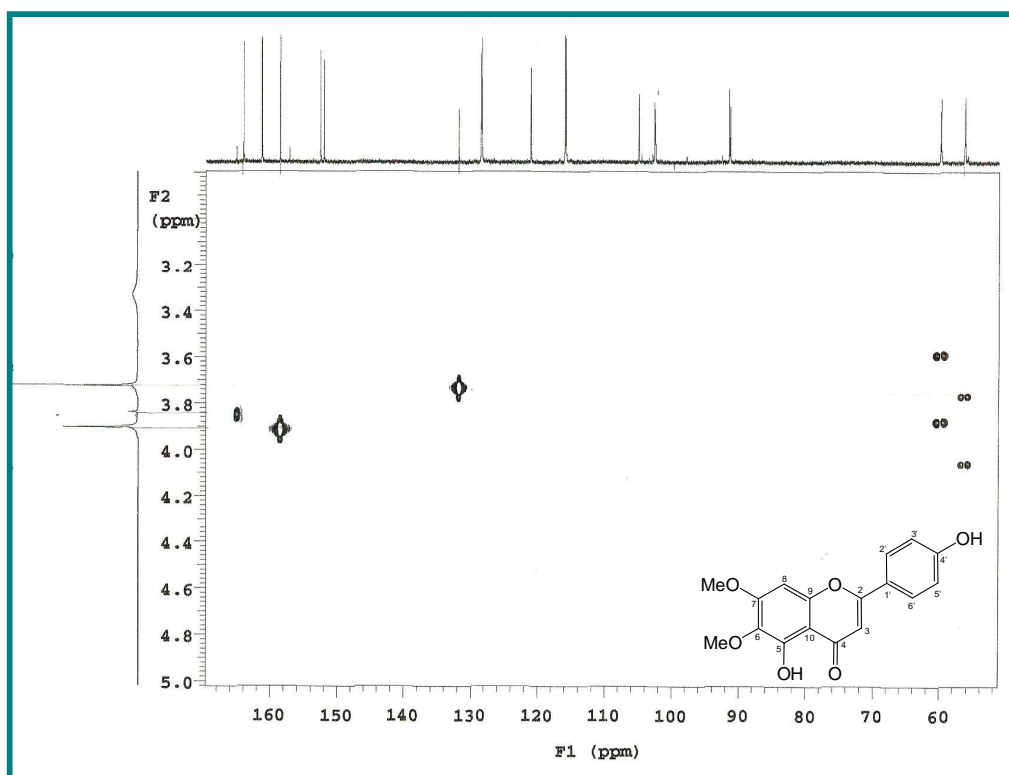


Figura 112- Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (500 e 125 MHz, DMSO- d_6) de Pc-5 na região de (3,3-5,0 ppm) x (60-160 ppm).

5.11 Determinação estrutural de Pc-6

A substância codificada como Pc-6 apresentou-se como cristais amarelos, pesando 16 mg e com ponto de fusão 340-342°C.

Assim como para a substância Pc-1, o espectro de RMN C^{13} -APT (50 MHz, CD_3OD) de Pc-6 (Figura 113, p. 170) apresentou deslocamentos característicos de flavonóide do tipo flavona [δ_c 129.4 (C-2') e 103.8 (C-3)], com anel A dissubstituído [δ_c 95,0 (C-8); δ_c 100,1 (C-6);] e anel B apresentando um sistema AA'BB' [δ_c 129.4 (C-2'/6') e (117.0 (C-3'/5'))]. Nesse espectro observou-se ainda sinal em 183,9 para carbonila em ponte. Diferente das substâncias anteriores não foi observado sinais para metoxilas.

O espectro de RMN 1H (200 MHz, CD_3OD) e a sua expansão (Figura 114-115, p.171) apresentou dois dubletos acoplando *orto* entre si, em δ_H 7,83 ($J = 8,6$ Hz, 2H) e 6,91 ($J = 8,6$ Hz, 2H) compatíveis com os hidrogênios H-2'/6' e H-3'/5', respectivamente, do sistema AA'BB' de anel B de flavonóide; e outros dois sinais integrando para um hidrogênio cada, em δ_H 6,19 ($J = 1,6$ Hz, H-8) e 6,44 (*sl*, H-6), confirmando o anel A 5,7-dissubstituído, (PIZZOLATTI et al., 2003).além do singlete em 6,57 para H-3 confirmando se tratar de uma flavona.

A análise dos dados de RMN ^{13}C citados por Agrawal (1989) permitiu atribuir os demais sinais apresentados por Pc-6 (Tabela 13, p. 169).

Desta forma, os dados dos espectros de RMN 1H e ^{13}C , bem como, comparações com os dados apresentados na literatura (AGRAWAL,1989) permitiram identificar Pc-6 como sendo 4',5,7-trihidroxiavone ou apigenina relatado pela primeira vez em *Praxelis clematidea*.

A apigenina possui comprovada propriedade ansiolítica e sedativa, sendo capaz de se ligar aos receptores GABA-A cerebrais de maneira similar aos benzodiazepínicos (ALONSO JR, 1998).

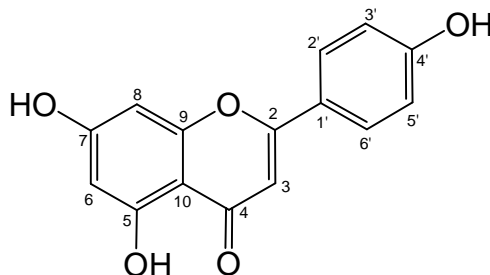


Tabela 13 Deslocamentos químicos para os núcleos de hidrogênio e carbono treze de Pc-6, verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (200 e 50 MHz, respectivamente) em CD_3OD , bem como, os deslocamentos químicos dos carbonos (δ_{C}^*) apresentados por Agrawal (1989) para a mesma substância (potência não informada) em $\text{DMSO-d}_6 + \text{D}_2\text{O}$ (δ em ppm e J em Hz).

Pc-6			
C	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}^*
2	166,2	-	165,5
3	103,8	6,57 (s, 1H)	104,3
4	183,9	-	183,2
5	163,2	-	162,0
6	100,1	6.44 (sl, 1H)	100,3
7	166,0	-	164,9
8	95,0	6.19 (d, $J=1,6$, 1H)	95,6
9	159,4	-	158,7
10	105,3	-	105,1
1'	123,2	-	122,7
2'/6'	129,4	7,83 (d, $J = 8,6$, 2H)	129,8
3'/5'	117,0	6,91 (d, $J = 8,6$, 2H)	117,3
4'	162,7	-	161,8

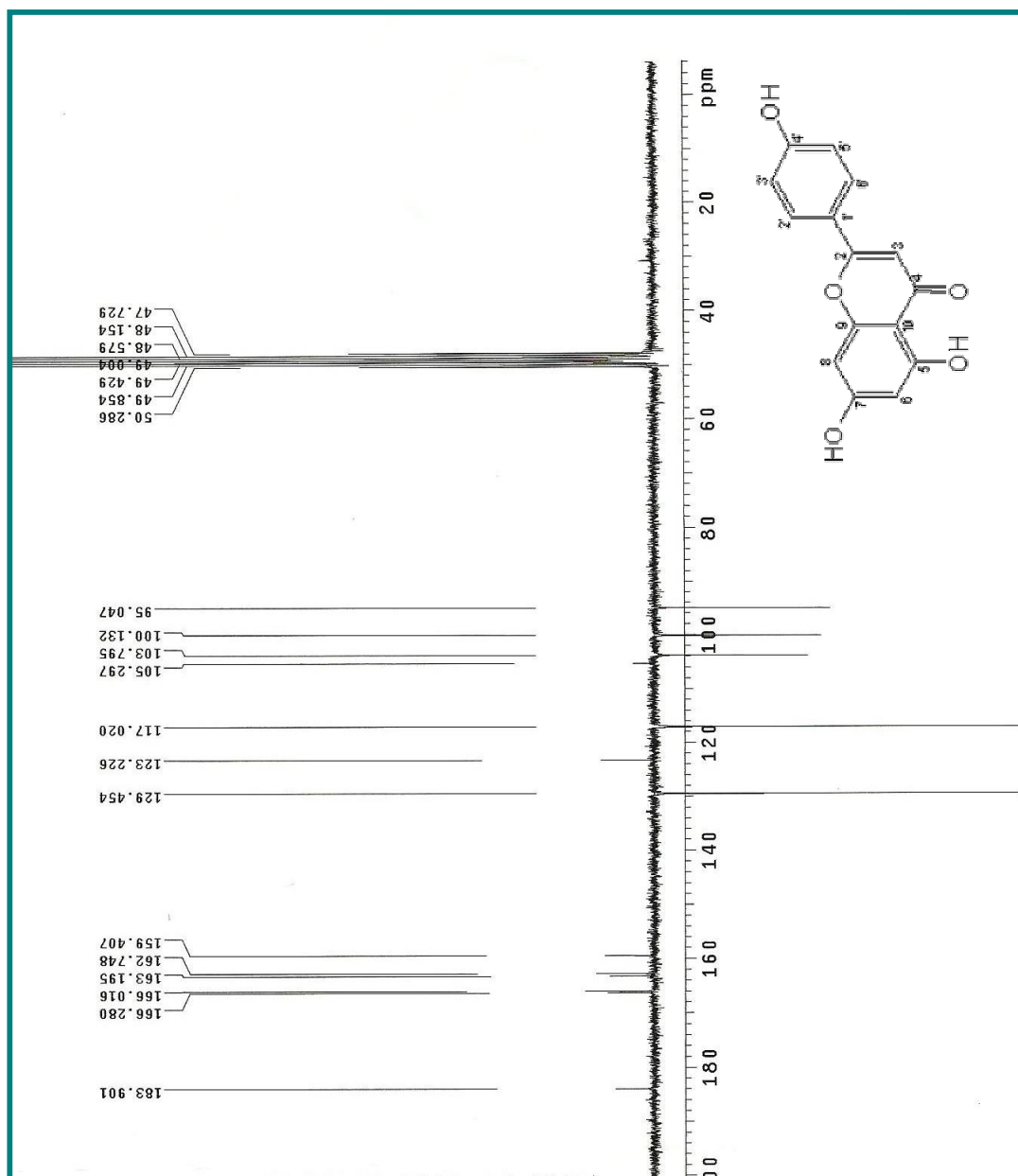
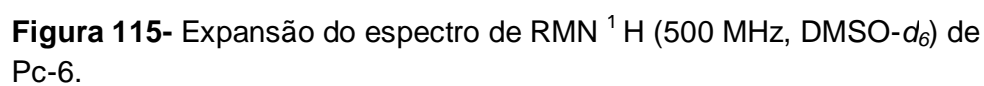
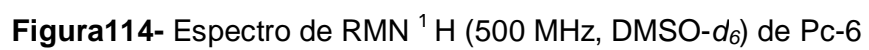


Figura 113- Espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, DMSO- d_6) de Pc-6.



5.12 Determinação estrutural de Pc-7

A substância Pc-7 apresentou-se como cristais marrons pesando 13 mg e com ponto de fusão 327-329°C.

Como nos compostos anteriores foram observados sinais no RMN C^{13} -APT (125 MHz, CD_3OD) (Figura 116, p. 175) para carbonos sp^2 em δ_C 166,3 e 103,7, que sugeriram a presença de dupla ligação em C-2 e C-3, respectivamente; bem como, o sinal em δ_C 183,7 para carbonila em C-4, indicaram que o flavonóide correspondia a uma flavona e sinais para carbonos metínicos sp^2 em δ_C 100,5 (C-6) e 95,3 (C-8) permitiram sugerir a presença de um anel A 5,7-dissubstituído. Diferente do padrão dos compostos anteriores não foi observado os sinais para anel B apresentando um sistema AA'BB', sendo observado sinais para dois carbonos sustentando função oxigenada (δ_C 147,8 e 151,1).

O espectro de RMN 1H (500 MHz, CD_3OD) e a expansão (Figura 117-118, p. 176-177) apresentaram deslocamentos químicos que corroboraram com a proposta do espectro de RMN ^{13}C para a presença de um esqueleto flavonoídico do tipo flavona com anel A dissubstituído [δ_H 6,2 (d, $J=2,0,1H$) e 6,41 (d, $J=2,0, 1H$)] (PIZZOLATTI et al., 2003). Nesse espectro e em suas expansões também foi observado na região de aromático um conjunto de sinais correspondentes a um duplo dubleto em δ_H 7,36 acoplando orto ($J=9,0$) e meta ($J=2,0$), um dupleto com acoplamento orto em 6,89 ($J=9,0$) e outro dubleto acoplando meta em δ_H 7,36 ($J=2,0$). Esses dados juntamente com os dados do RMN C^{13} que mostraram três sinais intensos em δ_C 114,1; 116,8 e 120,0 sugerem sistema ABX na molécula. A presença de sinais em δ_C 147,1 e 151,1 sugerem um flavonóide com anel B dissubstituído com funções oxigenadas nos carbonos 3' e 4' (AGRAWAL, 1989).

Os valores dos deslocamentos químicos dos carbonos (C-3', C-4', C-5, C-6 e C-4) e ausência de sinais para metoxilas inferem que os substituintes oxigenados são todos hidroxilas.

Desta forma, os dados dos espectros de RMN 1H e ^{13}C uni e bidimensionais, bem como, comparações com os dados apresentados na literatura permitiram identificar Pc-7 como sendo 5,7,3',4'-tetrahidroxiflavona também conhecida como escutellereina relatado pela primeira vez em *Praxelis clematidea*.

A escutellereina é indicada para o tratamento de problemas cardiovasculares e cerebrovasculares (ZHOU et al., 2009) e faz parte da composição de uma

preparação farmacêutica que tem capacidade de inibir a transcriptase reversa do HIV. (KO et al., 2009)

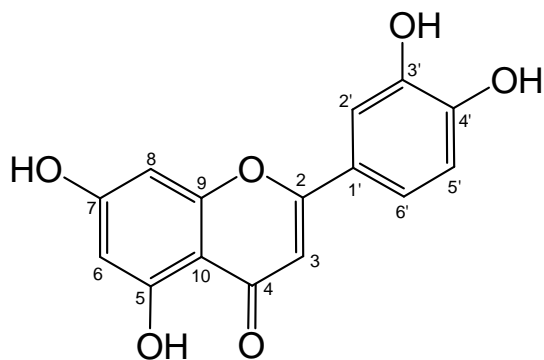


Tabela 14 – Deslocamentos químicos para os núcleos de hidrogênio e carbono treze de Pc-7, verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, respectivamente) em CD_3OD , bem como, os deslocamentos químicos dos carbonos (δ_{C}^*) apresentados Agrawal (1989) para a mesma substância (potência não informada) em $\text{DMSO}-d_6$. (δ em ppm e J em Hz).

Pc-7					
HMQC			HMBC		δ_{C}^*
C	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	
2	166,3	-			164,5
3	103,7	6,51 (s, 1H)	C-4, C-2	C-10, C-1'	103,3
4	183,7	-			182,2
5	163,1	-			162,1
6	100,5	6.2 (d, $J=2.0$, 1H)	C-6, C-7	C-9	99,2
7	167,0	-			164,7
8	95,3	6.41 (d, $J=2,0$, 1H)	C-7, C-9	C-6, C-10	94,2
9	159,5	-			157,9
10	105,0	-			104,2
1'	123,0	-			122,1
2'	114,1	7,36 (d, $J = 2,0$, 1H)	C-3'	C-2, C-4', C-6'	113,8
3'	147,8	-			146,8
4'	151,1	-			150,1
5'	116,8	6,89 (d, $J = 9,0$, 1H)		C-3', C-1'	116,4
6'	120,0	7,36 (dd, $J = 9,0; J=2,0$, 1H)		C-2, C-4'	122,7

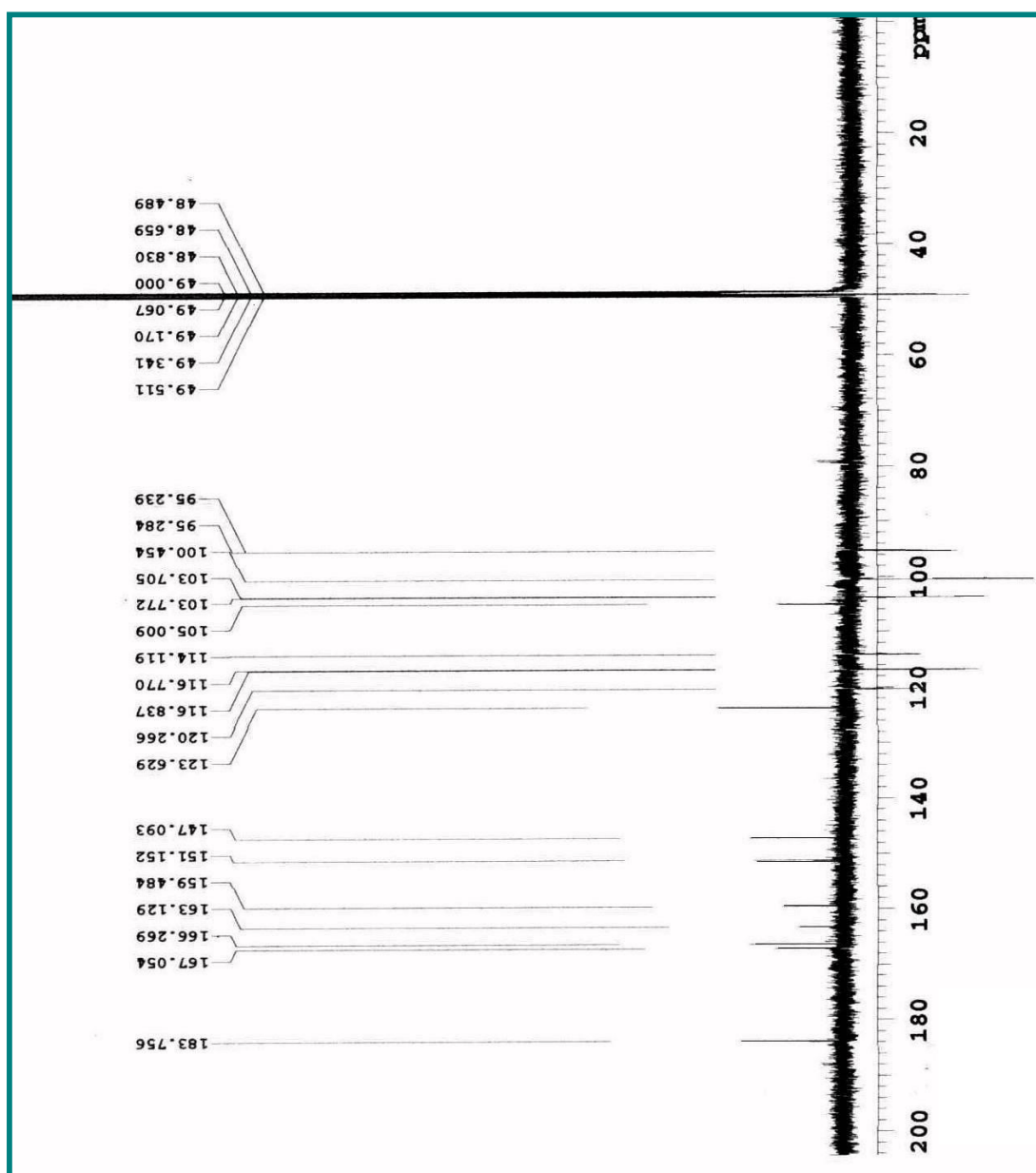


Figura 116- Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Pc-7.

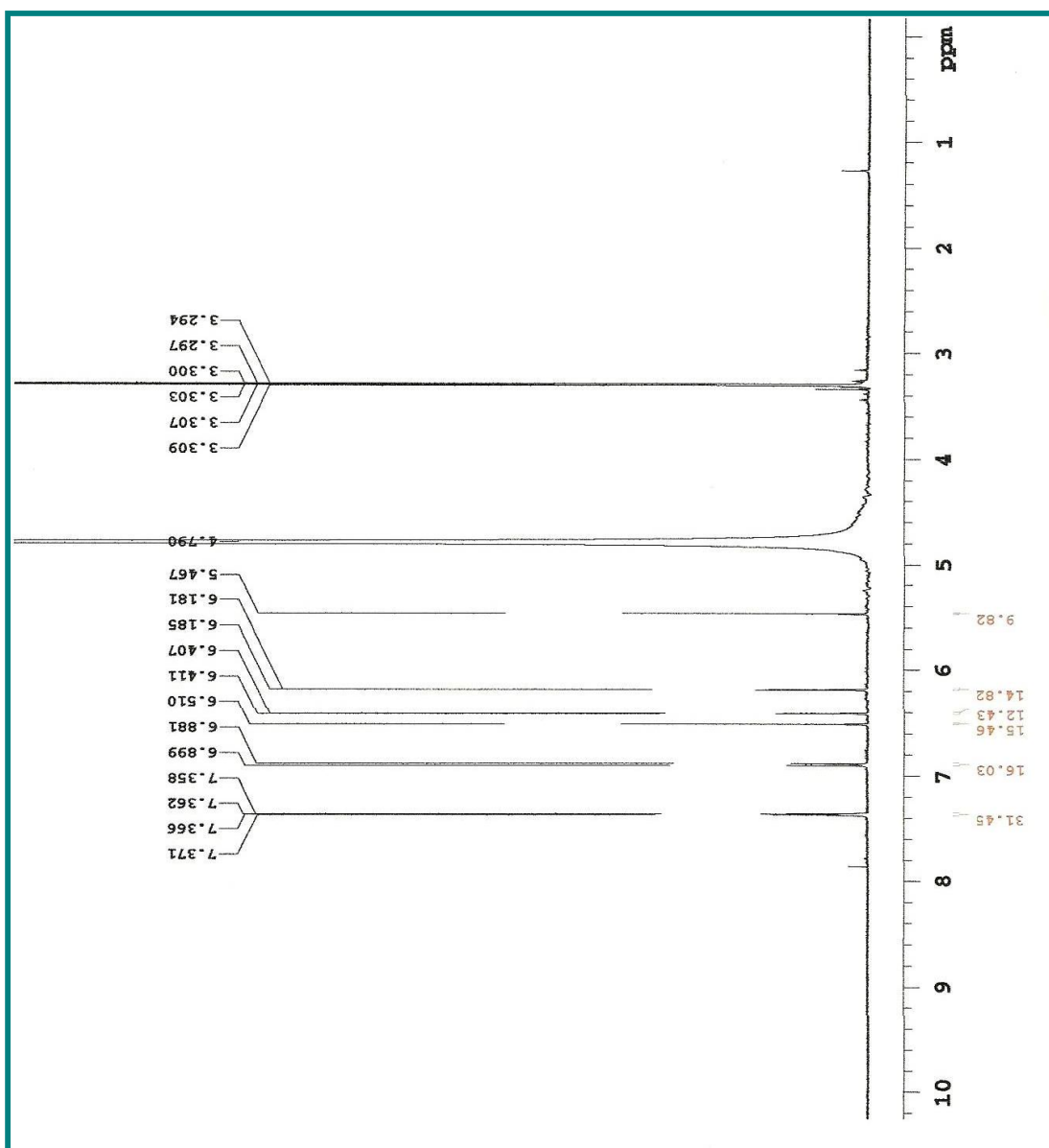


Figura 117- Espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Pc-7

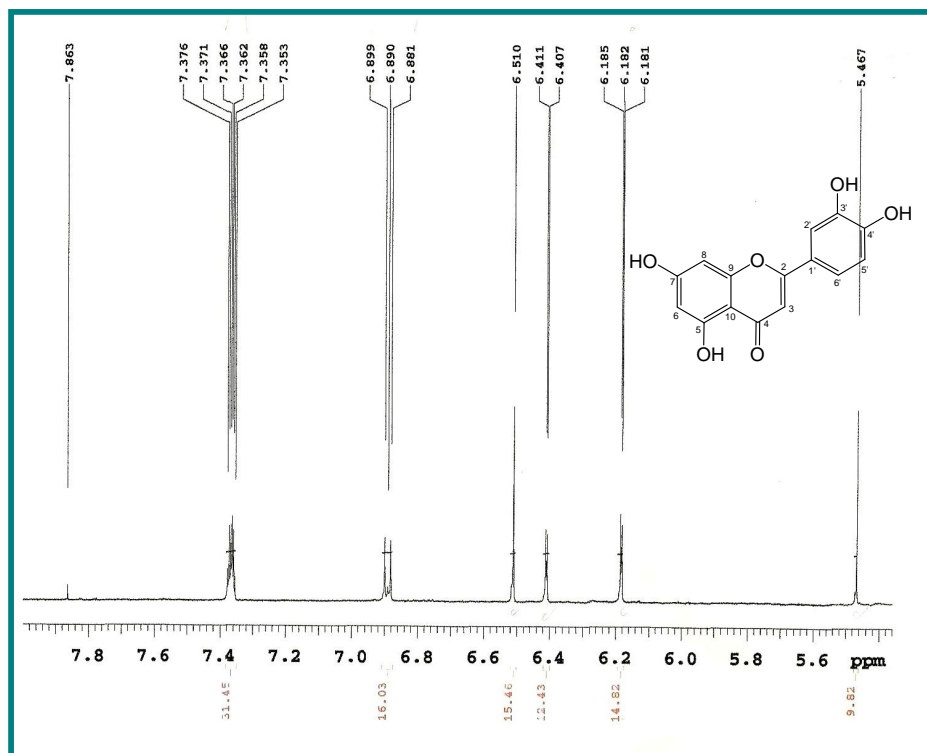


Figura 118- Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Pc-7

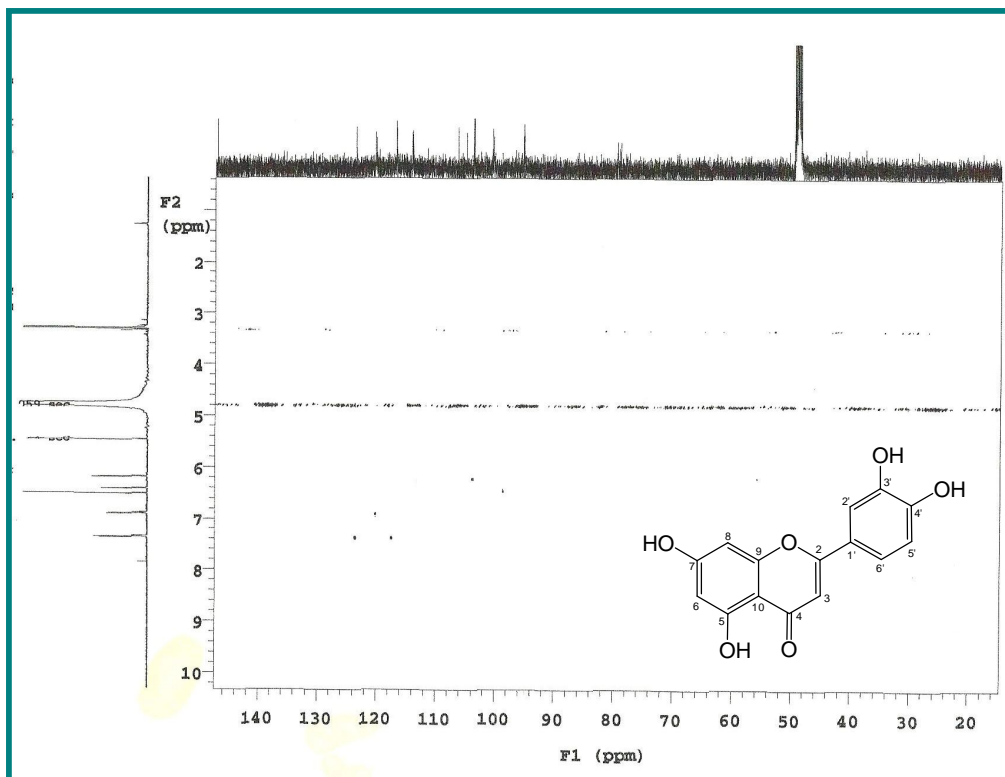


Figura 119- Espectro de RMN ^1H x ^{13}C -HMQC (500 e 125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Pc-7.

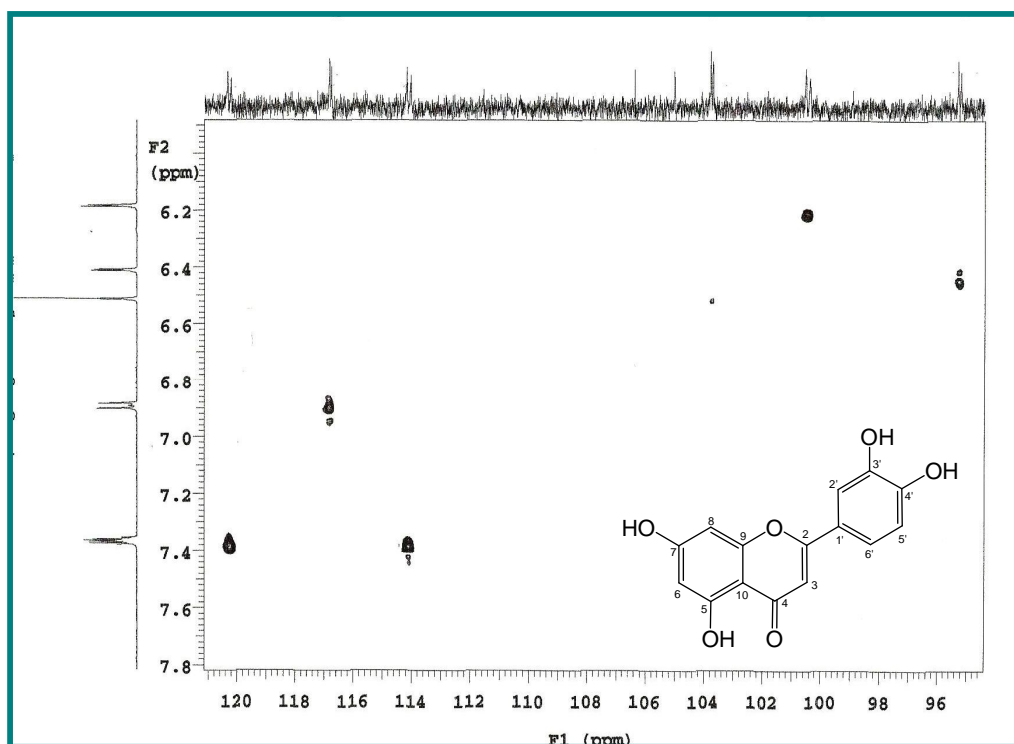


Figura 120-Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Pc-7.

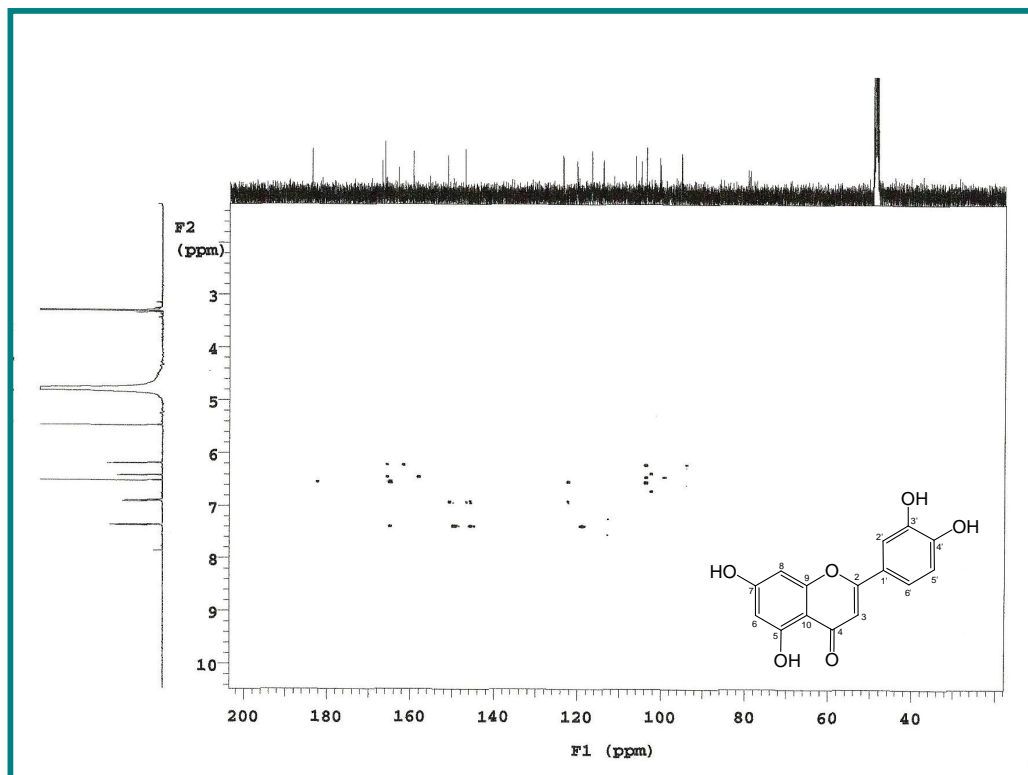


Figura 121- Espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (500 e 125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Pc-7.

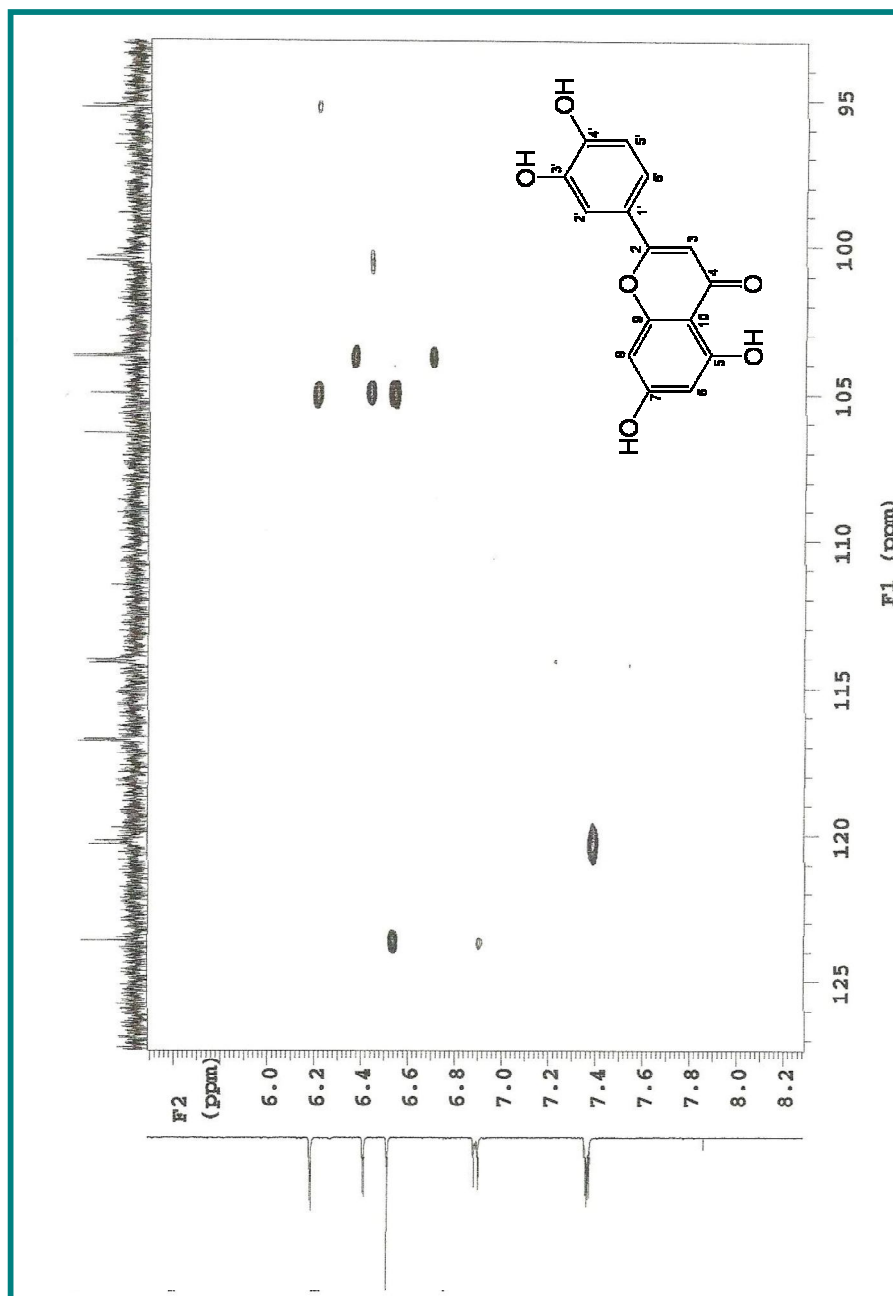


Figura 122- Espectro de RMN ^1H x ^{13}C -HMBC (500 e 125 MHz, DMSO- d_6) de Pc-7 na região de (6,0-8,2 ppm) x (95-125 ppm).

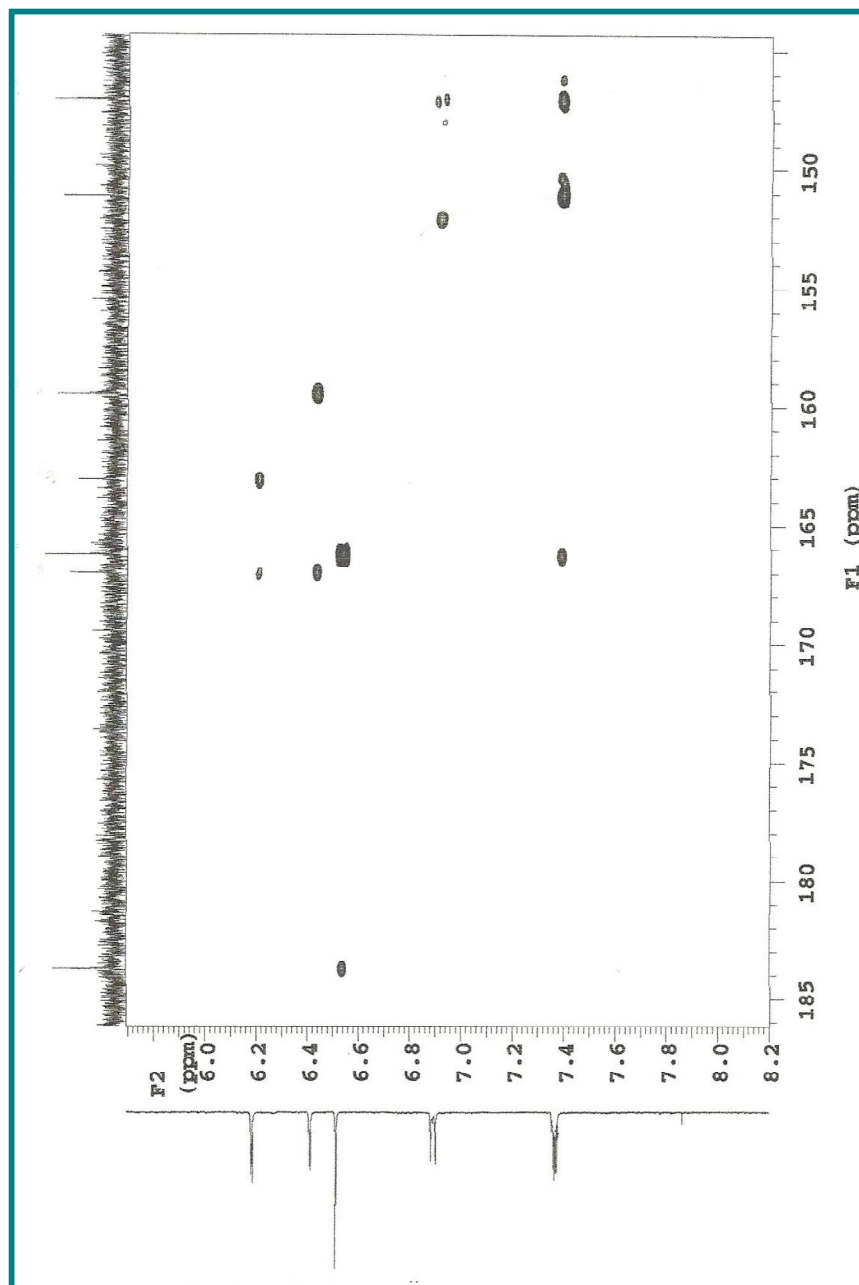
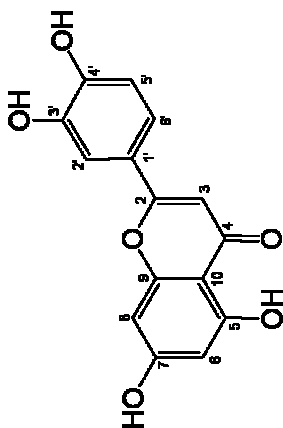


Figura 123- Espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (500 e 125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Pc-7 na região de (6,0-8,2 ppm) x (145-185 ppm).



5.13 Atividade moduladora da resistência bacteriana a drogas

As flavonas isoladas da fase clorofórmica (Pc-1 a Pc-6) foram submetidas a teste farmacológico para avaliar sua capacidade de modular a resistência bacteriana a drogas.

Numa primeira etapa as flavonas foram testadas isoladamente e não apresentaram atividade antibacteriana na concentração de 256 µg/mL contra a linhagem de *Staphylococcus aureus* AS-1199B.

Quando as substâncias (Pc-1 a Pc-6) foram incorporados ao meio de cultura na concentração de 64 µg/mL correspondente a um quarto da CIM (que seguramente não interfere na sobrevivência bacteriana), foi observada para a linhagem SA-1199B uma redução das CIMs de pelo menos duas vezes (até dezesseis vezes) da norfloxacin e do brometo de etídio (Tabela 15, abaixo). É importante mencionar que o uso de uma concentração tão baixa quanto um quarto da CIM é recomendado para evitar possíveis resultados falso-positivos (STAVRI et al., 2006). Todos os experimentos foram realizados duas vezes com resultados consistentes.

Tabela 15- Concentrações inibitórias mínima para os antibióticos e o brometo de etídeo contra *Staphylococcus aureus* cepa AS-1199B, na presença e ausência das flavonas.

Flavonas	CIM (µg/mL)		
	Nor	EB	Pef
Isoladas	128	32	16
Apigenina	128	32	16
Genkawnina	64 (2x)	16 (2x)	16
7,4'dimetiapigenina	64 (2x)	16 (2x)	16
Cirsimaritina	32 (4x)	8 (4x)	16
Trimetilapigenina	16 (8x)	8 (4x)	16
Tetrametilescutellerina	8 (16x)	2 (16x)	16

Nor-norfloxacin; EB-brometo de etídeo; Pef.-Pefloxacin

()* entre parênteses, os fatores de redução da CIM.

O gene *norA* presente na linhagem SA-1199B MDR é superexpresso, devido a maior transcrição do seu gene ou ao aumento da estabilidade do RNAm (KAATZ; SEO, 1997). Segundo Van Bambeke et al. (2006), o aumento da atividade de efluxo confere um alto grau de resistência, de 1 até 64 vezes o valor da CIM. A diminuição da CIM ao associar os antibióticos e biocidas como os flavonóides, é uma indicação da ação desses flavonóides como inibidores do sistema de efluxo.

O brometo de etídio é um conhecido substrato para a proteína de efluxo NorA e efluxo ativo é o único mecanismo conhecido de resistência a este corante intercalante de DNA (MARKHAM et al; 1999). Portanto, o uso de brometo de etídio contra a cepa SA-1199B é de valor para demonstrar que as flavonas metoxiladas aqui avaliadas modulam a resistência ao norfloxacin devido à inibição da bomba de efluxo. Pefloxacin, uma quinolona hidrofóbica, é um substrato pobre da bomba de efluxo Nora, e assim foi utilizado como controle negativo (MARQUEZ et al., 2009).

A atividade de modulação pode estar relacionada a lipofilicidade dos flavonóides devido a presença de grupos metoxilas. A lipofilicidade é uma característica comum de diversos inibidores da bomba de efluxo resistente a múltiplas drogas. Qualidade esta, apontada por Gibbons (2004), como provavelmente importante para facilitar sua solubilidade na membrana plasmática bacteriana e na ligação as proteínas de efluxo.

Uma análise dos logP (calculados com o auxílio do programa ChemDraw Ultra 10.0, Cambridge Softwares) para os compostos nos trás informações a respeito da lipofilicidade dos mesmo, onde quanto maior o LogP maior a lipofilicidade (Tabela 16, abaixo)

Tabela 16- LogP das flavonas isoladas da fase clorofórmica de *P. clematidea*.

FLAVONAS	LogP
Apigenina	1.9
Genkawnina	2.17
7,4'dimetiapiigenina	2.43
Cirsimaritina	2,04
Trimetilapigenina	2.69
Tetrametilescutellerina	2,57

Tal ordem de lipofilicidade explica, em parte, a ordem de atividade no teste de modulação de resistência bacteriana a droga. Onde as duas substâncias mais ativas (trimetilapigenina e tetrametilescutellerina) são também as mais lipofílicas.

Observa-se também a importância da presença de uma metoxila na posição 4' das flavonas, já que as atividade dos compostos Pc-1 e Pc-3 foram superiores àquela dos compostos Pc-4 e Pc-6, bem como a atividade do composto Pc-2 em relação àquela do Pc-5. Outro fator importante é a quantidade de metoxilas presentes, já que, de modo geral, os compostos Pc-2 e Pc-5 foram mais ativos que outros compostos, o que fica evidente se observarmos que Pc-5 tem uma lipofilicidade maior somente que Pc-6 e não apresenta metoxila na posição 4', sendo, mesmo assim, mais ativo que Pc-1, Pc-4 e Pc-6. Tais fatores são importantes, pois, para inibição do transportador bacteriano, são necessárias substâncias mais lipofílicas e menos hidroxiladas, o que pode conferir certa seletividade às substâncias que se deseja aplicar como antimicrobianos, diminuindo a possível ocorrência de efeitos colaterais devido inibição do transportador presente em seres humanos.

Esses resultados foram publicados em forma de artigo na revista *Molecules* (APÊNDICE 1).

CONCLUSÕES



6 CONCLUSÕES

O estudo farmacológico de *Verbesina macrophylla* corrobora com os trabalhos desenvolvidos por Bohlman e colaboradores (1980), pois evidencia a espécie como bioprodutora de terpenóides e derivados do ácido cinâmico.

Foram isolados de *Verbesina macrophylla* seis substâncias das quais cinco estão sendo descritas pela primeira vez na espécie: ácido *p*-cumárico, 6-*Z*-*p*-cumaroil-4 α -hidroxieudesmano, (-)-bornil-*p*-*cis*-cumarato, (-)-bornil-*p*-*trans*-cumararato e ácido *p*-hidroxibenzóico.

De *Praxelis clematidea* foram isoladas sete flavonas, todas inéditas na espécie: 4',5,7- trihidroxiflavona ; 4',5-dihidroxi-7 metoxiflavona; 5-hidroxi-4',7 dimetoxiflavona; 4',5,7-trimetoxiflavona; 5,4'-dihidroxi-6,7 dimetoxiflavona e 4',5, 6,7- tetrametoxiflavona e 5,7,3',4'-tetrahidroxiflavona.

As flavonas isoladas foram avaliadas quanto a sua atividade farmacológica de modulação da resistência bacteriana a drogas usando a linhagem de *Staphylococcus aureus* AS-1199B, capaz de produzir a bomba de efluxo NorA. Foi observado que as flavonas não apresentaram atividade antibacteriana significativa frente à linhagem de *Staphylococcus aureus* usada, mas atuaram como moduladora da resistência bacteriana.

Unindo os dados da estrutura química das substâncias e os resultados farmacológicos obtidos no teste de modulação, foi possível fazer uma correlação entre a atividade moduladora da resistência bacteriana a droga e o grau de lipofilicidade das flavonas conferida pelos grupos metoxilas, visto que o composto mais metoxilado a 4',5, 6,7- tetrametoxiflavona reduziu a concentração inibitória mínima da droga (Norfloxacino) dezesseis vezes.

Estudos farmacológicos, biotecnológicos e biossintéticos subseqüentes devem ser realizados para maior apreciação das potencialidades clínicas e industriais dos flavonóides de *Praxelis clematidea*.

REFERÊNCIAS



REFERÊNCIAS

1. AGOSTINI, F.; SANTOS, A. C. A.; ROSSATO, M.; PANSERA, M. R.; ZATTERA, F.; WASUM, R.; SERAFINI, L. A. Estudo do óleo essencial de algumas espécies do gênero *Baccharis* (Asteraceae) do sul do Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 215-220, 2005.
2. 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, p. 383–395, 2007.
3. AGRAWAL, P. K. **Carbon-13 NMR of Flavonoids**. New York: Elsevier, 1989.
4. ALBUQUERQUE, I. L.; ALVES, L. A.; LEMOS, T. L. G.; MONTE, F. J. Q.; BRAZ-FILHO, R. Ácido canárico (3,4-seco derivado do lupano) em própolis do Ceará. **Química Nova**, v. 30, p. 828-831, 2007.
5. AKENDENGUÉ, B.; CHAMPY, P.; NZAMBA, J.; ROBLOT, F.; LOISEAU, P. M.; BORIES, C. Antifungal and anthelmintic activities of *Cleistopholis patens* (Annonaceae). **Planta Medica**, v. 75, p. 1143-1145, 2009.
6. ALMEIDA, J. R. G. S.; SILVA, M. S.; DA-CUNHA, E. V.; ATHAÍDE-FILHO, P. F.; DINIZ, M. F. F. M.; SILVA, M. G.; TAKEMURA, O. S.; BARBOSA-FILHO, J. M. Chemical constituents and analgesic activity of *Conocliniopsis prasiifolia*. **Pharmaceutical Biology**, v. 44, p. 76-78, 2006.
7. ALONSO, J. R. **Tratado de Fitomedicina: bases clínicas y farmacológicas**. Buenos Aires: ISIS Ed. SRL; 1998.
8. AMARO-LUIS, J. M.; RAMÍREZ, I.; DELGADO-MÉNDEZ, P.; ZACARIAS, D. J. Eudesmane derivatives from *Verbesina turbacensis*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.13, p.352-357, 2002.
9. AMORIM, E. L. C.; LIMA, C. S. A.; HIGINO, J. S.; SILVA, L. R. S.; ALBUQUERQUE, U. P. Fitoterapia: instrumento para uma melhor qualidade de vida. **Infarma**, v. 15, p. 66-68, 2003.
10. ANDEREGG T. R.; SADER, H. S.; FRITSCH, T. R.; ROSS, J. E.; JONES, R. N. Trends in linezolid susceptibility patterns: report from the

- 2002-2003 worldwide Zyvox Annual Appraisal of Potency and Spectrum (ZAAPS) Program. International. **Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, p. 13-21. 2005.
11. ANDREATINI, R.; BOERNGEN-LACERDA, R.; ZORZETTO FILHO, D. Tratamento farmacológico do transtorno de ansiedade generalizada: perspectivas futuras. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 23, p. 233-242, 2001.
12. AYERS, S.; ZINK, D. L.; MOHN, K.; POWELL, J. S.; BROWN, C. M.; MURPHY, T.; BRAND, R.; PRETORIUS, S.; STEVENSON, D.; THOMPSON, D.; SINGH, S. B. Flavones from *Struthiola argentea* with anthelmintic activity in vitro. **Phytochemistry**, v. 69, p. 541-545, 2007.
13. BABU, T. H.; MANJULATHA, K.; KUMAR, G. S.; HYMAVATHI, A.; TIWARI, A. K.; PUROHIT, M.; RAO, J. M.; BABU, K. S. Gastroprotective flavonoid constituents from *Oroxylum indicum* Vent. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, p. 117-120, 2010.
14. BANERJEE, S.; JAKUPOVIC, J.; BOHLMANN, F.; KING, R. M.; ROBINSON, H. A rearranged eudesmane and further verbesindiol derivatives from *Verbesina eggersii*. **Phytochemistry**, v. 24, p. 1106, 1985.
15. BARRETO DE CASTRO, L. A. Conclusions and recommendations, in SEIDL, P. (ed.), The use of biodiversity for sustainable development: investigation os bioactive products and their commercial applications, Proceedings of a Workshop. **Academia Brasileira de Ciências & MCT, Manaus**, p. 104, 1994.
16. BATISTA, R.; BRAGA, F. C.; OLIVEIRA, A. B. Quantitative determination by HPLC of entkaurenoic and grandiflorenic acids in aerial parts of *Wedelia paludosa* D.C. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p.119-125, 2005.
17. BELOFSKY, G.; CARRENO, R.; LEWIS, K.; BALL, A.; CASADEI, G.; TEGOS, G. P. Metabolites of the "smoke tree", *Dalea spinosa*, potentiate antibiotic activity against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 261-264, 2006.
18. BOHLMANN, F.; ZDERO, C.; ROBINSON, H.; KING, R. M. Naturally occurring terpene derivatives. Part 409. Two new eudesmane

- cinnamates from *Verbesina sordescens*. **Phytochemistry**, v. 21, p. 1663-1664, 1982.
19. BOHLMANN, F.; WEGNER, P.; JAKUPOVIC, J.; KING, R.M. Structure and synthesis of the methyl ester of N-(acetoxyl)jasmonylphenylalanine from *Praxelis clematidea*. **Tetrahedron**, v. 40, p. 2537– 2540, 1984.
20. BOHLMANN, F.; LONITZ, M. Naturally occurring terpene derivatives. Part 123. New sesquiterpenes from *Verbesina occidentalis*. **Phytochemistry**, v. 17, p. 453–455. 1978.
21. BOHLMANN F, GRENZ M, GUPTA RK; DHAR, A. K.; AHMED, M.; KING, R. M.; ROBINSON, H. Eudesmane derivatives from *Verbesina* species. **Phytochemistry**, v.19, p. 2391–2397, 1980.
22. BOX, V. G. S.; BARDOUILLE, V.; CHAN, W. R. Enantio-eudesmane sesquiterpenes from *Verbesina rupestris*. **Phytochemistry**, v.16, p. 987-90, 1977.
23. BRUNO-COLMENAREZ, J.; AMARO-LUIS, J.M.; RAMÍREZ, I.; DELGADO-MÉNDEZ, P.; DELGADO, G. D. Absolute configuration of two eudesmane derivatives from *Verbesina turbacensis* H.B.K. **Journal of Chemical Crystallography**, v. 40, p. 110-115, 2010.
24. BURKART A.; BACIGALUPO, N. M.; CABRERA, A. L.; CROVETTO, R. M.; SORARÚ, S. B.; (1974). Dicotiledôneas Metaclamídeas (Gamopétalas). In: Burkart A, ed., **Flora Ilustrada de Entre Rios (Argentina)**, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuária, Buenos Aires, Argentina. Cabrera AL, Klein RM. Compostas – Tribo Eupatorieae, Flora Ilustrada, 1989.
25. CARMIGNANI, M.; VOLPE, A.R.; BOTTA, B.; ESPINAL, R.; DE BONNEVAUX, S. C.; DE LUCA, C.; BOTTA, M.; CORELLI, F.; TAFI, A.; SACCO, R.; DELLE MONACHE, G. Synthesis and pharmacology of (3,4-dimethoxycinnamoyl)-N1-agmatine and synthetic analogues. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 2950-2958, 2001.
26. CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, p. 99-105, 1998.

27. CHAMBERS, H. F. Methicilin-resistant staphylococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v.1, p. 173-186. 1988.
28. CHOPRA, I.; HESSE, L.; O'NEIL, A. J. Exploiting current understanding of antibiotic action for discovery of new drugs. **Journal of Applied Microbiology**, Symposium Supplement, v. 92, p.4-15. 2002.
29. COATEA, R. M. Enantio- eudesmane sesquiterpenes from *Verbesina rupestris*. **Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe**, v. 33, p. 73, 1976.
30. CORLETT, R.T.; SHAW, J.C. *Praxelis clematidea*; yesterday South America, today Hong Kong, tomorrow the world? **Memoirs of the Hong Kong Natural History Society**, v. 20, p. 235-236, 1995.
31. CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. Columbia University Press: New York, USA, 1981.
32. DICKSON, R. A.; HOUGHTON, P. J.; HYLANDS, P. J.; GIBBONS, S. Antimicrobial, resistance-modifying effects, antioxidant and free radical scavenging activities of *Mezoneuron benthamianum* Baill., *Securinega virosa* Roxb. & Willd. and *Microglossa pyrifolia* Lam. **Phytotherapy Research**, v. 20, p. 41-45. 2006.
33. DOFF, W. In vitro tuberculostatic action of aloe and its most important components. **Arzneimittel-Forschung**, v.3, p. 627-30, 1953.
34. DU, Q.; Chen, H. The methoxyflavones in *Citrus reticulata* Blanco cv. ponkan and their antiproliferative activity against cancer cells. **Food Chemistry**, v. 119, n.2, p. 567-572, 2009.
35. EMERENCIANO, V.P.; MILITÃO, J.S.L.T.; CAMPOS, C.C.; ROMOFE, P.; KAPLAN, M.A.C.; ZAMBON, M.; BRANT, A.J.C. Flavonoids as chemotaxonomic markers for Asteraceae. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29, p. 947-957, 2001.
36. EMERECIANO, V. P.; BARBOSA, K. O.; SCOTTI, M. T.; FERREIRA, M. J. P. Self-organizing maps in chemotaxonomic studies of Asteraceae: a classification of tribes using flavonoid data. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, p. 891-899, 2007.
37. FALCÃO, H. S. **Avaliação da atividade antiulcerogênica do extrato etanólico bruto e fase clorofórmica obtidos das partes aéreas de *Praxelis clematidea* (Griseb.)** R. M. King & H. Robinson em modelos

- animais Dissertação de mestrado, Universidade Federal da Paraíba. 2007.
- 38.FALCÃO-SILVA, V. S.; SILVA, D. A.; SOUZA, M. F. V.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P. Modulation of drug resistance in *Staphylococcus aureus* by a Kaempferol glycoside from *Herissantia tiubae* (Malvaceae). **Phytotherapy Reserch**,v. 23,p. 1367-1370, 2009.
- 39.FOSTER, R. C. **A catalogue of the ferns and flowering plants of Bolivia. Contributions from the Gray Herbarium**, v.184, p. 1–223, 1958.
- 40.FORZZA, R. C. **Lista de espécies Flora do Brasil**, 2010. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/>.
- 41.GARDNER, P. D.; PARK, G. J.; ALBERS, C. C. α - and β - Verbesinol. Sesquiterpene alcohols of the *cis*-decahydronaphthalene series. **Journal of the American Chemical Society**, V. 83, p. 1511-12, 1961.
- 42.GIBBONS, S.; OLUWATUYI, M.; VEITCH, N. C.; GRAY, A. I. Bacterial resistance modifying agents from *Lycopus europaeus*. **Phytochemistry**, v. 62, p. 83–87. 2003.
- 43.GIBBONS, S., MOSER, E., KAATZ, G. W. Catechin gallates inhibit multidrug resistance (MDR) in *Staphylococcus aureus*. **Plant Letter**, v. 70, p.1-3. 2004.
- 44.GIBBONS, S., UDO, E. E. The effect of reserpine, a modulator of multidrug efflux, on the *in vitro* activity of tetracycline against clinical isolates of methicillin resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) possessing the *tet*(K) determinant. **Phytotherapy Research**, v.14, p. 139-140. 2000.
- 45.GLENNIE C. W, JAIN S. C. Flavonol 3, 7- diglycosides of *Verbesina encelioides* .**Phytochemistry**, v. 19, p.157–158, 1980.
- 46.GONZALES, R. D.; SCHRECKENBERGER, P. C.; GRAHAM, M. B.; KELKAR, S.; DENBESTEN, K.; QUINN, J. P. Infections due to vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* resistant to linezolid. **The Lancet**, v. 357, p. 1179. 2001.
- 47.GUIMARÃES, D. O. **Prospecção química e biológica em fungos endofíticos associados à *Vigueira arenaria* (Asteraceae)**.2006, p.

208. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Universidade de São Paulo-Ribeirão Preto, 2006.
- 48.GUZ, N. R.; STERMITZ, F. R.; JOHNSON, J. B.; BEESON, T. D.; WILLEN, S.; HSIANG, J.; LEWIS, K. Flavonolignan and flavone inhibitors of a *Staphylococcus aureus* multidrug resistance pump: structure-activity relationships. **Journal of Medical Chemistry**, v. 44, p. 261-268. 2001.
- 49.GYLMAN, A. G. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 9. ed. México: McGraw-Hill, 1996.
- 50.HERZ, W.; KUMAR, N. Aromatic and other constituents of four *Verbesina* species: Structure and stereochemistry of verbesinol. **Phytochemistry**,v. 20, p. 247-250, 1981.
- 51.HEYWOOD, V. H. **Flowering plants of the world**, Oxford University Press: New York, 1993.
- 52.HSU, T. W.; PENG, C. I.; WANG, C. M. *Austroeupatorium inulifolium* (Kunth) King & Robinson (Asteraceae), a Newly Naturalized Plant in Taiwan. **Taiwan**, v. 51, p. 41-46, 2006.
- 53.JAKUPOVIC, J.; ELLMAUERER, E.; JIA, Y.; BOHLMANN, F.; DOMINGUEZ, X. A.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Further eudesmane derivatives from *Verbesina* species. **Planta Medica**, v. 53, p. 39-42, 1987.
- 54.JONES, M. E.; BOENINK, N. M.; VERHOEF, J.; KÖHRER, K.; SCHMITZ, J. F. Multiple mutations conferring ciprofloxacin resistance in *Staphylococcus aureus* demonstrate the long term stability in an antibiotic free environment. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 45, p. 353-356. 2000.
- 55.JEONG, J.; KANG, S.; LEE, I.; LEE, J.; JUNG, H.; CHOI, C. Antioxidant and chemosensitizing effects of flavonoids with hydroxy and/or methoxy groups and structure-activity relationship. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v.10, 537-546, 2007.
- 56.JORGENSEN, P. M.; NEE, M.; BECK, S. G. Catálogo de las plantas vasculares de Bolivia. **Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden**, 2011.

57. JOUD, C. **Towards a new pathway for synthesis of taxol and its analogs. 2005.** Dissertação (Mestrado em Ciências, Florida State University College of Arts and Sciences) 2005.
58. KAATZ, G. W.; MOUDGAL, V. V.; SEO, S. M.; KRISTIANSEN, J. E. Phenothiazines and thioxanthenes inhibit multidrug efflux pump activity in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, p.719-726. 2003.
59. KAATZ, G. W., SEO, S. M. Mechanisms of fluorquinolone resistance in genetically related strains of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, p. 2733-2737. 1997.
60. KAATZ, G. W., SEO, S. M., RUBLE, C. A. Efflux-mediated fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 37, p. 1086-1094. 1993.
61. KARIS, P. O.; RYDING, O. Tribe Heliantheae. In: Bremer, K. 1994. **Asteraceae: cladistics and classification.** Timber Press, Portland, P. 559-625, 1994.
62. KING, R. M.; ROBISON, H. The genera of Eupatoriaes (Asteraceae). **Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden**, p. 6, 1987.
63. KO, Y. H.; OH, H. J.; KO, Y. J.; KANG, H. J.; AHN, H. M. Anti-HIV compositions containing flavonoids. **Repub. Korean Kongkae Taeho Kongbo**, 2009.
64. KOLAK, U.; HACIBEKIROGLU, I.; OZTURK, M.; OZGOKCE, F.; TOPCU, G.; ULUBELEN, A. Antioxidant and anticholinesterase constituents of *Salvia pocalata*. **Turkish Journal of Chemistry**, v. 33, p. 813-823, 2009.
65. KUETE, V.; NONO, E. C. N.; MKOUNGA, P.; MARAT, K.; HULTIN, P. G.; NKENGFAK, A. E. Antimicrobial activities of the CH₂Cl₂-CH₃OH (1:1) extracts and compounds from the roots and fruits of *Pycnanthus angolensis* (Myristicaceae). **Natural Product Research**, v. 25, p. 432-443, 2011.
66. LEWIS, K. In: Search of natural substrates and inhibitors of MDR pumps. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 3, p. 247-254. 2001.

67. LEWIS, K.; AUSUBEL, F. M. Prospects for plant-derived antibacterials. **Nature Biotechnology**, v. 24, p. 1504-1507. 2006.
68. LING, Y-R. The new world *Artemisia* L. p. 255-281. In: HIND, D.J.N.; JEFFREY, C.; POPE, G.V. Advances in compositae systematics. **Royal Botanic Gardens**, p. 255-281, 1995
69. LOMOVSKAYA, O.; BOSTIAN, K. A. Practical applications and feasibility of efflux pump inhibitors in the clinic – a vision for applied use. **Biochemical Pharmacology**, v. 71, p. 910-918. 2006.
70. LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.
71. LYNCH, A. S. Efflux systems in bacterial pathogens: an opportunity for therapeutic intervention? An industry view. **Biochemical Pharmacology**, v. 71, p. 949-956. 2006.
72. LU, J.; QI, J.; ZHU, D.; YU, B. Antioxidant activity and structure-activity relationship of the flavones from the leaves of *Aquilaria sinensis*. **Zhongguo Tianran Yaowu**, v. 6, p. 456-460, 2008.
73. MARKHAM, P.; WESTHAUS, E.; KLYACHKO, K.; JOHNSON, M. E.; NEYFAKH, A. A. Multiple novel inhibitors of the NorA multidrug transporter of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, p. 2404-2408. 1999.
74. MARQUEZ, B.; NEUVILLE, L.; MOREAU, N. J.; GENET, J. P.; DOS SANTOS, A. F.; CAÑO DE ANDRADE, M. C.; SANT'ANA, A. E. Multidrug resistance reversal agent from *Jatropha elliptica*. **Phytochemistry**, v. 66, p. 1804-1811. 2005.
75. MARTINEZ, M.; ROMO DE VIVAR, A.; ORTEGA, A.; QUINTERO, M. L.; GARCIA, C.; FRONCZEK, F. R. **Eudesmane triols from *Verbesina virgata***. Inst. Quim., Univ. Nac. Auton. Mexico, Mexico City, Mex. **Phytochemistry**, v. 22, p. 979-82, 1983.
76. MIHARA, R.; MITSUNAGA, T.; FUKUI, Y.; NAKAI, M.; YAMAJI, N.; SHIBATA, H. A novel acylated quercetin tetraglycoside from oolong tea (*Camelia sinensis*) extracts. **Tetrahedron Letters**, v. 45, p. 5077-5080, 2004.
77. MONACHE, G. D.; VOLPE, A. R.; MONACHE, F. D.; VITALI, A.; BOTTA, B.; ESPINAL, R.; DE BONNEVAUX, S. C.; DE LUCA, C.; BOTTA, M.;

- CORELLI, F.; CARMIGNANI, M. Novel hypotensive agents from *Verbesina caracasana*. 7-Further hypotensive metabolites from *Verbesina caracasana*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.9, p.3249-3254, 1999.
78. MONKS, N. R.; FERRAZ, A.; BORDIGNON, S.; MACHADO, K. R.; LIMA, M. F. S.; DA ROCHA, A. B.; Schwartzmann G. In vitro cytotoxicity of extracts from Brazilian Asteraceae. **Pharmacology Biology**, v.40, p.494-500, 2002.
79. MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24, p. 105-111, 2001.
80. MOREIRA, R. C. T.; COSTA, L. C. B.; COSTA, R. C. S.; ROCHA, E. A. Abordagem Etnobotânica acerca do uso de plantas medicinais na Vila Cachoeira, Ilhéus, Bahia, Brasil. **Acta Farmacêutico Bonaerense**, v. 21, p. 205-11, 2002.
81. MORRIS, M. E., ZHANG, S. Flavonoid–drug interactions: effects of flavonoids on ABC transporters. **Life Sciences**, v. 78, p. 2116-2130. 2006.
82. MOTA, K. S. L.; DIAS, G. E. N.; PINTO, M. E. F.; LUIZ-FERREIRA, A. SOUZA-BRITO, A. R. M.; HIRUMA-LIMA, C. A.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BATISTA, L. M. Flavonoids with gastroprotective activity. **Molecules**, v. 14, p. 979-1012, 2009.
83. MURILLO, R.; CASTRO, V.; ARAYA, M.; POVEDA, L. Eudesmanes from *Verbesina oerstediana* Benth (Asteraceae). **Ingenieria y Ciencia Quimica**, v. 21, p. 17-19, 2004.
84. NOUMI, E.; DIBAKTO, T. W. Medicinal plants used for peptic ulcer in the Bengangte region, Western Cameroon. **Fitoterapia**, v. 17, p. 406-412, 2000.
85. OELRICHS, P. B.; VALLELY, P. J.; MACLEOD, J. K.; LEWIS, I. A. S. Isolation of Galegine from *Verbesina enceloiodes*. **Journal of Natural Products**, v.44, p. 754–755, 1981.
86. OGUNGBE, I. V.; CROUCH, R. A.; HABER, W. A.; SETZER, W. N. Phytochemical investigation of *Verbesina turbacensis* kunth: trypanosome cysteine protease inhibition by (-)-bornyl esters. **Natural Product Communications**, v. 5, p.1161-1166, 2010.

87. OLIVEIRA, R. A. G. **Plantas medicinais usadas na dermatologia: avaliação da atividade biológica de seus extratos, óleos essenciais e suas associações**. 2006. 220 p. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – LTF/CCS/UFPB, João Pessoa, 2006.
88. OLUWATUYI, M., KAATZ, G. W., GIBBONS, S. Antibacterial and resistance modifying activity of *Rosmarinus officinalis*. **Phytochemistry**, v. 65, p. 3249-3254. 2004.
89. ORTEGA, A.; MALDONADO, E.; FRONCZEK, F. R.; DELORD, T. R.; CHIARI, G. Elemanolides from *Verbesina seatonii*. **Phytochemistry** v.24, p. 1755-1760, 1985.
90. PELTER, A.; WARD, R. S.; GRAY, T. I. The carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of flavonoids and related compounds. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, p. 2475-2483, 1976.
91. PHILLIPSON, G. W.; ANDERSON, A. C.; **Journal of Ethnopharmacol.** V. 25, p. 61, 1998.
92. PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, p. 45-61, 2002.
93. PIDOOCK, L. J. V. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacterial. **Clinical Microbiology Review**, v. 19, p. 382-402. 2006.
94. PIZZOLATTI, M. G.; CUNHA-JUNIOR, A.; SZPOGANICZ, B.; SOUSA, E.; BRAZ-FILHO, R.; SCHRIPSEMA, J. Flavonóides glicosilados das folhas e flores de *Bauhinia forficata* (Leguminosae). **Química Nova**, v. 26, p. 466-469, 2003.
95. POLLOCK, S.H., SMITH, W. *New Alien Weed for Queensland Praxelis*. Queensland Herbarium Alert Sheet, Environmental Protection Agency, **2004**.
96. POOLE, K. Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. **Journal of Applied Microbiology**, Symposium Supplement, v. 92, p. 55-64. 2002.
97. POOLE, K., LOMOVSKAYA, O. Can efflux inhibitors really counter resistance? *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies*, v. 3, p. 145-152, 2006.

98. QUEENSLAND GOVERNMENT. Weed pocket guide agricultural and environmental weeds far North Queensland. Department of Natural Resources. Bin/weedident.cgi?tpl=pl...> Acesso em : Maio de 2011.
99. RODRIGUES V. E. G.; C. DE CARVALHO D. A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do Alto Rio Grande-Minas Gerais. **Ciência Agrotécnica**, v. 2, p.102, 2001.
100. ROJAS, J.; GUALTIERI, M.; ARAQUE, M.; MORALES, A.; RONDÓN, M.; VILLALTA, C. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Verbesina turbasensis* Kunth, HBK. **Revista Latinoamericana de Química**, v. 33, p.128-131, 2005.
101. ROSS, J. I.; FARRELL, A. M; EADY, E. A; COVE, J. H; CUNLIFFE, W. J. Characterization and molecular cloning of the novel macrolidestreptogramin B resistance determinant from *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 24, p. 851-862. 1989.
102. SALAMA, A. M.; AVENDANO, I. Y. Anti-inflammatory activity of α - amyron and apigenin-4',7-dimethylether isolated from *Alnus acuminata*. **Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas**, v. 34, p. 117-121, 2005.
103. SILVA, A. J. R.; ANDRADE, L. H. C. Etnobotânica Nordeste: estudo comparativo da relação entre comunidades e vegetação na Zona do Litoral – Mata do estado de Pernambucano, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 19, p. 45-60, 2005.
104. SILVEIRA, G. P.; NOME, F.; GESSER, J. C.; SÁ, M. M. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. **Química Nova**, v. 29, p. 844-855. 2006.
105. SMITH, E., WILLIAMSON, E.; ZLOH, M.; GIBBONS, S. Isopimaric acid from *Pinus nigra* shows activity against multidrug-resistant and EMRSA strains of *Staphylococcus aureus*. **Phytotherapy Research**, v. 19, p. 538-542, 2005.
106. SMITH, E.T. H. WILLIAMSON, E. M.; WAREHAM, N.; KAATZ, G. W.; GIBBONS, S. Antibacterials and modulators of bacterial resistance from the immature cones of *Chamaecyparis lawsoniana*. **Phytochemistry**, v. 68, p. 210-217. 2007.

107. SOUZA, M. F. V.; SILVA, D. A. **Extração, isolamento e reações de caracterização de constituintes químicos**. In: Psicofarmacologia: fundamentos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.
108. STAVRI, M., MATHEW, K. T., GIBBONS, S. Antimicrobial constituents of *Scrophularia deserti*. **Phytochemistry**, v. 67, p. 1530-1533. 2006.
109. STAVRI, M., PIDDOCK L.J.V., GIBBONS, S. Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, p.1247-1260. 2007.
110. STERMITZ, F. R.; CASHMAN, K. K.; KATHLEEN, M. H.; MOREL, C.; TEGOS, G. P.; LEWIS, K. Polyacylated neohesperidosides from *Geranium caespitosum*: bacterial multidrug resistance pump inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 13, p. 1915-1918. 2003.
111. STERMITZ, F. R.; SCRIVEN, L.N.; TEGOS, G.; LEWIS, K. Two flavonols from *Artemisa annua* which potentiate the activity of berberine and against a norfloxacinresistant strain of *Staphylococcus aureus*. **Planta Medica**, v. 68, p. 1140-1141. 2002.
112. STERMITZ, F.R.;TAWARA-MATSUDA, J.; LORENZ, P.; MUELLER, P.; ZENEWICZ, L.; LEWIS, K. 5'-Methoxyhydnocarpin-D and pheophorbide A: *Berberis* species components that potentiate berberine growth inhibition of resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Natural Products**, v. 63. p. 1146-1149. 2000.
113. TAKEDA, K.; HARBORNE, J.B.; SELF, R. Identification and distribution of malonated anthocyanins in plants of the Compositae. **Phytochemistry**, v. 25, p.1337-1342, 1986.
114. TEGOS, F. R.; STERMITZ, O. L.; KIM, L. Multidrug pump inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, p. 3133-3141. 2002.
115. The Sadtler Standard Spectra. Sadtler Research Laboratories: Philadelphia, v. J n. 3160, 1973.
116. TIM CUSHNIE, T. P.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, p. 343–356, 2005.

117. WANG, Z. H.; CHRISTIE, P.; CHEN, Q. B.; LIU, X. X.; XIE, L. L., BAI, C. J.; LI, X. L. Allelopathic potential and chemical constituents of volatile oil from *Praxelis clematidea*. **Allelopathy Journal**, v.18, p. 225-235, 2006.
118. VAN BAMBEKE, F.; PAGÈS, J. L. Inhibitors of bacterial efflux pumps as adjuvants in antibiotic treatments and diagnostic tools for detection of resistance by efflux. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**, v. 1, p. 157-175. 2006.
119. VAN BAMBEKE, F.; GLUPCZYNSKI, Y.; PLÉSIAT, P.; PECHERE, J. C.; TULKENS, P. M. Antibiotic efflux pumps in prokaryotic cells: occurrence, impact on resistance and strategies for the future of antimicrobial therapy. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, p. 1055-1065. 2003.
120. VERDI, L. G.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos **Quimica Nova**, v. 28, p. 85-94, 2005.
121. XU, W.; JACOB, M. R.; AGARWAL, A. K.; CLARK, A. M.; LIANG, Z.; LI, X. Verbesinosides A-F, novel 15,27-cyclooleanane saponins from the American native plant *Verbesina virginica* . **Journal of Natural Products**, v. 72, p.1022-1027, 2009.
122. XU, W. H.; LIANG, Q.; LIANG, Z. S.; LI, X. C. Tow new eudesmane derivatives from *Verbesina virginica*. **Chinese Chemical Letters**, v. 21, p. 693-695, 2010.
123. YIM, SOON-HO; KIM, H. J.; LEE; IK-SOO. A polyacetylene and Flavonoids from *Cirsium rhinoceros*. **Archives of Pharmacal Reserch**, v. 26, p. 128-131, 2003.
124. ZHOU, X.; ZHOU, M.; An, X. Preparation and medical application of scutellarein. **Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu**, 2009.
125. ZLOH, M., KAATZ, G. W., GIBBONS, S. Inhibitors of multidrug resistance (MDR) have affinity for MDR substrates. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, p. 881-885. 2004.
126. ZOMFELEFER, W. B. **Guide to flowering plant families**, Chapel Hill & London: Carolina, USA, 1994.

APÊNDICE



Article

Flavonoids from *Praxelis clematidea* R.M. King and Robinson Modulate Bacterial Drug Resistance

Gabriela Lemos de Azevedo Maia ^{1,2,*}, Vivyanne dos Santos Falcão-Silva ³, Pedro Gregório Vieira Aquino ⁴, João Xavier de Araújo-Júnior ⁴, Josean Fechine Tavares ¹, Marcelo Sobral da Silva ¹, Luis Cezar Rodrigues ¹, José Pinto de Siqueira-Júnior ³ and José Maria Barbosa-Filho ^{1,*}

¹ Laboratory of Pharmaceutical Technology, Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB 58051, Brazil; E-Mails: josean@ltf.ufpb.br (J.F.T.); marcelosobral@ltf.ufpb.br (M.S.S.); lcezar@ltf.ufpb.br (L.C.R.)

² Academic Collegiate of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Sao Francisco Valley, Petrolina, PE 56304, Brazil

³ Laboratory of Genetics of Microorganisms, Department of Molecular Biology, Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB 58059, Brazil; E-Mails: vivyannefalcao@yahoo.com.br (V.S.F.-S.); jpsiq@uol.com.br (J.P.S.-J.)

⁴ Laboratory of Research on Natural Resources, Institute of Chemistry and Biotechnology, Federal University of Alagoas, Maceió, AL 57072, Brazil; E-Mails: pgvaquino@hotmail.com (P.G.V.A.); joaoxjr@yahoo.com.br (J.X.A.-J.)

* Authors to whom correspondence should be addressed; E-Mails: gabriela.lam@gmail.com (G.L.A.M.); jbarbosa@ltf.ufpb.br (J.M.B.-F.); Tel.: +55-87-3862-9354 (G.L.A.M.); Tel./Fax: + 55-83-3216-7364 (J.M.B.-F.).

Received: 12 May 2011; in revised form: 2 June 2011 / Accepted: 7 June 2011 /

Published: 10 June 2011

Abstract: Chemical studies of *Praxelis clematidea* R.M. King & Robinson resulted in the isolation of six flavones: Apigenine, genkwanine, 7,4'-dimethylapigenin, trimethylapigenin, cirsimaritin and tetramethylscutellarein, which were tested for their toxicity against *Staphylococcus aureus* SA-1199B, a strain possessing the NorA efflux pump. Efflux pumps are integral proteins of the bacterial membrane and are recognized as one of the main causes of bacterial drug resistance, since they expel antibiotics from the cell. The inhibition of this transporter is one form of modulating bacterial resistance to antimicrobial drugs. The flavones tested did not show any significant antibacterial activity against the *Staphylococcus aureus* strain used, but were able to modulate bacterial drug resistance.

This property might be related to the degree of lipophilicity of the flavones conferred by the methoxyl groups, since 4',5,6,7 tetramethoxyflavone the most methoxylated compound, reduced the minimal inhibitory concentration of the drug 16-fold.

Keywords: *Praxelis clematidea*; Asteraceae; flavonoids; antibacterial activity; bacterial resistance; efflux pump

1. Introduction

The family Asteraceae is the largest Angiosperm group, consisting of approximately 23,000 species distributed in 1,535 genera. It has a cosmopolitan distribution, and found on all the continents except Antarctica. South America is home to about 20% of the existing genera. In Brazil, there are approximately 180 genera and 3,000 species distributed throughout the country.

Plants from this family have been extensively studied for their chemical composition and biological activity and some have led to the development of new drugs and insecticides [1-13].

Praxelis clematidea R.M. King & Robinson belongs to the Eupatorieae tribe of the family Asteraceae, and consists of 2,400 species distributed in 170 genera [14]. The species has the following synonyms: *Eupatorium clematideum* Griseb. and *Eupatorium urtifolium* var. *clematideum* (Griseb.) Hieron ex. Kuntze.

It is a perennial weed native to South America and distributed throughout Bolivia, Peru and Argentina. In Brazil, it is found mainly in the states of Bahia, Alagoas, Pernambuco, Paraíba, Amazonas and Mato Grosso [15]. In phytochemical studies, Bolhmann and coworkers [16] isolated *N*-(acetoxyl)-jasmonoylphenylalanine-methyl-ester. Gas chromatographic analysis showed the presence of sesquiterpenes and monoterpenes in the essential oil extracted from *P. clematidae*, which also showed growth inhibitory effect on two plant species, *Lactuca sativa* and *Brassica campestris*, and on fungal colonies of *Fusarium oxysporum* and *Phytophthora capsici* [17]. A pharmacological study conducted with the aerial parts of this species demonstrated significant gastroprotective activity against gastric ulcers induced in animals with ethanol, stress, and a non-steroidal antiinflammatory [18].

The studies on *Praxelis clematidea* don't report the presence of flavonoids, although scientific studies conducted on the family Asteraceae have identified flavonoids as important chemotaxonomic markers of this family [19]. Based on this information, we started with the aerial parts of *Praxelis clematidea* to isolate compounds belonging to this secondary metabolite class. This class is increasingly becoming an object of investigation, and many studies have isolated and identified flavonoids that possess antifungal, antiviral and antibacterial activities. In addition, various studies have demonstrated synergy between active flavonoids, and between flavonoids and conventional chemotherapeutic agents [20,21].

The ever increasing bacterial resistance to antibiotics is a serious problem for public health that affects most current antibacterial agents. Efflux pumps are integral proteins of the bacterial membrane and are recognized as one of the major sources of bacterial resistance since they extrude antibiotics from the cell [22,23].

Modulators of antibiotic drug resistance are compounds that potentiate antibiotic activity against resistant strains. Some of these agents act as efflux pump inhibitors (EPIs) [24,25]. Plants provide a rich source of EPIs and several compounds have been identified as potent inhibitors [26–28].

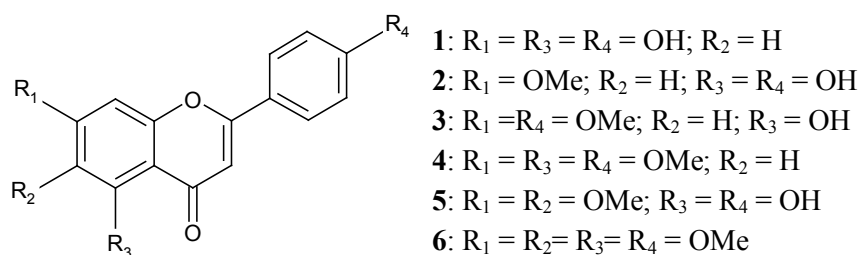
The aim of the present work was to isolate and characterize the structure of flavonoids from *Praxelis clematidea* and study their activity as modulators of drug resistance in *Staphylococcus aureus* SA-1199B.

Some methoxylated flavonoids that potentiate the activity of antimicrobial drugs have already been described [29–32]. However, as far as we know, none of the flavonoids presented here has been previously evaluated. The results add new scientific evidence that flavonoids modulate antibiotic resistance, probably by efflux pump inhibition.

2. Results and Discussion

The structural identification of the compounds (Figure 1) was carried out based on the analysis of the spectral data and by comparison with the literature [33,34]. The compounds were: (1) apigenine (4',5,7-trihydroxyflavone), (2) genkwanin (4',5-dihydroxy-7-methoxyflavone), (3) 7,4'-dimethylapigenin (5-hydroxy-4',7-dimethoxyflavone), (4) trimethylapigenin (4',5,7-trimethoxyflavone), (5) cirsimaritin (4',5,-dihydroxy-6,7-dimethoxyflavone) and (6) tetramethylscutellarein (4',5,6,7-tetramethoxyflavone).

Figure 1. Isolated flavonoids from *Praxelis clematidea*.



Methoxylated flavones showed no antibacterial activity at 256 $\mu\text{g/mL}$ against the tested strain of *S. aureus*. When the compounds were added to the growth medium at 64 $\mu\text{g/mL}$ (1/4 MIC), a reduction in the MIC of at least two-fold (and up to 16-fold) was observed for norfloxacin and ethidium bromide (Table 1). All experiments were carried out at least twice with consistent results.

Table 1. Minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibiotics and ethidium bromide against *Staphylococcus aureus* strain SA-1199B, in the absence and presence of flavones.

Flavones	MIC ($\mu\text{g/mL}$)		
	Norfloxacin	Ethidium bromide	Pefloxacin
None	128	32	16
1	128	32	16
2	64 (2 \times) ^a	16 (2 \times)	16
3	64 (2 \times)	16 (2 \times)	16
4	16 (8 \times)	8 (4 \times)	16
5	32 (4 \times)	8 (4 \times)	16
6	8 (16 \times)	2 (16 \times)	16

^a Fold reduction in MIC.

Methoxylated flavones modulate drug activity by reducing the concentration needed to inhibit the growth of the drug-resistant (effluxing) bacteria. This activity may be related to flavanoid lipophilicity due to the presence of methoxyl groups. Lipophilicity is a common feature of several efflux pump inhibitors and may be a key factor for inhibition in Gram-positive bacteria [28].

Ethidium bromide is a well-known substrate for the NorA efflux protein, and active efflux is the only known mechanism of resistance to this DNA-intercalating dye [35]. Therefore, the use of ethidium bromide against the strain SA-1199B was used to demonstrate that the methoxylated flavones evaluated here modulated norfloxacin resistance by efflux pump inhibition.

Pefloxacin, a hydrophobic quinolone, is a poor substrate of the NorA efflux pump, and it was used as a negative control [25]. Reductions in MICs of norfloxacin and ethidium bromide when combined with chlorpromazine or trifluoperazine were also observed (data not shown), and the results were consistent with those reported by Kaatz *et al.* [24] and by Falcão-Silva *et al.* [32]; both phenothiazines were used as positive (internal) control.

The results can be explained by the increasing lipophilicity in the compounds. An analysis of log P values for the compounds (calculated with ChemDraw Ultra 10.0, Cambridge Software) revealed the following order of lipophilicity: **1** (log P 1.9) < **5** (log P 2.04) < **2** (log P 2.17) < **3** (log P 2.43) < **6** (log P 2.57) < **4** (log P 2.69). This order explains, in part, the following order of activity: Nor: **1** < **2/3** < **5** < **4** < **6** and EB: **1** < **2/3** < **5/4** < **6**.

The importance of the presence of a methoxyl in the 4' position [29] was also observed, as the activity of compounds **3** and **4** was higher than that of compounds **1** and **2**, as well as the activity of compound **6** in relation to that of compound **5**. Another important factor was the total number of methoxyls in the flavonoids, in general, compounds **5** and **6** were more active than the other compounds, which is evident when we observe that compound **5** has a greater lipophilicity only compared to compound **1** and does not show a methoxyl in the 4' position, even though it is more active than compounds **1**, **2** and **3**.

3. Experimental

3.1. General

The NMR spectra were obtained with a Mercury-Varian spectrometer at 200 MHz (^1H) and 50 MHz (^{13}C) and a VARIAN System model operating at 500 MHz (^1H) and 125 MHz (^{13}C). The solvents used were CDCl_3 , CD_3OD and $\text{DMSO}-d_6$, whose characteristic peaks in ^1H and ^{13}C -NMR are used to adjust the frequency scale. For column chromatography, silica gel 60 (70-230 Mesh) from Merck was utilized as the stationary phase. PF_{254} silica gel from Merck was used for the analytical (ATLC) and preparative (PTLC) thin-layer chromatography. The studied substances were identified by using ultraviolet radiation at wavelengths of 254 and 366 nm and by impregnation of plates in glass containers saturated with iodine vapor.

3.2. Plant Material

The aerial parts of *Praxelis clematidea* R.M. King & Robinson were collected in Lagoa do Paturi, a municipality of Santa Rita, in the state of Paraíba (Brazil), in May 2008. The identification of the

botanical material was performed by Prof. Dr. Maria de Fatima Agra, Botany Sector, Laboratory of Pharmaceutical Technology/UFPB “Professor Delby Fernandes de Medeiros”. Exsiccates of the plant are deposited in the Prof. Lauro Pires Xavier (JPB) Herbarium, Paraiba Federal University, under the code M. F. Agra *et al.* 6894 (JPB).

3.3. Extraction and Isolation

The dried and pulverized plant material (aerial parts, 10 kg) was submitted to exhaustive maceration utilizing ethanol as the extraction solvent (3×10 L, every 72 h). The ethanolic solution obtained was concentrated in a rotary evaporator under reduced pressure, resulting in a crude ethanolic extract (600 g). This was partitioned with hexane, chloroform and ethyl acetate. The chloroform phase (120.96 g) was submitted to adsorption column chromatography (CC) using silica gel as the stationary phase and chloroform and methanol as the mobile phase, both as pure or as binary mixtures of increasing polarity, resulting in 188 fractions. These samples were analyzed by ATLC, and after examination with under UV light and iodine vapor, they were classified according to their R_f values into 25 groups. The sub-fractions 10–18 and 64–70 appeared as yellow solids and were identified as compounds **3** and **5**. The subgroup 23–24 was submitted to PTLC, utilizing chloroform and methanol (97:3) and furnishing compounds **6**, **2** and **4**. The subgroup 77–80 was submitted to PTLC, using chloroform and methanol (95:5) and supplying compound **1**.

3.4. Bacterial Strains

The *S. aureus* strain used, SA-1199B, over expresses the *norA* gene encoding the NorA efflux protein which extrudes hydrophilic fluoroquinolones and other drugs such as DNA-intercalating dyes [24,36]. The strain, kindly provided by Professor Simon Gibbons (University of London), was maintained on blood agar base slants (Laboratorios Difco Ltda., Brazil), and prior to use, the cells were grown overnight at 37 °C in brain heart infusion broth (BHI–Laboratorios Difco Ltda., Brazil).

3.5. Antibiotics and Chemicals

Norfloxacin, pefloxacin and ethidium bromide were obtained from Sigma Aldrich Co. Ltd. (USA). The stock solutions of the flavones were prepared in DMSO, and the highest concentration remaining after dilution in broth (4%) caused no inhibition of bacterial growth.

3.6. Drug Susceptibility Testing and Modulation Assay

The minimum inhibitory concentrations (MICs) of the antibiotics and flavonoids were determined in BHI by micro-dilution assay, using a suspension of ca. 10^5 CFU/mL and a drug concentration range from 256 to 0.5 µg/mL (twofold serial dilutions). MIC is defined as the lowest concentration at which no growth is observed. A solution of resazurin (0.01% w/v in sterile distilled water) was used to detect bacterial growth by color change from blue to pink. For the evaluation of flavones as modulators of drug resistance, the “modulation assay” was used, a method that has been widely applied to identify potential EPIs [29], *i.e.*, the MICs of antibiotics were determined in the presence of the flavones (in the BHI) at a sub-inhibitory concentration.

3.7. Log P Estimation

The structures were drawn utilizing the ChemDraw Ultra® 10.0 program (CambridgeSoft, 1986–2005), which also estimate their log P values.

4. Conclusions

Six flavones were isolated from *Praxelis clematidea* and identified through ^1H and ^{13}C -NMR data. Assays were carried out with these compounds against a strain of *Staphylococcus aureus* SA-1199B, with NorA efflux pump activity, demonstrating that the highest methoxylated flavones showed the highest efflux pump inhibition, or modulating of bacterial resistance. Inhibition of the bacterial transporter is related to the lipophilicity of the compound and might confer selectivity when used with antimicrobials.

Acknowledgements

J.P.S-J. and V.S.F-S. are very grateful to Simon Gibbons (University of London). The authors thank Maria de Fatima Agra for botanical identification of the species, and CNPq, CAPES, PRONEX/FAPESQ-PB Brazil for financial support.

References

1. Zomlefer, W.B. *Guide to Flowering Plant Families*; University of North Carolina Press: Chapel Hill, NC, USA, 1994; p. 430.
2. Maas, M.; Petereit, F.; Hensel, A. Caffeic acid derivatives from *Eupatorium perfoliatum* L. *Molecules* **2009**, *14*, 36-45.
3. Bigovic, D.; Brankovic, S.; Kitic, D.; Radenkovic, M.; Jankovic, T.; Savikin, K.; Zivanovic, S. Relaxant effect of the ethanol extract of *Helichrysum plicatum* (Asteraceae) on isolated rat ileum contractions. *Molecules* **2010**, *15*, 3391-3401.
4. Ozgen, U.; Sevindik, H.; Kazaz, C.; Yigit, D.; Kandemir, A.; Secen, H.; Calis, I. A new sulfated α -ionone glycoside from *Sonchus erzincanicus* Matthews. *Molecules* **2010**, *15*, 2593-2599.
5. Brown, G.D. The biosynthesis of artemisinin (Qinghaosu) and the phytochemistry of *Artemisia annua* L. (Qinghao). *Molecules* **2010**, *15*, 7603-7698.
6. Gasparetto, J.C.; Campos, F.R.; Budel, J.M.; Pontarolo, R. *Mikania glomerata* Spreng. and *M. laevigata* Sch. Bip. ex Baker, Asteraceae: Agronomic, genetic, anatomical, chemical, pharmacological, toxicological studies and its use in herbal therapy programs in Brazil. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2010**, *20*, 627-640.
7. Khan, A.L.; Hussain, J.; Hamayun, M.; Gilani, S.A.; Ahmad, S.; Rehman, G.; Kim, Y.H.; Kang, S.M.; Lee, I.J. Secondary metabolites from *Inula britannica* L. and their biological activities. *Molecules* **2010**, *15*, 1562-1577.
8. Lima Silva, F.; Fischer, D.C.H.; Tavares, J.F.; Silva, M.S.; Athayde-Filho, P.F.; Barbosa-Filho, J.M. Compilation of secondary metabolites from *Bidens pilosa* L. *Molecules* **2011**, *16*, 1070-1102.

9. Sánchez-Mendoza, M.E.; Reyes-Ramírez, A.; Cruz-Antonio, L.; Martínez-Jiménez, L.; Rodríguez-Silverio, J.; Arrieta, J. Bioassay-guided isolation of an anti-ulcer compound, tagitinin C, from *Tithonia diversifolia*: Role of nitric oxide, prostaglandins and sulfhydryls. *Molecules* **2011**, *16*, 665-674.
10. De Souza Falcão, H.; Leite, J.A.; Barbosa-Filho, J.M.; Athayde-Filho, P.F.; de Oliveira Chaves, M.C.; Moura, M.D.; Ferreira, A.L.; de Almeida, A.B.A.; Souza-Brito, A.R.M.; de Fátima Foemiga Melo Diniz Diniz, M.; Batista, L.M. Gastric and duodenal antiulcer activity of alkaloids: A review. *Molecules* **2008**, *13*, 3198-3223.
11. Oladipupo, L.A.; Adebola, O.O. Chemical composition of the essential oils of the flowers, leaves and stems of two *Senecio polyanthemoides* Sch. Bip. samples from South Africa. *Molecules* **2009**, *14*, 2077-2086.
12. Kurdelas, R.R.; Lima, B.; Tapia, A.; Egly Feresin, G.; Gonzalez Sierra, M.; Rodríguez, M.V.; Zacchino, S.; Enriz, R.D.; Freile, M.L. Antifungal activity of extracts and prenylated coumarins isolated from *Baccharis darwinii* Hook & Arn. (Asteraceae). *Molecules* **2010**, *15*, 4898-4907.
13. Chaturvedula, V.S.P.; Prakash, I. A new diterpene glycoside from *Stevia rebaudiana*. *Molecules* **2010**, *16*, 2937-2943.
14. Hsu, T.W.; Peng, C.I.; Wang, C.M. *Austroeupatorium inulifolium* (Kunth) King & Robinson (Asteraceae), a Newly Naturalized Plant in Taiwan. *Taiwania* **2006**, *51*, 41-46.
15. Ortiz, J.V.C. *Resposta de dípteros endofagos de capítulos de Praxelis clematidea* (Grisebach) King & Robinson (Eupatorieae-Asteraceae) a concentração de recurso e ao isolamento entre plantas. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ecologia. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia: Campinas, São Paulo, Brazil, 1997.
16. Bohlmann, F.; Wegner, P.; Jakupovic, J.; King, R.M. Structure and synthesis of the methyl ester of *N*-(acetoxy) jasmonoylphenylalanine from *Praxelis clematidea*. *Tetrahedron* **1984**, *40*, 2537-2540.
17. Wang, Z.H.; Christie, P.; Chen, Q.B.; Liu, X.X.; Xie, L.L.; Bai, C.J.; Li, X.L. Allelopathic potential and chemical constituents of volatile oil from *Praxelis clematidea*. *Allelopathy J.* **2006**, *18*, 225-235.
18. Falcão, H.S. *Avaliação da atividade antiulcerogênica do extrato etanólico bruto e fase clorofórmica obtidos das partes aéreas de Praxelis clematidea* (Griseb.) R. M. King & H. Robinson em modelos animais. Masters Dissertation, Federal University of Paraíba: João Pessoa, Paraíba, Brazil, 2007.
19. Emerenciano, V.P.; Militão, J.S.L.T.; Campos, C.C.; Romoff, P.; Kaplan, M.A.C.; Zambon, M.; Brant, A.J.C. Flavonoids as chemotaxonomic markers for Asteraceae. *Biochem. Syst. Ecol.* **2001**, *29*, 947-957.
20. Cushnie, T.P.T.; Lamb, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2005**, *26*, 343-356.
21. Mota, K.S.L.; Dias, G.E.N.; Pinto, M.E.F.; Luiz-Ferreira, A.; Monteiro Souza-Brito, A.R.; Hiruma-Lima, C.A.; Barbosa-Filho, J.M.; Batista, L.M. Flavonoids with gastroprotective activity. *Molecules* **2009**, *14*, 979-1012.
22. Piddock, L.J.V. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacterial. *Clin. Microbiol. Rev.* **2006**, *19*, 382-402.

23. Demain, A.L.; Sanchez, S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. *J. Antibiot.* **2009**, *62*, 5-16.
24. Kaatz, G.W.; Seo, S.M.; Ruble, C.A. Efflux-mediated fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1993**, *37*, 1086-1094.
25. Marquez, B.; Neuville, L.; Moreau, N.J.; Genet, J.; dos Santos, A.F.; Caño de Andrade, M.C.; Sant'Ana, A.E.G. Multidrug resistance reversal agent from *Jatropha elliptica*. *Phytochemistry* **2005**, *66*, 1804-1811.
26. Gibbons, S. Plants as a source of bacterial resistance modulators and anti-infective agents. *Phytochem. Rev.* **2005**, *4*, 63-78.
27. Gibbons, S. Phytochemicals for bacterial resistance—Strengths, weaknesses and opportunities. *Planta Med.* **2008**, *74*, 594-602.
28. Stavri, M.; Piddock, L.J.V.; Gibbons, S. Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. *J. Antimicrob. Chemother.* **2007**, *59*, 1247-1260.
29. Guz, N.R.; Stermitz, F.R.; Johnson, J.B.; Beeson, T.D.; Willen, S. Flavonolignan and flavone inhibitors of a *Staphylococcus aureus* multidrug resistance pump: Structure-activity relationships. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 261-268.
30. Stermitz, F.R.; Scriven, L.N.; Tegos, G.; Lewis, K. Two flavonols from *Artemisa annua* which potentiate the activity of berberine and against a norfloxacin resistant strain of *Staphylococcus aureus*. *Planta Med.* **2002**, *68*, 1140-1141.
31. Silva, D.A.; Falcão-Silva, V.S.; Gomes, A.Y.S.; Costa, D.A.; Lemos, V.S.; Agra, M.F.; Braz-Filho, R.; Siqueira-Júnior, J.P.; Sousa, M.F.W. Triterpenes and phenolic compounds isolated from the aerial parts of *Herissantia tiubae* and evaluation of 5,4',-dihydroxy-3,6,7,8,3'-pentamethoxy-flavone as modulator of bacterial drug resistance. *Pharm. Biol.* **2009**, *47*, 279-284.
32. Falcão-Silva, V.S.; Silva, D.A.; Souza, M.F.V.; Siqueira-Junior, J.P. Modulation of drug resistance in *Staphylococcus aureus* by a kaempferol glycoside from *Herissantia tiubae* (Malvaceae). *Phytother. Res.* **2009**, *23*, 1367-1370.
33. Almeida, J.R.G.S.; Sobral da Silva, M.; da-Cunha, E.V.L.; de Athayde-Filho, P.F.; Melo Diniz, M.F.F.; da Silva, M.G.; Takemura, O.S.; Barbosa-Filho, J.M. Chemical constituents and analgesic activity of *Conocliniopsis prasiifolia*. *Pharm. Biol.* **2006**, *44*, 76-78.
34. Agrawal, P.K. *Carbon-13 NMR of Flavonoids*; Elsevier: New York, NY, USA, 1989.
35. Markham, P.; Westhaus, E.; Klyachko, K.; Johnson, M.E.; Neyfakh, A. Multiple novel inhibitors of the NorA multidrug transporter of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43*, 2404-2408.
36. Kaatz, G.W.; Seo, S.M. Inducible NorA-mediated multidrug resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1995**, *39*, 2650-2655.

Sample Availability: Samples of the compounds are available from the authors.