

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

VANESSA WINIEWSKI

CONSTITUINTES QUÍMICOS E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *Sinningia
warmingii* (GESNERIACEAE)

Curitiba

2016

VANESSA WINIEWSKI

CONSTITUINTES QUÍMICOS E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *Sinningia warmingii* (GESNERIACEAE)

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Química, Curso de Pós-Graduação em Química, Departamento de Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Professora Dra. Maria Élide Alves Stefanello.

Curitiba

2016

W769c

Winiewski, Vanessa

Constituintes químicos e atividade antimicrobiana de *sinningia warmingii* (gesneriaceae) / Vanessa Winiewski. – Curitiba, 2016.
178f. . : il. [algumas color.] ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-graduação em Química, 2016.

Orientadora: Maria Élide Alves Stefanello.

1. Química Farmacêutica. 2. Plantas medicinais. 3. Gesneriaceae. 4. Naftoquinonas. I. Universidade Federal do Paraná. II. Stefanello, Maria Élide Alves. III Título.

CDD: 615.3


TERMO DE APROVAÇÃO

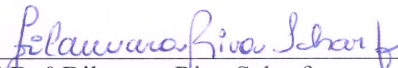
**CONSTITUINTES QUÍMICOS E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
*SINNINGIA WARMINGII***

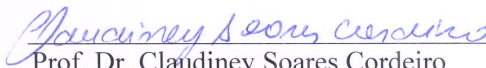
por

VANESSA WINIEWSKI

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química,
pela Comissão Examinadora composta por:

Orientador: 
Prof.^a Dr.^a Maria Élide Alves Stefanello
Dep. de Química – UFPR


Prof.^a Dr.^a Dilamara Riva Scharf
Dep. de Eng. Química – FURB


Prof. Dr. Claudiney Soares Cordeiro
Dep. de Química – UFPR

Curitiba, 18 de novembro de 2016.

Dedico esta dissertação aos meus Pais Loian e Sandra e meus irmãos Jaqueline e Felipe.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a toda a minha família, principalmente aos meus pais Loian Winiewski e Sandra M. M. Winiewski, e aos meus irmãos Jaqueline e Felipe, por todo amor, apoio e incentivo que recebo diariamente mesmo estando longe.

A Deus, pela vida e pela oportunidade de tudo isso acontecer, estando sempre presente em todos os momentos.

À minha orientadora Professora Dra. Maria Élda Alves Stefanello, pela orientação, dedicação e ensinamentos, um exemplo a seguir de pessoa e profissional.

Aos meus colegas de laboratório. Em especial ao Cristhian Santos Oliveira e à Magali Amorim. Obrigada pelo companheirismo, por dividirem comigo momentos de angústias e alegrias, além de ajuda no trabalho.

À Dra. Maria Helena Verdán, pela amizade e toda a ajuda desde o início do trabalho, e mesmo depois estando longe sempre disposta a ajudar.

Aos Professores da banca Prof. Dr. Claudiney Soares Cordeiro e Profa. Dra. Dilamara Riva Scharf pelo aceite e disponibilidade em avaliar e contribuir com este trabalho.

Ao Professor Dr. Francisco de Assis Marques pelas sugestões e contribuições no exame de qualificação.

Aos Professores que fizeram parte da minha formação como mestre, Andersson Barison, Francisco de Assis Marques, Beatriz H. L. N. S. Maia, Leandro Piovan, e Bruno J. Gonçalves da Silva.

Ao Professor Dr. Marcos José Salvador do Instituto de Biologia da Unicamp, pelos ensaios de atividade antimicrobiana.

À Clarisse B. Poliquesi do Museu Botânico Municipal de Curitiba pela coleta e identificação da espécie de *Sinningia warmingii*.

Ao centro de Ressonância Magnética Nuclear da UFPR, pelo auxílio e disponibilidade dos equipamentos.

Ao programa de Pós-graduação em Química da UFPR, pela estrutura e oportunidades.

À Universidade Federal do Paraná, pela estrutura.

A todos que direta e indiretamente auxiliaram para a realização deste trabalho. Obrigada!

Os sonhos não determinam o lugar onde vocês vão chegar, mas produzem a força necessária para tirá-los do lugar em que vocês estão. Sonhem com as estrelas para que vocês possam pisar pelo menos na Lua. Sonhem com a Lua para que vocês possam pisar pelo menos nos altos montes. Sonhem com os altos montes para que vocês possam ter dignidade quando atravessarem os vales das perdas e das frustrações. Bons alunos aprendem a matemática numérica, alunos fascinantes vão além, aprendem a matemática da emoção, que não tem conta exata e que rompe a regra da lógica. Nessa matemática você só aprende a multiplicar quando aprende a dividir, só consegue ganhar quando aprende a perder, só consegue receber, quando aprende a se doar.

(Augusto Cury)

RESUMO

A família Gesneriaceae compreende cerca de 150 gêneros e 3.000 espécies, podendo ser ervas, cipós ou arbustos, geralmente ornamentais. No Brasil ocorrem 27 gêneros e 211 espécies, algumas das quais são utilizadas na medicina tradicional. O gênero mais comumente encontrado no Brasil é *Sinningia*, com 72 espécies. A espécie *Sinningia warmingii* é uma planta herbácea, de ciclo anual, com tubérculo perene. Pode ser encontrada no Brasil desde Minas Gerais até o Rio Grande do Sul além de nos demais países da América do Sul com exceção do Chile e Uruguai. Estudos fitoquímicos com espécies de *Sinningia* revelaram a presença de diversas classes de compostos como quinonas, terpenos, cromenos, e glicosídeos fenólicos. Em um estudo anterior o extrato em hexano dos tubérculos de *Sinningia warmingii* rendeu oito substâncias conhecidas: tectoquinona, 1-hidroxitectoquinona, 7-hidroxitectoquinona, 7-metoxitectoquinona, aggregatina C, aggregatina D, halleridona e 8-metoxilapachenol. O trabalho atual teve como objetivos continuar o estudo fitoquímico dos tubérculos de *S. warmingii* e avaliar a sua atividade antimicrobiana. Os tubérculos de *S. warmingii*, secos e moídos, foram extraídos com etanol. O extrato resultante foi particionado com hexano, acetato de etila e butanol. As substâncias presentes nas frações foram isoladas e purificadas através de técnicas cromatográficas. Para identificação das substâncias isoladas foram utilizados métodos espectroscópicos, principalmente ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas, além de comparação com a literatura. Desse modo foram obtidas oito substâncias: tectoquinona (**SW1**), aggregatina E (**SW2**), aggregatina F (**SW3**), warmingiina A (**SW4**), warmingiina B (**SW5**), halleridona (**SW6**), cleroindicina B (**SW7**), e cornosídeo (**SW8**). Destas, **SW1** e **SW6** já haviam sido reportadas anteriormente em *S. warmingii*, **SW4** e **SW5** são inéditas, e as demais estão sendo reportadas pela primeira vez na espécie. O extrato etanólico e as frações em hexano, acetato de etila e butanol foram avaliados quanto à atividade antimicrobiana, *in vitro*, contra bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 14458, *S. epidermidis* ATCC 12228), Gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 10799, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) e fungos (*Candida albicans* ATCC 10231, *C. glabrata* ATCC 30070, *C. dubliniensis* ATCC 778157 e *C. parapsilosis* ATCC 22019). Todas as amostras se mostraram inativas (CIM > 500 µg mL⁻¹) e por essa razão as substâncias isoladas não foram testadas.

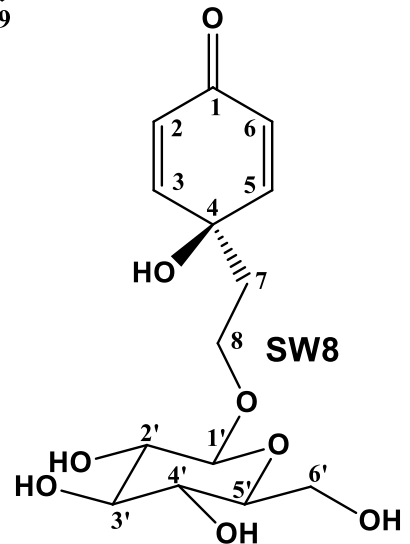
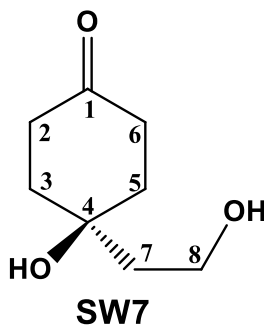
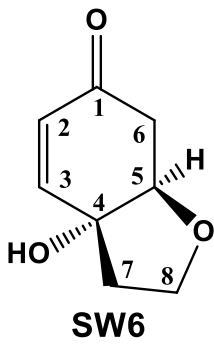
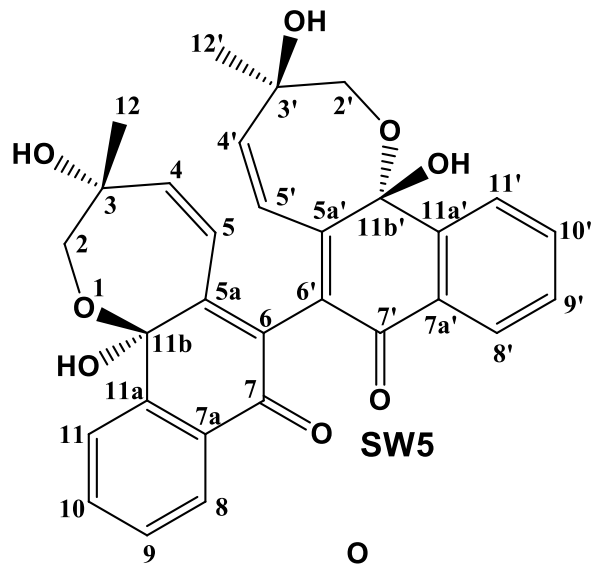
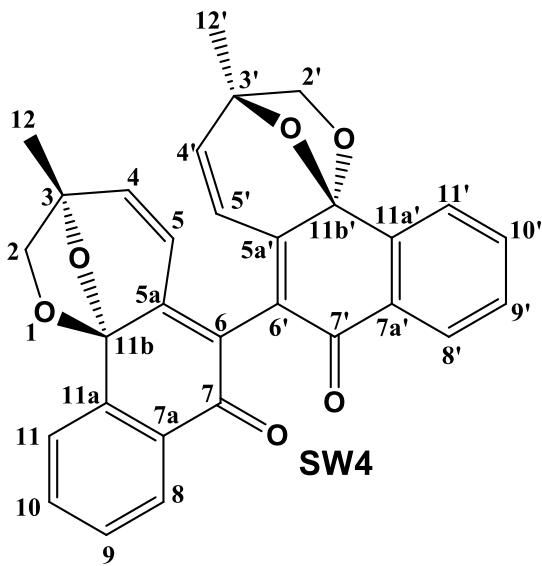
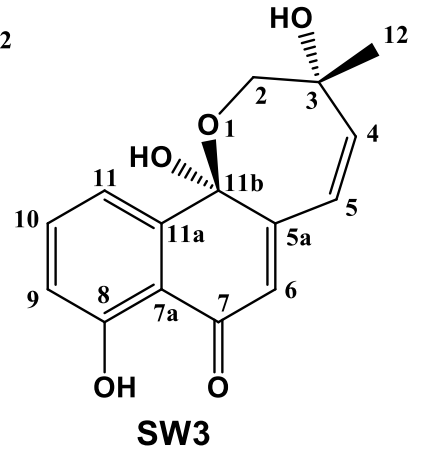
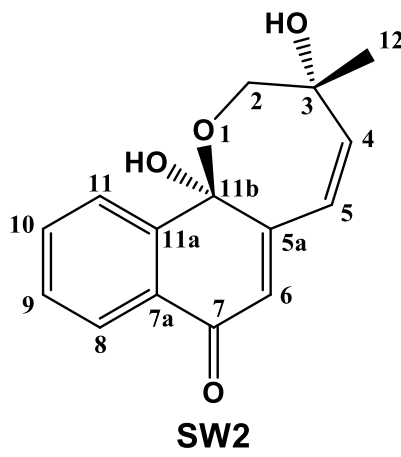
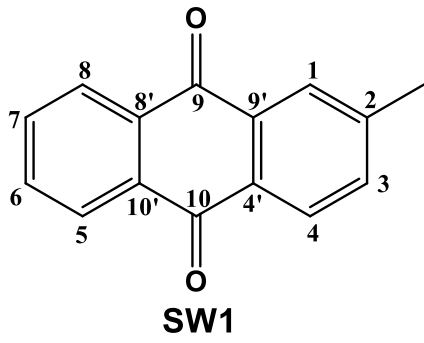
Palavras chaves: Gesneriaceae, *Sinningia warmingii*, naftoquinonas, atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

The Gesneriaceae family comprises about 150 genera and 3,000 species of herbs, shrubs or lianas, usually ornamental. In Brazil there are 27 genera and 211 species, of which some are used in the traditional medicine. The largest genus is *Sinningia* with 72 species. *Sinningia warmingii* is an herbaceous plant with annual cycle and perennial tubers, which is found in Brazil from Minas Gerais to Rio Grande do Sul as well as in other countries of South America except Chile and Uruguay. Phytochemical studies with *Sinningia* species revealed the presence of several classes of compounds such as quinones, terpenes, chromenes, and phenolic glycosides. In a previous study, the hexane extract from *Sinningia warmingii* tubers yielded eight known substances: tectoquinone, 1-hydroxytectoquinone, 7-hydroxytectoquinone, 7-methoxytectoquinone, aggregatin C, aggregatin D, halleridone and lapachenole. This work aims to continue the phytochemical study of *S. warmingii* tubers, and to evaluate its antimicrobial activity. Dried and powdered tubers of *S. warmingii*, were extracted with ethanol and the resulting extract were partitioned with hexane, ethyl acetate and 1-butanol. Compounds were isolated by chromatographic techniques, and identified by spectroscopic methods, mainly nuclear magnetic resonance and mass spectrometry, besides comparison with the literature. In this way, eight compounds were identified: tectoquinone (**SW1**), aggregatin E (**SW2**), aggregatin F (**SW3**), warmingiin A (**SW4**), warmingiin B (**SW5**), halleridone (**SW6**), cleroidicin B (**SW7**), and cornoside (**SW8**). **SW1** and **SW6** had been previously reported in *S. warmingii*, **SW4** and **SW5** are new, and the other are being reported for the first time in the species. The ethanolic extract and fractions in hexane, ethyl acetate and butanol were evaluated *in vitro* for antimicrobial activity against Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus* ATCC 14458, *S. epidermidis* ATCC 12228), Gram-negative (*Escherichia coli* ATCC 10799, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) and fungi (*Candida albicans* ATCC 10231, *C. glabrata* ATCC 30070, *C. dubliniensis* ATCC 778157, and *C. parapsilosis* ATCC 22019). All samples were inactive (MIC > 500 g mL⁻¹), and for this reason the isolated substances were not tested.

Key words: Gesneriaceae, *Sinningia warmingii*, naphthoquinones, antimicrobial activity.

ESTRUTURAS DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS



LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Espécie da família Gesneriaceae, <i>Saintpaulia ionantha</i> (violeta africana).....	16
FIGURA 2. Espécies de <i>Sinningia</i> . A - <i>Sinningia leucotricha</i> ; B - <i>S. speciosa</i> (gloxínia)..	17
FIGURA 3. Flavonóides e fenólicos isolados de <i>Sinningia cardinalis</i>	20
FIGURA 4. Constituintes voláteis de <i>Sinningia tubiflora</i> (8) e <i>S. aggregata</i>	20
FIGURA 5. Antraquinonas isoladas de <i>Sinningia spp</i>	20
FIGURA 6. Hidronaftoquinonas (19-24) e naftoquinonas isoladas de <i>Sinningia spp</i>	21
FIGURA 7. Fenólicos isolados de <i>Sinningia spp</i>	21
FIGURA 8. Glicosídeo fenólico (28) e etilciclohexanoides isolados de <i>Sinningia spp</i>	22
FIGURA 9. Esteróides isolados de <i>Sinningia spp</i>	22
FIGURA 10. Cromenos isolados de <i>Sinningia spp</i>	23
FIGURA 11. Sesquiterpenos isolados de <i>Sinningia spp</i>	24
FIGURA 12. Triterpenos isolados de <i>Sinningia spp</i>	25
FIGURA 13. Fotos de <i>S. warmingii</i> : planta florida no campo, detalhe da flor e tubérculo.	26
FIGURA 14. Espectro de RMN de ^1H de SW1 , com ampliação região aromática (CDCl_3 , 400 MHz).....	37
FIGURA 15. Mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C de SW1 (CDCl_3 , 400 MHz).	37
FIGURA 16. Mapa de correlação a longa distância ^1H - ^{13}C de SW1 (CDCl_3 , 400 MHz). ..	38
FIGURA 17. Correlações observadas no mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância de SW1	38
FIGURA 18. Espectro de RMN de ^1H de SW2 (CDCl_3 , 200 MHz).	41
FIGURA 19. Mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C de SW2 (CDCl_3 , 400 MHz).	41
FIGURA 20. Mapa de correlação a longa distância ^1H - ^{13}C de SW2 (CDCl_3 , 400 MHz). ..	42
FIGURA 21. Principais correlações observadas no mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância de SW2	42
FIGURA 22. Espectro de RMN de ^1H de SW3 (CDCl_3 , 400 MHz).	44
FIGURA 23. Mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C de SW3 (CDCl_3 , 400 MHz).	45
FIGURA 24. Mapa de correlação a longa distância ^1H - ^{13}C de SW3 (CDCl_3 , 400 MHz). ..	45
FIGURA 25. Principais correlações observadas no mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância de SW3	46
FIGURA 26. Ilustração da estrutura de SW4 obtida por cristalografia de Raios X.	48
FIGURA 27. Espectro de massas de alta resolução de SW4	49
FIGURA 28. Espectro de RMN de ^1H de SW4 (CDCl_3 , 600 MHz)	49
FIGURA 29. Mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C de SW4 (CDCl_3 , 600 MHz).	50
FIGURA 30. Mapa de correlação a longa distância ^1H - ^{13}C de SW4 (CDCl_3 , 600 MHz). ..	50

FIGURA 31. Espectro de dicroísmo circular de SW4	51
FIGURA 32. Principais correlações observadas no mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância de SW4	51
FIGURA 33. Espectro de massas de alta resolução da mistura SW5 . Ampliação dos picos correspondentes as substâncias SW4 e SW5	54
FIGURA 34. Espectro de RMN ^1H de SW5 (CDCl_3 , 600 MHz).	55
FIGURA 35. Espectros de RMN de ^1H de SW5 (superior) e SW4 (inferior), com ampliação da região dos hidrogênios metílicos (CDCl_3 , 600 MHz).	55
FIGURA 36. Espectro de RMN de ^1H da região olefínica de SW5 imediatamente após o isolamento (superior) e seis semanas depois (inferior) (CDCl_3 , 600 MHz).	56
FIGURA 37. Mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C de SW5 (CDCl_3 , 600 MHz).	56
FIGURA 38. Mapa de correlação a longa distância ^1H - ^{13}C de SW5 (CDCl_3 , 600 MHz).	57
FIGURA 39. Principais correlações observadas no mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância de SW5	57
FIGURA 40. Espectro de RMN de ^1H de SW6 (CDCl_3 , 200 MHz).	59
FIGURA 41. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e DEPT-135 de SW6 (CDCl_3 , 50 MHz).	60
FIGURA 42. Espectro de RMN de ^1H de SW7 (CDCl_3 , 400 MHz).	62
FIGURA 43. Mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C de SW7 (CDCl_3 , 400 MHz).	62
FIGURA 44. Mapa de correlação a longa distância ^1H - ^{13}C de SW7 (CDCl_3 , 400 MHz).	63
FIGURA 45. Principais correlações observadas no mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância de SW7	63
FIGURA 46. Espectro de RMN de ^1H de SW8 (MeOH-D_4 , 400 MHz).	65
FIGURA 47. Mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C de SW8 (MeOH-D_4 , 400 MHz)	66
FIGURA 48. Mapa de correlação a longa distância ^1H - ^{13}C de SW8 (MeOH-D_4 , 400 MHz).	66
FIGURA 49. Principais correlações observadas no mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância de SW8	67
FIGURA 50. Proposta biogenética para o ácido 1,4-diidroxi-naftóico	70
FIGURA 51. Proposta biogenética para os derivados de naftoquinonas isolados de <i>S. warmingii</i>	72

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Frações obtidas da cromatografia em coluna da fração em hexano.....	29
TABELA 2. Frações obtidas da cromatografia em coluna da fração em AcOEt.	31
TABELA 3. Frações obtidas da cromatografia em coluna da fração em 1-butanol.	32
TABELA 4. Substâncias isoladas de <i>Sinningia warmingii</i>	35
TABELA 5. Dados de RMN de SW1 (CDCl ₃ , 400 MHz) e comparação com dados da literatura	39
TABELA 6. Dados de RMN de SW2 (CDCl ₃ , 400 MHz) e comparação com dados da literatura	43
TABELA 7. Dados de RMN de SW3 (CDCl ₃ , 400 MHz) e comparação com dados da literatura	46
TABELA 8. Dados de RMN de SW4 (CDCl ₃ , 600 MHz).....	52
TABELA 9. Dados de RMN de SW5 (CDCl ₃ , 600 MHz).....	58
TABELA 10. Dados de RMN de SW6 (CDCl ₃ , 400 MHz) e comparação com dados da literatura	60
TABELA 11. Dados de RMN de SW7 (CDCl ₃ , 400 MHz) e comparação com dados da literatura	64
TABELA 12. Dados de RMN de SW8 (MeOH-D ₄ , 400 MHz) e comparação com dados da literatura	67

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

1D	Uma dimensão
2D	Duas dimensões
ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de etila
c	Concentração
CC	Cromatografia em coluna
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DCM	Diclorometano
δ	Deslocamento químico
<i>d</i>	Dupleto
<i>dd</i>	Duplo dupleto
<i>ddd</i>	Duplo duplo dupleto
<i>dq</i>	Duplo quarteto
<i>dm</i>	Duplo multipleteo
<i>dt</i>	Duplo tripleto
DEPT-135	Intensificação dos níveis através da transferência de polarização sem efeito de distorção
EM-AR	Espectroscopia de massas de alta resolução
EtOH	Etanol
HMBC	<i>Heteronuclear multiple bond coherence</i> (correlação nuclear a múltiplas ligações)
HSQC	<i>Heteronuclear single quantum coherence</i> (correlação heteronuclear a uma ligação)
HPLC	High performance liquid chromatography

Hz	Hertz
IV	Infravermelho
min	Minutos
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
<i>n</i> -BuOH	1-Butanol
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
T _R	Tempo de retenção
TMS	Tetrametilsilano
Unicamp	Universidade Estadual de Campinas
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. FAMÍLIA GESNERIACEAE	16
1.2. GÊNERO <i>SINNINGIA</i>	17
2. OBJETIVOS	26
2.1. GERAIS	26
2.2. ESPECÍFICOS	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1. PROCEDIMENTOS GERAIS	27
3.2. ESTUDO FITOQUÍMICO.....	28
3.2.1. COLETA DO MATERIAL BOTÂNICO	28
3.2.2. PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS	28
3.2.3. ISOLAMENTO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	28
3.3. ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	33
3.4. DADOS FÍSICOS E ESPECTROMÉTRICOS DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1. IDENTIFICAÇÃO DA ANTRAQUINONA SW1	36
4.2. IDENTIFICAÇÃO DAS HIDRONAFTOQUINONAS SW2 E SW3	39
4.3. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS DERIVADOS DIMÉRICOS DE NAFTOQUINONAS SW4 E SW5	47
4.4. IDENTIFICAÇÃO DOS ETILCICLOEXANOIDES SW6 , SW7 E SW8	58
4.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	68
5. PROPOSTA DE BIOGÊNESE	68
6. CONCLUSÃO	73
7. REFERÊNCIAS	74

1. INTRODUÇÃO

Produtos naturais são substâncias formadas através de vias do metabolismo secundário, ou seja, aquelas não essenciais para o crescimento, desenvolvimento ou reprodução de um organismo. Podem ser encontrados em fungos, bactérias e organismos marinhos, mas as plantas superiores são a principal fonte de produtos naturais. São frequentemente produzidos em resposta a estímulos externos, como variações de nutrientes, infecção e competição com outras espécies (VAISHNAV e DEMAIN, 2010; STROHL, 2000). Cada espécie produz um conjunto de metabólitos secundários adequado às demandas particulares do seu nicho ecológico.

A diversidade química dos metabólitos secundários reflete as diferenças entre os organismos, com suas particularidades morfológicas e enzimáticas (HARTMANN, 2007). O metabolismo secundário vegetal tem sido uma rica fonte de novas substâncias biologicamente ativas, muitas das quais se tornaram extremamente importantes na terapia (NEWMAN *et al.*, 2008). A grande biodiversidade, ainda pouco explorada, representa um estímulo para a descoberta de medicamentos baseados em produtos naturais. A interação dos diversos organismos entre si e com o ambiente leva à produção de diversas substâncias químicas naturais complexas (McCHESNEY *et al.*, 2007).

Apesar do declínio na utilização de produtos naturais, devido ao desenvolvimento de análogos sintéticos com alto rendimento, a investigação química, principalmente de famílias pouco conhecidas, é importante para a descoberta de novas moléculas, que possam ser utilizadas diretamente na terapia ou como modelo de novas drogas destinadas tanto a fármacos, como também para cosméticos, agroquímicos entre outros (McCHESNEY *et al.*, 2007).

Dentre os compostos bioativos com maior interesse, estão aqueles que apresentam atividade antitumoral, visto que vários tumores ainda não dispõem de tratamento adequado. Existe também interesse na descoberta de novos fármacos destinados aos tratamentos de doenças infecciosas. Entre os anos de 2005 e 2007 um total de 13 fármacos derivados de produtos naturais foram aprovados para utilização (COSTA-LUTUFO *et al.*, 2010), e no decorrer dos anos esse número só tende a crescer.

Além desse aspecto utilitário, os estudos fitoquímicos contribuem para a compreensão das relações filogenéticas entre os táxons (quimiosistemática) e para documentar a composição química de espécies que podem vir a ser extintas no futuro próximo.

1.1. FAMÍLIA GESNERIACEAE

A família Gesneriaceae Rich. & Juss. é pantropical, com poucas espécies encontradas nas regiões frias. Atualmente são reconhecidos cerca de 150 gêneros e 3000 espécies. No Brasil ocorrem 27 gêneros e 211 espécies, sendo 140 espécies endêmicas. (ARAUJO *et al.*, 2015). As gesneriáceas podem ser ervas, cipós ou arbustos, perenes ou anuais, terrestres, epífitas (sobre outras plantas) ou rupícolas (sobre pedras). Apresentam folhas geralmente opostas, podendo ser rosuladas ou verticiladas e as flores zigomorfas com uma diversa variedade de cores, sendo frequentemente utilizadas como ornamentais. A espécie ornamental mais conhecida da família é a violeta africana (*Saintpaulia ionantha*) (Figura 1) (BOGGAN & SHALIT, 2006).

A família Gesneriaceae pertence à ordem das Lamiales, estando taxonomicamente próxima às famílias Plumbaginaceae, Lentibulariaceae, Calceolariaceae e Oleaceae (BARROS, *et al.*, 2010). Gesneriaceae é subdividida em duas subfamílias, Cyrtandroideae e Gesnerioideae de acordo com o desenvolvimento do embrião após a germinação da semente. Na subfamília Cyrtandroideae os cotilédones crescem de maneira desigual e não há presença de endosperma e ovário súpero. As espécies desta subfamília são paleotropicais com ocorrência na África, Ásia, Europa e Oceania, com exceção da tribo Coronanthereae que ocorre na Austrália e América do Sul. A subfamília Gesnerioideae, ao contrário da Cyrtandroideae, apresenta crescimento dos cotilédones de maneira homogênea e presença de endosperma e ovário ínfero na maioria das espécies. Esta subfamília é exclusivamente neotropical (ARAUJO *et al.*, 2005; BURTT, 1977; PERRET *et al.*, 2013)

Muitas espécies de Gesneriaceae são utilizadas na medicina tradicional, principalmente contra febre, tosse, resfriado, dores, doenças infecciosas e inflamatórias (VERDAN & STEFANELLO, 2012).



Figura 1. Espécie da família Gesneriaceae, *Saintpaulia ionantha* (violeta africana).

1.2. GÊNERO *SINNINGIA*

O gênero *Sinningia* Nees é neotropical, compreendendo 72 espécies, distribuídas desde o sul do México até o norte da Argentina. A maioria é encontrada no território brasileiro, principalmente nas regiões Sul e Sudeste do país (ARAUJO & CHAUTEMS, 2015a; ARAUJO & CHAUTEMS, 2015b; FERREIRA *et al.*, 2014). São ervas terrestres, rupícolas (crescendo em cima de pedras) ou epifíticas (crescendo em cima de árvores), com caule carnoso ou lenhoso na parte basal, sem raízes adventícias e sistema subterrâneo tuberoso perene, em alguns casos obsoleto. A maioria das espécies de *Sinningia* apresenta um ciclo anual de desenvolvimento. As partes aéreas crescem durante o período chuvoso (primavera/verão) e fenecem no período de seca (outono/inverno), deixando as gemas dormentes nos tubérculos, que renascem na próxima primavera (CHAUTEMS, 2003; ARAUJO *et al.*, 2005). Entretanto algumas espécies são exceção a esse padrão. Como exemplo, podemos citar *S. nordestina*, distinta dos demais membros do gênero pela presença de tubérculos vestigiais, que não rebrotam (CHAUTEMS *et al.*, 2000).

A maioria das espécies de *Sinningia* são ervas pequenas, com flores vermelhas ou alaranjadas, o que lhes dá um grande potencial ornamental. *Sinningia speciosa*, conhecida como gloxínia, é cultivada e facilmente encontrada nas floriculturas. O seu cultivo foi iniciado na Inglaterra ainda no início do século XIX (ZAITLIN, 2012). Outra espécie vendida como ornamental é *S. leucotricha*, conhecida como rainha-do-abismo (brazilian edelweiss no exterior), cujas populações naturais estão em risco devido à coleta indiscriminada, aliada à degradação ambiental causada pela agricultura e pela expansão urbana (Figura 2) (UNEMOTO *et al.*, 2006).

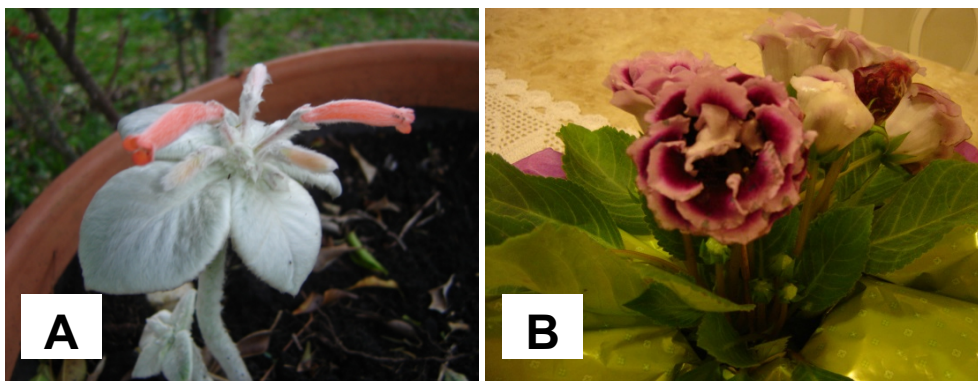


Figura 2. Espécies de *Sinningia*. A - *Sinningia leucotricha*; B – *S. speciosa* (gloxínia).

Algumas espécies de *Sinningia* são empregadas na medicina popular. Os indígenas mexicanos utilizam *S. incarnata* como contraceptivo e contra diarreia (WIEHLER, 1995; BORK *et al.*, 1997), enquanto que na Colômbia essa planta é considerada revitalizante (CARBONÓ-DELAHOZ & DIB-DIAZGRANADOS, 2013). *S. tubiflora* é empregada como purgativo na Argentina (WIEHLER, 1995). No Brasil, os tubérculos de *S. allagophylla* são considerados úteis como tônico e emoliente, enquanto que as partes aéreas são empregadas como diurético e febrífugo (MORS *et al.*, 2000; GOMES & SHEPHERD, 2000). Outra espécie considerada medicinal no Brasil é *S. macrostachya*, utilizada para tratar problemas renais (CEOLIN, 2009).

Estudos químicos e farmacológicos com espécies de *Sinningia* são relativamente recentes, estando restritos a poucas espécies. *Sinningia cardinalis* (Lehm) H.E. Moore foi a primeira espécie do gênero a ser investigada, revelando a presença das antocianinas luteolinidina-5-O-glucopiranosídeo (**1**), apigeninidina-5-O-glucopiranosídeo (**2**), luteolina-7-O-glicosídeo (**3**), luteolina-7-O-glucuronídeo (**4**) e apigenina-7-O-glucuronídeo (**5**), além de verbascosídeo (**6**), um glicosídeo fenólico, e do ácido cinâmico (**7**) (Figura 3) (JENSEN, 1996; SWINNY *et al.*, 2000; WINEFIELD, *et al.*, 2005).

Duas espécies tiveram os seus constituintes voláteis investigados: *S. tubiflora* cujas flores produzem um aroma rico em linalol (**8**) (PERRET *et al.*, 2003), e *S. aggregata*, que produz uma resina aromática constituída de compostos alifáticos de cadeia longa e uma fração sesquiterpênica. Nesta fração se destacam acetato de (*Z*)-nerolidila (8,5%, **9**), espatulenol (7,5%, **10**) e (*E*)-nerolidol (6,4%, **11**) (STEFANELLO *et al.*, 2005) (Figura 4).

Tendo em vista a escassez de dados químicos sobre a família Gesneriaceae e, em particular sobre o gênero *Sinningia*, o nosso grupo de pesquisa tem se dedicado nos últimos anos ao estudo fitoquímico de espécies desse gênero.

O estudo fitoquímico dos tubérculos de *S. aggregata* forneceu 20 substâncias: tectoquinona (**12**), 1-hidroxitectoquinona (**13**), 6-hidroxitectoquinona (**14**), 7-hidroxitectoquinona (**15**), 7-metoxitectoquinona (**16**), pustulina (**17**), 1,6-diidroxitectoquinona (**18**), aggregatinas A-F (**19-24**), cornosídeo (**25**), tirosol (**26**), ferulato de icosila (**27**), calceolariosídeo-B (**28**), halleridona (**29**), sitosterol (**30**) e, estigmasterol (**31**) (Figuras 5-9). As substâncias **19-24** eram inéditas na literatura (VERDAN *et al.*, 2010; 2015b).

Os tubérculos de *S. speciosa* renderam as naftoquinonas **16** e rubiawallina-B (**32**), enquanto que as partes aéreas forneceram os esteroides **30** e **31**, juntamente com os cicloetilexanoides isorengiol (**33**) e cleroindicina-B (**34**) (Figuras 6-9) (VERDAN *et al.*, 2009).

Os tubérculos de *S. allagophylla*, uma planta encontrada na região centro-sul do

Brasil, forneceram 22 substâncias: **12**, **15**, **23**, **29**, oleato de sitosterila (**35**), linoleato de sitosterila (**36**), oleato de estigmasterila (**37**), linoleato de estigmasterila (**38**), dunninol (**39**), α -dunniona (**40**), dunniona (**41**), 8-hidroxi-dunniona (**42**), lapachenol (**43**), 8-metoxilapachenol (**44**), allagophyllidimeros A-C (**45-47**), (2S)-12-hidroxi-lapachenol (**48**), (3R)-3,4-diidro-3-hidroxi-4-oxo-8-metoxilapachenol (**49**), 6-metoxi-7,8-benzocumarina (**50**), cedrol (**51**) e ácido oleanólico (**52**) (Figuras 5-8, 9-12). As substâncias **44-49** eram inéditas na literatura (RIVA *et al.*, 2012; SCHARF *et al.*, 2016).

S. leucotricha forneceu vários sesquiterpenos como o ácido leucotrichóico (**53**), leucotrichol (**54**), presilphiperfolan-9-ol (**55**), 11-*epi*-subergorgiol (**56**), 11-*epi*-silphiperfolenal (**57**), além dos triterpenos hederagenina (**58**), ácido 23-hidroxiursólico (**59**) e ácido betulínico (**60**), e das naftoquinonas 7,8-dimetoxidunniona (**61**), 7-hidroxi- α -dunniona (**62**) e 6-metoxi-7-hidroxi- α -dunniona (**63**) (Figuras 6, 11 e 12) (VERDAN *et al.*, 2013; 2015a).

Os tubérculos de *S. canescens* produzem um óleo aromático contendo principalmente sesquiterpenos não oxigenados (82,6%), sendo os principais constituintes β -santaleno (**64**, 14,6%), β -cedreno (**65**, 10,4%), α -cedreno (**66**), 2-*epi*- β -funebreno (**67**) e *trans*-cadinana-1(6)-4-dieno (**68**, 10,0%). Os compostos **66** e **67** co-eluíram, representando juntos 18,3%. Além do óleo foram isoladas as seguintes substâncias: **12**, **29**, **39**, **54**, **55**, **62**, **63**, 7,8-dimetoxi- α -dunniona (**69**), 7-metoxi-8-hidroxi- α -dunniona (**70**) (Figuras 5, 6, 8, 11 e 19) (VERDAN *et al.*, 2014; 2015a).

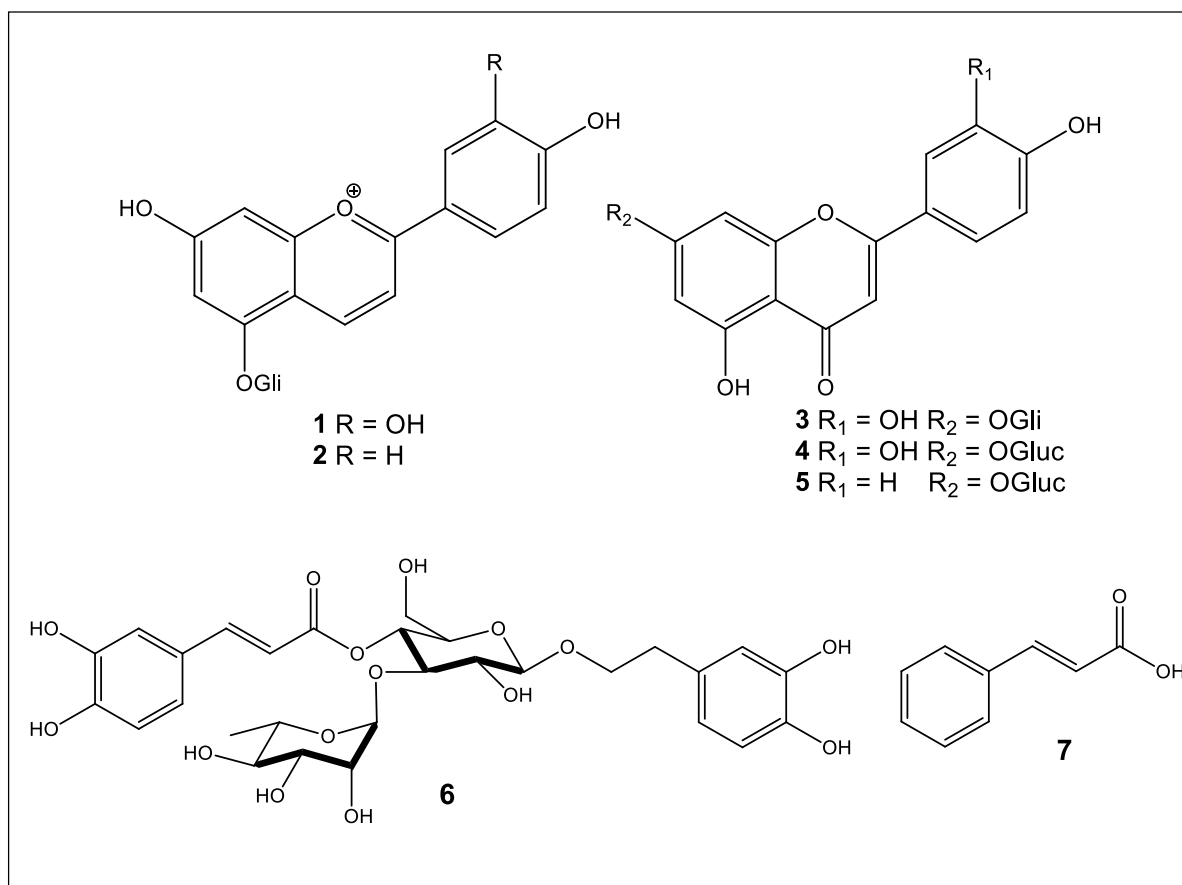


Figura 3. Flavonoides e fenólicos isolados de *Sinningia cardinalis*.

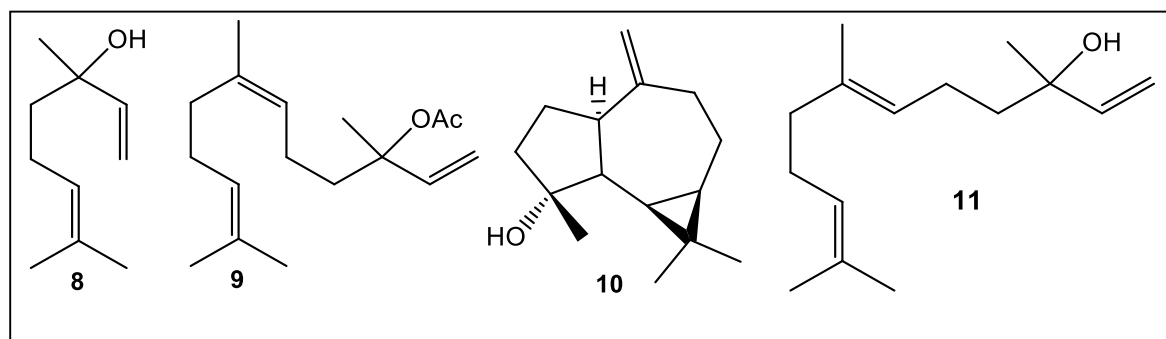


Figura 4. Constituintes voláteis de *Sinningia tubiflora* (**8**) e *S. aggregata*.

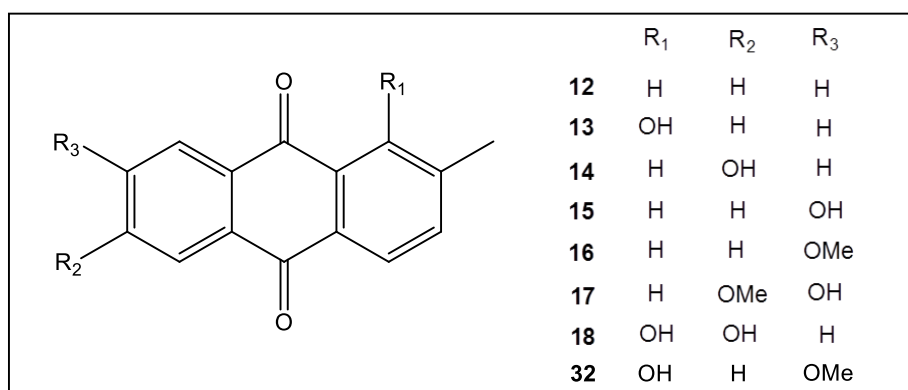


Figura 5. Antraquinonas isoladas de *Sinningia* spp.

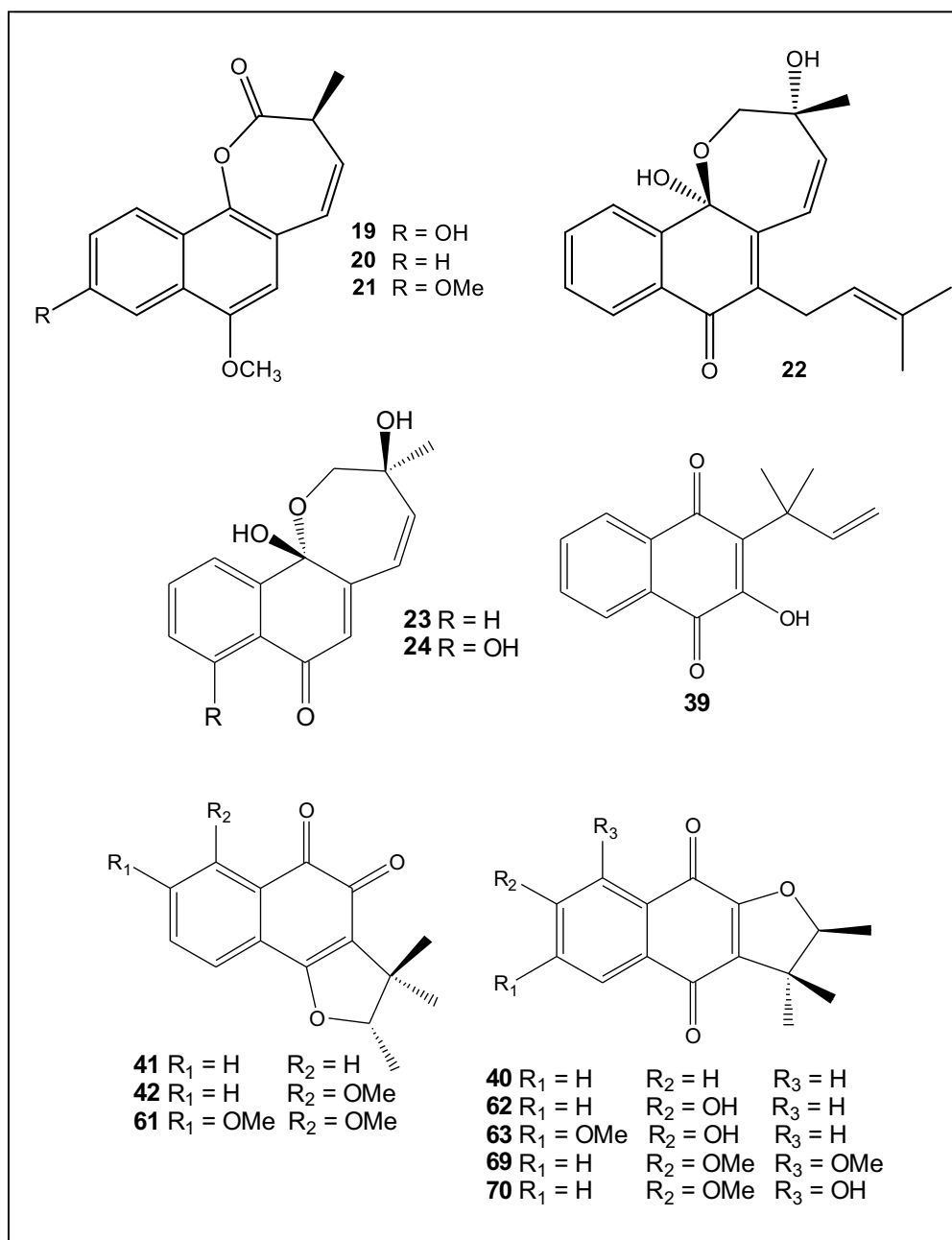


Figura 6. Hidronaftoquinonas (**19-24**) e naftoquinonas isoladas de *Sinningia* spp.

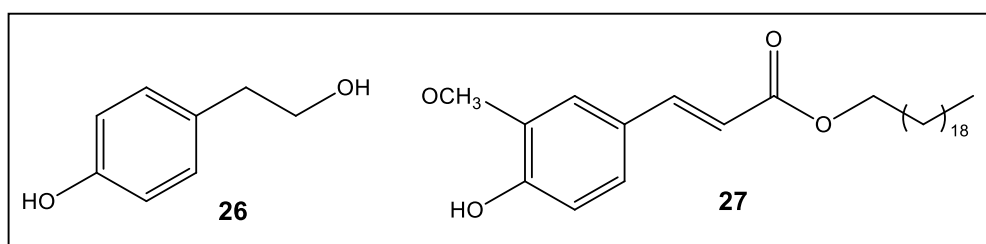


Figura 7. Fenólicos isolados de *Sinningia* spp.

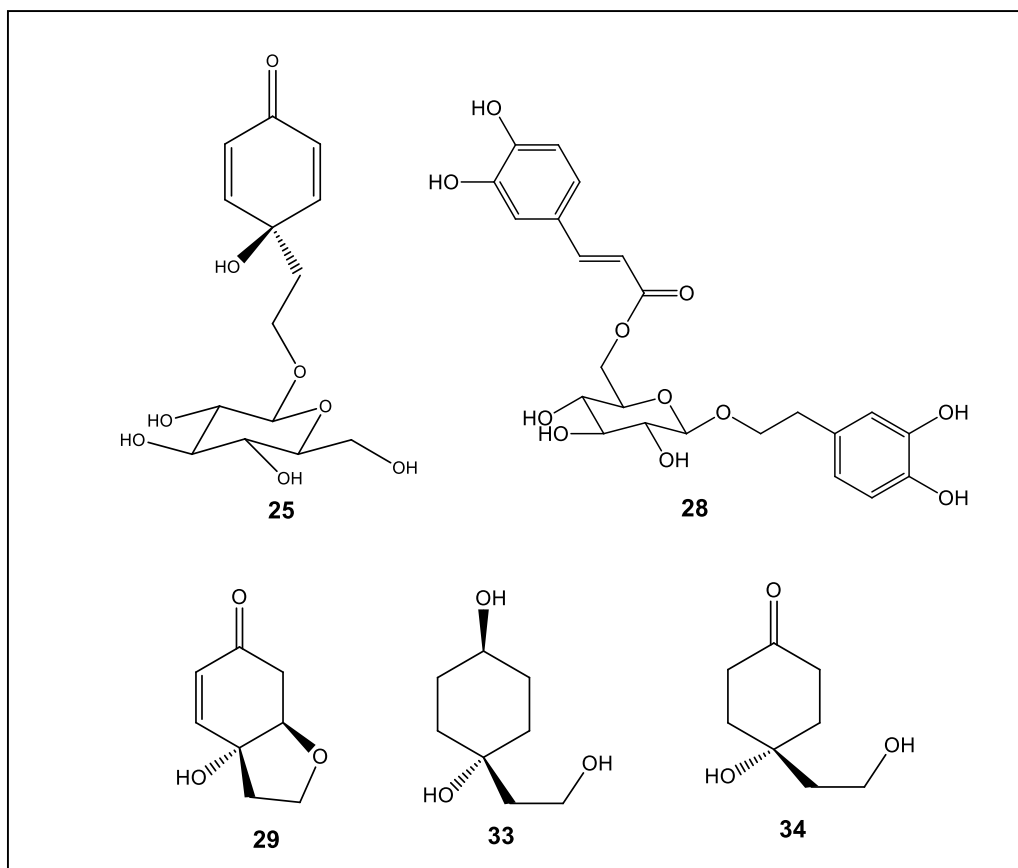


Figura 8. Glicosídeo fenólico (**28**) e etilciclohexanoides aislados de *Sinningia* spp.

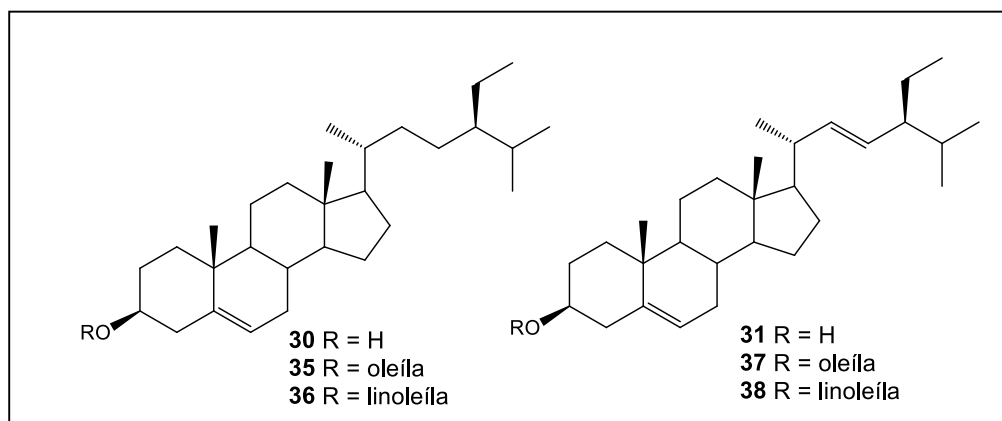


Figura 9. Esteroides aislados de *Sinningia* spp.

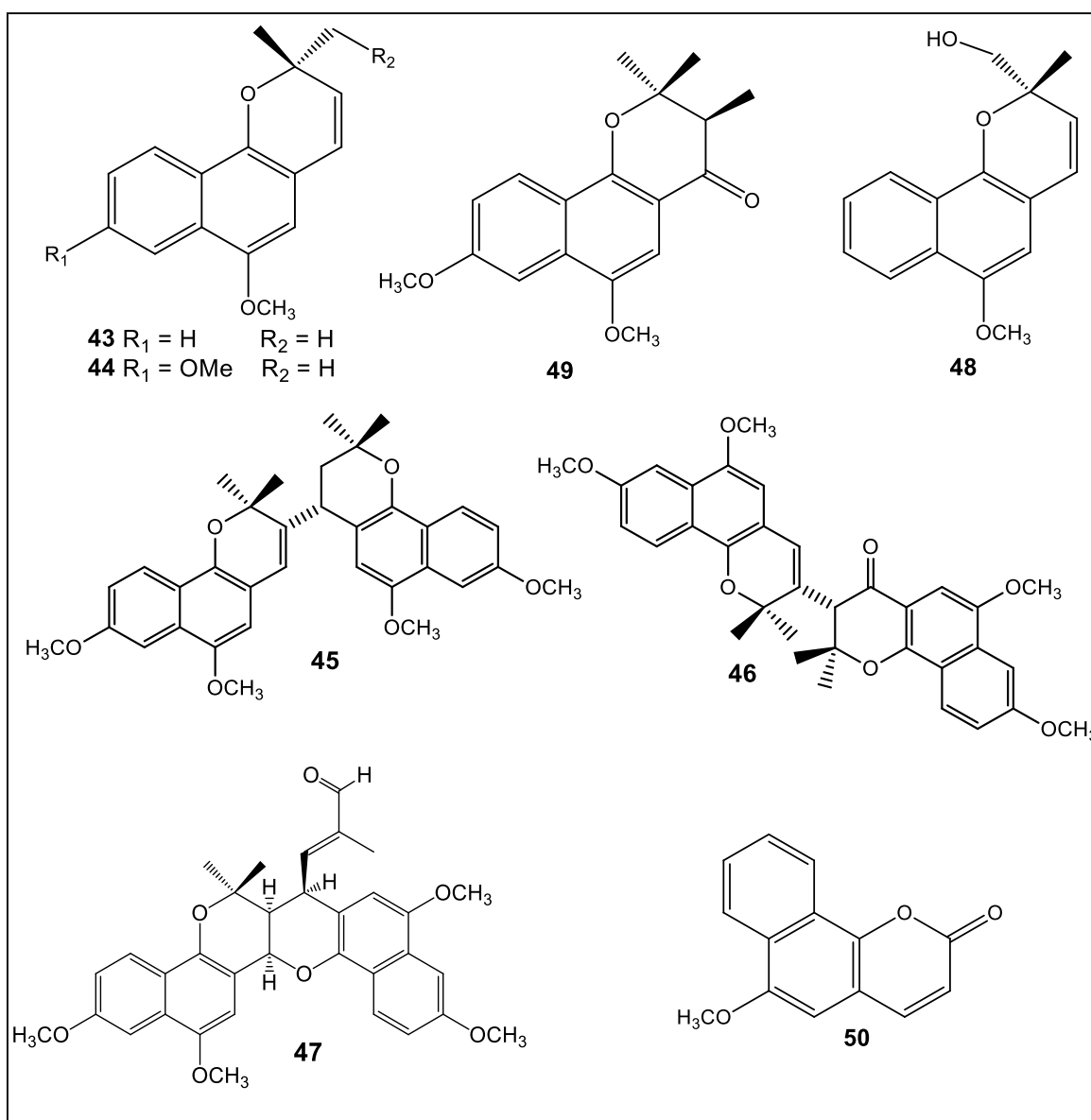


Figura 10. Cromenos e cumarina (**50**) isolados de *Sinningia* spp.

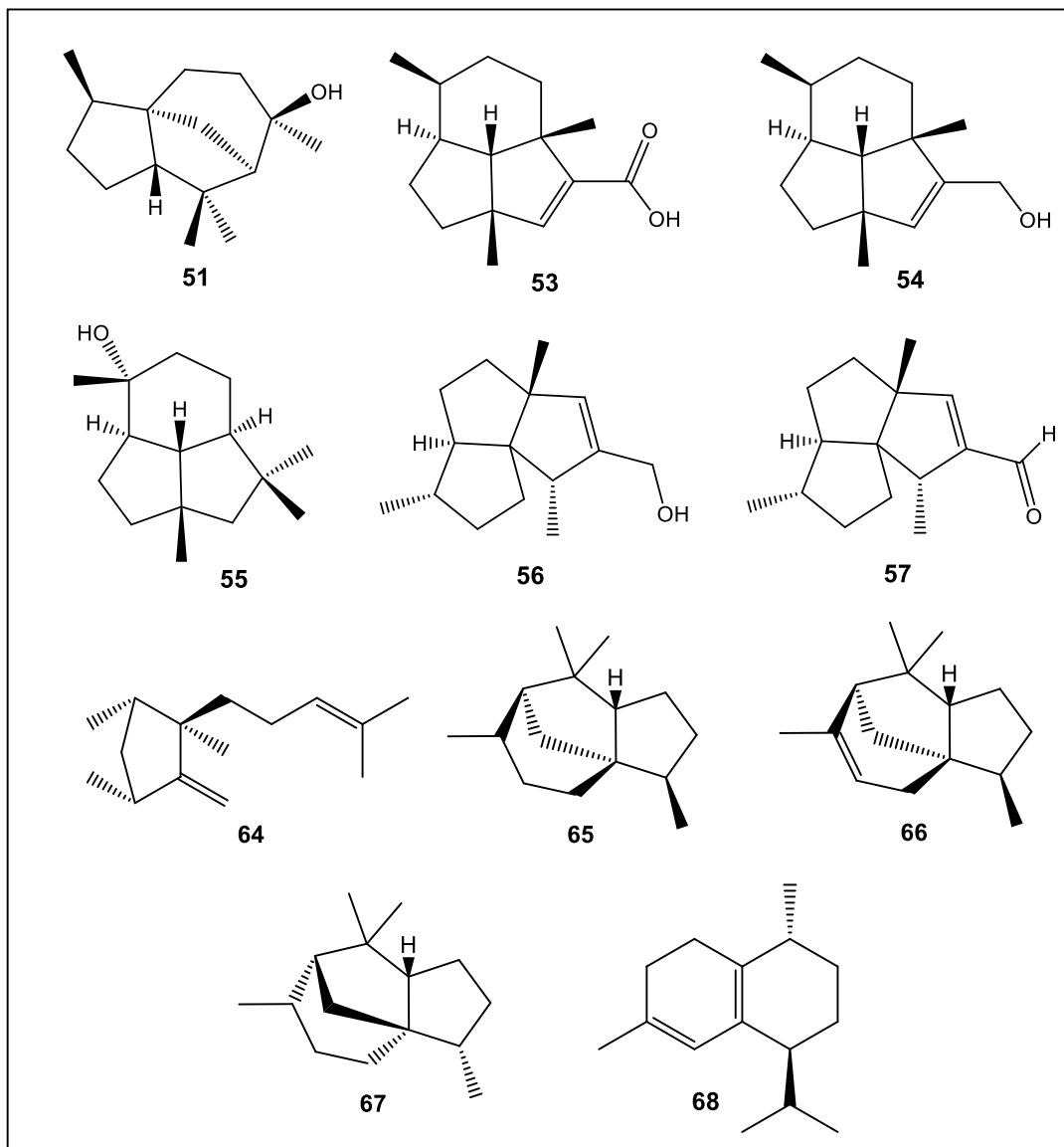


Figura 11. Sesquiterpenos aislados de *Sinningia* spp.

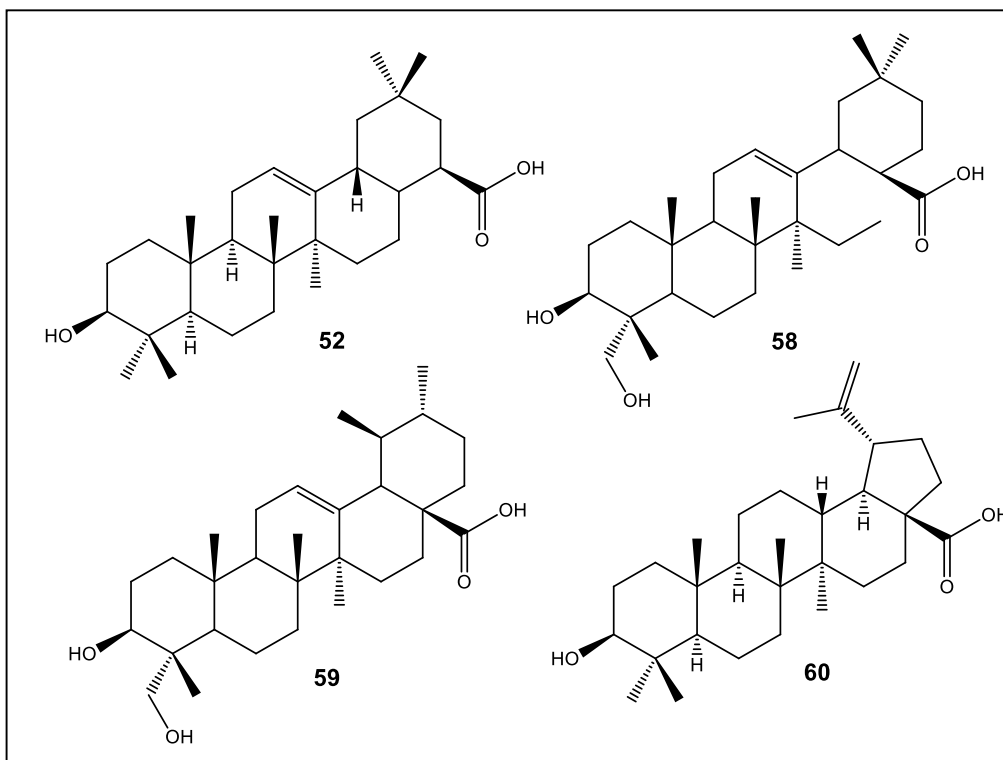


Figura 12. Triterpenos isolados de *Sinningia* spp.

Algumas substâncias isoladas de *Sinningia* spp apresentaram atividade biológica. A naftoquinona dunninol (**39**), isolada de *S. allagophylla*, apresentou atividade citotóxica *in vitro* contra as linhagens de células tumorais humanas de glioma, mama, ovário resistente a múltiplos fármacos e leucemia. Dunninol inibiu totalmente o crescimento dessas células em concentrações de 1,14-6,88 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (RIVA *et al.*, 2012). Essa mesma planta forneceu o cromeno 8-metoxilapachenol (**44**) que apresentou atividade anti-inflamatória e analgésica (BARBOSA *et al.*, 2013), além de atividade larvicida (SCHARF, 2014). A substância agregatina D (**22**) isolada pela primeira vez de *S. aggregata*, também apresentou atividade citotóxica contra as linhagens de células tumorais humanas de melanoma, rim e ovários. A concentração necessária para inibir 50% do crescimento das células (IC_{50}) variou de 0,30-12,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (VERDAN *et al.*, 2015b). Além disso, essa substância mostrou se analgésica na dor de origem inflamatória (SOUZA *et al.*, 2015).

No presente trabalho pretende-se dar continuidade ao estudo do gênero *Sinningia*, através da investigação de *S. warmingii* (Hiern.) Chautems.

S. warmingii (Figura 13), é uma planta herbácea, anual, com tubérculo perene, que atinge até 50 cm de altura. Ocorre no Brasil, desde Minas Gerais até o Rio Grande do Sul, e também nos demais países da América do Sul, com exceção do Chile e Uruguai (ARAUJO *et al.*, 2005; ARAUJO & CHAUTEMS, 2015a). Não foi encontrado um nome popular para esta planta no Brasil, mas na província de Utcubamba, região Amazônica, no Peru, ela é conhecida como “papa-madre” e tem sido utilizada pela população local

para o tratamento de problemas ginecológicos, como inflamação puerperal e infecções causadas por fungos ou bactérias. Uma análise fitoquímica revelou a presença nos tubérculos principalmente de glicosídeos fenólicos (CASANA *et al.*, 2012).



Figura 13. Fotos de *S. warmingii*: planta florida no campo, detalhe da flor e tubérculo.

Um estudo fitoquímico anterior com o extrato em hexano dos tubérculos de *S. warmingii* rendeu oito substâncias conhecidas, **12**, **13**, **15**, **16**, **21**, **22**, **29** e **43**, que haviam sido isoladas anteriormente de *S. aggregata* e/ou *S. allagophylla* (VERDAN *et al.*, 2014). Entretanto várias frações do extrato hexânico, que continham constituintes minoritários, não foram purificadas, bem como os extratos em solventes mais polares (acetato de etila e butanol). Além disso, nenhum ensaio biológico havia sido conduzido com essa planta.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAIS

Realizar o estudo fitoquímico de *Sinningia warmingii* e avaliar a sua atividade biológica.

2.2. ESPECÍFICOS

Isolar e identificar os principais metabólitos secundários de diferentes extratos dos tubérculos de *S. warmingii*. Realizar testes de atividade antimicrobiana com os extratos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. PROCEDIMENTOS GERAIS

Nas separações por cromatografia em coluna (CC), usou-se gel de sílica 60. Para preparar as placas cromatográficas preparativas (CCDP), espalhou-se uma suspensão de gel de sílica 60 PF₂₅₄ em mistura com água destilada numa proporção de 15 g/30 mL, sobre placas de vidro 20x20 cm, usando um espalhador, que forneceu uma espessura de 1,00 mm. Para as análises por cromatografia de camada delgada analítica foram utilizadas placas prontas recobertas com gel de sílica na espessura de 0,25 mm. Na revelação destas placas usou-se radiação UV (366 e 254 nm) e, solução a 5% de H₂SO₄ em etanol. Os reagentes e solventes utilizados foram produtos analíticos.

Para identificação das substâncias isoladas, foi utilizada principalmente a técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Os espectros foram obtidos em espectrômetros operando a 200, 400 ou 600 MHz para ¹H e 50, 100 e 150 MHz para ¹³C, usando-se técnicas uni e bidimensionais (HSQC e HMBC). Como solventes foram utilizados CDCl₃ e/ou MeOD e, TMS como referência interna. Os dados obtidos foram comparados com aqueles publicados na literatura. A análise por difração de Raios X foi realizada em um equipamento Bruker D8 venture, equipado com um monocromador e uma fonte de cobre. Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos em um espectrômetro LTQ-Orbitrap XL (Thermo Scientific), com ionização por “spray” de elétrons.

As separações por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram realizadas em um equipamento de cromatografia HPLC Waters composto por bomba quaternária, injetor automático, detector PDA 2998 e acoplado a um sistema de aquisição de dados Empower software. Foi utilizada uma coluna semi-preparativa, Phenomenex Nucleosil 100A C18, com injeções a partir de 25 µL, espessura da fase estacionária de 5 µm e tamanho 250x10 mm. Os solventes orgânicos utilizados foram metanol e acetonitrila grau HPLC, além de água ultrapura (Milli-Q). Estes foram filtrados em membrana de náilon 0,45 µm (Millipore) e desgaseificados por 30 minutos em banho de ultrassom antes de serem usados.

3.2. ESTUDO FITOQUÍMICO

3.2.1. COLETA DO MATERIAL BOTÂNICO

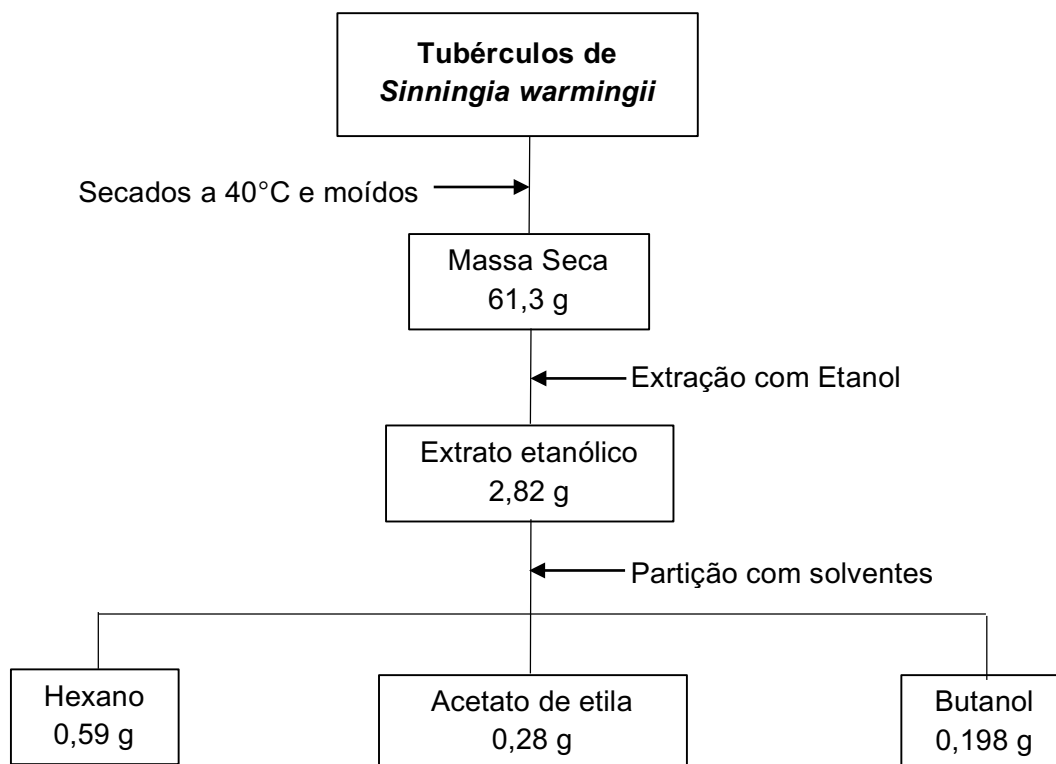
Os tubérculos de *Sinningia warmingii* (Hiern.) Chautems foram coletados na cidade de Londrina, PR em maio de 2012, pela botânica Clarisse B. Poliquesi. Uma exsicata foi depositada no Museu Botânico Municipal sob o número 12804.

3.2.2. PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS

Os tubérculos frescos (307,2 g) foram fatiados, secados em estufa em temperatura de 40°C e então triturados. O material seco resultante (61,3 g) foi extraído com etanol pela técnica de maceração a frio, que consiste em deixar o material em contato com o solvente, a temperatura ambiente, por 24 horas, e após esse tempo, remover o solvente por filtração, adicionando nova porção de solvente. Este procedimento foi repetido por três vezes utilizando 600 mL de solvente em cada vez. O solvente foi evaporado em evaporador rotativo, resultando no extrato etanólico bruto (SWE, 2,82 g). Este foi dissolvido em EtOH:H₂O 9:1 (150 mL) e extraído com hexano (3 x 50 mL). Em seguida foi adicionado 120 mL de H₂O e a mistura resultante foi extraída novamente com AcOEt (3 x 100 mL), e *n*-BuOH (3 x 100 mL). Os solventes foram removidos, resultando nos extratos em hexano (0,59 g), AcOEt (0,28 g) e *n*-BuOH (0,198 g) (Esquema 1).

3.2.3. ISOLAMENTO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

A fração em hexano (SWD) foi fracionada através de cromatografia em coluna (CC) utilizando como fase estacionária gel de sílica, eluída com misturas de hexano:acetona (99:1 até 3:7), acetona pura, acetona: metanol (1:1) e por fim metanol. Foram recolhidas 43 frações de 30 mL, que foram reunidas em 11 grupos após comparação por CCDA (Tabela 1, Esquema 2).



Esquema 1. Procedimento da extração dos tubérculos de *Sinningia warmingii*.

Tabela 1. Frações obtidas da cromatografia em coluna da fração em hexano.

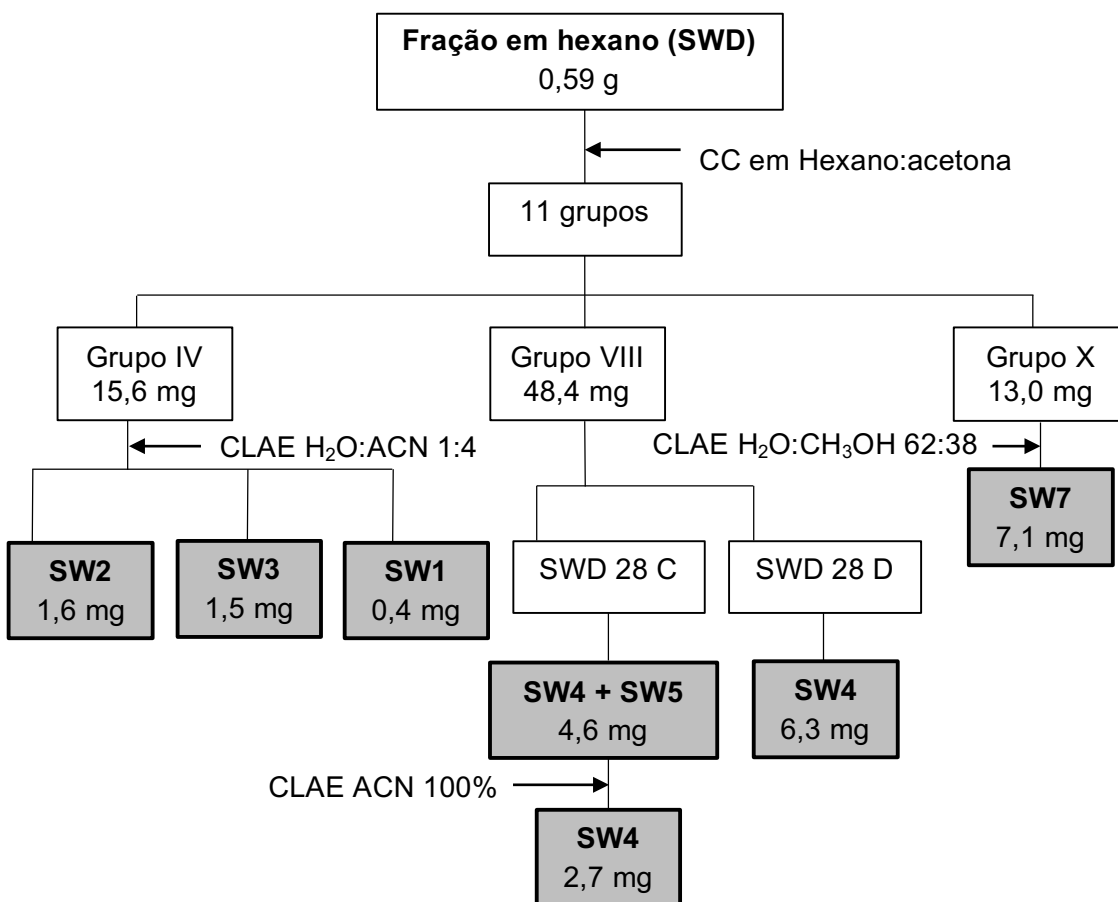
GRUPO	FRAÇÃO	SOLVENTE	MASSA (mg)
*I	SWD 1-11	Hexano:acetona (100:0; 99:1; 9:1)	19,1
*II	SWD 12-13	Hexano:acetona 9:1	141,6
*III	SWD 14-16	Hexano:acetona 8:2	36,3
IV	SWD 17-18	Hexano:acetona 8:2	15,6
*V	SWD 19-22	Hexano:acetona 3:2	13,4
VI	SWD 23-24	Hexano:acetona 3:2	27,2
*VII	SWD 25-27	Hexano:acetona 3:2	164,6
VIII	SWD 28-30	Hexano:acetona 1:1	48,4
IX	SWD 31-32	Hexano:acetona 3:7	33,1
X	SWD 33-35	Hexano:acetona 3:7	13,0
*XI	SWD 36-43	Acetona; Acetona:MeOH 1:1; MeOH	22,6

*Frações estudadas anteriormente.

O grupo IV foi purificado por CLAE (método isocrático H₂O:ACN 1:4 com fluxo de 1,0 mL min⁻¹, por 20 min), fornecendo as frações SWD17-I (T_R = 7,83 min; 1,6 mg, **SW2**), SWD17-II (T_R = 8,54 min; 1,5 mg, **SW3**), e SWD17-IV (T_R = 13,47 min; 0,4 mg, **SW1**).

O grupo VIII foi purificado por CCDP, eluída com CH₂Cl₂:AcOEt 95:5, sendo isoladas SWD 28 C (4,6 mg, **SW4 + SW5**) e SWD 28 D (6,3 mg, **SW4**). A fração SWD 28 C foi purificada por CLAE (ACN 100% fornecendo **SW4** (T_R = 3,31 min, 2,7 mg).

O grupo X foi purificado através de CLAE (método isocrático H₂O: CH₃OH 62:38 com fluxo de 1,0 mL min⁻¹, por 20 min), sendo obtida SWD 33-35 C (T_R = 7,59 min; 7,1 mg, **SW7**).



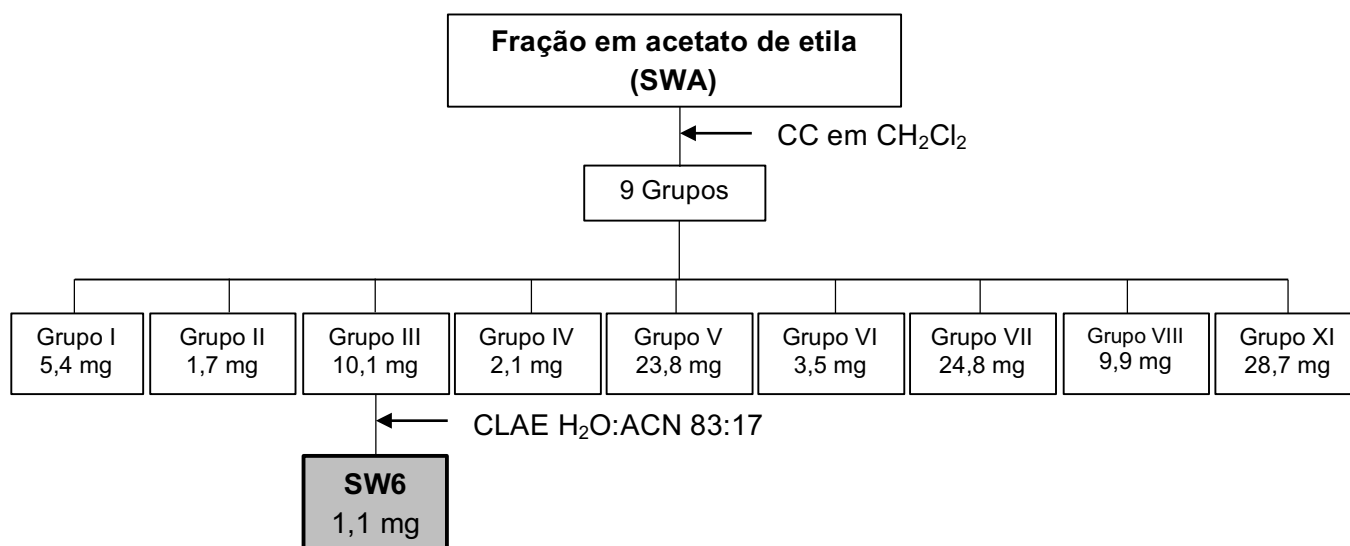
Esquema 2. Procedimento experimental do fracionamento da fração em hexano.

A fração em AcOEt (SWA) foi submetida á CC, eluída com CH₂Cl₂ e misturas de CH₂Cl₂:MeOH, sendo recolhidas 40 frações de 20 mL, as quais foram reunidas em 9 grupos (Tabela 2, Esquema 3).

Tabela 2. Frações obtidas da cromatografia em coluna da fração em AcOEt.

GRUPO	FRAÇÃO	SOLVENTE	MASSA (mg)
I	SWA 1-3	CH ₂ Cl ₂	5,4
II	SWA 4-12	CH ₂ Cl ₂ ; CH ₂ Cl ₂ :MeOH 98:2	1,7
III	SWA 13-15	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 98:2; 9:1	10,1
IV	SWA 16-17	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 9:1	2,1
V	SWA 18-22	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 8:2	23,8
VI	SWA 23-24	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 8:2	3,5
VII	SWD 25-28	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 8:2; 3:2	24,8
VIII	SWD 22-32	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 3:2	9,9
IX	SWD 33-40	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 3:2; MeOH	28,7

Parte do grupo III (10,1 mg) foi purificada por CLAE (H₂O: ACN 83:17, isocrático, fluxo de 1,0 mL min⁻¹, por 6 min). Foi obtida a fração SWA 13-15 A (T_R = 3,57 min; 1,1 mg, **SW6**).

**Esquema 3.** Procedimento experimental do fracionamento da fração em acetato de etila.

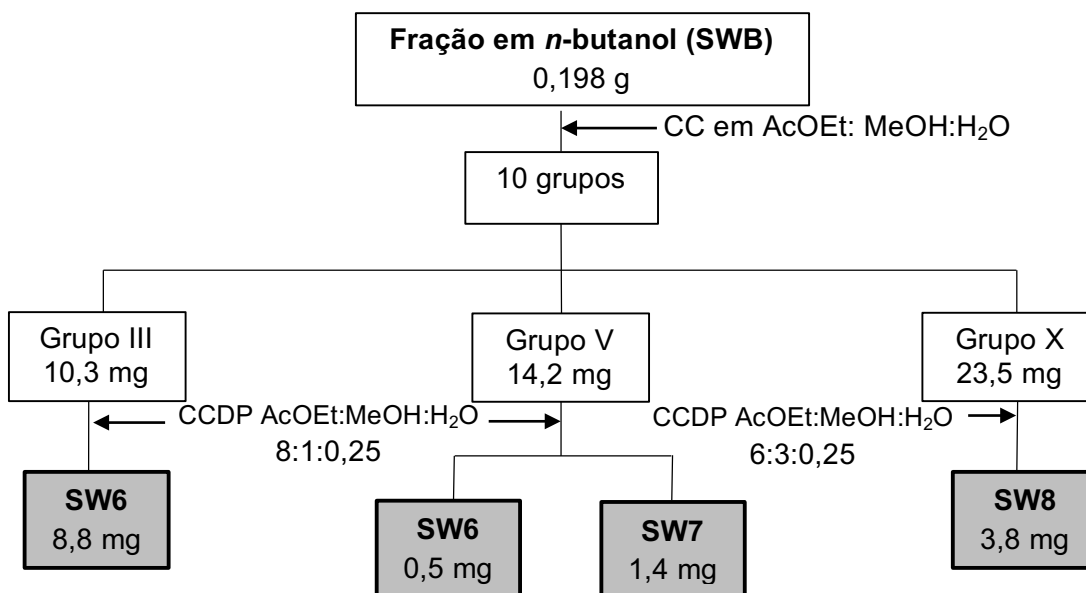
A fração em *n*-BuOH (SWB) foi submetida à cromatografia em coluna, eluída com AcOEt: MeOH:H₂O em gradiente 8:1:0,25; 7:2:0,25; 6:3:0,25; 5:4:0,25; 3:6:0,25 e por fim metanol, rendendo 37 frações que foram agrupadas em 10 grupos (Tabela 3, Esquema 4).

Os grupos III e V foram purificados por CCDP em AcOEt:MeOH:H₂O 8:1:0,25. Do grupo III foi isolada **SW6** (8,8 mg), enquanto o grupo V forneceu **SW7** (1,4 mg) e **SW6** (0,5 mg).

O grupo X foi purificado por CCDP em AcOEt:MeOH:H₂O 6:3:0,25, fornecendo SWB 22 – 24 B (3,8 mg, **SW8**).

Tabela 3. Frações obtidas da cromatografia em coluna da fração em 1-butanol.

GRUPO	FRAÇÃO	SOLVENTE	MASSA (mg)
I	SWB 1 – 3	AcOEt: MeOH:H ₂ O 8:1:0,25	2,7
II	SWB 4	AcOEt: MeOH:H ₂ O 8:1:0,25	0,8
III	SWB 5	AcOEt: MeOH:H ₂ O 8:1:0,25	10,3
IV	SWB 6	AcOEt: MeOH:H ₂ O 8:1:0,25	6,4
V	SWB 7 – 9	AcOEt: MeOH:H ₂ O 8:1:0,25	14,2
VI	SWB 10 – 13	AcOEt: MeOH:H ₂ O 8:1:0,25	24,3
VII	SWB 14 – 17	AcOEt: MeOH:H ₂ O 7:2:0,25	3,4
VIII	SWB 18 – 20	AcOEt: MeOH:H ₂ O 7:2:0,25	11,2
IX	SWB 21	AcOEt: MeOH:H ₂ O 5:4:0,25	4,7
X	SWB 22 – 24	AcOEt: MeOH:H ₂ O 3:6:0,25	23,5
XI	SWB 25 – 37	MeOH	35,0



Esquema 4. Procedimento experimental do fracionamento da fração em *n*-butanol.

3.3. ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

O extrato bruto em etanol dos tubérculos de *S. warmingii* (SWE), e as frações obtidas por partição (SWD, SWA, SWB) foram testados *in vitro* contra bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 14458, *S. epidermidis* ATCC 12228), Gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 10799, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) e fungos (*Candida albicans* ATCC 10231, *C. glabrata* ATCC 30070, *C. dubliniensis* ATCC 778157 e *C. parapsilosis* ATCC 22019).

As amostras foram avaliadas aplicando o método de microdiluição (SALVADOR *et al.*, 2002), com concentrações entre 10 a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A concentração inibitória mínima (CIM) foi calculada, como a menor concentração necessária para a completa inibição de crescimento do microrganismo testado. Os testes foram realizados em duplicata com três repetições, tendo bacitracina e cetoconazol como controles positivos para bactérias e fungos, respectivamente. A solução de propilenoglicol / água destilada estéril (5:95, v/v) foi o controle negativo. Os testes foram realizados no Instituto de Biologia (UNICAMP), sob responsabilidade do Prof. Dr. Marcos José Salvador.

3.4. DADOS FÍSICOS E ESPECTROMÉTRICOS DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

SW1

Tectoquinona: Sólido amarelo; massa molecular calculada $C_{15}H_{10}O_2$: 222,2431; CLAE: $t_R = 13,43$ min, isocrático $H_2O:ACN$ 1:4; RMN 1H , HSQC, HMBC Figuras: 14-17 (páginas 37-38), Tabela 5 (página 39).

SW2

Aggregatina E: Óleo amarelado; massa molecular calculada $C_{15}H_{14}O_4$: 258,2716; CLAE: $t_R = 7,83$ min, isocrático $H_2O:ACN$ 1:4; $[\alpha]_D^{25} = +7,23$ ($c=0,053$, $CHCl_3$); RMN 1H , HSQC, HMBC Figuras: 18-21 (páginas 41-42), Tabela 6 (página 43).

SW3

Aggregatina F: Óleo amarelado; massa molecular calculada $C_{15}H_{14}O_5$: 274,2706; CLAE: $t_R = 8,54$ min, isocrático $H_2O:ACN$ 1:4; $[\alpha]_D^{25} = +14,0$ ($c=0,04$, $CHCl_3$); RMN 1H , HSQC, HMBC Figuras: 22-25 (páginas 44-46), Tabela 7 (página 46).

SW4

Warminguiina A: Sólido incolor; EM-AR: m/z $[M + Na]^+$ calculado para $C_{30}H_{22}O_6Na$: 501,4858, obtido: 501,1308; CLAE: $t_R = 3,31$ min, ACN 100%; $[\alpha]_D^{20} = +50,0$ ($c=0,003$, CH_3OH); UV-Vis (MeOH) λ_{max}/nm ($\log \epsilon$) = 206 (4,0), 218 (3,9), 269 (3,5); DC ($c=0,01$, CH_3OH) λ_{max} (θ) = 251 (-15.3), 300 (+12.6), 366 (+4.5); Raios X Figura 26 (página 48); RMN 1H , HSQC, HMBC Figuras: 28-30 (páginas 49-50), Tabela 8 (página 52).

SW5

Warminguiina B: Sólido incolor; EM-AR: m/z $[M - H]^-$ calculado para $C_{30}H_{25}O_8$: 513,5195, obtido: 513,15641; RMN 1H , HSQC, HMBC Figuras: 33-39 (páginas 54-57), Tabela 9 (página 58).

SW6

Halleridona: Óleo avermelhado; massa molecular calculada $C_8H_{10}O_3$: 154,6299; CLAE: $t_R = 3,57$ min, isocrático $H_2O:ACN$ 83:17; RMN 1H , DEPT-135 Figuras: 40-41 (páginas 59-60), Tabela 10 (página 60).

SW7

Cleroidicina B: Óleo incolor; massa molecular calculada $C_8H_{14}O_3$: 158,1968; CLAE: $t_R=7,59$ min, isocrático $H_2O:CH_3OH$ 62:38; RMN 1H , HSQC, HMBC Figuras: 42-45 (páginas 62-63), Tabela 11 (página 64).

SW8

Cornosídeo: Sólido branco; massa molecular calculada $C_{14}H_{20}O_8$: 316,3072; RMN 1H , HSQC, HMBC Figuras: 46-49 (páginas 65-67), Tabela 12 (página 67).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fracionamento cromatográfico do extrato etanólico dos tubérculos de *S. warmingii* resultou no isolamento e identificação de oito substâncias (Tabela 4). Destas, **SW4** e **SW5** são inéditas, **SW1** e **SW6** já foram descritas em *S. warmingii*, e as demais estão sendo descritas pela primeira vez na espécie.

Tabela 4. Substâncias isoladas de *Sinningia warmingii*.

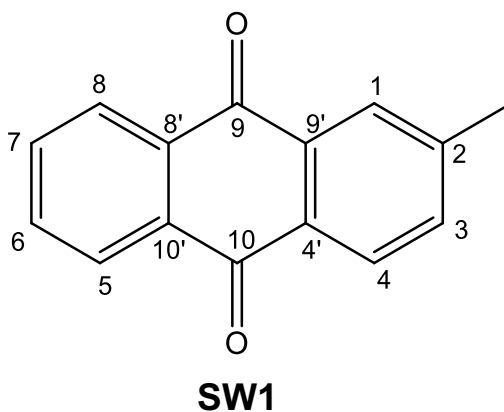
Substância	Massa (mg)
SW1	0,4
SW2	1,6
SW3	1,5
SW4	9,0
SW5 + SW4	4,6
SW6	10,4
SW7	8,5
SW8	3,8

4.1. IDENTIFICAÇÃO DA ANTRAQUINONA **SW1**

O espectro de RMN de ^1H de **SW1** (Figura 14) mostrou sinais de sete hidrogênios na região de hidrogênios aromáticos, distribuídos em dois sistemas de spins. Um deles apresentava dois multipletos em δ_{H} 8,31 e 7,80 (dois hidrogênios cada), sugerindo um anel aromático 1,2-dissubstituído. O outro mostrava sinais de três hidrogênios em δ_{H} 8,22, 8,11 e 7,61, com constantes de acoplamento típicas de um anel aromático 1,2,4-trissubstituído. Foi também observado um simpleto em δ_{H} 2,55, integrando para três hidrogênios, indicando um grupo metila ligado a um anel aromático.

Através dos mapas de correlação ^1H - ^{13}C direta (HSQC) e a longa distância (HMBC) foram obtidos os dados de RMN de ^{13}C de **SW1** (Figuras 15 e 16; Tabela 5). Foram observados 12 sinais correspondentes aos dois anéis aromáticos entre δ_{C} 126,6 e δ_{C} 145,5, dois sinais de grupos carbonila de cetona α - β -insaturada em δ_{C} 183,0 e δ_{C} 183,7 e um sinal de grupo metila em δ_{C} 21,8, caracterizando uma metilantraquinona.

Pelo experimento HMBC determinou-se a posição do grupamento metila no C-2, através das correlações desse grupo com os carbonos em δ_{C} 127,5 (C-1), 135,1 (C-3) e 145,5 (C-2). As demais correlações confirmaram a estrutura da 2-metilantraquinona, conhecida como tectoquinona (MOREIRA *et al.*, 2006).



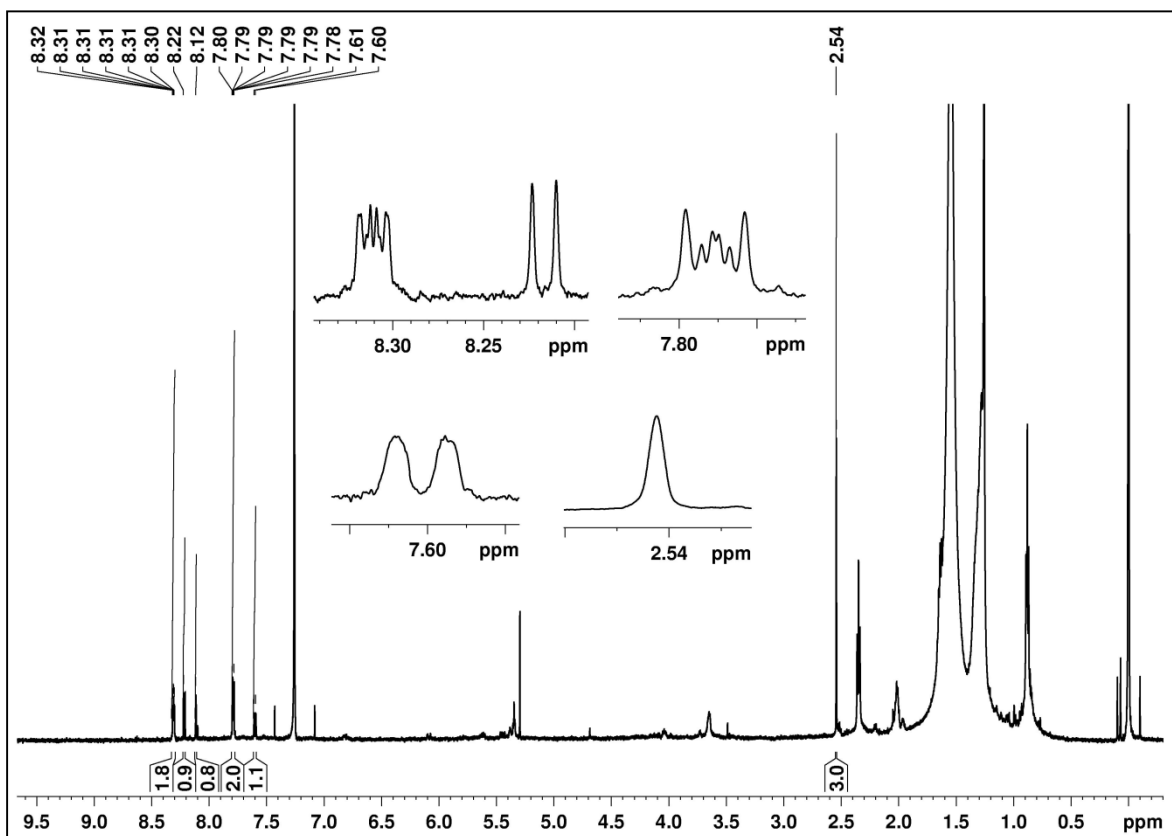


Figura 14. Espectro de RMN de ^1H de **SW1**, com ampliação região aromática (CDCl_3 , 400 MHz).

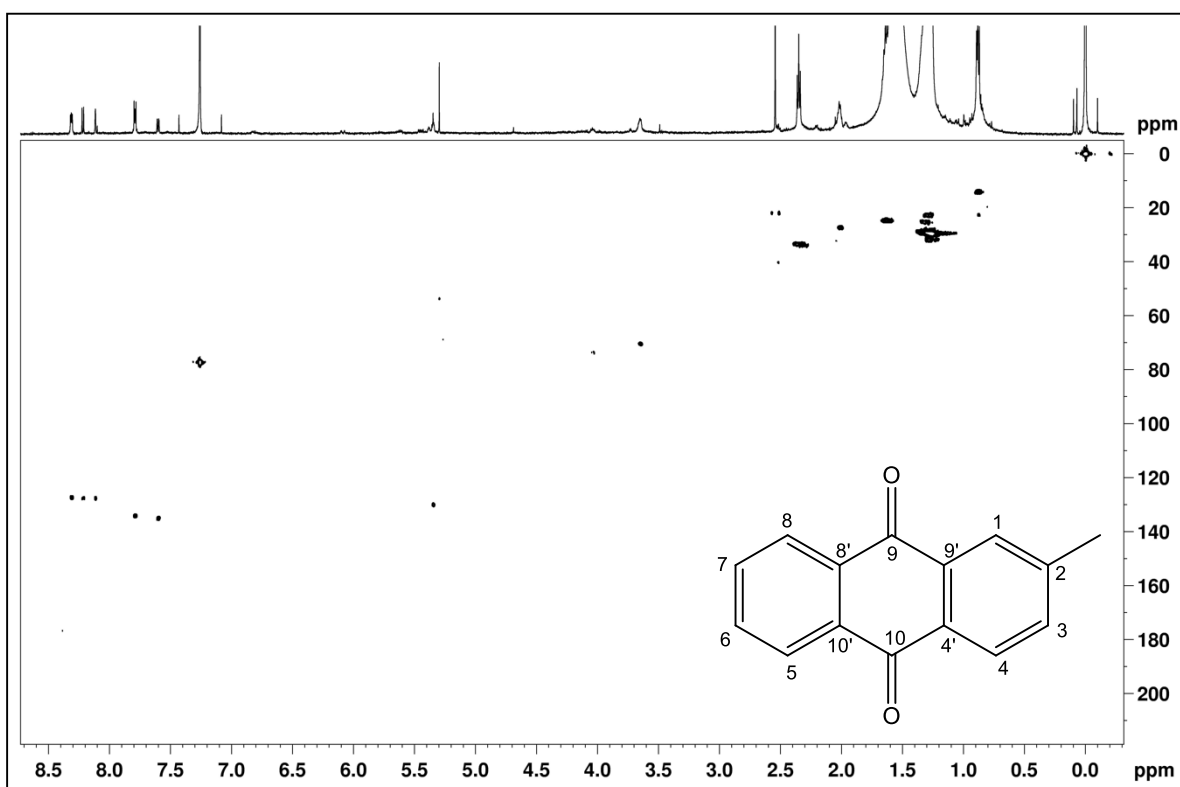


Figura 15. Mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C de **SW1** (CDCl_3 , 400 MHz).

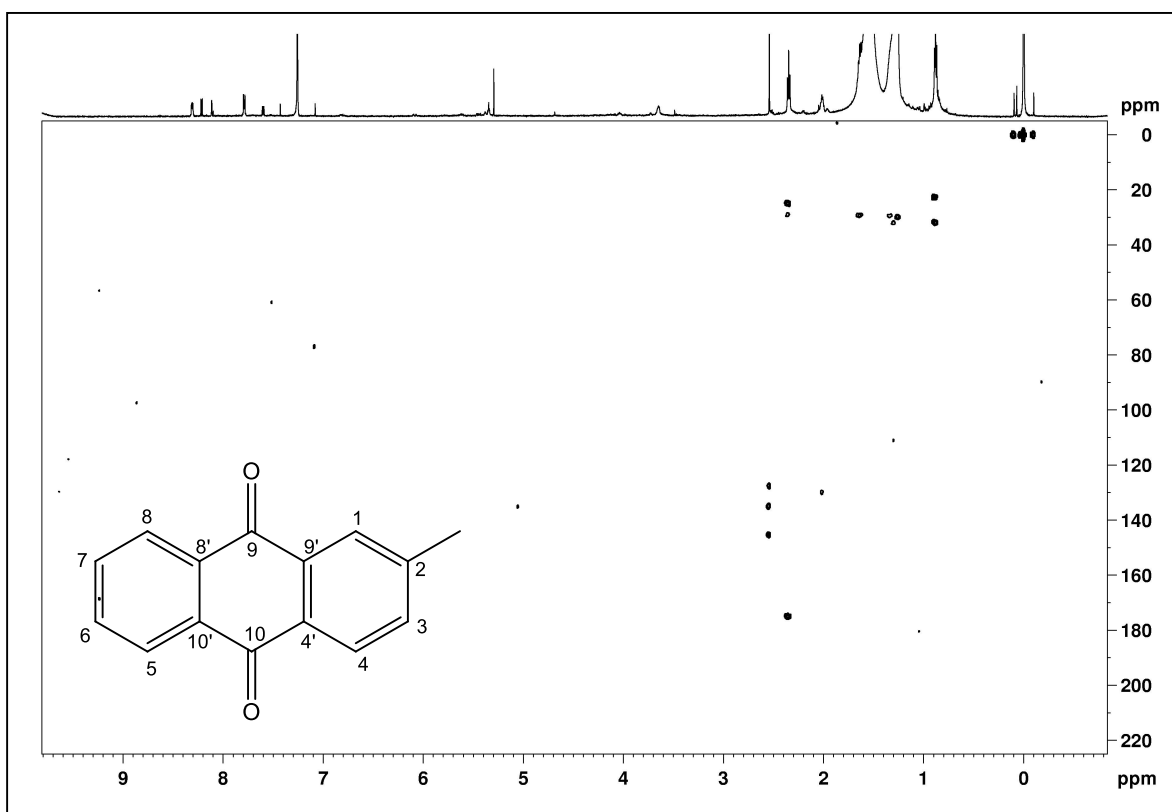


Figura 16. Mapa de correlação a longa distância ^1H - ^{13}C de SW1 (CDCl_3 , 400 MHz).

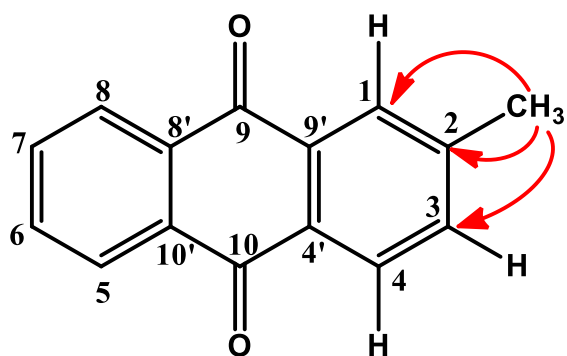


Figura 17. Correlações observadas no mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância de SW1.

Tabela 5. Dados de RMN de **SW1** (CDCl₃, 400 MHz) e comparação com dados da literatura (CDCl₃, 300 MHz, MOREIRA *et al.*, 2006).

Pos.	SW1			Tectoquinona	
	δ_C	δ_H ; mult. (J em Hz)	^{LD} J _{H,C}	δ_C	δ_H ; mult. (J em Hz)
1	127,5	8,11 <i>dq</i> (0,6; 1,8)	3, 4', 9, CH ₃	127,4	8,11 <i>d</i> (1,3)
2	145,5	-	-	145,2	-
3	135,1	7,61 <i>ddd</i> (0,6; 1,8; 7,9)	1, 2, 4', CH ₃	134,9	7,60 <i>dd</i> (8,0; 1,3)
4	126,9	8,22 <i>d</i> (7,9)	2, 9', 10	127,5	8,20 <i>d</i> (8,0)
4'	131,2	-	-	131,3	-
5	126,6	8,31 <i>m</i>	-	127,1	8,31 <i>m</i>
6	134,7	7,80 <i>m</i>	-	133,9	7,79 <i>m</i>
7	134,7	7,80 <i>m</i>	-	134,0	7,79 <i>m</i>
8	126,6	8,31 <i>m</i>	-	127,1	8,31 <i>m</i>
8'	133,4	-	-	133,6	-
9	183,7	-	-	183,4	-
9'	133,4	-	-	133,4	-
10	183,0	-	-	183,0	-
10'	133,8	-	-	133,6	-
CH ₃	21,8	2,55 <i>s</i>	1, 2, 3	21,9	2,54 <i>s</i>

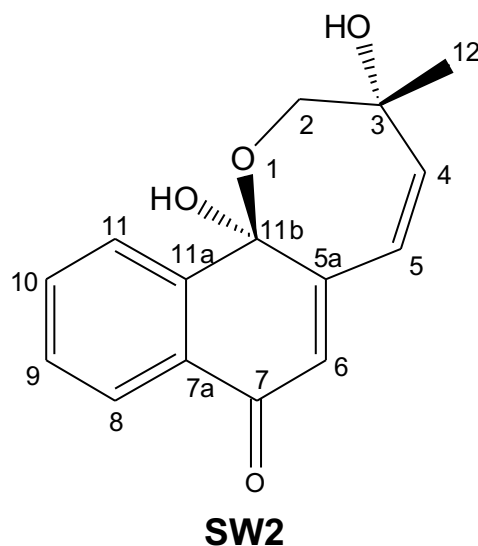
4.2. IDENTIFICAÇÃO DAS HIDRONAFTOQUINONAS **SW2** E **SW3**

No espectro de RMN de ¹H (Figura 18) da substância **SW2** foram observados sinais de quatro hidrogênios aromáticos entre δ_H 7,54 e δ_H 8,09, formando um sistema de spin característico de um anel aromático 1,2-dissubstituído. Também foram observados sinais de três hidrogênios olefínicos, sendo dois dupletos em δ_H 6,44 e 6,47, e um simpleto em δ_H 6,15, além de sinais de hidrogênios oximetilênicos em δ_H 3,84 e 3,99, e de um grupo metila em δ_H 1,71.

No mapa de correlação direta ¹H -¹³C (HSQC, Figura 19) foi possível relacionar os hidrogênios aos seus respectivos carbonos (Tabela 6).

Através do mapa de correlação a longa distância (Figura 20) foram observados seis carbonos quaternários, incluindo um dioxigenado em δ_c 99,0, um oxigenado em δ_c 81,0 e um carbono carbonílico em δ_c 184,5.

Entre as correlações observadas no HMBC, aquelas entre o grupo metila (C-12) e os carbonos em δ_c 74,8 (C-2), 81,0 (C-3) e 141,1 (C-4), e também aquelas entre o grupo oximetileno (H-2) e os carbonos C-4 e C-11b (δ_c 99,0) podem ser consideradas de diagnóstico para o grupo diidrometiloxepino. Por outro lado, as correlações entre H-8 (δ_H 8,10) e C-7 (δ_c 184,5) e, H-6 (δ_H 6,15) com C-5 (δ_c 126,3) e C-11b (δ_c 99,0) indicaram uma hidronaftoquinona (Tabela 6). Analisando todos os dados **SW2** foi identificada como agregatina E, uma hidronaftoquinona já isolada pelo nosso grupo de pesquisa dos tubérculos de *Sinningia aggregata* (VERDAN *et al.*, 2015b) e *S. allagophylla* (SCHARF *et al.*, 2016).



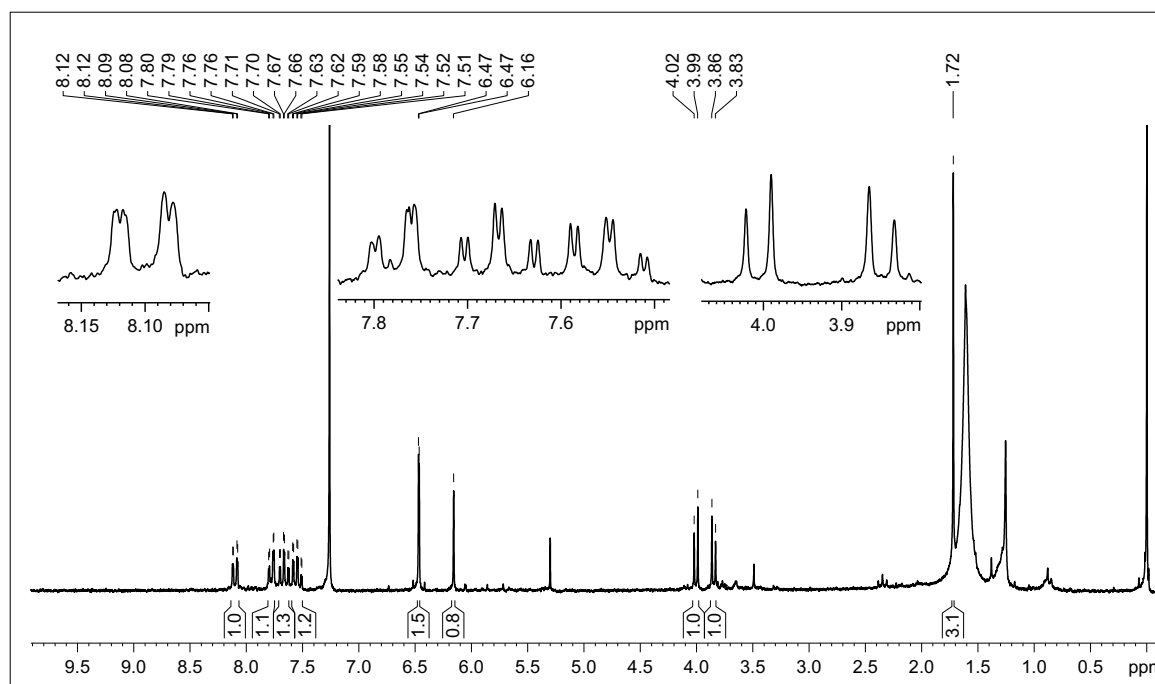


Figura 18. Espectro de RMN de ^1H de **SW2** (CDCl_3 , 400 MHz).

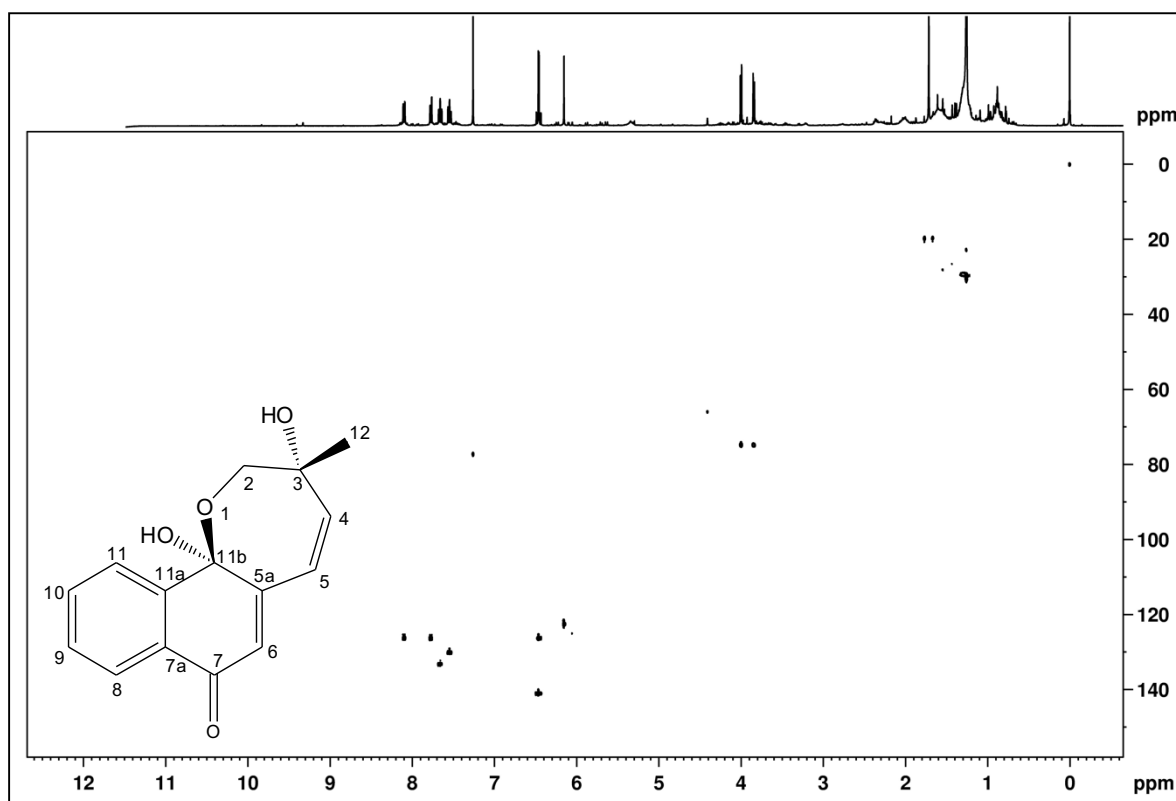


Figura 19. Mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C de **SW2** (CDCl_3 , 400 MHz).

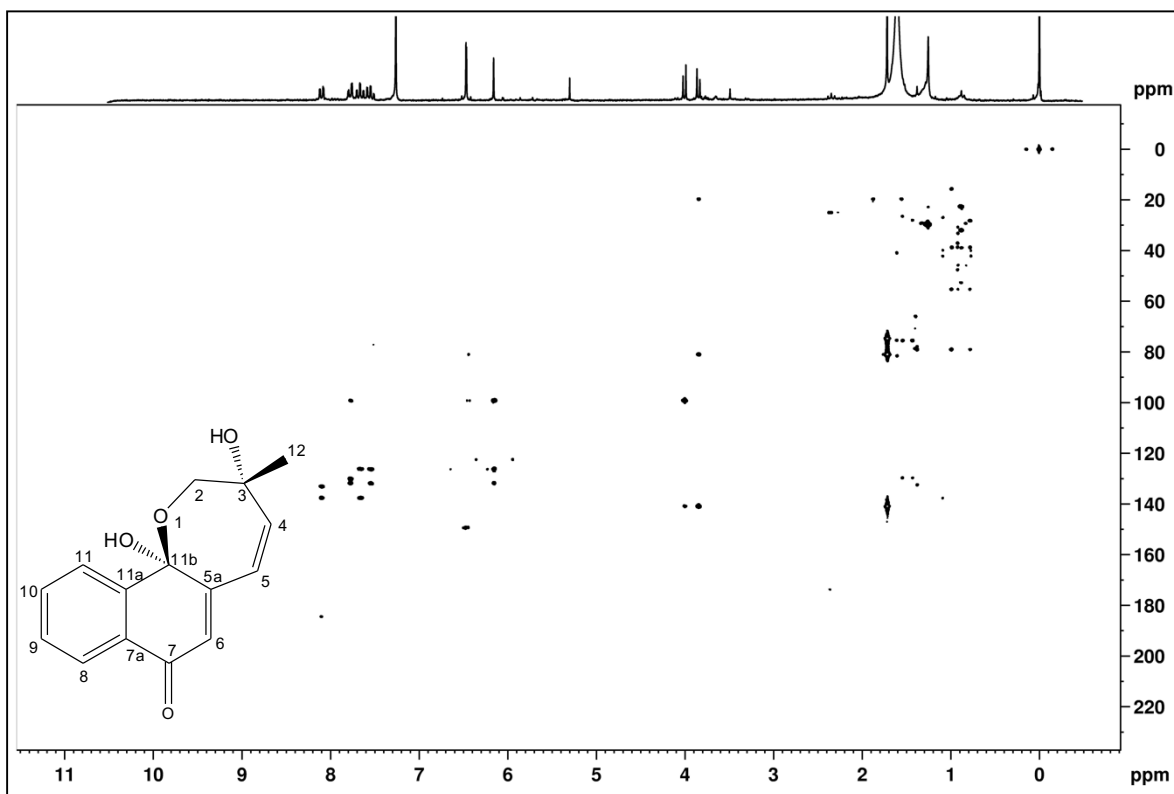


Figura 20. Mapa de correlação a longa distância $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ de **SW2** (CDCl_3 , 400 MHz).

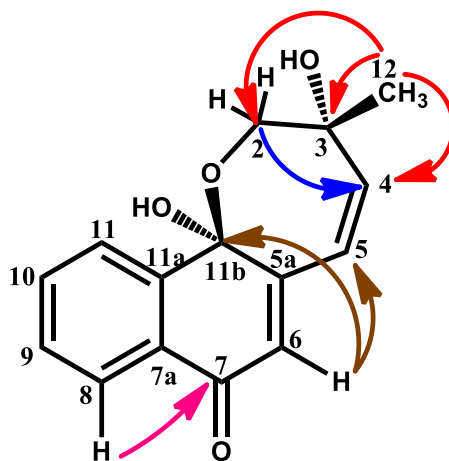


Figura 21. Principais correlações observadas no mapa de correlação $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ a longa distância de **SW2**.

Tabela 6. Dados de RMN de **SW2** (CDCl₃, 400 MHz) e comparação com dados da literatura (CDCl₃, 400 MHz, VERDAN *et al.*, 2015b).

Pos.	SW2			Aggregatina E	
	δ_c	δ_H ; mult. (J em Hz)	^{LD} J _{H,c}	δ_c	δ_H ; mult. (J em Hz)
2	74,8	3,84 <i>d</i> (6,4) 3,99 <i>d</i> (6,4)	3, 4, 12 4, 11b	74,8	3,84 <i>d</i> (6,4) 4,00 <i>d</i> (6,4)
3	81,0	-	-	81,0	-
4	141,1	6,47 <i>d</i> (9,5)	3, 5a, 11b	141,1	6,47 <i>d</i> (9,5)
5	126,3	6,44 <i>d</i> (9,5)	3, 5a	126,3	6,44 <i>d</i> (9,5)
5a	149,3	-	-	149,3	-
6	122,5	6,15 <i>s</i>	5, 7a, 11b	122,6	6,15 <i>s</i>
7	184,5	-	-	184,5	-
7a	131,8	-	-	131,8	-
8	126,3	8,09 <i>dd</i> (7,8; 1,4)	7, 10, 11a	126,3	8,10 <i>dd</i> (7,8; 1,4)
9	130,0	7,54 <i>ddd</i> (7,8; 7,6; 1,3)	7a, 11	130,1	7,54 <i>ddd</i> (7,8; 7,6; 1,3)
10	133,1	7,65 <i>ddd</i> (7,8; 7,6; 1,4)	8, 11a	133,2	7,66 <i>ddd</i> (7,8; 7,6; 1,4)
11	126,4	7,77 <i>dd</i> (7,8 1,3)	7a, 9, 11b	126,4	7,77 <i>dd</i> (7,8 1,3)
11a	137,6	-	-	137,6	-
11b	99,0	-	-	99,2	-
12	19,7	1,71 <i>s</i>		19,7	1,71 <i>s</i>

O espectro de RMN de ¹H (Figura 22) da substância **SW3** foi muito similar ao de **SW2** indicando que essas duas substâncias possuíam o mesmo esqueleto básico. No entanto, no espectro de RMN de ¹H de **SW3** observou-se um sinal típico de uma hidroxila quelada (δ_H 12,30), e sinais de apenas três hidrogênios ligados a anel aromático (δ_H 7,03, 7,54 e 7,26), em um sistema de spin característico de um anel 1,2,3-trissubstituído. Os demais sinais de uma hidronaftoquinona com um anel metiloxepino também foram observados (Tabela 7). O grupo hidroxila deve estar em C-8, devido ao seu deslocamento químico, que indica interação com um grupo carbonila. As correlações nos mapas de contorno HSQC e HMBC (Figuras 23 e 24; Tabela 7) confirmaram **SW3** como aggregatina F, uma substância já isolada dos tubérculos de *Sinningia aggregata* (VERDAN *et al.*, 2015b).

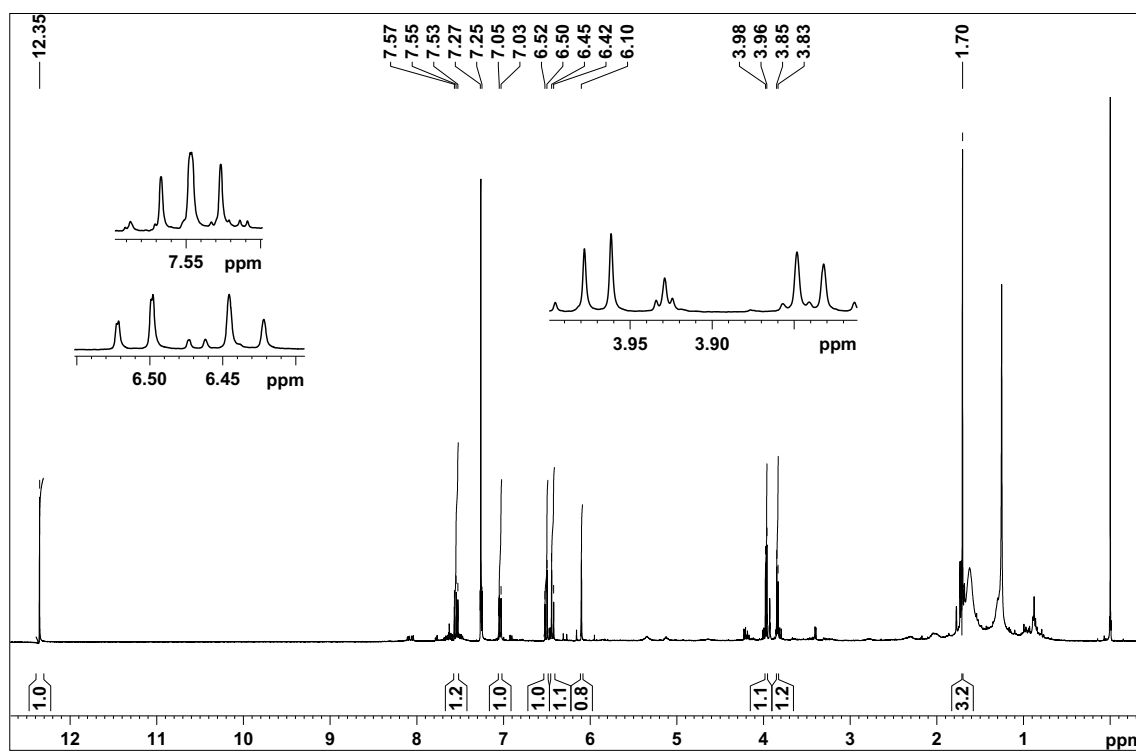
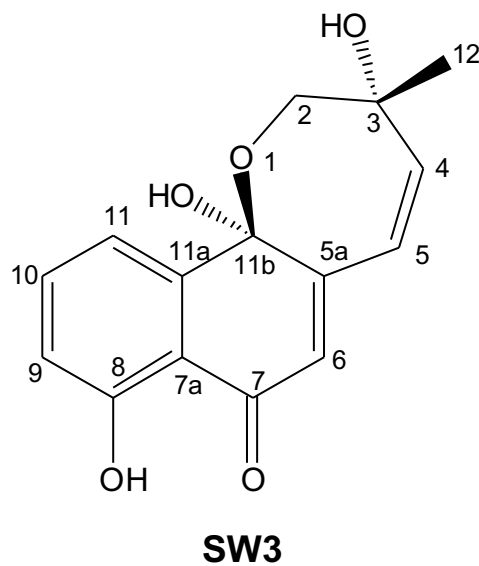


Figura 22. Espectro de RMN de ^1H de SW3 (CDCl_3 , 400 MHz).

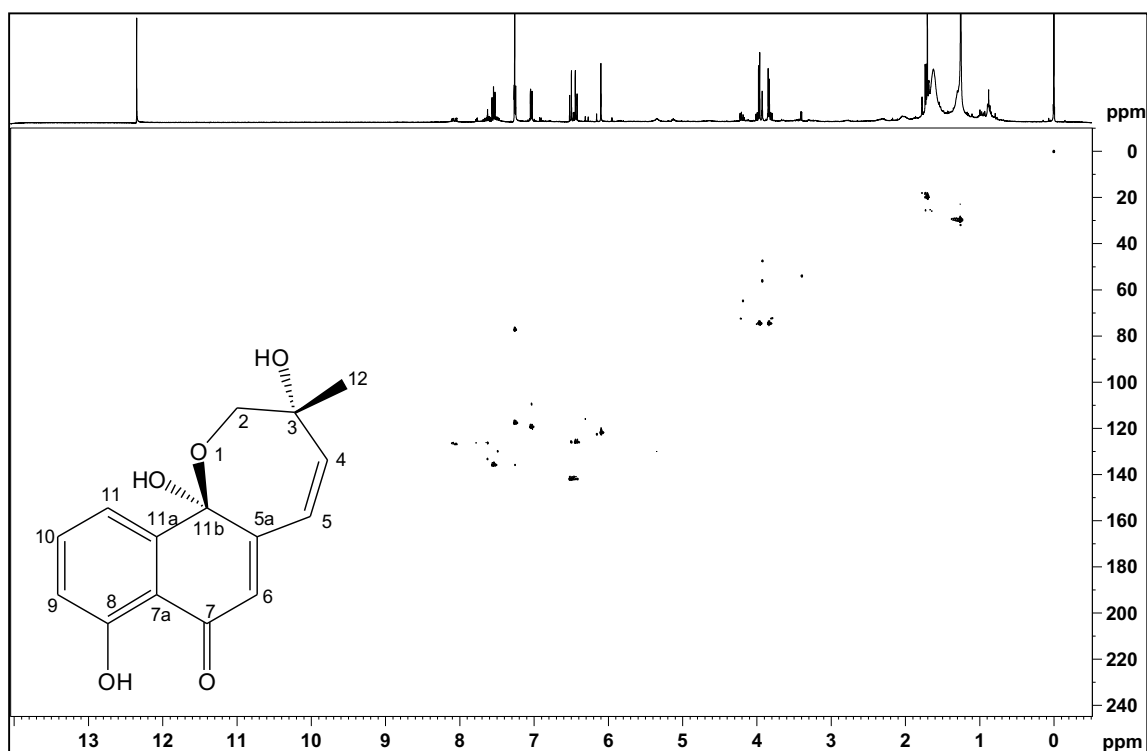


Figura 23. Mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C de SW3 (CDCl_3 , 400 MHz).

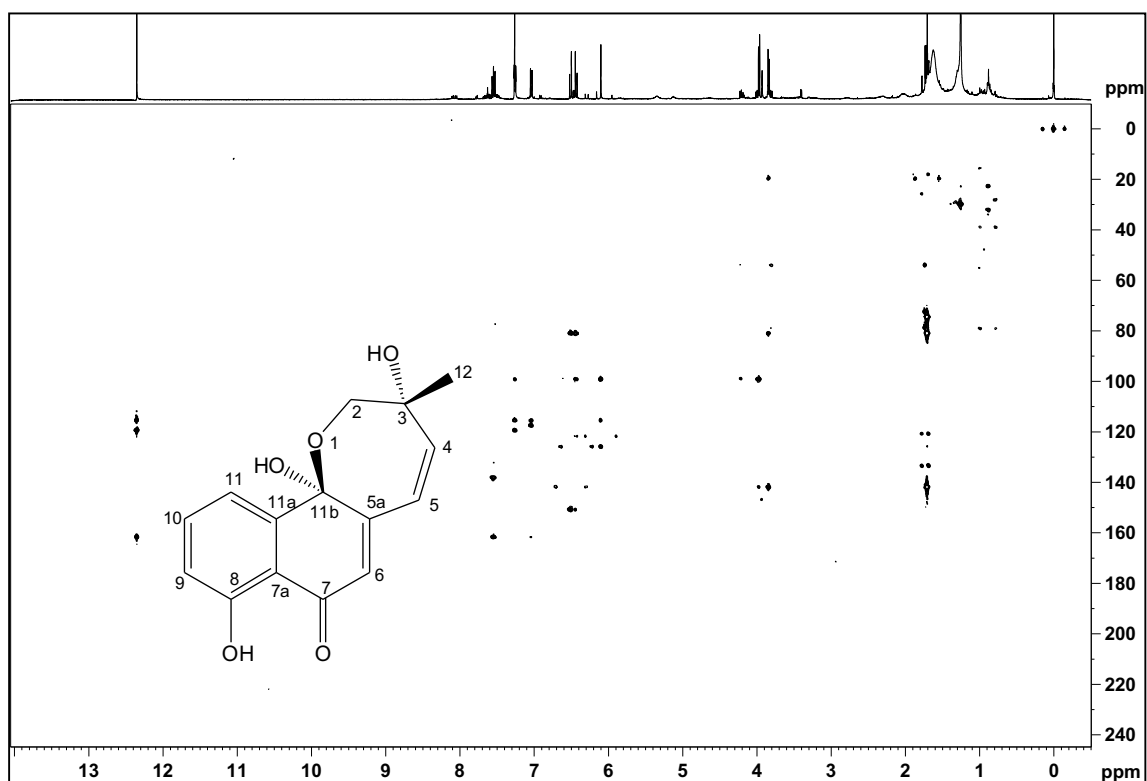


Figura 24. Mapa de correlação a longa distância ^1H - ^{13}C de SW3 (CDCl_3 , 400 MHz).

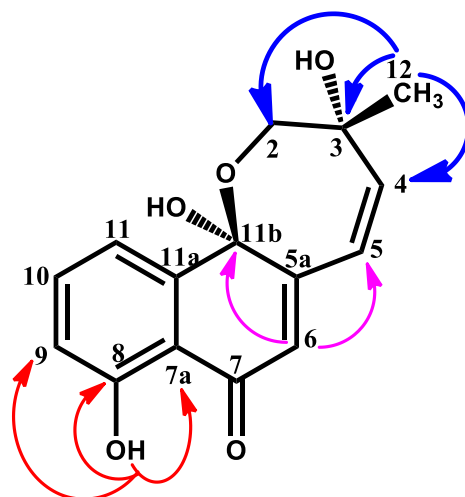


Figura 25. Principais correlações observadas no mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância de **SW3**.

Tabela 7. Dados de RMN de **SW3** (CDCl_3 , 400 MHz) e comparação com dados da literatura (CDCl_3 , 400 MHz, VERDAN *et al.*, 2015b).

Pos.	SW3			Aggregatina F	
	δ_c	δ_H ; mult. (J em Hz)	$^{LD}J_{H,C}$	δ_c	δ_H ; mult. (J em Hz)
2	74,4	3,83 <i>d</i> (6,6) 3,96 <i>d</i> (6,6)	3, 4, 12, 4, 11b	74,4	3,84 <i>d</i> (6,6) 3,97 <i>d</i> (6,6)
3	89,9	-	-	89,9	-
4	141,8	6,50 <i>d</i> (9,4)	3, 5a	141,8	6,51 <i>d</i> (9,4)
5	125,7	6,43 <i>d</i> (9,4)	3, 5a, 11b	125,7	6,43 <i>d</i> (9,4)
5a	150,7	-	-	150,7	-
6	121,7	6,10 <i>s</i>	5, 7a, 11b	121,7	6,10 <i>s</i>
7	189,9	-	-	189,9	-
7a	115,3	-	-	115,3	-
8	161,5	-	-	161,5	-
9	119,2	7,03 <i>dd</i> (8,3; 1,1)	7a, 11	119,2	7,04 <i>dd</i> (8,3; 1,1)
10	135,7	7,54 <i>dd</i> (8,3; 7,7)	8, 11a	135,7	7,55 <i>dd</i> (8,3; 7,7)
11	117,5	7,26 <i>dd</i> (7,7 1,1)	7a, 9, 11b	117,5	7,26 <i>dd</i> (7,7 1,1)
11a	138,0	-	-	138,0	-
11b	99,0	-	-	99,0	-
12	19,6	1,70 <i>s</i>	2, 3, 4	19,6	1,70 <i>s</i>
OH	-	12,30 <i>s</i>	7a, 8, 9	-	12,30 <i>s</i>

4.3. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS DERIVADOS DIMÉRICOS DE NAFTOQUINONAS **SW4** E **SW5**

O espectro de RMN de ^1H de **SW4** (Figura 28) foi muito similar ao de **SW2**, apresentando sinais para os mesmos grupos, com pequenas diferenças nos deslocamentos químicos, exceto pelo sinal de H-6 (δ_{H} 6,15) de **SW2** que estava ausente no espectro de **SW4**. Nos mapas de correlação HSQC e HMBC (Figuras 29 e 30) foram observados 15 carbonos, como para **SW2** (Tabela 6). As correlações observadas também apontaram para o mesmo esqueleto de **SW2**. A ausência de um sinal para H-6 sugeriu em um primeiro momento, que este hidrogênio teria sido substituído por um grupo hidroxila. Entretanto H-5 (δ_{H} 6,35) mostrou correlações com carbonos em δ_{C} 80,6, 99,5, 126,4 e 147,4, e por comparação com os deslocamentos químicos de **SW2**, C-6 deve ser o carbono em δ_{C} 126,4. Esse deslocamento químico indica a ligação de C-6 com outro carbono. Como apenas 15 carbonos foram detectados, deve-se ter uma estrutura simétrica. O espectro de massas de **SW3** no modo positivo (Figura 27) mostrou um pico em m/z 501,1308 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, indicando a fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{22}\text{O}_6$. Por comparação com um possível dímero de **SW2**, nota-se que **SW4** perdeu duas moléculas de água, devendo ter formado um anel entre C-3 e C-11b. A fim de confirmar essa suposição, um monocristal foi obtido através de lenta evaporação de uma solução de acetonitrila e, analisado por cristalografia de Raios X. Essa análise permitiu confirmar a estrutura e determinar a configuração absoluta de **SW4**. Como pode ser visto na Figura 26, essa substância é um dímero, derivado de **SW2** com a configuração absoluta 3*R*, 3'*R*, 11b*S*, 11b'*S*, e foi denominada warminguiina A. O espectro de dicroísmo circular de **SW4** (Figura 31) foi similar aos espectros de dicroísmo de **SW2** e **SW3** descritos na literatura (VERDAN *et al.*, 2015b) indicando que essas três substâncias têm a mesma configuração absoluta em C-3 e C-11b.

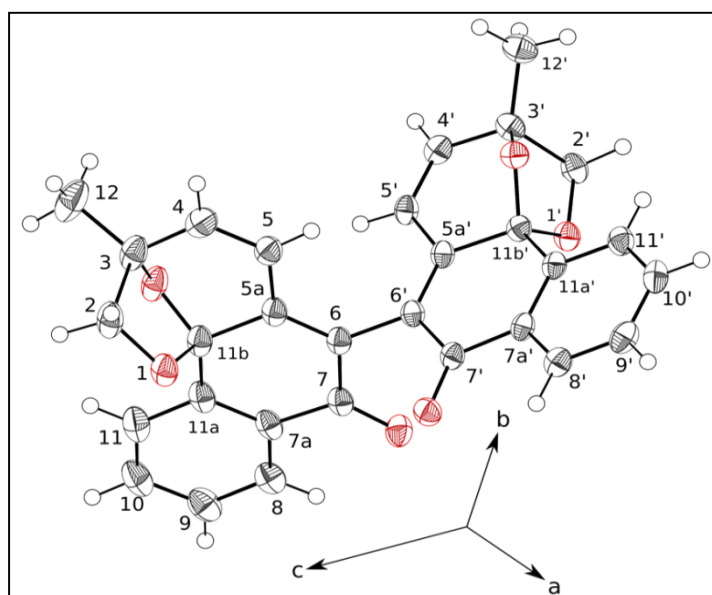
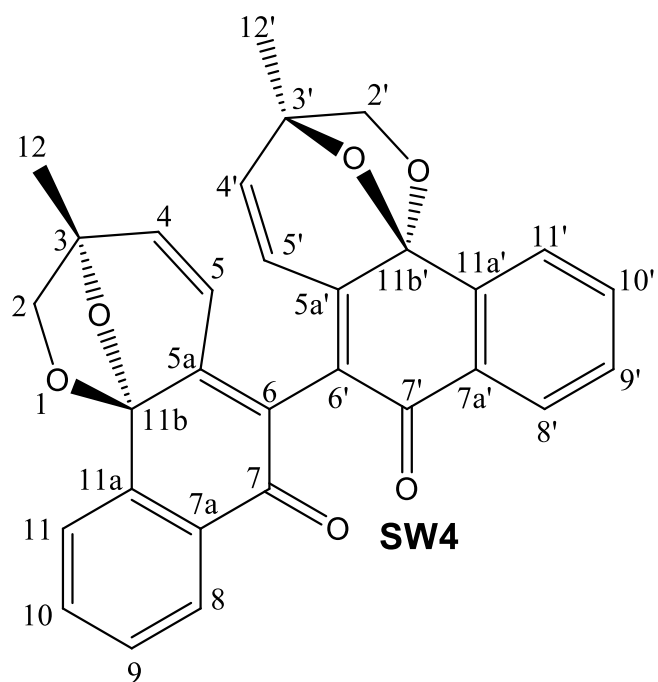


Figura 26. Ilustração da estrutura de **SW4** obtida por cristalografia de Raios X.

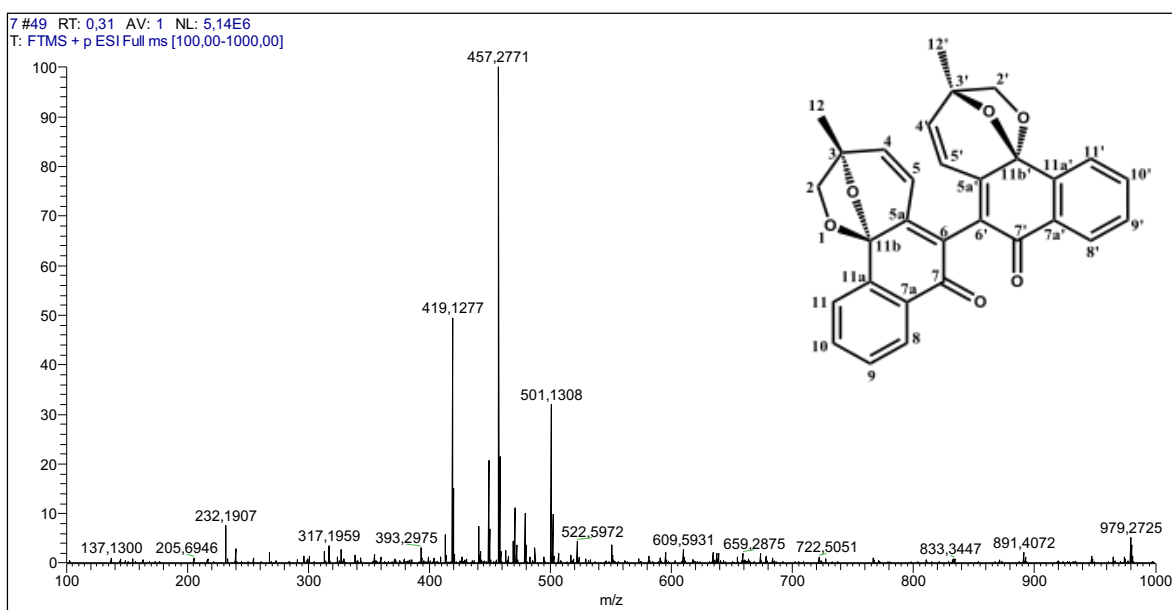


Figura 27. Espectro de massas de alta resolução de SW4.

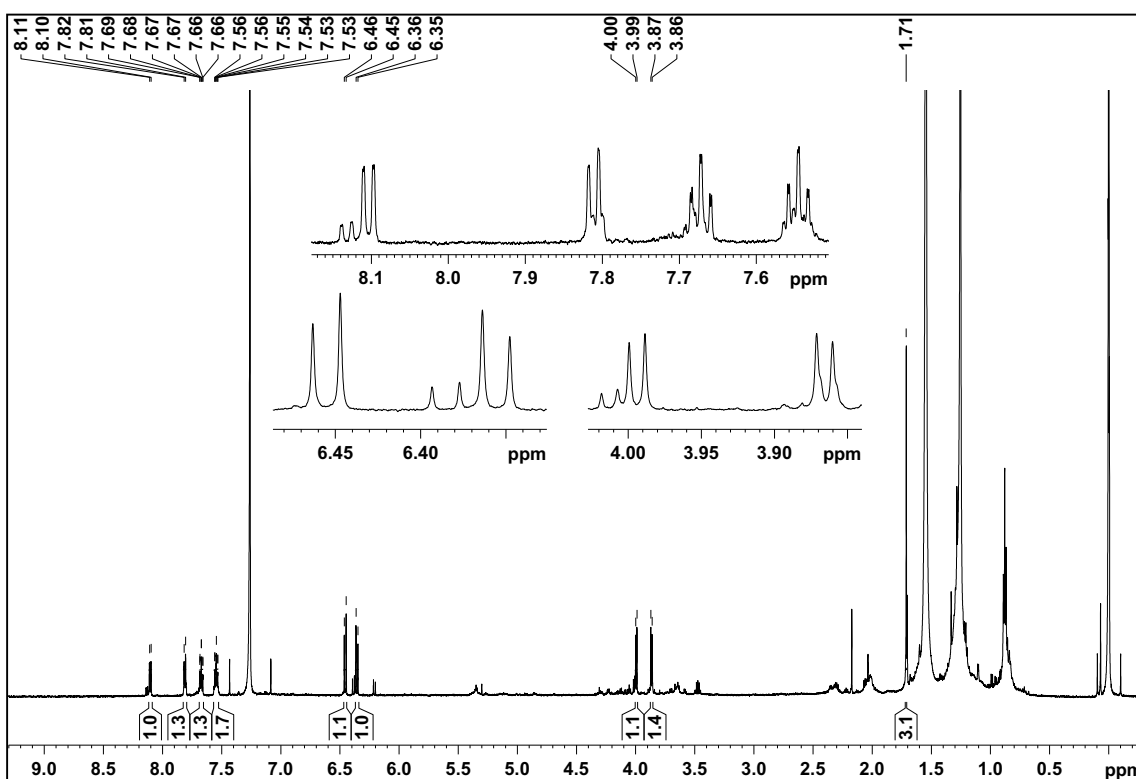


Figura 28. Espectro de RMN de ^1H de SW4 (CDCl_3 , 600 MHz).

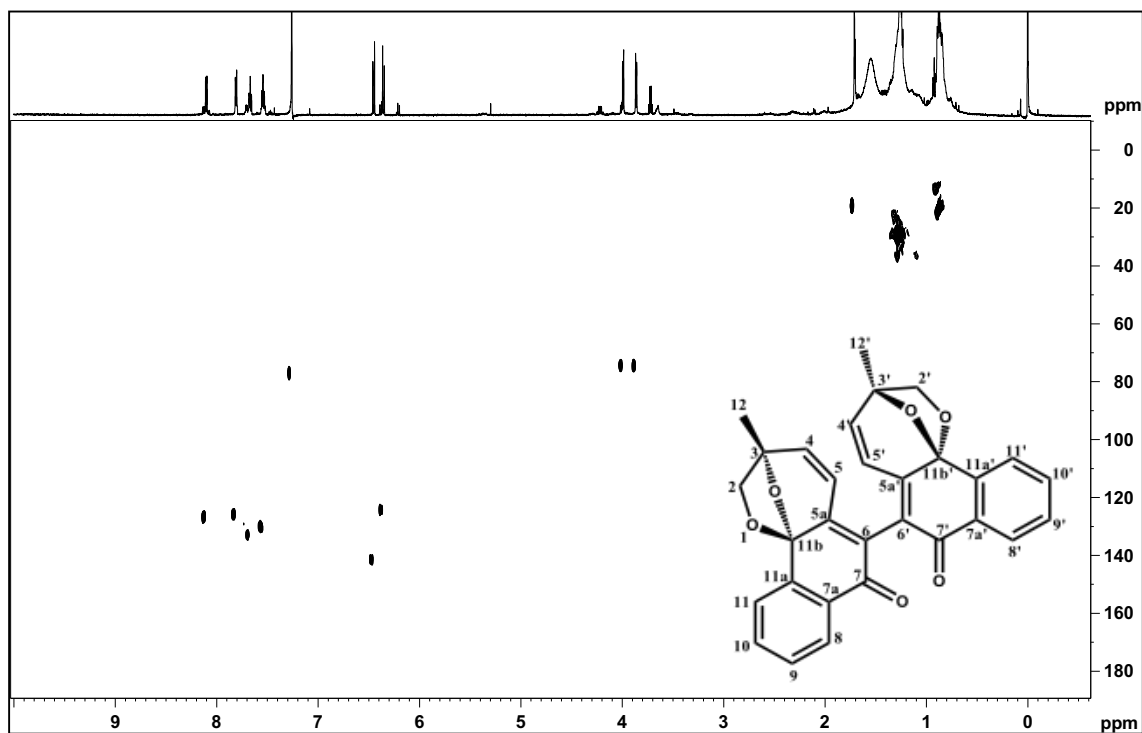


Figura 29. Mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C de SW4 (CDCl_3 , 600 MHz).

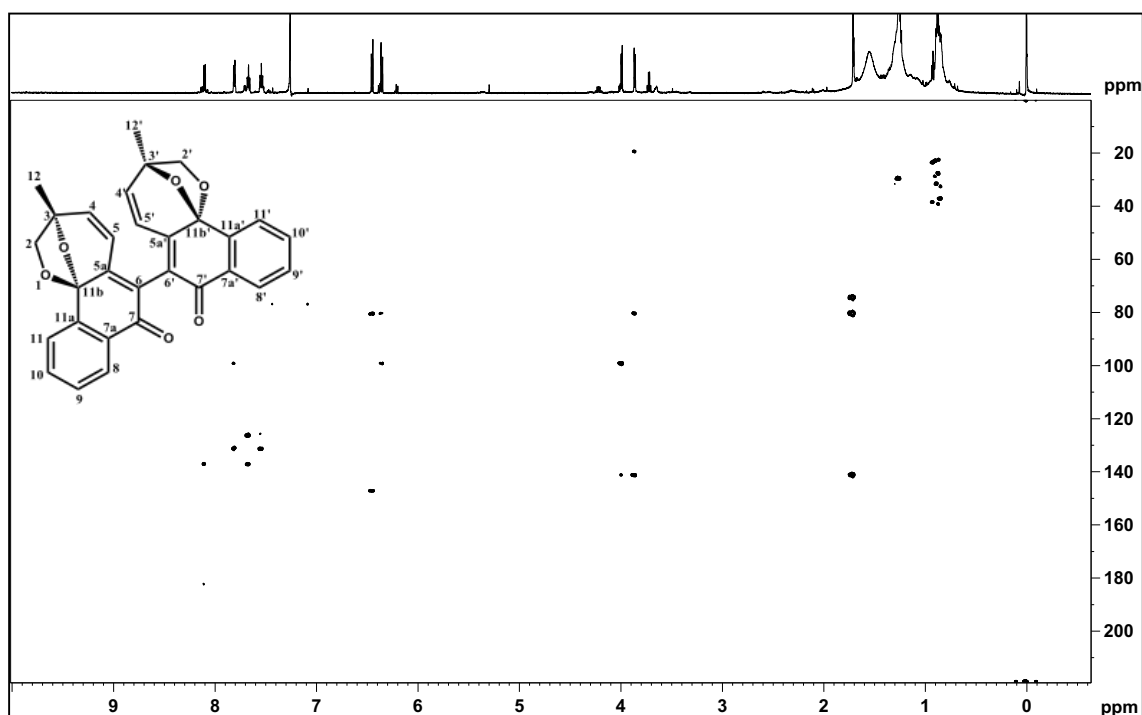


Figura 30. Mapa de correlação a longa distância ^1H - ^{13}C de SW4 (CDCl_3 , 600 MHz).

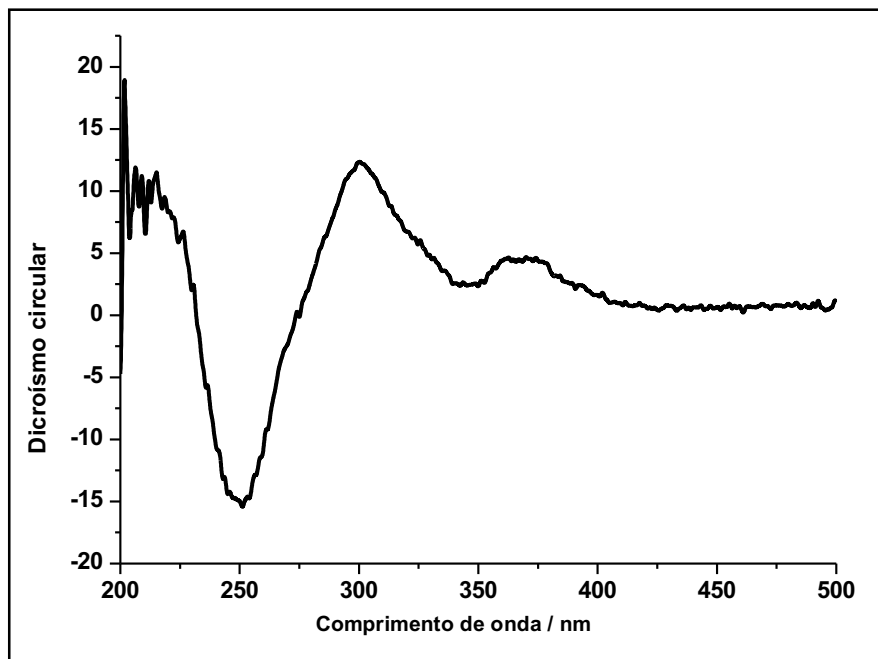


Figura 31. Espectro de dicroísmo circular de **SW4**.

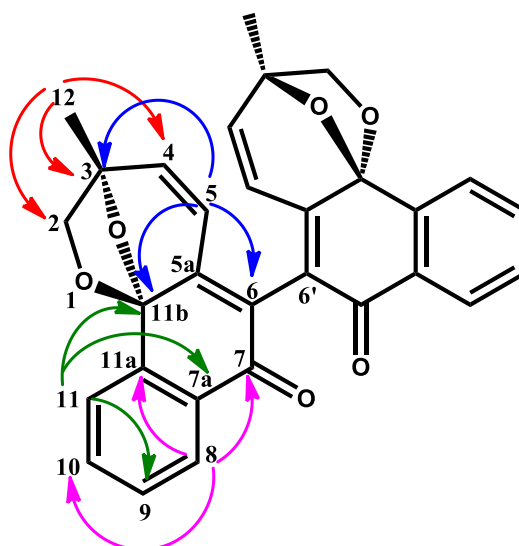
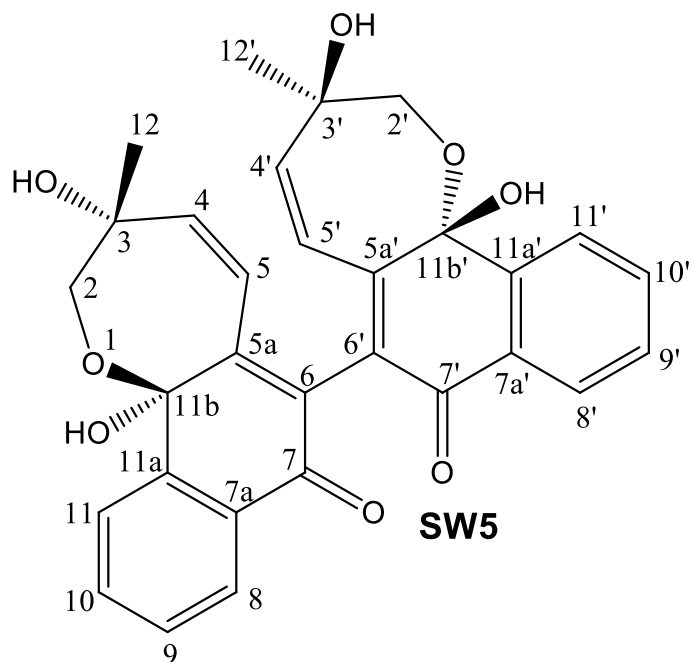


Figura 32. Principais correlações observadas no mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância de **SW4**.

Tabela 8. Dados de RMN de **SW4** (CDCl₃, 600 MHz).

Posição	δ_c	δ_H ; mult. (J em Hz)	^{LD} J _{H,c}
2, 2'	74,4	3,86 <i>d</i> (6,5) 4,00 <i>d</i> (6,5)	3, 4, 12 4, 11b
3, 3'	80,6	-	-
4, 4'	141,4	6,45 <i>d</i> (9,7)	2, 5a, 12
5, 5'	124,2	6,35 <i>d</i> (9,7)	3, 6, 12
5a, 5'a	147,4	-	-
6, 6'	126,4	-	-
7, 7'	182,7	-	-
7a, 7'a	131,3	-	-
8, 8'	126,7	8,10 <i>ddd</i> (7,8; 1,3; 0,8)	7, 10, 11a
9,9'	130,0	7,54 <i>ddd</i> (7,8; 7,6; 1,3)	7a, 11
10,10'	133,1	7,67 <i>ddd</i> (7,8; 7,6; 1,3)	8, 11a
11, 11'	126,0	7,81 <i>ddd</i> (7,8; 1,3; 0,8)	7a, 9, 11b
11a, 11'a	137,4	-	-
11b, 11'b	99,5	-	-
12	19,2	1,71 <i>s</i>	2, 3, 4

O espectro de RMN de ¹H de **SW5** (Figura 34) apresentou vários sinais em duplicata, com intensidades diferentes, mostrando tratar-se de uma mistura. A presença de uma mistura é particularmente clara na região dos hidrogênios olefínicos (Figura 36). A integração dos sinais nessa região mostra uma relação de 1:0,07 entre os dois componentes. Por comparação com o espectro de RMN de ¹H de **SW4** (Figura 35) pode-se notar que o componente minoritário é **SW4** (warminguiina A). O outro componente deve ter uma estrutura muito similar, pois o espectro tem o mesmo perfil com deslocamentos químicos ligeiramente diferentes. A análise das correlações nos mapas de correlação HSQC e HMBC (Figuras 37 e 38; Tabela 9) indicou a presença de 15 carbonos, devendo ser, portanto uma estrutura dimérica simétrica. Isso levou a proposição de uma estrutura derivada diretamente da dimerização de **SW2** (agregatina E), contendo quatro hidroxilas (em C-3, C-3', C-11b e C-11'b), como mostrado abaixo.



Com o objetivo de confirmar essa estrutura foi obtido o espectro de massas de alta resolução no modo negativo (Figura 30). Observou-se um pico em m/z 477,13517, que pode ser atribuído a **SW4** ($C_{30}H_{21}O_6$, $[M - H]^-$), e outro em m/z 513,15641, que pode ser atribuído a **SW5** ($C_{30}H_{25}O_8$, $[M - H]^-$). Desse modo, **SW5** foi identificada como um dímero de **SW2**, sendo denominada warminguiina B.

Foi feita uma tentativa de separação das duas substâncias por CLAE, mas somente **SW4** foi obtida. Também, um novo espectro de RMN de 1H da mistura foi obtido após seis semanas e mostrou que a proporção de **SW5** havia variado de cerca de 60% para 30% (Figura 36). Esses resultados sugeriram que **SW4** seria um artefato formado a partir de **SW5** durante o processo de isolamento. A estrutura de **SW5**, com hidroxilas próximas entre si favorece a desidratação catalisada por ácido. E tanto o gel de sílica como os solventes orgânicos usados comumente no laboratório contêm traços de ácidos. Outra possibilidade é que essas substâncias existam em equilíbrio, em função do teor de água presente tanto no gel de sílica como nos solventes orgânicos. Sendo **SW5** precursor de **SW4** (warminguiina A), deve ter a mesma configuração absoluta. Considerando que há uma mudança de prioridade dos grupos ao redor de C-11b, a sua configuração absoluta foi determinada como 3*R*, 3'*R*, 11b*R*, 11'b*R*.

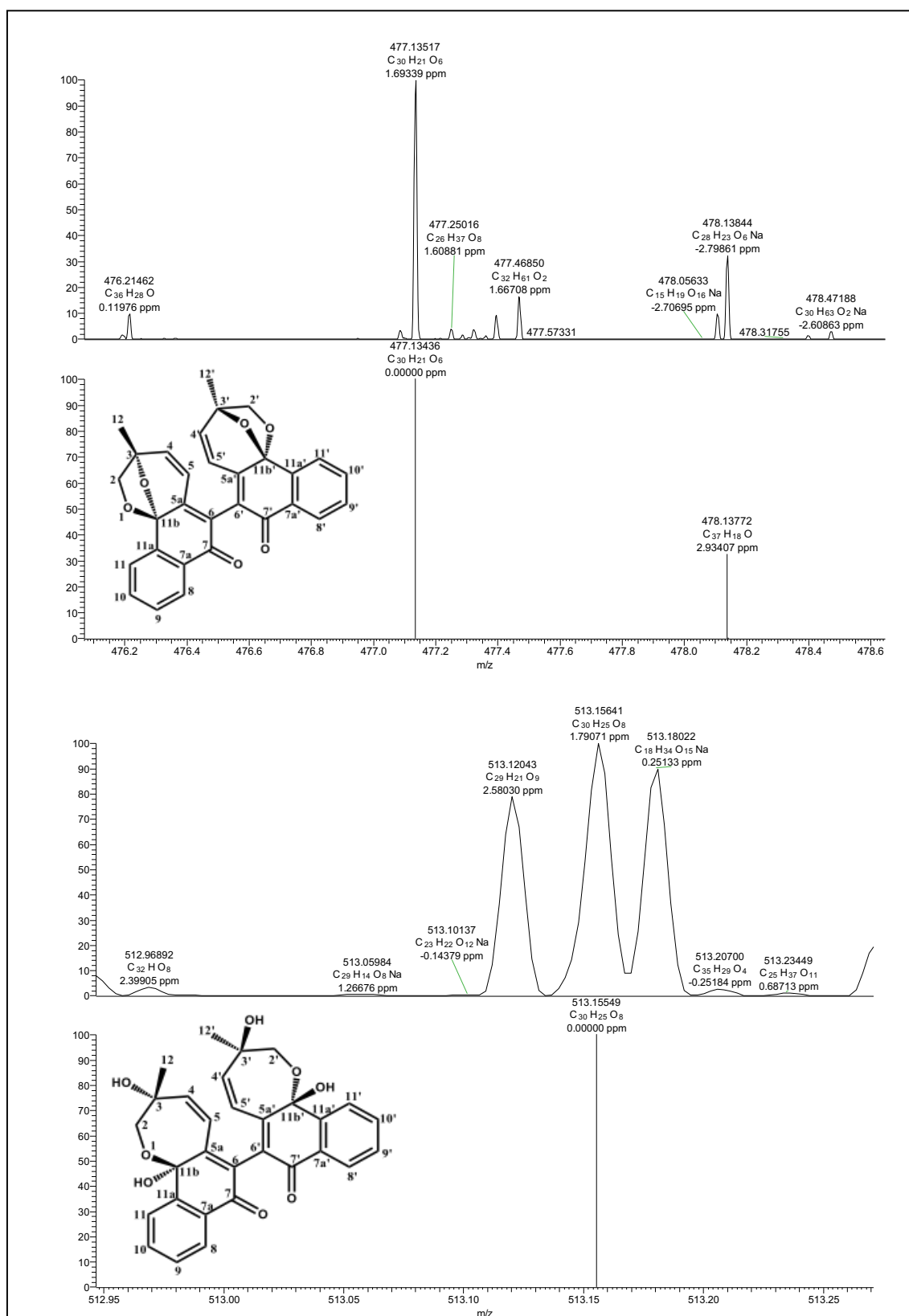


Figura 33. Espectro de massas de alta resolução da mistura **SW5**. Ampliação dos picos correspondentes às substâncias **SW4** e **SW5**.

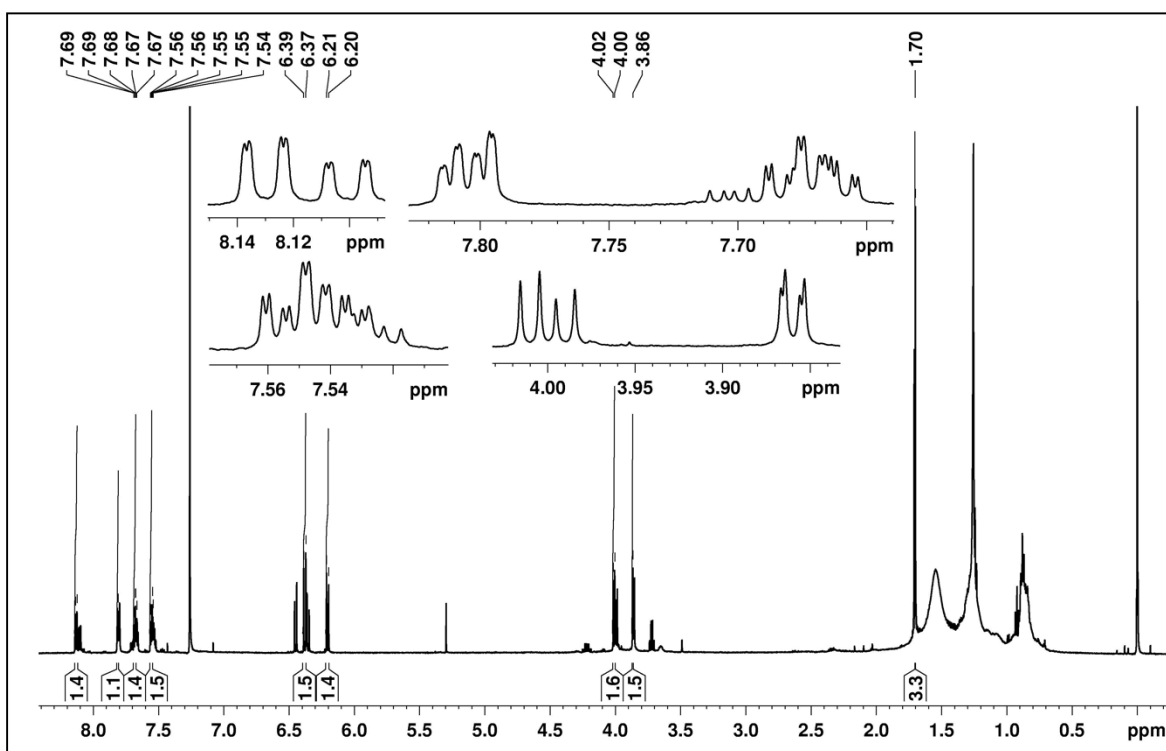


Figura 34. Espectro de RMN ^1H de **SW5** (CDCl_3 , 600 MHz).

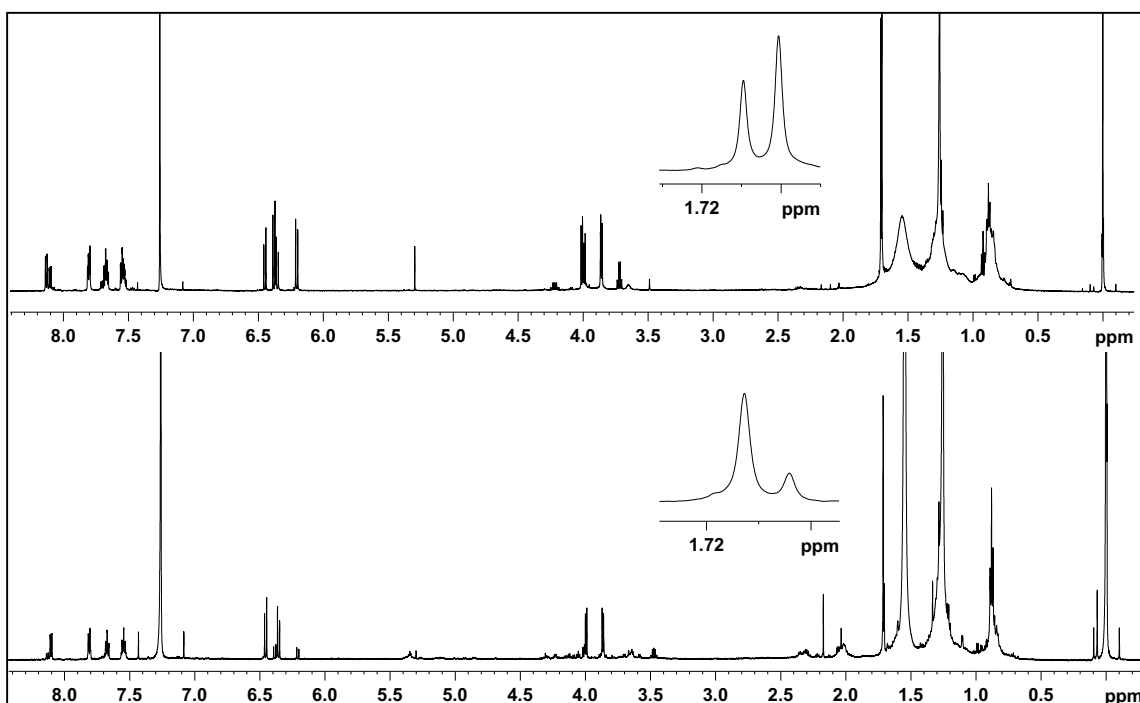


Figura 35. Espectros de RMN de ^1H de **SW5** (superior) e **SW4** (inferior), com ampliação da região dos hidrogênios metílicos (CDCl_3 , 600 MHz).

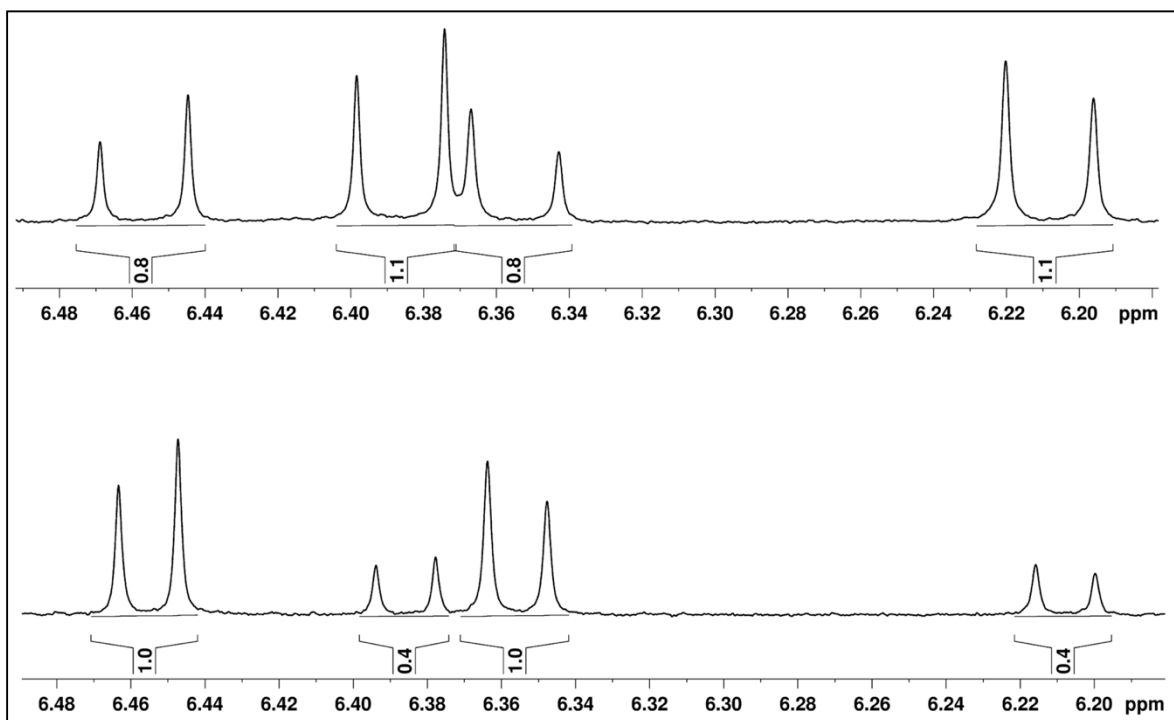


Figura 36. Espectro de RMN de ^1H da região olefínica de **SW5** imediatamente após o isolamento (superior) e seis semanas depois (inferior) (CDCl_3 , 600 MHz).

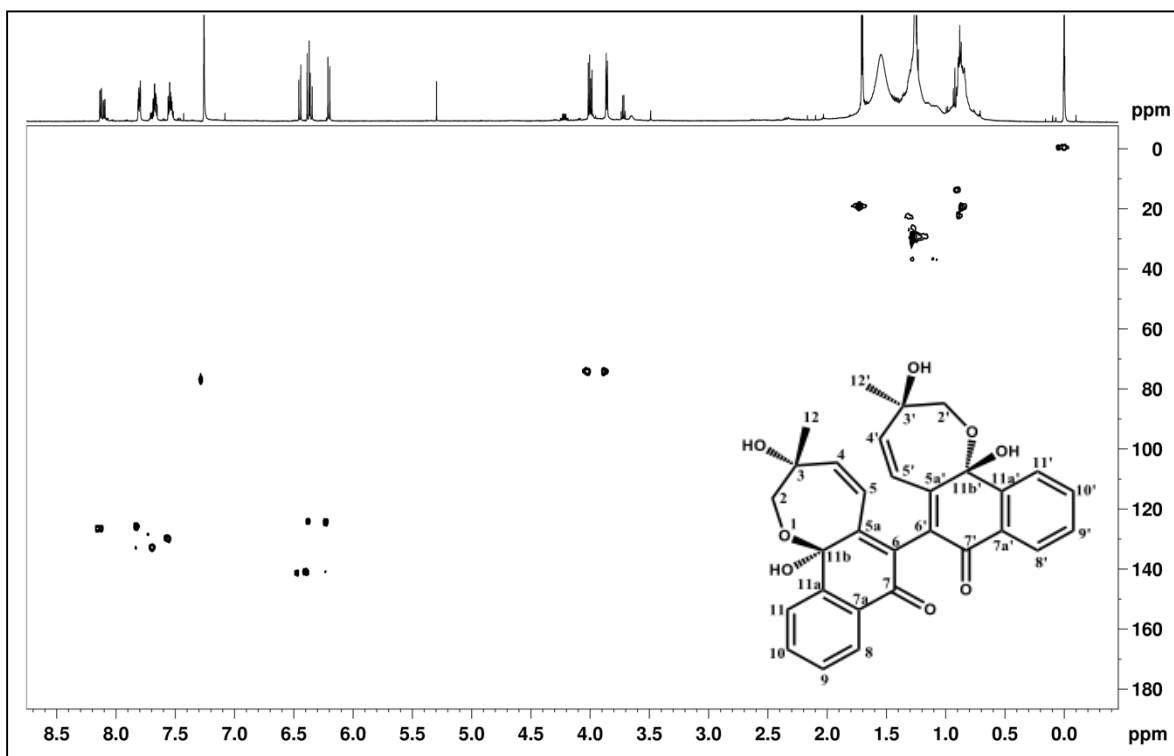


Figura 37. Mapa de correlação direta $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ de **SW5** (CDCl_3 , 600 MHz).

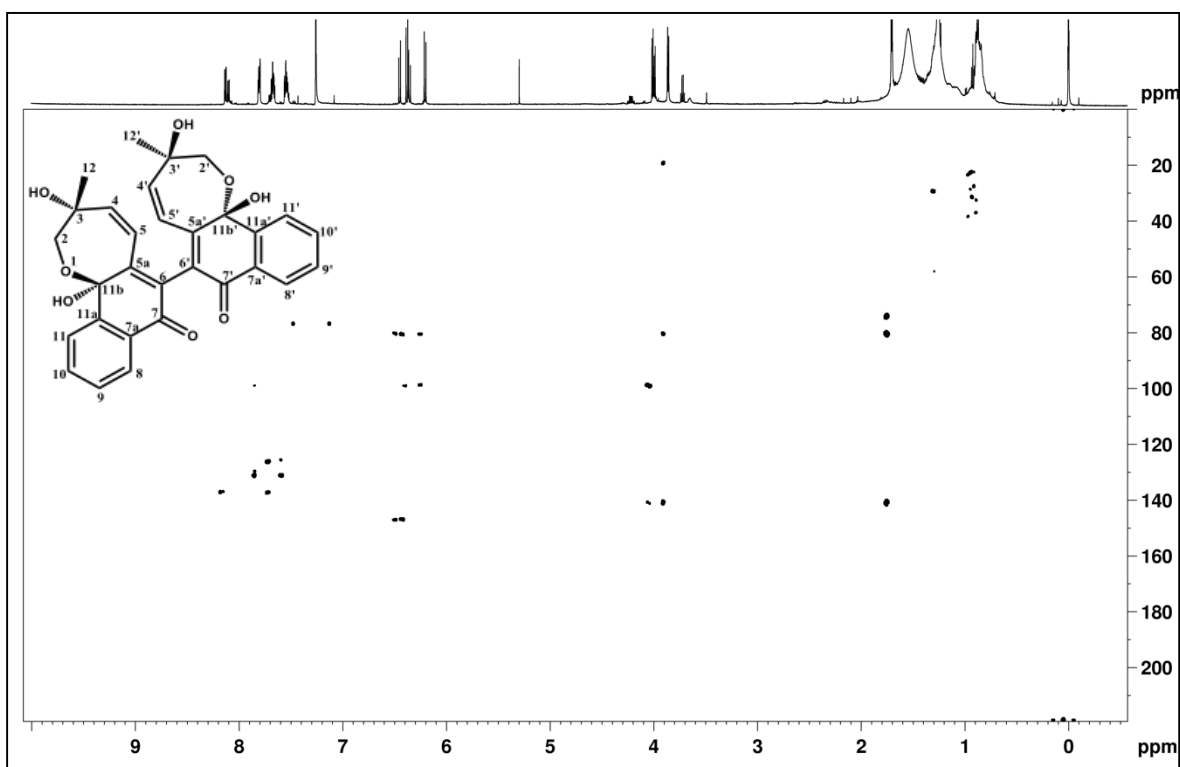


Figura 38. Mapa de correlação a longa distância $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ de **SW5** (CDCl_3 , 600 MHz).

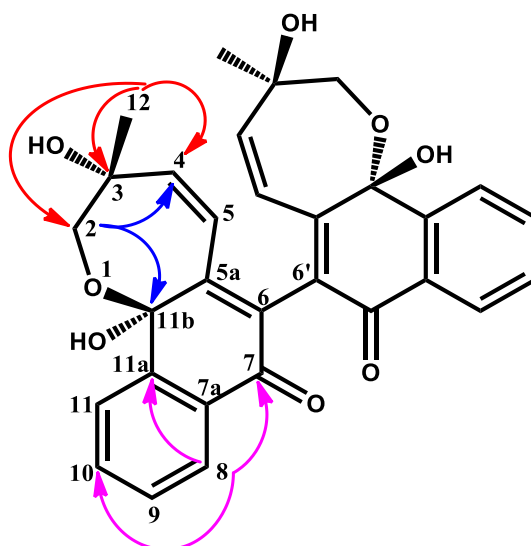


Figura 39. Principais correlações observadas no mapa de correlação $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ a longa distância de **SW5**.

Tabela 9. Dados de RMN de **SW5** (CDCl₃, 600 MHz).

Posição	δ_C	δ_H ; mult. (J em Hz)	^{LD} J _{H,C}
2, 2'	74,2	3,86 <i>d</i> (6,6) 4,01 <i>d</i> (6,6)	4, 12 -
3, 3'	80,6	-	-
4, 4'	140,8	6,39 <i>d</i> (9,7)	2, 5a, 12
5, 5'	124,6	6,20 <i>d</i> (9,7)	3, 6, 12
5a, 5'a	147,2	-	-
6, 6'	125,8	-	-
7, 7'	182,2	-	-
7a, 7'a	131,2	-	-
8, 8'	126,6	8,13 <i>ddd</i> (7,8; 1,2; 0,5)	7, 10, 11a
9, 9'	129,8	7,55 <i>ddd</i> (7,8; 7,6; 1,3)	7a, 11
10, 10'	132,9	7,68 <i>ddd</i> (7,8; 7,6; 1,2)	8, 11a
11, 11'	125,8	7,82 <i>ddd</i> (7,8; 1,3; 0,5)	7a, 9, 12
11a, 11'a	137,2	-	-
11b, 11'b	99,2	-	-
12	19,3	1,70 <i>s</i>	2, 3, 4

4.4. IDENTIFICAÇÃO DOS ETILCICLOEXANOIDES **SW6**, **SW7** E **SW8**

Nesse grupo de substâncias os espectros de RMN de ¹H não apresentam sinais característicos de hidrogênios ligados a anéis aromáticos ou de grupos metila, indicando que são substâncias alifáticas.

Em várias frações foi obtida a mesma substância **SW6**. O seu espectro de RMN ¹H (Figura 40) apresentou características de um composto não aromático, hidroxilado. Observou-se sinais de dois hidrogênios na região olefínica, sendo um duplo duplete em δ_H 6,77 (*J*= 10,2; 1,4) e um duplete em δ_H 6,02 (*J*= 10,2). Também foram observados sinais de um hidrogênio oximetínico (δ_H 4,25), dois hidrogênios oximetilênicos (δ_H 4,08 e 3,95), além de quatro hidrogênios metilênicos (δ_H 2,78, 2,61, 2,34 e 2,23) (Tabela 10). Com os espectros de RMN de ¹³C{¹H} e DEPT-135 (Figura 41) foi deduzida a presença de oito carbonos, sendo três metilênicos (δ_C 39,6, 39,0 e 66,0), três metínicos (δ_C 80,8,

127,8 e 149,0) e dois quaternários (δ_C 74,4 e 197,8).

Esses dados foram prontamente reconhecidos como da substância conhecida como halleridona ou rengiolona. Esta molécula é obtida como um racemato, devido a uma ciclização não estereoespecífica. O anel tetraidrofurano com configuração *cis* é deduzido pelas constantes de acoplamento (MESSANA *et al.*, 1984; BELLAKHDAR *et al.*, 1988). Esta molécula é uma cicloexenona já isolada anteriormente de outras frações de *S. warmingii* (VERDAN *et al.*, 2014).

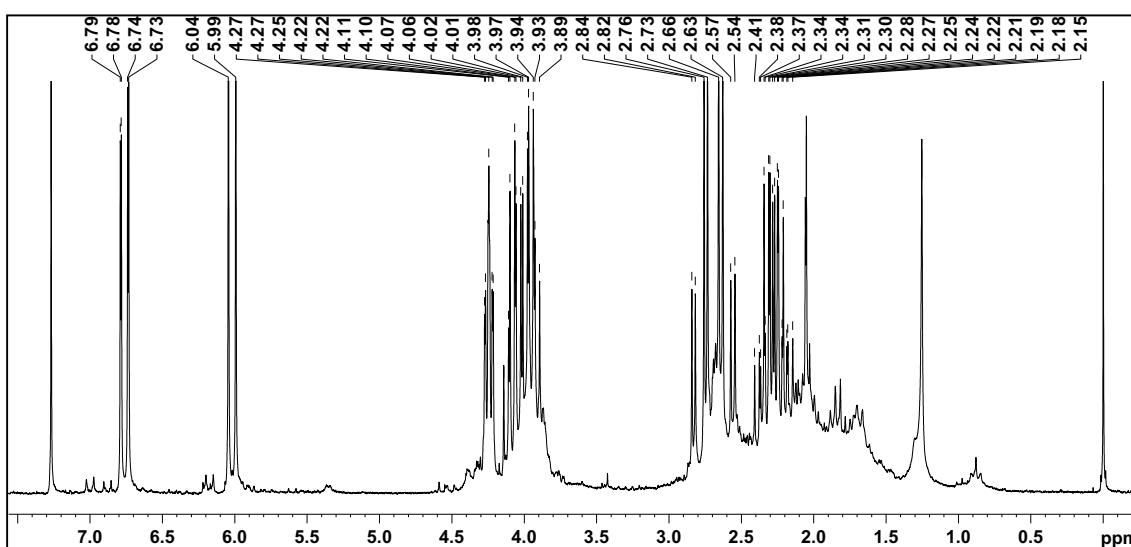
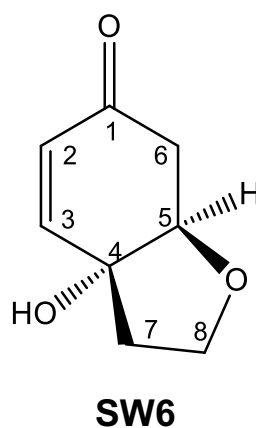


Figura 40. Espectro de RMN de ^1H de **SW6** (CDCl_3 , 200 MHz).

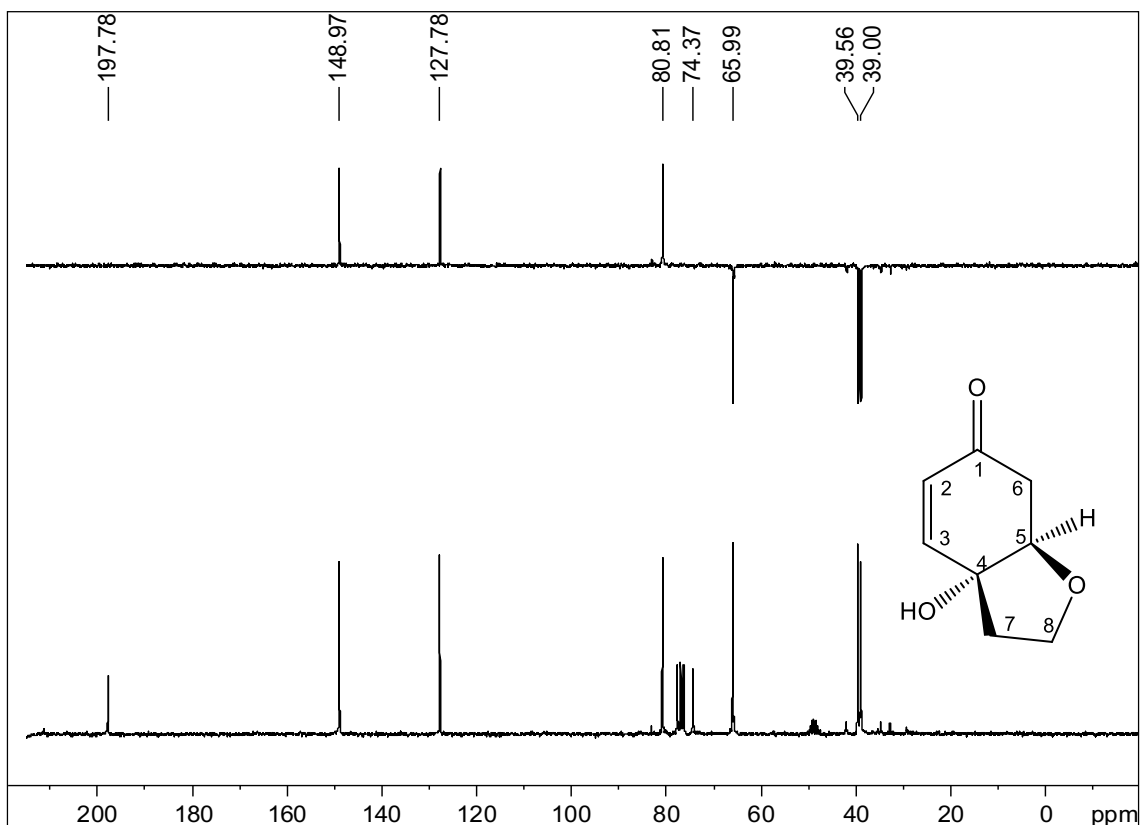
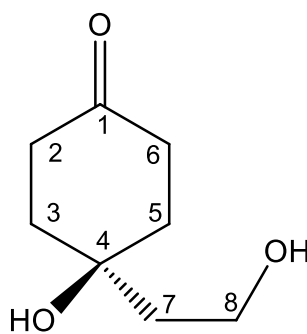


Figura 41. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e DEPT-135 de **SW6** (CDCl_3 , 50 MHz).

Tabela 10. Dados de RMN de **SW6** (CDCl_3 , 400 MHz) e comparação com dados da literatura (CDCl_3 , 100 MHz, MESSANA *et al.*, 1984).

Pos.	SW6		Halleridona	
	δ_{C}	δ_{H} ; mult. (J em Hz)	δ_{C}	δ_{H} ; mult. (J em Hz)
1	197,8	-	197,7	-
2	127,8	6,02 <i>d</i> (10,2)	127,4	6,02 <i>d</i> (10,0)
3	149,0	6,77 <i>dd</i> (10,2; 1,4)	149,2	6,86 <i>dd</i>
4	74,4	-	74,7	-
5	80,8	4,25 <i>ddd</i> (5,8; 4,7; 1,4)	80,8	4,28 <i>dt</i> (15,0)
6 ax		2,78 <i>dd</i> (16,8; 4,7)		
6 eq	39,6	2,61 <i>dd</i> (16,8; 5,8)	39,2	2,70 <i>m</i> (16,0; 4,0)
7 ax		2,23 <i>ddd</i> (13,1; 8,1; 6,6)		
7 eq	39,0	2,34 <i>ddd</i> (13,1; 8,3; 6,4)	39,7	2,30 <i>t</i> (7,0)
8 ax		3,95 <i>ddd</i> (8,6; 8,1; 6,4)		
8 eq	66,0	4,08 <i>ddd</i> (8,6; 8,3; 6,6)	65,9	3,96 <i>t</i> (7,0)

Duas frações forneceram a substância **SW7**. O seu espectro de RMN de ^1H (Figura 42) é muito semelhante ao da substância apresentada anteriormente, diferenciando-se por não apresentar os sinais de hidrogênios olefínicos. Foram observados sinais de oito hidrogênios metilênicos (δ_{H} 1,73, 1,84, 2,11, 2,25 e 2,77), além de um tripleto equivalente a dois hidrogênios oximetilênicos em δ_{H} 4,01 ($J= 5,6$, H-8). Através dos experimentos de correlação direta (HSQC Figura 43) e a longa distância (HMBC Figura 44) ^1H - ^{13}C foram observados sinais de apenas seis carbonos, sendo um deles típico de cetona (δ_{C} 212,2) e dois característicos de carbonos alifáticos oxigenados (δ_{C} 70,5 e 59,9). Esses dados sugeriram uma etilciclohexanona simétrica. No HMBC foi observado que os hidrogênios em δ_{H} 4,01 (H-8, δ_{C} 59,9) fazem correlação com C-7 (δ_{C} 41,7) e C-4 (δ_{C} 70,5), o sinal em δ_{H} 1,84 (H-7) faz correlação com C-4 e C-5 (δ_{C} 37,2), e os hidrogênios em δ_{H} 2,77 (H-5) fazem correlação com C-1 (δ_{C} 212,2). Estes dados espectrais estão de acordo com a estrutura da substância conhecida como cleroidicina B (TIAN *et al.*, 1997), previamente isolada pelo nosso grupo de *Sinningia speciosa* (VERDAN *et al.*, 2009).

**SW7**

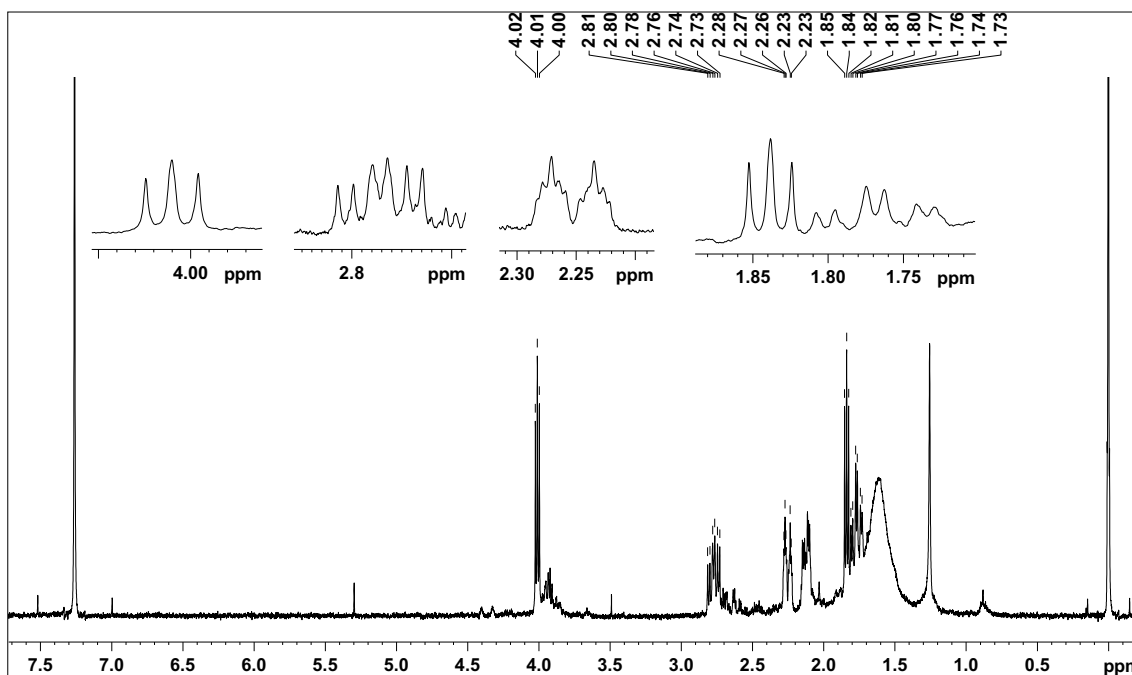


Figura 42. Espectro de RMN de ^1H de **SW7** (CDCl_3 , 400 MHz).

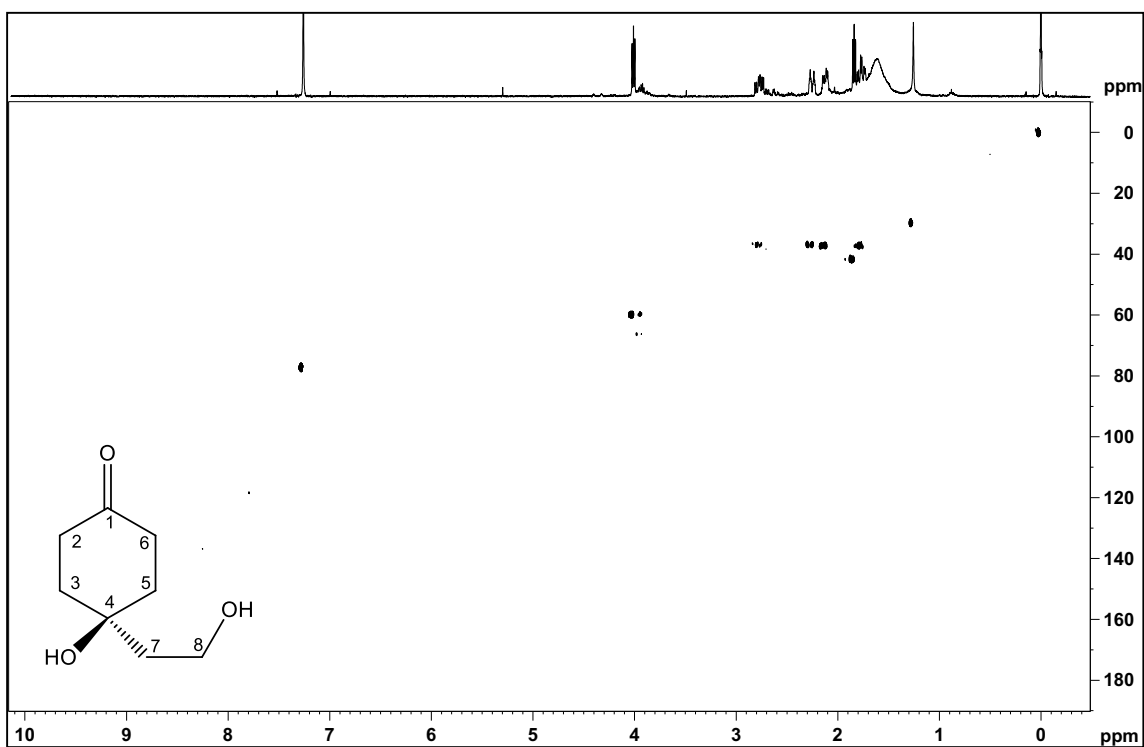


Figura 43. Mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C de **SW7** (CDCl_3 , 400 MHz).

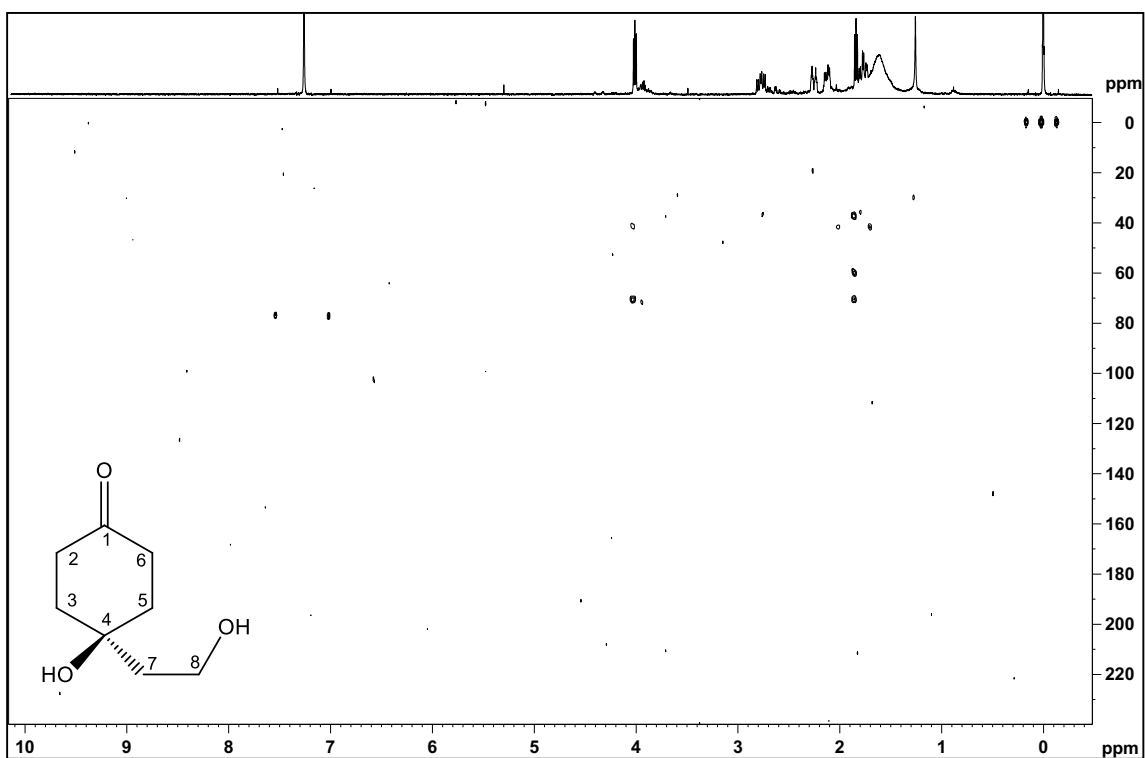


Figura 44. Mapa de correlação a longa distância $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ de **SW7** (CDCl_3 , 400 MHz).

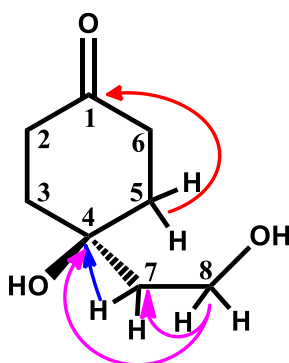


Figura 45. Principais correlações observadas no mapa de correlação $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ a longa distância de **SW7**.

Tabela 11. Dados de RMN de **SW7** (CDCl₃, 400 MHz) e comparação com dados da literatura (C₅D₅N, 400 MHz, TIAN *et al.*, 1997).

Pos.	SW7			Cleroidicina B	
	δ_C	δ_H ; mult. (J em Hz)	^{LD} J _{H,C}	δ_C	δ_H ; mult. (J em Hz)
1	212,2	-	-	211,5	-
2 ax	36,8	2,77 ddd (15,0; 13,7; 6,0)	1, 4, 5	37,8	2,95 dt (13,6; 6,2)
2 eq		2,25 m	1, 4, 5		2,32 dt (13,6; 4,8)
3 ax	37,2	1,73 m	1, 4, 6	37,6	1,84 dt (13,2; 6,2)
3 eq		2,11 m	1, 4, 6		2,16 dt (13,2; 4,8)
4	70,5	-	-	69,8	-
5 ax	37,2	1,73 m	1, 4, 6	37,6	1,84 dt (13,2; 6,2)
5 eq		2,11 m	1, 4, 6		2,16 dt (13,2; 4,8)
6 ax	36,8	2,77 ddd (15,0; 13,7; 6,0)	1, 4, 5	37,8	2,95 dt (13,6; 6,2)
6 eq		2,25 m	1, 4, 5		2,32 dt (13,6; 4,8)
7 ax	41,7	1,84 t (5,6)	3,4,5,8	44,4	2,05 t (6,6)
7 eq		2,34 ddd (13,1;8,3;6,4)			
8 ax	59,9	4,01 t (5,6)	4,7	58,8	4,18 t (6,6)
8 eq		4,08 ddd (8,6;8,3;6,6)			

A substância **SW8** apresentou em seu espectro de RMN de ¹H (Figura 46) sinais de quatro hidrogênios olefínicos (δ_H 7,02 e 6,11), de vários hidrogênios oxigenados (δ_H 4,22-3,14), e de um grupo metilênico (δ_H 2,05, *t*, *J*=6,5) referente a um grupo CH₂ vizinho a outro CH₂. Os mapas de contorno HSQC e HMBC (Figuras 47 e 46, Tabela 12) mostraram 13 sinais de carbonos, incluindo um grupo carbonila α,β -insaturado em δ_C 188,1 e um carbono em δ_C 104,4, que pode ser atribuído ao carbono anomérico da glucose. Esses dados indicaram um etilcicloexanoide simétrico glicosilado. Entre as correlações, verificou-se que os carbonos em δ_C 154,6 e 154,7 estão ligados aos hidrogênios em δ_H 7,02 (H-3 e H-5), os quais possuem correlação com os carbonos em δ_C 41,1 (C-7), 69,4 (C-4), 128,1 (C-2 e C-6), 154,7 (C-5) e 188,1 (C-1). Por outro lado, os hidrogênios oximetilênicos em δ_H 3,99 (H-8b) e δ_H 3,64 (H-8a) estão ligados ao carbono em δ_C 65,8 (C-8) e fazem correlação com os carbonos em δ_C 69,4 (C-4), 41,1 (C-7) e 104,4 (C-1'). Analisando-se todas as demais correlações (Tabela 12) e por comparação com a literatura **SW8** foi identificada como cornosídeo, um precursor para a formação da halleridona (JENSEN *et al.*, 2000), já isolado de *Sinningia aggregata* (VERDAN *et al.*, 2015b).

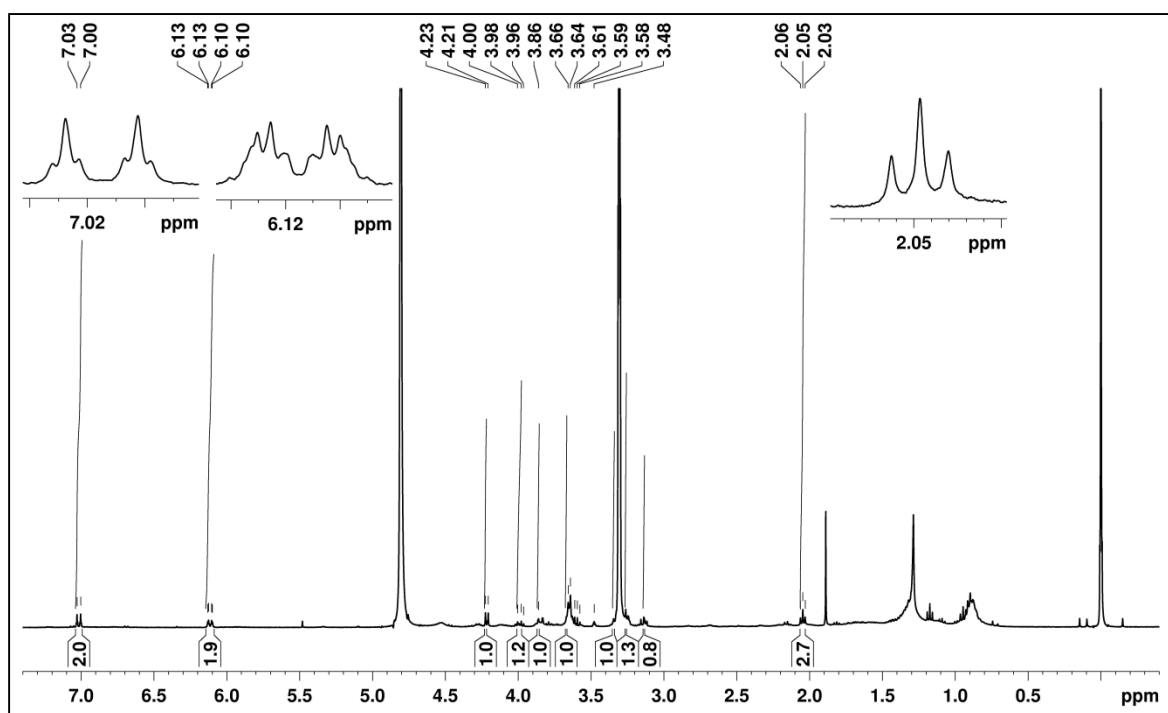
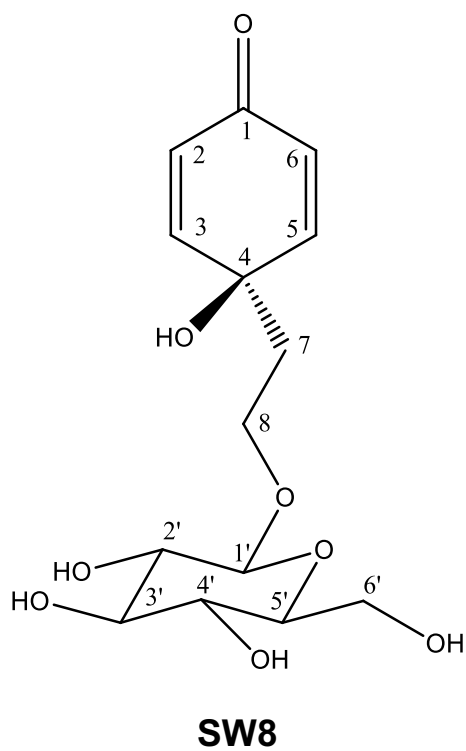


Figura 46. Espectro de RMN de ^1H de **SW8** (MeOH-D₄, 400 MHz).

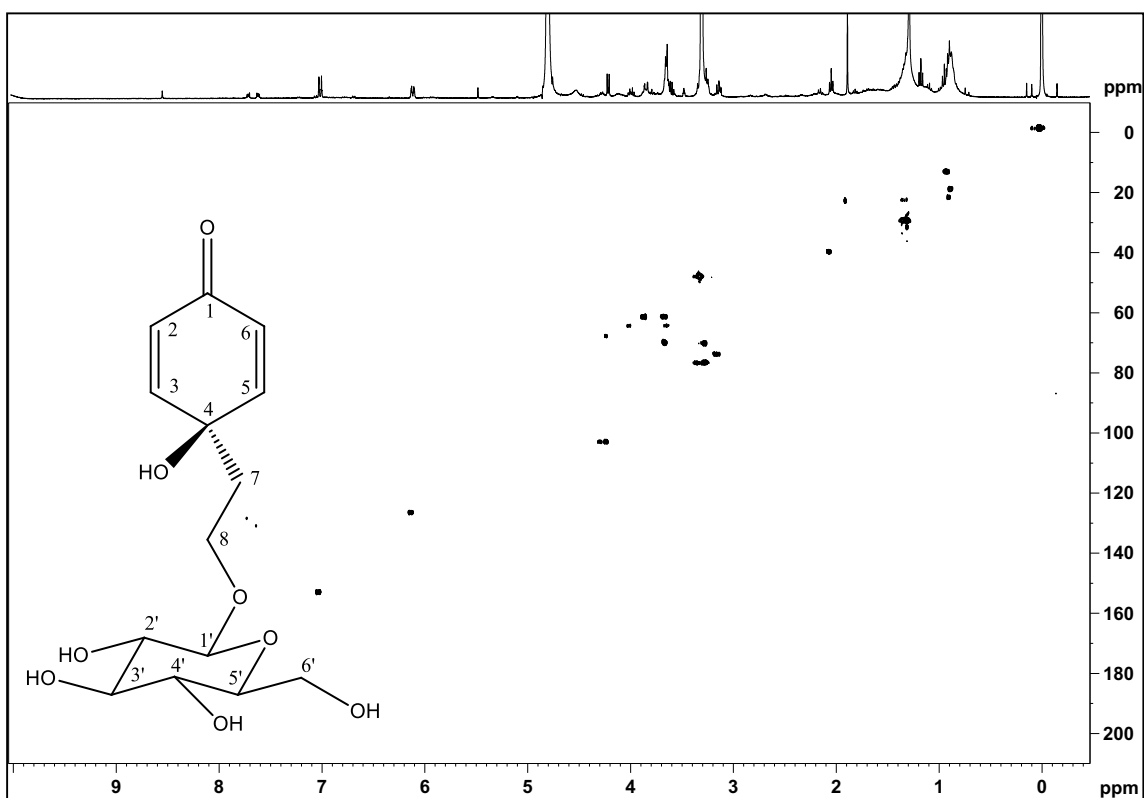


Figura 47. Mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C de SW8 (MeOH-D₄, 400 MHz).

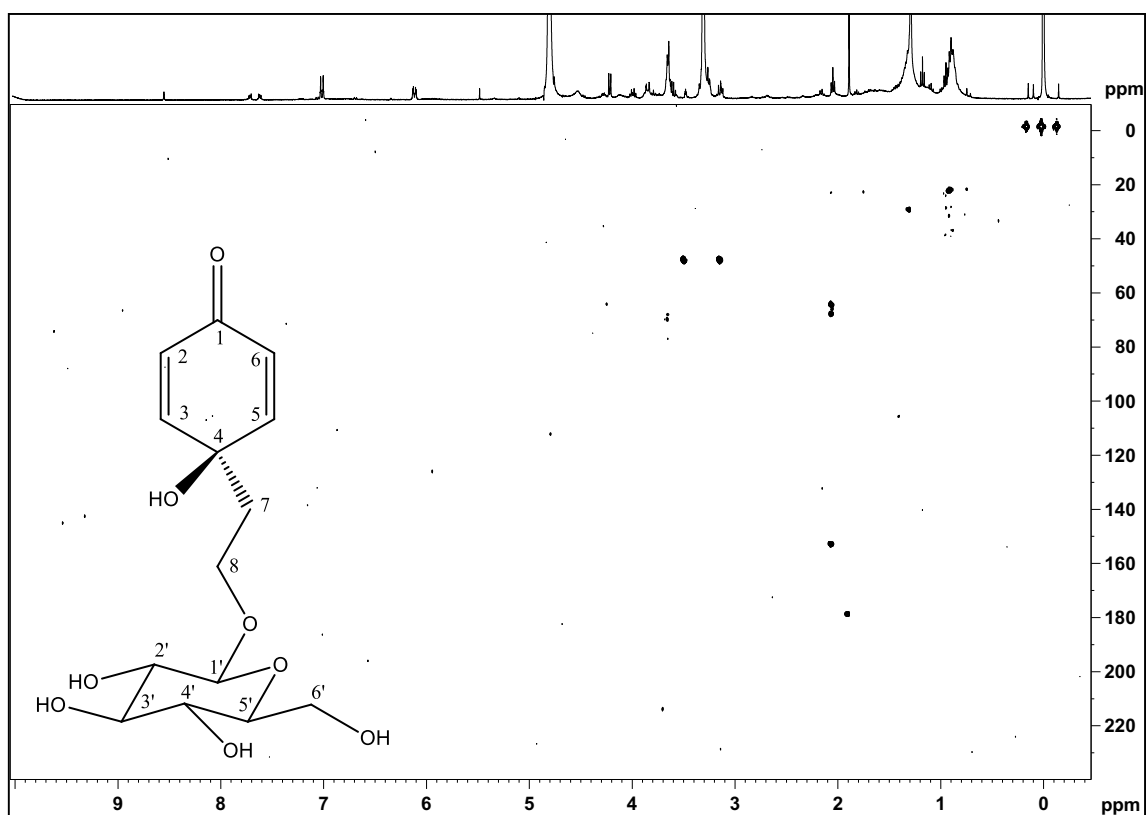


Figura 48. Mapa de correlação a longa distância ^1H - ^{13}C de SW8 (MeOH-D₄, 400 MHz).

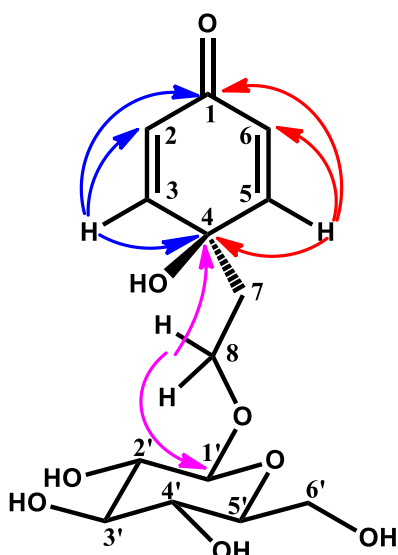


Figura 49. Principais correlações observadas no mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância de **SW8**.

Tabela 12. Dados de RMN de **SW8** (MeOH- D_4 , 400 MHz) e comparação com dados da literatura (D_2O , 250 MHz, JENSEN *et al.*, 2000).

Posição	SW8			Cornosídeo	
	δ_{C}	δ_{H} ; mult. (<i>J</i> em Hz)	$^{\text{LD}}J_{\text{H,C}}$	δ_{C}	δ_{H} ; mult. (<i>J</i> em Hz)
1	188,1	-	-	189,3	-
2 e 6	128,1	6,11 <i>dm</i> (10,1)	-	127,9	6,59 (10,5)
3 e 5	154,6 e 154,7	7,02 <i>dt</i> (10,1; 1,9)	1, 2, 4, 5, 6, 7	154,0	7,44 (10,5)
4	69,4	-	-	69,2	-
7	41,1	2,05 <i>t</i> (6,5)	3, 4, 5, 8	39,3	2,48 <i>t</i> (7,0)
8a	65,8	3,64 <i>m</i>	4, 7, 1'	65,8	-
8b		3,99 <i>dt</i> (10,0; 6,5)	4, 7, 1'		-
1'	104,4	4,22 <i>d</i> (7,7)	8	102,9	4,71 <i>d</i> (7,0)
2'	75,2	3,14 <i>dd</i> (8,7; 7,7)	1', 3'	73,8	-
3'	78,2	3,35 <i>m</i>	-	76,5	-
4'	71,7	3,25 <i>m</i>	-	70,4	-
5'	78,1	3,25 <i>m</i>	-	76,7	-
6'a	62,8	3,66 <i>m</i>	4'	61,5	-
6'b		3,85 <i>m</i>	4'		-

4.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Ensaio de atividade antimicrobiana utilizam de diversos métodos, entre os mais conhecidos estão a difusão em ágar, macro e microdiluição. O método de microdiluição, utiliza de placas de plástico estéreis, com 96 poços de fundo redondo ou cônico, e nelas são adicionados pequenos volumes de caldo contendo o meio de cultura e aos microrganismos. O método é de baixo custo, rápido e com alto rendimento, permitindo determinar a concentração inibitória mínima (CIM) (OSTROSKY *et al.*, 2008).

Considerando o uso de *S. warmingii* no tratamento de doenças infecciosas (CASANA *et al.*, 2012), o extrato etanólico e as frações obtidas por partição foram testadas para atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis* e *C. glabrata*. Todas as amostras se mostraram inativas (CIM > 500 µg mL⁻¹) e por essa razão as substâncias isoladas não foram testadas.

Apesar desse resultado negativo, não pode ser afirmado que a espécie não é útil no tratamento de doenças infecciosas, pois foi avaliado o material proveniente de uma população de *S. warmingii* da região Sul. É possível que as plantas crescendo na Amazônia tenham diferenças na composição química que justifiquem o uso popular.

5. PROPOSTA DE BIOGÊNESE

As naftoquinonas são derivadas da via do chiquimato, tendo como precursor o ácido *O*-succinilbenzóico (OSB) (INOUE *et al.*, 1984). A rota biossintética é iniciada com o ácido chiquímico, que sofre fosforilação com ATP, gerando o ácido trifosfatochiquímico. Este então, pela ação da enzima EPSP sintase, ocorre adição de uma unidade de fosfoenolpiruvato (PEP) e posteriormente uma eliminação-1,2 do ácido fosfórico, resultando no ácido trifosfato-5-enolpiruvilchiquímico (EPSP). A eliminação-1,4 de ácido fosfórico do EPSP, leva a formação do ácido corísmico, que através de um rearranjo dos grupos hidroxila gera o seu isômero, o ácido isocorísmico. O ácido 2-oxoglutárico é descarboxilado na presença de TPP, levando a formação do ânion TPP do semialdeído succínico, que ataca o ácido isocorísmico através de uma reação do tipo Michael. Em seguida ocorre a saída de TPP, gerando o ácido 2-succinil-5-enolpiruvil-6-hidroxi-3-ciclohexen-1-carboxílico (SEPHCHC). Na sequência, ocorre a eliminação do ácido pirúvico e formação do ácido 2-succinil-6-hidroxi-2,4-cicloexadien-1-carboxílico (SHCHC), seguida

de uma desidratação característica de eliminação *syn*, para então formar o OSB. Após, o OSB sofre adição de tioéster coenzima-A, logo depois ocorre uma condensação do Claisen para a formação de um anel, posteriormente uma desidratação seguida de hidrólise do tio éster e enolização para o ácido 1,4-diidroxinaftóico (DEWICK, 2002).

A C-alkilação concomitante a descarboxilação leva ao precursor direto das agregatinas. Na sequência uma oxidação, seguida de uma adição intramolecular, geram um hemiacetal cíclico, que após oxidação leva a formação da hidronaftoquinona **SW2**. O acoplamento de duas unidades de **SW2** leva à formação do composto **SW5**, que por sua vez, com a perda de duas moléculas de água gera o composto **SW4**. A oxidação de **SW2** gera **SW3**, em quanto que, a sua alquilação com o grupo prenila leva a formação da agregatina D.

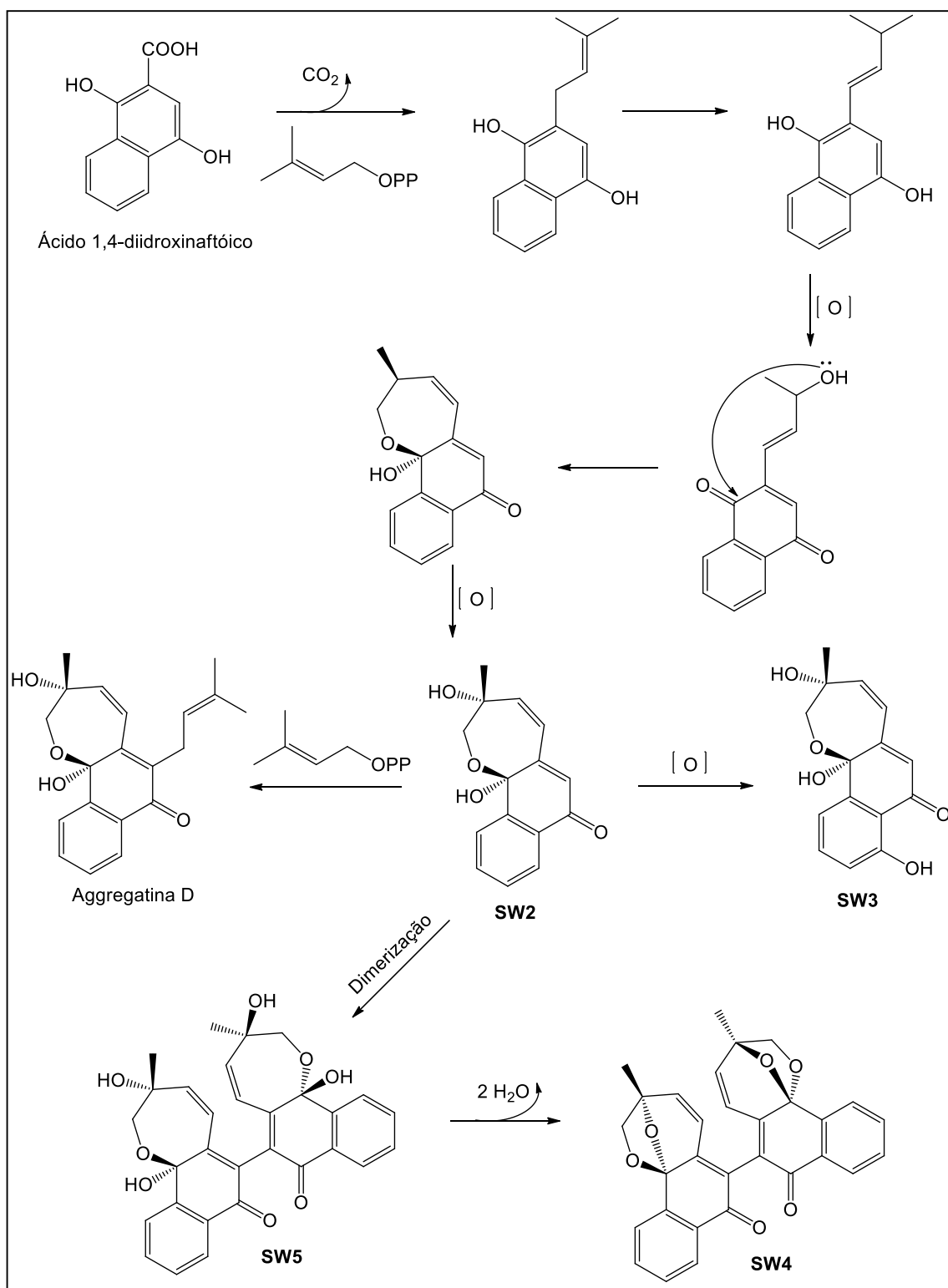


Figura 51. Proposta biogenética para os derivados de naftoquinonas isolados de *S. warmingii*.

6. CONCLUSÃO

Neste estudo de *Sinningia warmingii* foram identificadas duas substâncias inéditas, derivadas de naftoquinonas (warminguiinas A e B), além de seis conhecidas, sendo uma antraquinona (tectoquinona), duas hidronaftoquinonas (agregatinas E e F) e três etilcicloexanoides (halleridona, clerindicina B e cornosídeo). Destas apenas tectoquinona e halleridona já haviam sido reportadas nesta espécie. As substâncias conhecidas já haviam sido isoladas de *S. aggregata* e/ou *S. allagophylla*.

Dentre as substâncias novas, os resultados indicaram que warminguiina A (**SW4**) pode ser um artefato formado pela desidratação de warminguiina B durante o isolamento. Por sua vez, warminguiina B (**SW5**) é estruturalmente formado pelo acoplamento de duas unidades de agregatina E (**SW2**), um hemicetal com um esqueleto carbônico raro. Apenas três compostos deste tipo são conhecidos, tendo sido isolados pela primeira vez de *Sinningia aggregata*. A presença de agregatinas em *S. warmingii* e também em *S. allagophylla* sugere uma proximidade taxonômica entre essas espécies.

Os resultados dos ensaios biológicos de atividade antimicrobiana não se mostraram relevantes em relação ao uso tradicional de *S. warmingii* em doenças infecciosas. Entretanto para afirmar que o uso popular é inválido seria necessário estudar as plantas usadas na Amazônia, pois a composição química de qualquer planta varia ao longo de sua área de dispersão.

7. REFERÊNCIAS

- ARAUJO, A. O.; SOUZA, V. C.; CHAUTEMS, A. Gesneriaceae da Cadeia do Espinhaço de Minas Gerais, Brasil. **Brazilian Journal of Botany**, v. 28, n. 1, p. 109-135, 2005.
- ARAUJO, A.O. & CHAUTEMS, A. ***Sinningia* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, 2015a [Online]. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB7879>>. [Acessado 02/10/2016].
- ARAUJO, A.O. & CHAUTEMS, A. A new species of *Sinningia* (Gesneriaceae) and additional floristic data from Serra dos Carajás, Pará, Brazil. **Phytotaxa**, v. 227, p. 158-166, 2015b.
- ARAUJO, A.O.; CHAUTEMS, A.; FERREIRA, G.E. **Gesneriaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, 2015 [Online]. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB119>> [Acessado 02/10/2016].
- BARBOSA, F. L.; MORI, L. S.; RIVA, D.; STEFANELLO, M. É. A.; ZAMPRONIO, A. R. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the ethanolic extract, fractions and 8-methoxylapachenol from *Sinningia allagophylla* tubers. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 113, p. 1-7, 2013.
- BARROS, M. J. G.; MANSANO, V. F.; CHAUTEMS, A. Comparações florísticas e taxonomia da família Gesneriaceae no Parque Nacional do Itatiaia, Brasil. **Hoehnea**, v.37, n.1, p. 131-145, 2010.
- BELLAKHDAR, J.; TORRE, M. C.; RODRIGUEZ, B.; SAVONA, G.; BRUNO, M.; PIOZZI, F. Halleridone and related products from *Teucrium decipiens*. **Planta Medica**, v. 54, p. 267-267, 1988.
- BOGGAN, J.; SHALIT, P. What is a Gesneriad? **Gesneriads: The Journal for Gesneriad Growers**, v. 56, p. 14-21, 2006.
- BORK, P. M.; SCHMITZ, M. L.; KUHN, M.; ESCHER, C.; HEINRICH, M. Sesquiterpene lactone containing Mexican Indian medicinal plants and pure sesquiterpene lactones as potent inhibitors of transcription factor NF-κB. **FEBS Letters**, v. 402, p. 85-90, 1997.
- BURTT, B. L. Classification above the genus, as exemplified by Gesneriaceae, with parallels from other groups. **Plant Systematics and Evolution**, v.1, p. 97-109, 1977.
- CARBONÓ-DELAHOZ, E.; DIB-DIAZGRANADOS, J. C. Plantas medicinales usadas por

- los cogui en el rio Palomino, Sierra Nevada de Santa Marta (Colombia). **Caldasia**, v. 35, n.2, p.333-350, 2013.
- CASANA, C. F. D.; CRUZ, P. L. B.; TEIXEIRA, B. J.; MEDINA, M. D. P.; EFFIO, P. J. C. Análisis fitoquímico preliminar de la papa madre (*Sinningia warmingii*). **Pueblo Continente**, v. 23, n. 2, p. 345, 2012.
- CEOLIN, T. **Conhecimento sobre plantas medicinais entre agricultores de base ecológica da região Sul do Rio Grande do Sul**. Mestrado, UFPel, 2009.
- CHAUTEMS, A. BARACHO, G.S.; SIQUEIRA FILHO, J.A. A new espécie of *Sinningia* (Gesneriaceae) from northeastern Brasil. **Brittonia**, v. 52, p. 49-53, 2000.
- CHAUTEMS, A. **Flora Fanerogâmica do Estado de S. Paulo** (Ed.). São Paulo: Rima, 2003.
- COSTA-LUTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N. N.; MADEIRA, S. V. F.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O. A contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.
- DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. Chichester, John Wiley & Sons Ltd. 2002.
- FERREIRA, G. E.; WAECHTER, J. L.; CHAUTEMS, A. *Sinningia ramboi* (Gesneriaceae) a new species from South Brazil. **Systematic Botany**, v. 39, p. 975-979, 2014.
- GOMES, M. A. N.; SHEPHERD, S. L. K. Estudo da nutrição mineral *in vitro* relacionado à adaptação de *Sinningia allagophylla* (Martius) Wiehler (Gesneriaceae) às condições do cerrado. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 23, p. 153-159, 2000.
- HARTMANN, T. From waste products to ecochemicals: Fifty yeas research of plant secondary metabolism. **Phytochemistry**, v. 68, p. 2831-2846, 2007.
- INOUE, K.; UEDA, S.; NAYESHIRO, H.; MORITOME, N.; INOUYE, H. Biosynthesis of naphthoquinones and anthraquinones in *Streptocarpus dunnii* cell cultures. **Phytochemistry**, v. 23, n. 2, p. 312-318, 1984.
- JENSEN, S.R. Caffeoil phenylethanoide glycosides in *Sanango racemosum* and in the Gesneriaceae. **Phytochemistry**, v. 28, p. 45-51, 1996.
- JENSEN, S.R. Chemical relationships of *Polypremum procumbens*, *Tetrachondra hamiltonii* and *Peltanthera floribunda*. **Biochemical systematics and ecology**, v. 43, p. 777-783, 2000.

- McCHESNEY, J. D.; VENKATARAMAN, S. K.; HENRI, J. T., Plant natural products: Back to the future or into extinction? **Phytochemistry**, v. 68, p. 2015-2022, 2007.
- MESSANA, I; SPERANDEI, M.; MULTARI, G.; GALEFFI, C.; MARINI BETTOLO, G. B. A. Cyclohexadienone and a Cyclohexenone from *Halleria lúcida*. **Phytochemistry**, v. 23, p. 2617-2619, 1984.
- MORS, W. B.; RIZZINI, C. T.; PEREIRA, N. A. Medicinal Plants of Brazil. **Algonac: Reference Publications**, 2000.
- MOREIRA, R. Y.; ARRUDA, M. S.; ARRUDA, A. C.; SANTOS, L. S.; MÜLLER, A. H.; GUILHON, G. M. S. P.; SANTOS, A. S.; TEREZO, E. Antraquinonas e naftoquinonas do caule de um espécime de reflorestamento de *Tectona grandis* (Verbanaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n.3, p. 392-396, 2006.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; KINGSTON, D. G. I., Natural Products as Pharmaceuticals and Sources for Lead Structures. **Wermuth's- The Practice of Medicinal Chemistry**, v. 8, p. 159-186, 2008.
- OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R.; Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.
- PERRET, M.; CHAUTEMS, A.; DE ARAUJO, A. O.; SALAMIN, N. Temporal and spatial origin of Gesneriaceae in the New World inferred from plastid DNA sequences. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 171, n. 1, p. 61-79, 2013.
- PERRET, M.; CHAUTEMS, A.; SPICHIGER, R.; KITE, G.; SAVOLAINEN, V. Systematics and evolution of tribe Sinningieae (Gesneriaceae): evidence from phylogenetic analyses of six plastid DNA regions and nuclear NCPGS. **American Journal of Botany**, v. 90, p. 445-460, 2003.
- RIVA, D.; BARISON, A.; STEFANELLO, M. E. A.; POLIQUESI, C. B.; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E. C.; SALVADOR, M. J. Estudo químico de *Sinningia allogophylla* guiado por testes de atividade antiproliferativa. **Química Nova**, v. 35, p. 974-977, 2012.
- SALVADOR, M. J.; FERREIRA, E. O.; PRAL, E. M. F.; ALFIERI, S. C.; ALBUQUERQUE, S.; ITO, I. Y.; DIAS, D. A. Bioactivity of crude extracts and some constituents of *Blutaparon portulacoides* (Amaranthaceae). **Phytomedicine**, v. 9, p. 566, 2002.

- SCHARF, D. R. **Identificação de cromenos, naftoquinonas e outros constituintes de *Sinningia allagophylla* (Gesneriaceae) e avaliação de suas atividades citotóxica, anti-inflamatória, analgésica e larvicida.** Doutorado, UFPR, 2014.
- SCHARF, D. R.; VERDAN, M. H.; RIBEIRO, M. A.; SIMIONATTO, E. L.; SÁ, E. L.; SALVADOR, M. J.; BARISON, A.; STEFANELLO, M. E. A. Naphtocromenes and related constituents from the tubers of *Sinningia allagophylla*. **Journal of Natural Products**, v. 79, p. 792-798, 2016.
- SOUZA, G. V.; SIMAS, A. S.; BASTOS-PEREIRA, A. L.; FROIS, G. R. A.; RIBAS, J. L. C.; VERDAN, M. H.; KASSUYA, C. A. L.; STEFANELLO, M. E.; ZAMPRONIO, A. R. Antinociceptive Activity of the Ethanolic Extract, Fractions, and Aggregatin D Isolated from *Sinningia aggregata* Tubers. **PloS ONE**, v. 10, 2015, DOI: 10.1371/journal.pone.0117501.
- STEFANELLO, M.E.A.; CERVI, A.C.; WISNIEWSKI JR, A. Composição do óleo essencial de *Sinningia aggregata*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 331-333, 2005.
- STROHL, W. R., The role of natural products in a modern drug discovery program. **Drug Discovery Today**, v. 5, n. 2, p. 39-41, 2000.
- SWINNY, E.E.; BLOOR, S.J.; WONG, H. ¹H and ¹³C NMR assignments for the 3-deoxyanthocyanins, luteolinidin-5-glucoside and apigeninidin-5-glucoside. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 38, p. 1031-1033, 2000.
- TIAN, J.; ZHAO, Q.-S.; ZHANG, H.-J.; LIN, Z.-W.; SUN, H.-D. New cleroidinins from *Clerodendrum indicum*. **Journal of Natural Products**, v. 60, n. 8, p. 766-769, 1997.
- VAISHNAV, P. & DEMAIN, A. L., Unexpected applications of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 223–229, 2010.
- VERDAN, M.H.; BARISON, A., SÁ, E.L.; SALVADOR, M.J.; POLIQUESI, C.B.; EBERLIN, M.N.; STEFANELLO, M.E.A. Lactones and quinones from the tubers of *Sinningia aggregata*. **Journal of Natural Products**, v. 73, p. 1434-1437, 2010.
- VERDAN, M.H.; CERVI, A.C.; CAMPOS, F.R.; BARISON, A.; STEFANELLO, M.E.A. Anthraquinones and ethilciclohexane derivatives from *Sinningia speciosa* “Fyfiana”. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 37, p. 49-47, 2009.
- VERDAN, M. H.; ERENFRIED, C. A.; SCHARF, D. R.; CERVI, A. C.; SALVADOR, M. J.; BARISON, A.; STEFANELLO, M. E. A. Chemical constituents from *Sinningia canescens* and *S. warmingii*. **Natural Products Communications**, v. 9, p. 1535-1537, 2014.

- VERDAN, M. H.; KOOLEN, H. H. F.; SALVADOR, M. J.; BARISON, A.; STEFANELLO, M. E. A. A new naphthoquinone from *Sinningia leucotricha* (Gesneriaceae). **Natural Product Communications**, v. 10, n. 4, p. 625-626, 2015a.
- VERDAN, M.H.; STEFANELLO, M.E.A. Secondary metabolites and biological properties of Gesneriaceae species. **Chemistry & Biodiversity**, v. 9, n. 12, p. 2701-2731, 2012.
- VERDAN, M. H.; SOUZA, L. M.; CARVALHO, J. E.; COSTA, D. B. V.; SALVADOR, M. J.; BARISON, A.; STEFANELLO, M. E. A. Two new hydronaphthoquinones from *Sinningia aggregata* (Gesneriaceae) and cytotoxic activity of aggregatin D. **Chemistry & Biodiversity**, v. 12, p. 148-152, 2015b.
- VERDAN, M. H.; UNEMOTO, L. K.; FARIA, R. T.; SALVADOR, M. J.; SÁ, E. L.; BARISON, A.; STEFANELLO, M. E. A. Leucotrichoic acid, a novel sesquiterpene from *Sinningia leucotricha* (Gesneriaceae). **Tetrahedron Letters**, v. 54, p. 4735-4737, 2013.
- WIEHLER, H. Medicinal Gesneriads. 122 species of the Rain Forest plant family Gesneriaceae used medicinally in the neotropics. **Gesneriana**, v. 1, p. 98-120, 1995.
- WINEFIELD, C.S.; LEWIS, D.H.; SWINNY, E.E.; ZHANG, H.; ARATHOON, H.S.; FISCHER, T.C.; HALBWIRTH, H.; STICH, K.; GOSCH, C.; FORKMANN, G.; DAVIES, K.M. Investigation of the biosynthesis of 3-deoxyanthocianins on *Sinningia cardinalis*. **Physiologia Plantarum**, v. 124, p. 419-430, 2005.
- ZAITLIN, D. Intraspecific diversity in *Sinningia speciosa* (Gesneriaceae: Sinningieae) and possible origins of the cultivated florist's gloxinia. **AoB Plants**, pls039, 2012, DOI: 10.1093/aobpla/pls039.