

Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Química de Araraquara

Compostos fenólicos de
Paepalanthus geniculatus
(Eriocaulaceae).

Fabiano Pereira do Amaral

Araraquara
2012

Fabiano Pereira do Amaral

Compostos fenólicos de
Paepalanthus geniculatus
(Eriocaulaceae).

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como requisito
para obtenção do título de Doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. Wagner Vilegas

Araraquara
2012

FICHA CATALOGRÁFICA

A485c Amaral, Fabiano Pereira do
 Compostos fenólicos de *Paepalanthus geniculatus*
(Eriocaulaceae) / Fabiano Pereira do Amaral. – Araraquara :
[s.n], 2012
 128 f. : il.

 Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
 Orientador: Wagner Vilegas

 1. Produtos naturais. 2. Espectrometria.

 3. Eriocaulaceae. 4. Ressonância magnética nuclear.


I. Título.

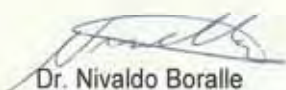
FABIANO PEREIRA DO AMARAL

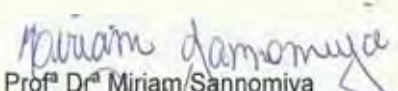
Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Química.

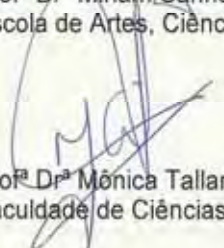
Araraquara, 18 de junho de 2012.

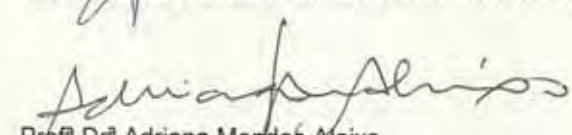
BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Wagner Villegas (Orientador)
Campus do Litoral Paulista – UNESP, São Vicente


Dr. Nivaldo Boralle
Instituto de Química – UNESP, Araraquara


Profª Drª Miriam Sannomiya
Escola de Artes, Ciências e Humanidade – USP, São Paulo


Profª Drª Mônica Tallarico Pupo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, Ribeirão Preto


Profª Drª Adriana Mendes Aleixo
Universidade Metodista de Piracicaba - UNIMEP, Santa Bárbara D'Oeste

SÚMULA CURRICULAR

1. Dados pessoais

Nome: Fabiano Pereira do Amaral

Filiação: Jarbas do Amaral e Maria de Lourdes Pereira do Amaral

Naturalidade: Botucatu SP

E-mail: amaralunesp@gmail.com

2. Formação acadêmica

Graduação

Instituição: Universidade Metodista de Piracicaba – UNIMEP-

Local: Piracicaba SP.

Curso: Ciências com Habilitação em Química.

Período: 2001 – 2004.

Pós-graduação:

Mestrado

Instituição: Universidade Paulista “Julio de Mesquita Filho”, UNESP, Faculdade de Ciências Agrônômicas. Mestre em Agronomia – Área de concentração: Energia na Agricultura.

Título da dissertação: Estudo das características físico-químicas dos óleos da amêndoa e polpa da macaúba [*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart]

Orientador: Prof. Dr. Fernando Broetto

Bolsista: CAPES (período 08/2006 – 12/2007)

Local: Botucatu SP

Período: 03/2006 – 12/2007

Doutorado

Instituição: Universidade Paulista “Julio de Mesquita Filho”, UNESP, Instituto de Química.

Título da tese: Isolamento e elucidação estrutural de fenólicos da *Paepalanthus geniculatus* (Eriocaulaceae).

Orientador: Prof. Dr. Wagner Vilegas

Bolsista: CNPq (período 08/2009 – 09/2010)

Bolsista: CAPES (período 10/2010 – 04/2011)

Bolsista: CNPq (período 04/2011 – 03/2012)

Local: Araraquara SP

Período: 03/2009 – 03/2012

3. Estágio no exterior

1. Estágio de aperfeiçoamento em Fitoquímica.

Local: Dipartimento di Scienze Farmaceutiche - Università degli studi di Salerno, Itália.

Período: 01/2010 – 03/2010

4. Doutorado sanduíche

Local: Dipartimento di Scienze Farmaceutiche - Università degli studi di Salerno, Itália.

Bolsista: Doutorado sanduíche – Capes/PDEE

Período: 10/2010 – 04/2011

5. Atuação profissional

5.1. Responsável pela disciplina de Corrosão, curso de técnico em química, Colégio Maria Vitória, Botucatu SP, 01/2005 – 07/2006.

5.2. Responsável pela disciplina de Química do meio ambiente, curso de técnico em química, Colégio Maria Vitória, Botucatu SP, 07/2007 – 12/2008.

6. Publicações

6.1. PEREIRA DO AMARAL, FABIANO; NAPOLITANO, ASSUNTA; MASULLO, MILENA; CAMPANER DOS SANTOS, LOURDES, FESTA, MICHELA; VILEGAS, WAGNER; PIZZA, COSIMO; PIACENTE, SONIA. HPLC-ESI-MSn profiling, isolation, structural elucidation and evaluation of the anti-oxidant potential of phenolics from *Paepalanthus geniculatus*. **Journal of Natural Products**, v.75, p. 547-556, 2012.

6.2. AMARAL, F. P.; BROETTO, F.; BATISTELA, C. B.; JORGE, S. M. A. Obtenção do óleo da polpa da macaúba (*Acrocomia aculeata*) utilizando soxhlet e hexano como solvente. **Energia na agricultura**, v. 26, n. 1, 2011.

7. Trabalhos de Conclusão de Curso de graduação

7.1. AMARAL, F. P.; Severi, J.. Participação em banca de Genildo Sirineu Tomé. Extração de Metabolitos secundários de fontes vegetais. 2009. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Técnico em Química) - EM Adelino Bordignon.

7.2. AMARAL, F. P.; SEVERI, J.. Participação em banca de Sandra de Oliveira Conde. Análise de Queijos. 2009. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Técnico em Química) - EM Adelino Bordignon.

7.3. AMARAL, F. P.; SEVERI, J.. Participação em banca de Matheus dos Santos Alves. Tintas Emulsionadas. 2009. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Técnico em Química) - EM Adelino Bordignon.

7.4. AMARAL, F. P.; SEVERI, J.. Participação em banca de Émerson Gálio. Análise de Tintas. 2009. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Técnico em Química) - EM Adelino Bordignon.

7.5. AMARAL, F. P.. Participação em banca de UNIMEP. I Seminário de socialização de projetos de estágio supervisionado. 2007. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química-Licenciatura) - Universidade Metodista de Piracicaba.

8. Supervisão científica

8.1. MARCELO RODRIGUES AMORIN. Estudo químico da planta da família Eriocaulaceae – *Tonina fluviatilis*. 2011. Bolsista de Iniciação Científica Fapesp.

8.2. VIVIANI REGINA ROSSI. Taninos totais em *Byrsonima intermédia*. 2008. **Monografia**.

8.3. Carlos Roberto Soares Junior. Estudo farmacognóstico e avaliação da atividade antimicrobiana de *Melampodium divaricatum* (Rich.in pers.) dc. Asteraceae. **Monografia**, 2010.

9. Trabalhos apresentados em congressos

Foram 2 trabalhos internacionais e 5 nacionais na forma de pôsteres.

“Para alcançarmos o sucesso, primeiramente temos que aprender a perder e a fracassar e para realizar grandes conquistas, devemos não apenas agir, mas também sonhar, não apenas planejar, mas também acreditar.” Anatole France

Dedico este meu sonho realizado aos meus pais, Jarbas do Amaral e Maria de Lourdes Pereira, e aos meus irmãos Amauri Amaral e Silmara Amaral, pelo apoio, incentivo, paciência, companheirismo, carinho, orações e sobretudo, pelo Amor que desde meu primeiro dia de aula fizeram até o impossível para que esta data se tornasse realidade!

Primeiramente vou agradecer a todas as coisas ruins que aconteceram na minha vida, estranho agradecer a fatos ruins? Não pelo menos para mim, pois serviram para dar um empurrão fazendo eu re-pensar e re-avaliar muito a minha vida. Hoje eu festejo e agradeço cada minuto, cada pessoa, cada gesto e cada amizade.

Hoje eu não diria que estou no final de um ciclo, eu diria que estou iniciando um novo ciclo de vida. Durante estes anos inúmeras pessoas contribuíram de forma direta ou indireta para meu crescimento como pessoa e cientista. Seria difícil relacionar a todos aqui, mas fica meu agradecimento, e acima de tudo pela amizade a mim dedicada.

Ao Prof. Dr. Wagner Vilegas, pela oportunidade, confiança, apoio, incentivo e discussões sobre esse trabalho de Tese. Quero que saiba que eu nunca tive tanto medo em minha vida de conversar ou perguntar algo para alguém como a você. Todas as vezes que eu saía da sua sala eu tremia e gaguejava talvez um bloqueio ou respeito por ser um supra-sumo da química de produtos naturais. Não sou o melhor e muito menos exemplo, mas eu me esforcei e peço desculpas por minhas limitações.

A Profa. Dr. Lourdes Campaner dos Santos, pelos ensinamentos, discussões dos experimentos de RMNs e Massas e a primeira viagem à Itália a qual aprendi muito.

Aos Professores Cozimo Pizza e Sônia Piacente da Università degli Studi di Salerno – Itália, por me aceitarem como aluno, pelos meses que puderam me orientar e pelas infinitas discussões. A Milena e Suzy responsáveis pelos experimentos de RMNs e pelos Massas eu sei o quanto são importantes.

Ao meu Pai, responsável pelo meu crescimento e amadurecimento como filho e profissional. Agradeço pelas conversas, conselhos e por muitas vezes dividir suas experiências de vida, que certamente me ajudaram a crescer como pessoa.

A minha Mãe pelas infinitas vezes que me deitei em seu colo e chorei aflito por algum motivo. Este momento de intimidade eu jamais esquecerei o quão foi importante para minha vida e por seu amor incondicional que me fez sentir forte e feliz.

A minha irmã sempre levarei como sua fala: “Se ainda não deu certo é porque ainda não chegou a hora e ao final”. Guardarei comigo o quanto você fez para ajudar eu estar aqui. Agradeço a sua compreensão e acreditar em mim, mais do que eu mesmo. A meu irmão que sempre está desligado a tudo, pelo seu humor, pela alegria e paz que transmite a todos e o admiro muito. Sempre digo a todos “Meu irmão é da paz”. A um irmão que ganhei com os passares destes anos meu de doutorado o qual se tornou algo importante na minha vida, de baladas, de risadas, de discutirmos futilidades de nossas vidas mesmo, de viagens e por perceber quando eu desanimava me incentivando a não desistir. Eu admiro sua Humildade como pessoa, a você Wagner sempre estarei ao seu lado.

A amiga Lourdes Campaner, pelos nossos picos altos e baixos de humor, mas sempre existindo um grande amor e respeito entre nós. Aprendi muito com suas lições de vida e jamais esquecerei quando fui com você para o Hospital do Câncer de Barretos, me sentei ao seu lado e você me contou sobre

sua vida e me disse “Fabiano todas as pessoas deveriam passar pelo menos 10 minutos da vida ai sentado onde você esta para aprender a dar valor na vida”. Eu aprendi viu marida.

A minha família de laboratório que passamos pelo menos 8h diárias juntos, brigamos, discutimos, brincamos, rimos muito, choramos bastante, eu quem diga se a salinha do CG registrasse gotas de lágrimas teríamos muitos picos cromatográficos depositado naquela biblioteca. Aos amigos da PG “antigos” Juliana Severe, Juliana Rodrigues, Viviane, Clenilson, Mariana, Marcelo Silva e Daniel Rinaldo que falava: “se não nos ajudarmos este barco afunda”, obrigado pelas discussões e ensinamentos. Aos “novos” Leonardo, Marcelo Tangerina, Lima Neto, Aline, Fabiana, Silvia, Raissa, Cláudia e Maria do Socorro, agradeço aos sorrisos encontrados nas ruas ou no laboratório ou nas baladas, aos dias de sol e chuva, à presença aos almoços do “bandejão” e a máfia da fitoquímica as 16h na cantina. Não posso esquecer também das inúmeras vezes que fugimos pela porta do fundo do laboratório para não passarmos na frente as sala do Prof. Wagner, fatos marcados na minha vida.

As minhas amigas e irmãs que adquiri durante 1 ano de laboratório, M. Socorro e Cláudia, sem vocês eu nada seria e não saberia o valor da verdadeira amizade. “Um dia vamos nós rir muito de tudo isso. Ao meu grande amigo Marcelo Tangerina, você é meu amigo sim, é importante e eu sei disso, deixo a você meu “abraço”.

Aos meus amigos da Università di Salerno, Treresa Perrota, Anna Morrone, Emilia, Suzy, Milena, Alexandro, Maria Luiza e Angela Mary jamais esquecerei cada rostinho seus.

Aos meus colegas da Tanatus, Erico, Eugenio, Flavia, Lidiane, Rinson e pela amizade e aos Drs. Oysenil e Progresso que sempre falavam: Vai estudar, você só será gente quando terminar o doutorado.

Ao Dr. Nivaldo do RMN – Santista pelas discussões dos espectros de RMN e a grande amizade que construímos nestes 4 anos.

As meninas das seções de pós graduação, Wenia, Patricia (*in memoriam*), Sandra, Célia (span); da diretoria Shirley (Inezita Barroso) e Cintia (sogra); secretaria departamento Angela pela amizade, carinho, paciência e acima de tudo respeito com os alunos. (Apelidos meus que elas adquiriram durante o tempo).

Aqui a duas pessoas especiais na minha vida, Osmir Ribeiro e Marli Ribeiro (*in memoriam*), diria que vocês são os precursores por eu estar aqui, sempre me incentivando e apoiando e acima de tudo preocupados com a minha vida profissional, familiar e sentimental. Marla, onde estiver sempre sentirei o seu abraço e você dizendo “*Parabéns Fabis*”.

À Deus que sempre estará ao meu lado, a minha frente e guiando meus caminhos.

A Fapesp, Capes, CNPq pelo apoio financeiro.

“Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, pois o futuro pertence a quem se atreve... e a vida é muito curta para ser insignificante” Charles Chaplin

RESUMO

No Brasil, 31 espécies vegetais de *Paepalanthus* foram registradas no Estado de Minas Gerais, no topo da Serra do Espinhaço, o principal centro de diversidade de Eriocaulaceae do Brasil e mais de 400 espécies de *Paepalanthus* e estão distribuídas geograficamente do estado do Amazonas a São Paulo. Apesar do grande número de espécies existentes em Eriocaulaceae, a sua peculiar composição química, aliadas às importantes atividades biológicas das substâncias isoladas, existem ainda muitas espécies que não possuem estudos, como no caso de *Paepalanthus geniculatus*. Portanto, neste trabalho, o extrato metanólico dos capítulos de *Paepalanthus geniculatus* (Bong.) Kunth foi estudado, utilizando HPLC-ESI-MSⁿ. As substâncias foram posteriormente isoladas do extrato metanólico e identificadas por RMN mono e bi-dimensionais. Com estas técnicas analíticas, foi possível identificar a presença de dezenove substâncias fenólicas, destas onze inéditas, sendo quinze flavonóides e quatro naftopiranos que auxiliará na taxonomia da família. Um flavonol glicosilado ciclodimérico ligado a uma unidade truxilato, também inédito foi isolado e identificado por métodos espectroscópicos e espectrométricos. Alguns flavonóides exibiram forte atividade antioxidante e nenhuma das substâncias apresentou efeito citotóxico significativo em células humanas cancerosas de próstata.

ABSTRACT

In Brazil, 31 plant species of *Paepalanthus* were registered in the State of Minas Gerais, at the top of the Espinhaço, the main center of diversity of Eriocaulaceae in Brazil and over 400 *Paepalanthus* are distributed geographically from the state of Amazonas to São Paulo. Despite the large number of species existing in Eriocaulaceae, its peculiar chemical composition, which has greatly aided in the taxonomy of the family, combined with the biological activities of isolated substances, there are still many species that have no studies, as in the case of *Paepalanthus geniculatus*. Therefore, in this work the methanol extract of the capitulae from *Paepalanthus geniculatus* (Bong.) Kunth were studied. An analytical approach based on HPLC-ESI-MSⁿ was applied to obtain the metabolite profile of this extract and led to the rapid identification of nineteen polyphenolic compounds, eleven unpublished, comprising fifteen flavonoids and four naphthopyranones. The substances were then isolated and identified by NMR mono and bidimensional. A glycosylated cyclodimeric flavonol bonded to a truxilate unit, also unpublished, was isolated and identified by spectroscopic and spectrometric methods. Some flavonoids showed strong antioxidant activity and none of the substances showed significant cytotoxic effect in human prostate cancer cells.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
τ	Tesla
δ	Deslocamento químico
$[\alpha]_D$	Desvio do plano da luz polarizada
μg	Micrograma
μm	Micron
CCDC	Cromatografia em camada delgada comparativa
CD_3OD	Metanol tetradeuterado
CG	Cromatografia Gasosa
COSY	COrrrelation Spectroscopy
<i>d</i>	Dupleto
<i>dd</i>	duplo dupleto
Da.	Dalton
DCF	Fluorescência da diclorofluoresceína
DCFH-DA	2,7'- diacetato de diclorodihidrofluoresceína
ESI	Ionização por <i>electrospray</i>
FIA	Injeção por fluxo contínuo
g	Gramas
GPC	Cromatografia de permeação em gel
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HPLC	High-performance liquid chromatography
ESI-MS ⁿ	Espectrometria de Massas - Ionização por Electrospray
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence
i.d.	diâmetro interno
IT	<i>ion trap</i>
<i>J</i>	Constante de acoplamento
kV	Kilovolts
<i>m</i>	Multiplete
<i>m/z</i>	relação massa/carga
mg	Miligramas
MHz	Megahertz
mm	Milímetro
mM	Milimolar
ssp	Espécies
PC3	Células humanas cancerígenas de próstata
RMN	Ressonância magnética nuclear
ROESY	Rotating-frame overhauser Spectroscopy
ROS	Espécies reativas a oxigênio
RP18	Fase reversa octadecilsilano
s	Singleto
t	Triplete
t-BuOOH	terc-butanol
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
TOCSY	Total correlation spectroscopy
t_r	tempo de retenção
UV	Ultravioleta
μL	Microlitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Distribuição geográfica de Eriocaulaceae.	19
Figura 2.	<i>Paepalantus spp.</i>	20
Figura 3.	Fluxograma do preparo do extrato dos capítulos de <i>Paepalanthus geniculatus</i> .	37
Figura 4.	Perfil por HPLC-MS do extrato metanólico dos capítulos de <i>Paepalanthus geniculatus</i> .	40
Figura 5.	Substâncias identificadas no extrato metanólico dos capítulos de <i>Paepalanthus geniculatus</i> .	41
Figura 6.	Estrutura da Substância 1C .	47
Figura 7.	Estrutura da Substância 4C .	48
Figura 8.	Estrutura da Substância 2C .	49
Figura 9.	Estrutura da Substância 5C .	51
Figura 10.	Estrutura da Substância 7C .	52
Figura 11.	Estrutura da Substância 13C .	53
Figura 12.	Estrutura da Substância 8C .	54
Figura 13.	Estrutura da Substância 3C .	55
Figura 14.	Estrutura da Substância 6C .	56
Figura 15.	Estrutura da Substância 9C .	57
Figura 16.	Estrutura da Substância 11C .	58
Figura 17.	Estrutura da Substância 17C .	59
Figura 18 -	Estrutura da Substância 19C .	60
Figura 19.	Estrutura da Substância 18C .	61
Figura 20.	Estrutura da Substância 14C .	63
Figura 21.	Estrutura da Substância 15C .	64
Figura 22.	Estrutura da Substância 10C .	65
Figura 23.	Padrão de fragmentação da substância 10C .	66
Figura 24.	Estrutura da substância 16C .	67
Figura 25.	Correlações do experimento HMB referente ao anel ciclobutânico (12C): (A) parte truxilato e da (B) parte truxinato.	70
Figura 26.	Estrutura da Substância 12C .	70
Figura 27.	Produção de ROS analisado pela intensidade da fluorescência de DCFH-DA por fluxo de análise citométrica (A). Média dos valores de intensidade de fluorescência, resultados estão expressos como valores médios de experimentos representativos realizados em triplicatas (n = 3, P < 0,001 x células tratadas com t-BuOOH) (B).	73
Figura 28.	Espectro de RMN de ¹ H da substância 1C (14,2 τ, CD ₃ OD).	92
Figura 29.	Espectro de HSQC da substância 1C – expansão nas regiões de 1,0 a 8,0 e 10,0 a 130 (CD ₃ OD).	92
Figura 30.	Espectro HMBC da substância 1C – expansão nas regiões de 1,0 a 8,0 e 10,0 a 165 (CD ₃ OD).	93
Figura 31.	Espectro de COSY da substância 1C - expansão nas regiões de 0,5 a 8,0 e 0,0 a 8,0 (CD ₃ OD).	93
Figura 32.	Espectros de HPLC-ESI-MS ⁿ (modo negativo) registrados para o íon [MH] ⁻ de m/z 639,4 e precursores da substância 1C .	94
Figura 33.	Espectro de RMN de ¹ H da substância 5C (14,2 τ, CD ₃ OD).	95
Figura 34.	Espectro de HSQC da substância 5C – expansão nas regiões de 1,0 a 8,0 e 10,0 a 140 (CD ₃ OD).	95

Figura 35.	Espectro de HMBC da substância 5C – expansão nas regiões de 1,0 a 8,5 e 10,0 a 165,0 (CD ₃ OD).	96
Figura 36.	Espectro de COSY da substância 5C – expansão nas regiões de 1,0 a 8,5 e 1,0 a 8,5 (CD ₃ OD).	96
Figura 37.	Espectros de HPLC-ESI-MS ⁿ (modo negativo) registrados para o íon [MH] ⁻ de <i>m/z</i> 681,2 e precursores da substância 5C .	97
Figura 38.	Espectro de RMN de ¹ H da substância 7C (14,2 τ, CD ₃ OD).	99
Figura 39.	Espectro de HSQC da substância 7C – expansão nas regiões de 0,5 a 8,0 e 10,0 a 130,0 (CD ₃ OD).	99
Figura 40.	Espectro de HMBC da substância 7C – expansão nas regiões de 0,5 a 8,0 e 5,0 a 180,0 (CD ₃ OD).	100
Figura 41.	Espectro de COSY da substância 7C – expansão nas regiões de 0,5 a 8,0 e 0,5 a 8,0 (CD ₃ OD).	100
Figura 42.	Espectros de HPLC-ESI-MS ⁿ (modo negativo) registrados para o íon [MH] ⁻ de <i>m/z</i> 681,2 e precursores da substância 7C .	101
Figura 43.	Espectro de RMN de ¹ H da substância 9C (14,2 τ, CD ₃ OD).	102
Figura 44.	Espectro de HSQC da substância 9C – expansão nas regiões de 1,0 a 8,0 e 10,0 a 140,0 (CD ₃ OD).	102
Figura 45.	Espectro de HMBC da substância 9C – expansão nas regiões de 1,0 a 8,0 e 10,0 a 145,0 (CD ₃ OD).	103
Figura 46.	Espectro de COSY da substância 9C – expansão nas regiões de 1,0 a 8,5 e 1,0 a 8,5 (CD ₃ OD).	103
Figura 47.	Espectros de HPLC-ESI-MS ⁿ (modo negativo) registrados para o íon [MH] ⁻ de <i>m/z</i> 665,2 e precursores da substância 9C .	104
Figura 48.	Espectro de RMN de ¹ H da substância 10C (14,2 τ, CD ₃ OD).	105
Figura 49.	Espectro de HSQC da substância 10C – expansão nas regiões de 2,0 a 8,0 e 10,0 a 120,0 (CD ₃ OD).	105
Figura 50.	Espectro de HMBC da substância 10C – expansão nas regiões de 2,0 a 7,5 e 10 a 180,0 (CD ₃ OD).	106
Figura 51.	Espectro de COSY da substância 10C – expansão nas regiões de 2,0 a 7,5 e 2,0 a 7,5 (CD ₃ OD).	106
Figura 52.	Espectros de HPLC-ESI-MS ⁿ (modo negativo) registrados para o íon [MH] ⁻ de <i>m/z</i> 611,2 e precursores da substância 10C .	107
Figura 53.	Espectro de RMN de ¹ H da substância 11C (14,2 τ, CD ₃ OD).	109
Figura 54.	Espectro de HSQC da substância 11C – expansão nas regiões de 0,5 a 8,5 e 10 a 140 (CD ₃ OD).	109
Figura 55.	Espectro de HMBC da substância 11C – expansão nas regiões de 1,0 a 8,5 e 10,0 a 185,0 (CD ₃ OD).	110
Figura 56.	Espectros de HPLC-ESI-MS ⁿ (modo negativo) registrados para o íon [MH] ⁻ de <i>m/z</i> 665,3 e precursores da substância 11C .	111
Figura 57.	Espectro de RMN de ¹ H da substância 12C (14,2 τ, CD ₃ OD).	112
Figura 58.	Espectro de HSQC da substância 12C – expansão nas regiões de 2,0 a 8,5 e 35,0 a 140,0 (CD ₃ OD).	112
Figura 59.	Espectro de HMBC da substância 12C – expansão nas regiões de 2,5 a 8,5 e 35,0 a 185,0 (CD ₃ OD).	113
Figura 60.	Espectro de COSY da substância 12C – expansão nas regiões de 2,0 a 8,5 e 2,5 a 8,5 (CD ₃ OD).	113
Figura 61.	Espectro de ROESY da substância 12C – expansão nas regiões de 2,0 a 8,5 e 2,5 a 8,5 (CD ₃ OD).	114

Figura 62.	Espectros de HPLC-ESI-MS ⁿ (modo negativo) registrados para o íon [MH] ⁻ de <i>m/z</i> 1247,4 e precursores da substância 12C .	115
Figura 63.	Espectro de HSQC da substância 13C – expansão nas regiões de 0,5 a 8,0 e 10,0 a 130,0 (CD ₃ OD).	117
Figura 64.	Espectro de HMBC da substância 13C – expansão nas regiões de 1,0 a 8,5 e 10,0 a 180 (CD ₃ OD).	117
Figura 65.	Espectro de COSY da substância 13C – expansão nas regiões de 0,5 a 8,0 e 0,5 a 8,0 (CD ₃ OD).	118
Figura 66.	Espectros de HPLC-ESI-MS ⁿ (modo negativo) registrados para o íon [MH] ⁻ de <i>m/z</i> 681,2 e precursores da substância 13C .	119
Figura 67.	Espectro de RMN de ¹ H da substância 16C (14,2 τ, CD ₃ OD).	120
Figura 68.	Espectro de HSQC da substância 16C – expansão nas regiões de 2,0 a 8,0 e 10,0 a 120,0 (CD ₃ OD).	120
Figura 69.	Espectro de HMBC da substância 16C – expansão nas regiões de 2,0 a 7,5 e 10 a 180,0 (CD ₃ OD).	121
Figura 70.	Espectros de HPLC-ESI-MS ⁿ (modo negativo) registrados para o íon [MH] ⁻ de <i>m/z</i> 681,2 e precursores da substância 16C .	122
Figura 71.	Espectro de RMN de ¹ H da substância 17C (14,2 τ, CD ₃ OD).	123
Figura 72.	Espectro de HSQC da substância 17C – expansão nas regiões de 2,0 a 8,0 e 10, a 140,0 (CD ₃ OD).	123
Figura 73.	Espectro de HMBC da substância 17C – expansão nas regiões de 1,0 a 8,0 e 10,0 a 140,0 (CD ₃ OD).	124
Figura 74.	Espectro de COSY da substância 17C – expansão nas regiões de 1,0 a 8,0 e 1,0 a 8,0 (CD ₃ OD).	124
Figura 75.	Espectros de HPLC-ESI-MS ⁿ (modo negativo) registrados para o íon [MH] ⁻ de <i>m/z</i> 681,2 e precursores da substância 17C .	125
Figura 76.	Espectro de RMN de ¹ H da substância 19C (14,2 τ, CD ₃ OD).	126
Figura 77.	Espectro de HSQC da substância 19C – expansão nas regiões de 2,0 a 8,2 e 30,0 a 150,0 (CD ₃ OD).	126
Figura 78.	Espectro de COSY da substância 19C – expansão nas regiões de 3,0 a 8,2 e 3,0 a 8,2 (CD ₃ OD).	127
Figura 79.	Espectros de HPLC-ESI-MS ⁿ (modo negativo) registrados para o íon [MH] ⁻ de <i>m/z</i> 681,2 e precursores da substância 19C .	128

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Gêneros pertencentes à família Eriocaulaceae segundo a proposta de Ruhland (1903).	20
Tabela 2.	Panorama químico do gênero <i>Paepalanthus</i> pertencente à família Eriocaulaceae.	24
Tabela 3.	Substâncias isoladas do gênero <i>Paepalanthus</i> Eriocaulaceae.	25
Tabela 4.	Massas (g) e rendimentos (%) obtidos dos extratos dos capítulos de <i>Paepalanthus geniculatus</i> .	36
Tabela 5.	Gradiente de eluição cromatográfico empregado nas frações 54-57 (304 mg) e 64-68 (117 mg) dos capítulos da <i>Paepalanthus geniculatus</i> .	37
Tabela 6.	Gradiente de eluição cromatográfico empregado no extrato do capítulo da <i>Paepalanthus geniculatus</i> .	38
Tabela 7.	Atividade antioxidante das substâncias 1C-19C do extrato metanólico dos capítulos da <i>Paepalanthus geniculatus</i> do ensaio TEAC.	72
Tabela 8.	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (CD_3OD , ppm, $11,7\tau$) das substâncias identificadas nos capítulos de <i>Paepalanthus geniculatus</i> .	86

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	18
1.1	Química de Eriocaulaceae	21
1.2	Panorama químico das espécies do gênero <i>Paepalanthus</i>	24
2.	OBJETIVOS	29
3.	EXPERIMENTAL	31
3.1	Instrumentos	32
3.2	Reagentes	35
3.3	Material vegetal	35
3.4	Extração dos metabólitos	35
3.5	Procedimentos cromatográficos	36
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	39
4.1	Análise por HPLC-ESI-MS ⁿ	43
4.2	Purificação e identificação das estruturas (1C-19C)	45
4.3	Discussão e determinação das estruturas 1C-19C	46
4.3.1	Grupo I - Derivados da quercetina que apresentam metoxila na posição 7.	46
	Substância (1C)	46
4.3.2	Grupo II - Derivados da quercetina que apresentam metoxila na posição 6.	47
	Substância (4C)	47
	Substância (2C)	48
4.3.3	Grupo III - Derivados da quercetina que apresentam metoxila na posição 6 e açúcar acetilado.	49
	Substância (5C)	49
	Substância (7C)	51
	Substância (13C)	52
4.3.4	Grupo IV - Derivados do kaempferol que apresentam metoxila na posição 6.	53
	Substância (8C)	53
	Substância (3C)	54
	Substância (6C)	55
4.3.5	Grupo V – Derivados do kaempferol que apresentam metoxila na posição 6 e acetilação no açúcar.	56
	Substância (9C)	56
	Substância (11C)	57
	Substância (17C)	58
4.3.5	Grupo VI – Flavonóides acil glicosilados	59
	Substância (19C)	59
	Substância (18C)	60
4.3.6	Grupo VII – Naftopiranonas	61
	Substância (14C)	61
	Substância (15C)	63
	Substância (10C)	64
	Substância (16C)	66
4.3.7	Grupo VIII - Flavonóide acil glicosilado ciclodimérico	67
	Substância (12C)	68

	4.4 Atividade antioxidante	70
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	75
	REFERÊNCIAS	79
	ANEXOS	85

1. INTRODUÇÃO

Compostos fenólicos de Paepalanthus geniculatus (Eriocaulaceae).

1. Introdução

Plantas pertencentes à família Eriocaulaceae compreendem cerca de 1200 espécies distribuídas em 11 gêneros. Apresentam distinções das demais monocotiledôneas por possuir flores diclinas reunidas em densos capítulos. A diversidade da família encontra-se na região neotropical (Figura 1). O Brasil possui o principal centro de diversidade dessas espécies localizado na Cadeia do Espinhaço, sobretudo no Estado de Minas Gerais (Giulietti & Hensold, 1991; Stützel, 1998; Sano, 2004). Outros centros destas diversidades encontram-se na Venezuela, Guiana e norte do Brasil (Hensold *et al.*, 1991; 1999).

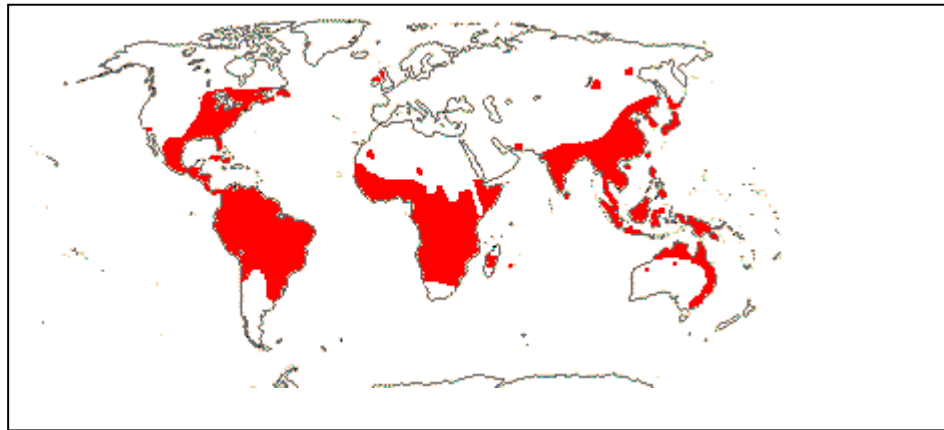


Figura 1 – Distribuição geográfica de Eriocaulaceae.

O principal habitat ocupado por estas espécies são os campos rupestres quartizíticos, ocorrendo também em outras formações abertas do Cerrado (Oliveira, 2010). Aproximadamente, 95 % destas espécies possuem distribuição bastante restrita, muitas vezes limitada a apenas uma localidade ou mesmo a uma serra (Giulietti *et al.*, 2005; Costa *et al.*, 2008). Conseqüentemente, Eriocaulaceae é uma das famílias mais citadas nas listas vermelhas de espécies ameaçadas de extinção, estando 94 espécies presentes na lista do estado de Minas Gerais (Biodiversitas, 2008).

A família é dividida em duas subfamílias: *Eriocauloideae* Ruhland, caracterizada por possuir flores diplostêmones e pétalas com glândulas; *Paepalanthoideae* Ruhland, que possui flores isostêmones e pétalas sem glândulas. (Koernicke 1863; Ruhland 1903).

Sano (1999) define o gênero desta subfamília baseando-se nas características florais pistiladas. A grande diversidade taxonômica e morfológica de *Paepalanthoideae* concentra-se em dois gêneros: *Paepalanthus* Mart., com cerca de 450 espécies e *Syngonanthus* Ruhland,

com cerca de 200 espécies (Giulietti & Hensold 1990). Nesses dois gêneros está também a maioria das espécies de importância econômica na família. Muitas dessas espécies são utilizadas na confecção de artesanatos de sempre-vivas, sendo a principal fonte de renda de comunidades artesãs (Giulietti *et al.*, 1988; Schmidt *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2008).

Os gêneros (Tabela 1) apresentam distribuição pantropical, normalmente com algumas espécies em regiões temperadas, concentrando-se principalmente na América do Sul, com poucas espécies na América Central e uma espécie na África (Giulietti *et al.*, 1988; Giulietti *et al.*, 1990). Com mais de 1100 espécies e cerca de 11 gêneros, *Paepalanthus* é o maior gênero da família, com aproximadamente 400 espécies (Dokkedal *et al.*, 2008).

Tabela 1 - Gêneros pertencentes à família Eriocaulaceae segundo a proposta de Ruhland (1903), (número aproximado de espécies de cada gênero, Giulietti, 1997; Sano, 1999; Sano *et al.*, 2004).

<i>Eriocaulon</i> (450)	<i>Paepalanthus</i> (450)	<i>Leiothrix</i> (30)	<i>Rondonanthus</i> (6)
<i>Tonina</i> (10)	<i>Mesanthemum</i> ⁺ (10)	<i>Comanthera</i> (10)	<i>Actinocephalus</i> (29)
<i>Philodice</i> (10)	<i>Lachnocaulon</i> ⁺⁺ (10)	<i>Syngonanthus</i> (200)	

⁺ Gênero restrito à África. ⁺⁺ Gênero restrito à América do Norte.

No Brasil, 31 espécies vegetais de *Paepalanthus* (Figura 2) foram registradas no Estado de Minas Gerais, no topo da Serra do Espinhaço, o principal centro de diversidade de Eriocaulaceae do Brasil e mais de 400 espécies de *Paepalanthus* distribuídas geograficamente desde o estado do Amazonas até São Paulo (Giulietti, 1978; Sano *et al.*, 2004).



Figura 2 - *Paepalanthus* spp (Cabral, M. 2007).

Compostos fenólicos de Paepalanthus geniculatus (Eriocaulaceae).

Apesar do grande número de espécies existentes em Eriocaulaceae, a sua peculiar composição química, que muito tem auxiliado na taxonomia da família, aliadas às importantes atividades biológicas das substâncias químicas isoladas, existem ainda muitas espécies não investigadas, como no caso de *Paepalanthus geniculatus*.

1.1 Química de Eriocaulaceae

Os estudos químicos com Eriocaulaceae iniciaram-se com Augier (1956), analisando as folhas de *Mesanthemum radicans* Koern, identificando açúcares.

Bate Smith & Harborne (1969) relataram a presença da quercetagetina em *Eriocaulon nilagirensense* Steud. e *Eriocaulon septangulare*. Os mesmos autores detectaram o mesmo flavonol 6-oxigenado nas folhas de *Eriocaulon decangulare* L., *Eriocaulon brownianum* Mart., *Eriocaulon sexangulare* L. e *Eriocaulon wightianum* Mart. e sua ausência em *Eriocaulon truncatum* Ham.

Gibbs (1974) relata a presença dos flavonóides quercetagetina, kaempferol, 6-hidroxi-flavonol, patuletina e derivados de ácidos cinâmicos (ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido sinápico, ácido *p*-cumárico) em espécies do gênero *Eriocaulon*.

Salatino *et al.* (1990) avaliaram o teor de fenóis dos capítulos de 86 espécimens de 8 gêneros de Eriocaulaceae. Nesse estudo, os autores verificaram que, dentre os gêneros estudados, os que apresentaram teores mais baixos e menor variabilidade foram *Leiothrix* (0,2-1,4 %), seguido por *Syngonanthus* (0,3-1,7 %) e *Eriocaulon* (1,3-1,8 %). Os maiores teores e a maior variabilidade foram obtidos com *Paepalanthus*, com valores entre 0,7-8,9 %. Em *Paepalanthus*, as espécies pertencentes à *Paepalanthus* subg. *Platycaulon* foram as que apresentaram os maiores teores (3,6-8,4 %), enquanto que as de *Paepalanthus* subg. *Xeractis* apresentaram os menores teores (0,7-3,6 %). Do ponto de vista evolutivo, segundo os autores, esses resultados apontam para uma posição basal de *Paepalanthus*, devido aos maiores teores de fenóis, e uma posição mais avançada de *Leiothrix*.

Provost *et al.* (1990) isolaram a naftopiranona vioxantina em extratos acetônicos de *Paepalanthus falcifolius*, *Paepalanthus albovaginatus*, *Paepalanthus argentus*, *Paepalanthus ramosus* e *Paepalanthus cuspidatus*.

Dokkedal *et al.* (1992) investigaram a presença de flavonas *O*- e *C*-glicosiladas em 6 espécies do gênero *Leiothrix*. Os autores concluíram que o gênero *Leiothrix* pode ser distinguido de outros gêneros, como *Eriocaulon*, devido à presença dessas flavonas em espécies de *Leiothrix*.

Mayworm *et al.* (1993) encontraram a quercetagetina, quercetina-3-metiléter, a patuletina-3-*O*-glicosídeo e a apigenina 4'-*O*-glicosídeo em 4 espécies de *Paepalanthus* (*Paepalanthus hilairei*, *Paepalanthus robustus*, *Paepalanthus planifolius* e *Paepalanthus bifrons*). Esta informação aproximou taxonomicamente os gêneros *Paepalanthus* e *Eriocaulon*.

Ricci *et al.* (1996) realizaram o estudo taxonômico de 13 espécies de *Syngonanthus*, comprovando a presença de 24 flavonas, sobretudo derivados 7-*O*-glicosilados da luteolina e 6-hidroxiluteolina, além de *O*-glicosídeos da apigenina.

Nos últimos anos, a maioria dos trabalhos referentes a estudos químicos de plantas da família Eriocaulaceae foi realizada pelo grupo de estudo de química orgânica de produtos naturais coordenado pelo Prof. Dr. Wagner Vilegas e pela profa. Dra. Lourdes Campaner dos Santos.

Os trabalhos deste grupo tiveram início com a investigação dos capítulos de espécies de *Paepalanthus*. O estudo de *Paepalanthus bromelioides* resultou no isolamento de uma naftopiranona, a paepalantina (nafto[2,3-*C*]pirano-1-ona) (Vilegas *et al.*, 1990), e prosseguiu com a obtenção da paepalantina-9-*O*- β -D-glucopiranosídeo e da paepalantina-9-*O*- β -D-alopiranosil-(1'' \rightarrow 6')- β -D-glicopiranosídeo (Vilegas *et al.*, 1998). Nehme (1997) obteve derivados 7-metoxilados da quercetina nos escapos de *Paepalanthus bromelioides* e *Paepalanthus latipes*. Santos (1997) encontrou naftopiranonas nos capítulos e flavonóis 6-metoxilados derivados do kaempferol e da quercetina nos escapos de *Paepalanthus hilairei*. Três derivados glicosilados da semi-vioxantina foram encontrados também em *Paepalanthus vellozioides* e *Paepalanthus latipes* (Vilegas *et al.*, 1999a). Flavonóis acilados e glicosilados derivados da quercetina foram encontrados em *Paepalanthus hilairei*, *Paepalanthus robustus*, *Paepalanthus denudatus*, *Paepalanthus ramosus*, *Paepalanthus polyanthus* (Andrade *et al.*, 1999). Iniciando o estudo de folhas, foram isoladas diidronaftopiranonas glicosiladas de *Paepalanthus vellozioides* e *Paepalanthus latipes*, acompanhadas de flavonóides 7-metoxilados e seus glicosídeos (Vilegas *et al.*, 1999a e 1999b). A 5-desmetoxipaepalantina e

seus derivados glicosilados foram encontrados em *Paepalanthus macrocephalus* (Bong.) Koernicke (*Paepalanthus* sect. *Eriocaulopsis* subs. *Aphoro caulon*), em conjunto com derivados 6-metoxilados da quercetina e seus glicosídeos (Dokkedal, 2000). Coelho (2000) isolou outra naftopiranona, a vioxantina, e um dímero da paepalantina, ligado pelas posições 8-8'. Outro dímero, constituído por uma unidade de paepalantina e outra de semi-vioxantina, foi isolado de *Paepalanthus planifolius* (Santos *et al.*, 2001a). Dokkedal *et al.* (2007), identificou no extrato metanólico de *Paepalanthus argenteus* var. *argenteus* (Bongard) Hensold um flavanonol C-glicosilado, denominado xeractinol. Este diidroflavanonol identificado nesta espécie foi considerado também um importante marcador taxonômico de *Paepalanthus*, subg. *Xeractis*.

Com relação à composição química apolar, Garcia (1997) avaliou o perfil químico de extratos hexânicos de várias espécies da família Eriocaulaceae, encontrando hidrocarbonetos alifáticos lineares com cadeias que variam entre C25 e C31. A presença desses hidrocarbonetos provavelmente contribui para diminuir a perda de água pelas plantas (Raven *et al.*, 2001).

Considerando os demais gêneros de Eriocaulaceae estudados por nosso Grupo de Pesquisa, citamos ainda dados relevantes sobre a química de *Leiothrix*, *Eriocaulon*, *Syngonanthus* e *Xeractis*.

Santos *et al.* (2001b) isolaram pela primeira vez xantonas de *Leiothrix curvifolia* e *Leiothrix flavescens*. Estas xantonas possuem um grupo carboxi-metoxi na posição 8. A ocorrência do grupo COOCH₃ na posição 8 de uma xantona proveniente de planta não é usual. A maioria das xantonas isoladas de plantas comumente apresenta um grupo metila na posição 3, enquanto que as xantonas isoladas de líquens possuem um grupo metila na posição 8 (Elix *et al.*, 1990). Estes trabalhos contribuíram para discussão taxonômica dos gêneros, pois enquanto *Leiothrix* e *Syngonanthus* foram considerados gêneros próximos pela presença das flavonas, *Paepalanthus* foi considerado um gênero distinto destes por apresentar flavonóis e naftopiranonas (Dokkedal *et al.*, 2008).

Kitagawa *et al.* (2003) identificaram no extrato diclorometano dos capítulos de *Paepalanthus latipes* uma naftoquinona, citotóxica. Este foi o único relato de uma naftoquinona em espécies de Eriocaulaceae.

Silva *et al.* (2007) e Santos *et al.* (2009), estudando os capítulos e escapos de *Eriocaulon ligulatum*, identificaram, além dos flavonoides derivados da quercetina,

flavonoides acil glicosilados e um dímero da paepalantina. Estes dados contribuíram para aproximar o gênero *Eriocaulon* de *Paepalanthus*.

Pacifico *et al.* (2011), estudaram os capítulos e escapos de *Syngonanthus nitens*, conhecido por capim dourado e identificaram xantonas e flavonas. As xantonas foram identificadas majoritariamente nos capítulos, enquanto que nos escapos foram identificadas flavonas. Este foi o primeiro relato da presença de xantonas em espécies do gênero *Syngonanthus*, que até então eram consideradas próximas do gênero *Leiothrix* pela presença exclusiva de flavonas.

A Tabela 2 apresenta um panorama contendo todas as espécies de *Paepalanthus* que foram estudadas quimicamente pelo grupo de pesquisa, a fim de contribuir para a discussão taxonômica de *Paepalanthus* e seus *taxa* infragenéricos, bem como sua posição na família.

1.2 Panorama químico das espécies do gênero *Paepalanthus*

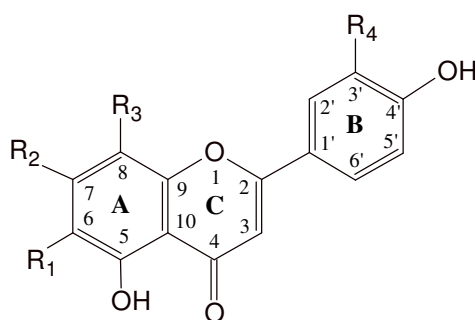
Várias espécies do gênero *Paepalanthus* pertencentes à família Eriocaulaceae foram investigadas, tendo-se isolado majoritariamente flavonóides e naftopiranonas apresentados na Tabelas 2. A Tabela 3 apresenta as estruturas das substâncias isoladas das espécies de *Paepalanthus* estudadas.

Tabela 2 - Panorama químico do gênero *Paepalanthus* pertencente à família Eriocaulaceae.

Espécie	Substâncias	Referências
<i>Paepalanthus</i>		
<i>P. subg. Xeractis</i>		
<i>P. chlorocephalus</i>	01, 07, 09, 24, 34, 37, 41	Dokkedal, 2000.
<i>P. argenteus</i> var. <i>argenteus</i>	02, 05, 12, 22, 28	Dokkedal, 2000, Dokkedal <i>et al.</i> , 2007.
<i>P. sect. actinocephalus</i>		
<i>P. polyanthus</i>	09, 10, 12, 15, 16, 17, 25, 27	Andrade <i>et al</i> , 1999; Santos <i>et al</i> , 2002.
<i>P. hilairei</i>	09, 14, 15, 16, 17, 24, 31, 32	Santos, 1997 e 2001; Andrade <i>et al</i> , 1999.
<i>P. robustus</i>	03, 10, 14, 16, 24, 25, 31, 32	Andrade <i>et al</i> , 1999.
<i>P. ramosus</i>	09, 10, 14, 15, 24, 29, 31, 32	Andrade <i>et al</i> , 1999; Santos, 2001b.
<i>P. denudatus</i>	09, 10, 14, 24, 25, 31, 32	Andrade <i>et al</i> , 1999; Dokkedal, 2000.

<i>P. microphyllus</i>	30, 31, 32, 36, 37, 38	Santos, 2001b.
<i>P. brachypus</i>	09, 16	Santos, 2001b.
<i>P. subsect. Aphorocaulon</i>		
<i>P. macrocephalus</i>	09, 12, 23, 24, 31, 34, 35, 39, 40	Dokkedal, 2000.
<i>P. sect. Diphyomene</i>		
<i>P. speciosus</i>	30, 31, 33, 39	Garcia, 1997.
<i>P. subg. Platycaulon</i>		
<i>P. vellozioides</i>	13, 19, 20, 21, 22, 26, 30, 32, 39, 40, 41	Vilegas <i>et al</i> , 1999a e 1999b.
<i>P. latipes</i>	13, 19, 20, 21, 22, 26, 30, 32, 39, 40, 44	Dokkedal, 2000; Vilegas <i>et al</i> , 1999a e 1999b; Nehme, 1997, Kitagawa <i>et al</i> ;, 2003
<i>P. bromelioides</i>	02, 12, 13, 20, 23, 29, 31, 32, 42	Vilegas <i>et al</i> , 1990 e 1998; Coelho <i>et al</i> , 2000.
<i>P. macropodus</i>	09, 11, 12, 18, 32	Andrade <i>et al</i> , 2002.
<i>P. planifolius</i>	03, 04, 06, 08, 14, 19, 27, 30, 31, 32, 41, 42, 43	Santos <i>et al</i> , 2001b.

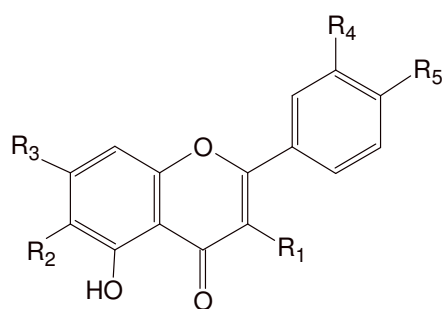
Continuação da Tabela 2.

Tabela 3 - Substâncias isoladas do gênero *Paepalanthus* Eriocaulaceae.**Agliconas de flavonas**

Substância	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
01	OCH ₃	OH	H	OH
02	OCH ₃	OH	H	OCH ₃
03	OH	OH	H	OH
04	OH	OCH ₃	H	H

Glicosídeos de flavonas

Substância	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
05	OCH ₃	O-glic	H	OCH ₃
06	H	O-glic	H	OH
07	C-glic	OH	H	OH
08	C-glic	OH	C-glic	H

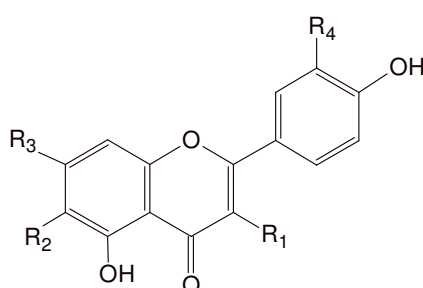


Aglicona de flavonóis

Substância	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
09	OCH ₃	OH	H	H	OH
10	OH	OH	H	OH	OH
11	OH	OH	OH	OH	OH
12	OCH ₃	OH	H	OH	OH
13	OH	OCH ₃	H	OH	OH

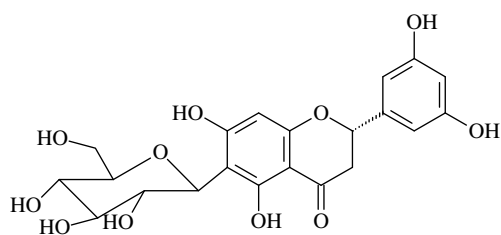
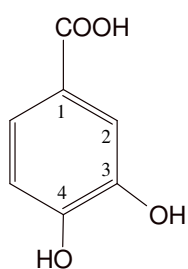
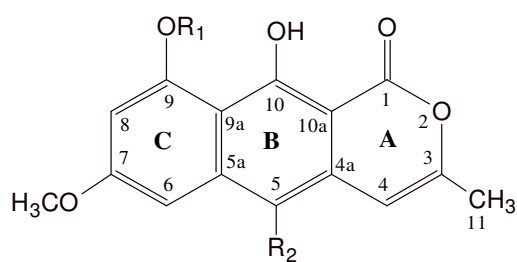
Glicosídeos de flavonóis

Substância	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
14	<i>O</i> -glic	OCH ₃	OH	H	OH
15	OH	OH	<i>O</i> -glic	OH	OH
16	<i>O</i> -glic	OCH ₃	OH	OH	OH
17	<i>O</i> -glic(1→6)ram	OCH ₃	OH	OH	OH
18	<i>O</i> -glic(4→1)glic	OCH ₃	OH	OH	OH
19	<i>O</i> -glic	OH	OCH ₃	OH	OH
20	OH	OH	OCH ₃	OH	<i>O</i> -glic
21	<i>O</i> -glic(1→6)glic	OH	OCH ₃	OH	OH
22	<i>O</i> -glic(1→2)ram	OH	OCH ₃	OH	OH
23	OH	OCH ₃	<i>O</i> -glic	OCH ₃	OH

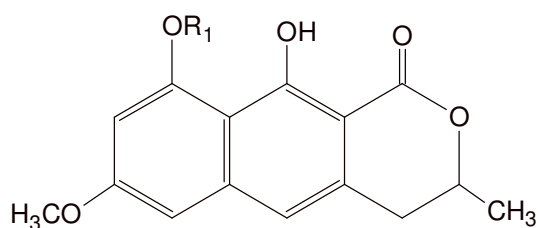


Flavonóis acilados

Substância	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
24	<i>O</i> -glic(6)- <i>p</i> -cum	OCH ₃	OH	H
25	<i>O</i> -glic(6)- <i>p</i> -cum	OCH ₃	OH	OH
26	<i>O</i> -glic(1→4)glic(2)-caf	OH	OCH ₃	OH
27	<i>O</i> -glic(6)-fer	OCH ₃	OH	OH

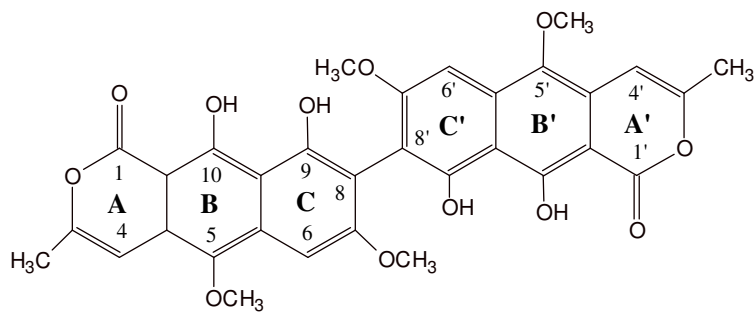
**28 - Diidroflavonol****29 Fenol simples****Naftopiranas**

Substância	R ₁	R ₂
30	H	OCH ₃
31	-glic	OCH ₃
32	-glic(1→6)alo	OCH ₃
33	-glic	H
34	-glic(1→6)glic	H
35	H	H
36	-glic(1→6)glic	OCH ₃
37	-ara(1→6)glic	OCH ₃
38	-ram(1→6)glic	OCH ₃

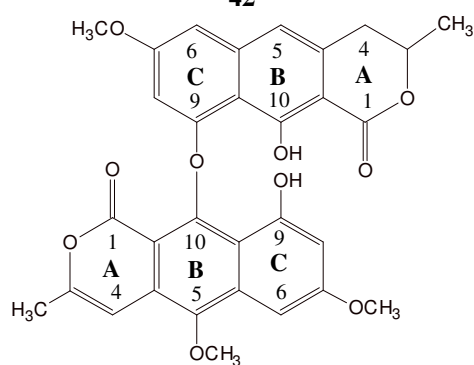
**³Δ-diidronaftopiranas**

Substância	R ₁
39	-glic
40	-glic(1→6)glic
41	-alo(1→6)glic

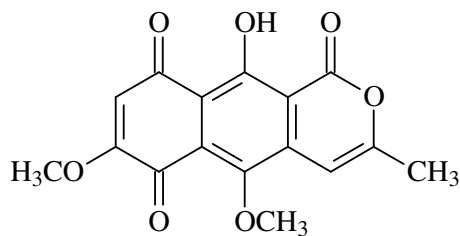
Naftopiranonas diméricas



42



43



44- Naftoquinona

Continuação da Tabela 3.

Legenda da Tabela 3: glic → glicopiranosídeo; Ram → raminopiranosídeo; Alo → alopiranosídeo; Ara → arabinopiranosídeo O-glic → O-glicosídeo; C-glic → C-glicosídeo; p-cum → p-Cumaroil; Caf → Cafeoil; Fer → Feruloil.

2. OBJETIVOS

Compostos fenólicos de Paepalanthus geniculatus (Eriocaulaceae).

2. Objetivos

Contribuir para o conhecimento da química e quimiotaxonomia de *Paepalanthus*.

Objetivos específicos

- Realizar estudo químico do extrato metanólico dos capítulos de *Paepalanthus geniculatus*.
- Avaliar a atividade antioxidante e anticâncer em células humanas cancerígenas (PC3) de próstata das substâncias isoladas dos capítulos de *Paepalanthus geniculatus*.

3. EXPERIMENTAL

Compostos fenólicos de Paepalanthus geniculatus (Eriocaulaceae).

3. Experimental

3.1 Instrumentos e métodos

- Cromatografia de Permeação em Gel (GPC): O fracionamento através de cromatografia por permeação em gel foi realizado utilizando uma coluna de vidro de 120 cm x 3 cm (i.d.) empacotada com 80 g de Sephadex LH-20 e acoplada a uma bomba peristáltica (Pharmacia[®]).

- Cromatografia em Camada Delgada Comparativa: Placas medindo 10 x 20 cm da DC-FERTIGPLATTEN DURASIL- 25UV254 - MARCHEREY - NAGEL- Art. nr. 812007. As placas foram eluidas no sistema de solventes diferentes: CHCl₃/MeOH/H₂O v/v/v (80:18:2). Revelador da CCDC, solução de Sulfato de Cerio IV, CARLO ERBA. As placas primeiramente eram visualizadas em UV a 366 nm para detecção das manchas fluorescentes. Após visualização das manchas fluorescentes, estas eram marcadas e as placas eram nebulizadas com solução de Sulfato de Cério. As placas eram aquecidas em placas aquecedoras a 80°C para o aparecimento das manchas.

- High Performance Liquid Chromatography (HPLC): foi realizado em um HPLC-UV (analítico/preparativo, gradiente/bomba binária G- 1312A e G-1328B), injetor Rheodyne, detector de arranjo foto diodos de varredura 190 - 800 nm e intervalo de 1 nm, modelo HP1100 da Agilent Technologies (Palo Alto, CA).

- Coluna de fase reversa RP18 Synergi Hidro (Phenomenex[®]) de 250 x 10 mm i.d., apresentando partículas com tamanho médio de 4 µm.

- Polarímetro: O registro da atividade óptica $[\alpha]_D$ dos compostos foram realizados em um Polarímetro POLAX-2L, da ATAGO.

- Ressonância Magnética Nuclear: A determinação estrutural dos compostos foi realizada em espectrômetro Bruker DRX 600, operando em 14,2 τ, usando software UX-RMN. As substâncias foram dissolvidas em CD₃OD.

- Os espectros de massas das substâncias foram obtidos em um espectrômetro de massas LCQ Deca (ESI-IT-MSⁿ, Thermo Finnigan[®]), equipado com um dispositivo de inserção direta da amostra via análise por injeção em fluxo contínuo (FIA). As substâncias foram analisadas no modo de ionização *electrospray* (ESI) e as fragmentações em múltiplos

estágios (MS^2 , MS^3 , MS^n) realizadas em uma interface do tipo *ion-trap* (IT), ThermoFinnigan, San José, CA, EUA.

O modo negativo foi escolhido para a geração dos espectros de massas em primeira ordem (MS), bem como para os demais experimentos em múltiplos estágios (MS^n), sob as seguintes condições: voltagem do capilar -32 , voltagem do spray -5 kV, temperatura do capilar 280 °C, gás de arraste (N_2) fluxo de 60 (unidades arbitrárias). A faixa de aquisição foi m/z 20-2000, com dois ou mais eventos de varredura realizados simultaneamente no espectro de massas LQC. O primeiro evento foi a varredura completa (*full-scan*) do espectro de massas para adquirir os dados dos íons na faixa do m/z estabelecida. Os demais eventos foram experimentos MS^n realizados a partir dos dados da primeira varredura para os íons precursores pré estabelecidos com a energia de colisão entre 25 e 30% da energia total do instrumento. Software *Xcalibur* versão 1.3 (Termo Finigan[®]) para aquisição e processamento dos dados.

O extrato metanólico dos capítulos de *Paepalanthus geniculatus* foi analisado por HPLC/ESI- MS^n on-line, utilizando um sistema de HPLC acoplado com um espectrômetro de massas *ion-trap*, Thermo Finnigan, San José, CA, EUA.

As separações por foram feitas utilizando-se uma coluna de fase reversa RP18 Luna (Phenomenex[®]) de 150 x 3 mm i.d., apresentando partículas com tamanho médio de 5 μm , fluxo 0,2 ml.min⁻¹. A eluição foi realizada no modo gradiente usando H_2O (A) e CH_3CN (B), ambos acidificados com 0,1 % com acido fórmico, como fase móvel.

As substâncias puras foram testadas utilizando-se o ensaio TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity). O valor obtido no ensaio TEAC é baseado na capacidade de uma substância antioxidante em sequestrar o radical catiônico 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolino-6sulfonato) (ABTS $\bullet+$) em análises espectrofotométricas. O cátion ABTS $\bullet+$ foi produzido pela reação de ABTS na concentração de 7 mM e 2,45 mM de persulfato de potássio em solução aquosa, estocados na ausência de luz e temperatura ambiente por 12 horas. O íon ABTS $\bullet+$ é um cromógeno azul-verde com uma absorção característica a 734 nm. A solução ABTS $\bullet+$ foi então diluída com PBS (solução salina tamponada de fosfato, pH 7,4) para uma absorbância de 0,70 a 734 nm, equilibrada a 30 °C. As amostras foram diluídas em metanol (MeOH) para produzir soluções de concentrações 0,3; 0,5; 1 e 1,5 mM. A reação foi iniciada pela adição de 1 mL de 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolino-6sulfonato) (ABTS) para 10 μL de cada diluição

das amostras. As determinações foram repetidas três vezes para cada diluição. A porcentagem de redução da absorbância a 734 nm foi calculada para cada concentração em relação ao branco de absorbância (MeOH) e em função à concentração do padrão ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox, Aldrich Chemical Co., Gillingham, Dorset, UK). As atividades antioxidantes do extrato metanólico e dos compostos **1-19** foram expressas como valores TEAC em comparação com a atividade TEAC dos compostos de referência relatados, quercetina, quercetina 3- O-glisodídeo e kaempferol 3-O-glucosídeo. O valor TEAC é definido como a concentração da solução padrão Trolox com a mesma capacidade antioxidante de uma concentração de 1 mM dos compostos em estudo. No caso do extrato, o valor TEAC é definido como a concentração da solução padrão Trolox com a mesma capacidade antioxidante de 1 mg/mL do extrato testado.

Células de câncer de próstata humano (PC3) foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com 2 mM de L-glutamina, 10 % de soro fetal bovino inativado e 1 % de penicilina/estreptomicina (todos da Cambrex Bioscience, Verviers, Belgium) a 37 °C e 5 % de CO₂. As células foram semeadas em concentração de 1 X 10⁵ células/cavidade em placas (Falcon, BD Bioscience, Bedford, MA, USA) um dia antes do tratamento. Ao final do período de incubação, as células foram processadas para análises FACS.

O efeito das substâncias nas espécies reativas de oxigênio intracelulares foi avaliado pela medida da fluorescência da diclorofluoresceína (DCF). As células foram incubadas por 24 horas na presença e ausência dos compostos em diferentes concentrações (1–10 µM). No final do período de incubação, as células foram re-suspensas (2 × 10⁵ cells/mL) em solução salina balanceada de Hank contendo 10 µM de 2,7'- diacetato de diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA). Após uma incubação de 20 minutos a 37 °C, a fluorescência de DCF foi monitorada por citometria de fluxo (FL1-Hchannel), a fim de estimar o potencial antioxidante dos compostos, controles e células tratadas com 300 µM do oxidante t-BuOOH por 30 minutos a 37 °C antes da adição do DCFH-DA.

Análise estatística: os resultados foram expressos pelas médias ± desvios padrão de três experimentos realizados em triplicata. Comparações estatísticas entre grupos foram realizadas usando análise de variância (ANOVA), seguida do teste paramétrico de Bonferroni. Diferenças foram consideradas significativas se $p < 0.05$.

3.2 Reagentes

- Solvente metanol tetradeuterado: CD₃OD (99,95%, Sigma-Aldrich®).
- Solventes grau HPLC: Acetonitrila, ácido Trifluoracético, ácido fórmico, metanol e água (Merck®).
- Solventes (PA) grau analítico: Os demais solventes citados neste trabalho.

3.3 Material Vegetal

- *Paepalanthus geniculatus* (Bong.) Kunth. foi coletado em outubro de 2007 em Santana do Riacho, MG-Brasil e identificados pelo botânico Prof. Dr. Paulo T. Sano, do IB-USP. A exsicata foi depositada no Herbário do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências – USP SPF 139.580. Capítulos e escapos *Paepalanthus geniculatus* foram separados e, em seguida, secos em estufa ventilada a 40°C durante 4 dias, moídos em moinhos de facas e posteriormente pesados, etiquetados, embalados e armazenados em local seco.

3.4 Extração dos metabólitos

Capítulos moídos (300 gramas) foram extraídos sucessivamente com solventes em ordem crescente de polaridade: hexano, diclorometano e metanol. A extração com hexano e diclorometano (2 litros cada), foi realizada por maceração, ficando em contato com o solvente orgânico por 3 semanas (cada). A extração com metanol foi realizada por percolação durante 3 dias. Os solventes foram evaporados em evaporador rotativo até diminuição dos seus volumes e secos em capela até a secura. Os extratos foram colocados em vidros etiquetados, pesados e guardados em local seco. A Figura 3 ilustra o processo de preparo dos extratos da espécie estudada e a Tabela 4 apresenta a massa e o rendimento do extrato.

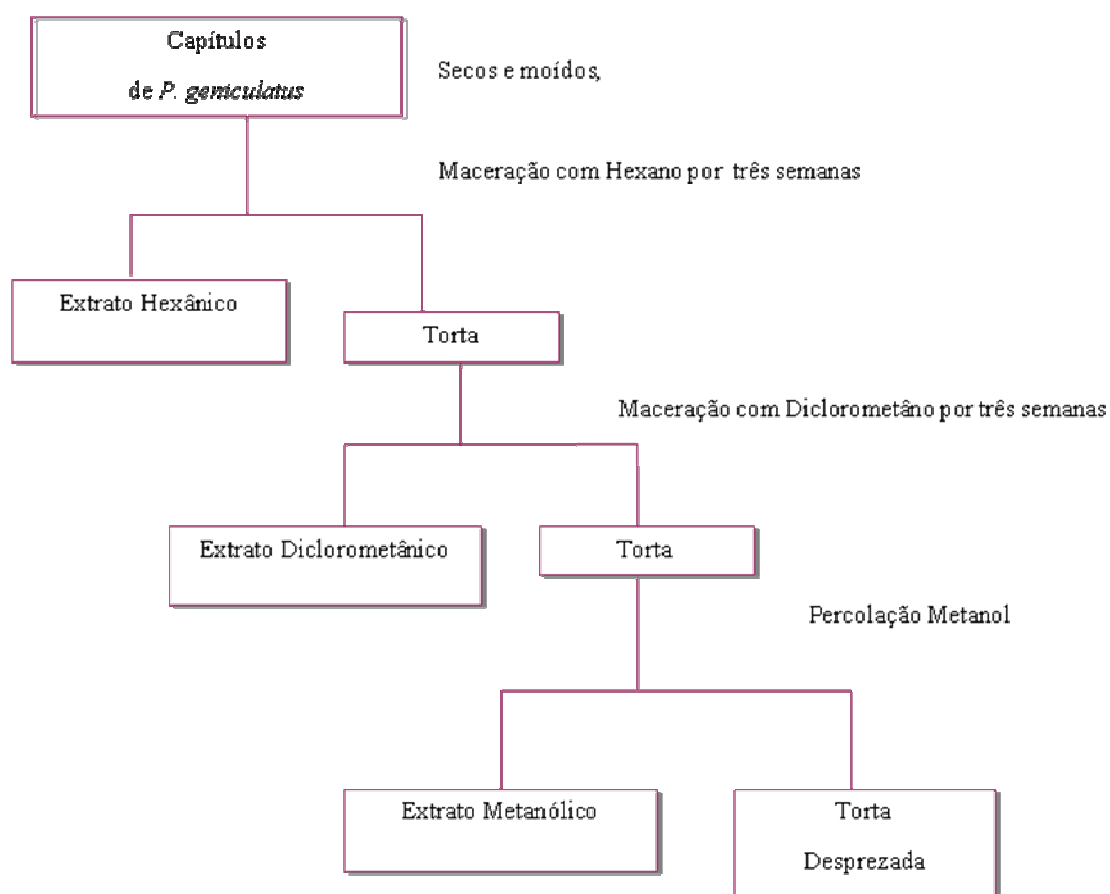


Figura 3 - Fluxograma do preparo do extrato dos capítulos de *Paepalanthus geniculatus*.

Tabela 4 - Massas (g) e rendimentos (%) obtidos dos extratos dos capítulos de *Paepalanthus geniculatus*.

Capítulos <i>Paepalanthus geniculatus</i>	Massa (g)	Rendimento (g) em relação ao material vegetal seco (300 g)	Rendimento (%) em relação a massa total dos extratos obtidos
ExHexânico	3,90	1,30	16
ExDiclorometano	8,10	2,70	33
ExMetanólico	12,20	4,06	50
TOTAL	24,40	8,06	99

3.5 Procedimentos cromatográficos

Cromatografia de permeação em gel (GPC): O extrato bruto metanólico dos capítulos (4,0 g) *Paepalanthus geniculatus* foi dissolvido em MeOH (15 mL) e centrifugado a 3.500

rpm por 10 minutos (repetindo duas vezes). O sobrenadante foi fracionado em Sephadex LH-20 (Pharmacia®) utilizando como fase móvel MeOH obtendo 156 frações (7 mL cada).

High Performance Liquid Chromatography (HPLC): As frações analisadas por HPLC-UV foram solubilizadas em MeOH/H₂O v/v (5:95) grau HPLC com a concentração de 10 mg.100µL⁻¹. Fase móvel composta H₂O (A) e CH₃CN (B) com fluxo de 2 mL.min⁻¹ com as condições de eluição apresentado na Tabela 5. Utilizando a coluna Sinergy Hidro 250 x 10 mm i.d.; 4 µm. O volume injetado foi de 60 µL com a concentração de 10 mg.mL⁻¹ das frações 54-57 (304 mg) e 64-68 (117 mg) do extrato metanólico de *Paepalanthus geniculatus*, oriundas da GPC.

As frações 54-57 (304 mg) provenientes do fracionamento da coluna de permeação em gel Sephadex LH-20 foram purificadas por HPLC-UV, fornecendo dezesseis substâncias: **1C** (3,9 mg, t_r = 22,0 min), **2C** (3,9 mg, t_r = 25,2 min), **3C** (1,5 mg, t_r = 27,4 min), **5C** (1,8 mg, t_r = 28,7 min), **6C** (3,3 mg, t_r = 30,8 min), **7C** (1,8 mg, t_r = 33,3 min), **8C** (2,7 mg, t_r = 33,6 min), **9C** (4,2 mg, t_r = 36,2 min), **10C** (3,4 mg, t_r = 37,7 min), **11C** (4,4 mg, t_r = 39,8 min), **13C** (2,9 mg, t_r = 43,7 min), **14C** (2,5 mg, t_r = 47,3 min), **15C** (1,3 mg, t_r = 51,6 min), **17C** (2,8 mg, t_r = 56,5 min), **18C** (2,2 mg, t_r = 68,2 min) e **19C** (1,0 mg, t_r = 69,6 min). As frações 64-68 (117 mg) também foram reunidas e purificadas por HPLC-UV fornecendo três substâncias: **4C** (1,6 mg, t_r = 30,2 min), **12C** (3,5 mg, t_r = 41,0 min) e **16C** (1,2 mg, t_r = 54,1 min).

Tabela 5 - Gradiente de eluição cromatográfico empregado nas frações 54-57 (304 mg) e 64-68 (117 mg) dos capítulos da *Paepalanthus geniculatus*.

Solvente A	Solvente B	Gradiente	
		Tempo (min)	% B
H ₂ O	CH ₃ CN	0	15
		30	25
		50	25
		80	35
		100	90
		110	100

HPLC-ESI-MSⁿ: Os espectros de massas do extrato metanólico e das substâncias puras dos capítulos foram analisadas utilizando H₂O e CH₃CN como fase móvel acidificado com 0,1 ácido fórmico com fluxo de 0,2 mL.min⁻¹. A Tabela 6 apresenta o gradiente de eluição. O volume injetado foi de 10 µL com a concentração de 20 µg.mL⁻¹ do extrato metanólico de *Paepalanthus geniculatus*.

Tabela 6 - Gradiente de eluição cromatográfico empregado no extrato do capítulo da *Paepalanthus geniculatus*.

Solvente A	Solvente B	Gradiente	
		Tempo (min)	% B
H ₂ O	CH ₃ CN	0	5
		3	5
		8	25
		11	26
		21	26
		24	27
		29	27
		36	38

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Compostos fenólicos de Paepalanthus geniculatus (Eriocaulaceae).

4. Resultados e discussões

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas com analisador *electrospray*, modo negativo (HPLC-ESI-MSⁿ), foi utilizada no estudo do extrato metanólico dos capítulos de *Paepalanthus geniculatus* (Figura 4). Foram identificadas 19 substâncias fenólicas, sendo 11 inéditas, naftopiranonas (**10C**, **16C**), os flavonoides derivados da quercetagetina (**1C**, **5C**, **7C**, **13C**), quatro derivados da galetina (**9C**, **11C**, **17C**, **19C**) e um flavonóide glicosilado ciclodimérico (**12C**) (Figura 26). Suas estruturas foram determinadas por experimentos de RMN 1D e 2D (¹H, COSY, HMBC, HSQC, e ROESY) (Figuras 28 - 78). As demais substâncias já citadas na literatura puderam ser facilmente identificadas através de experimentos de co-injeção da amostra com padrão das substâncias (**2C**, **3C**, **4C**, **6C**, **8C**, **13C**, **14C**, **15C**, **18C**) (Figura 4). A Figura 5 resume as estruturas das substâncias que foram detectadas por HPLC-ESI-MSⁿ.

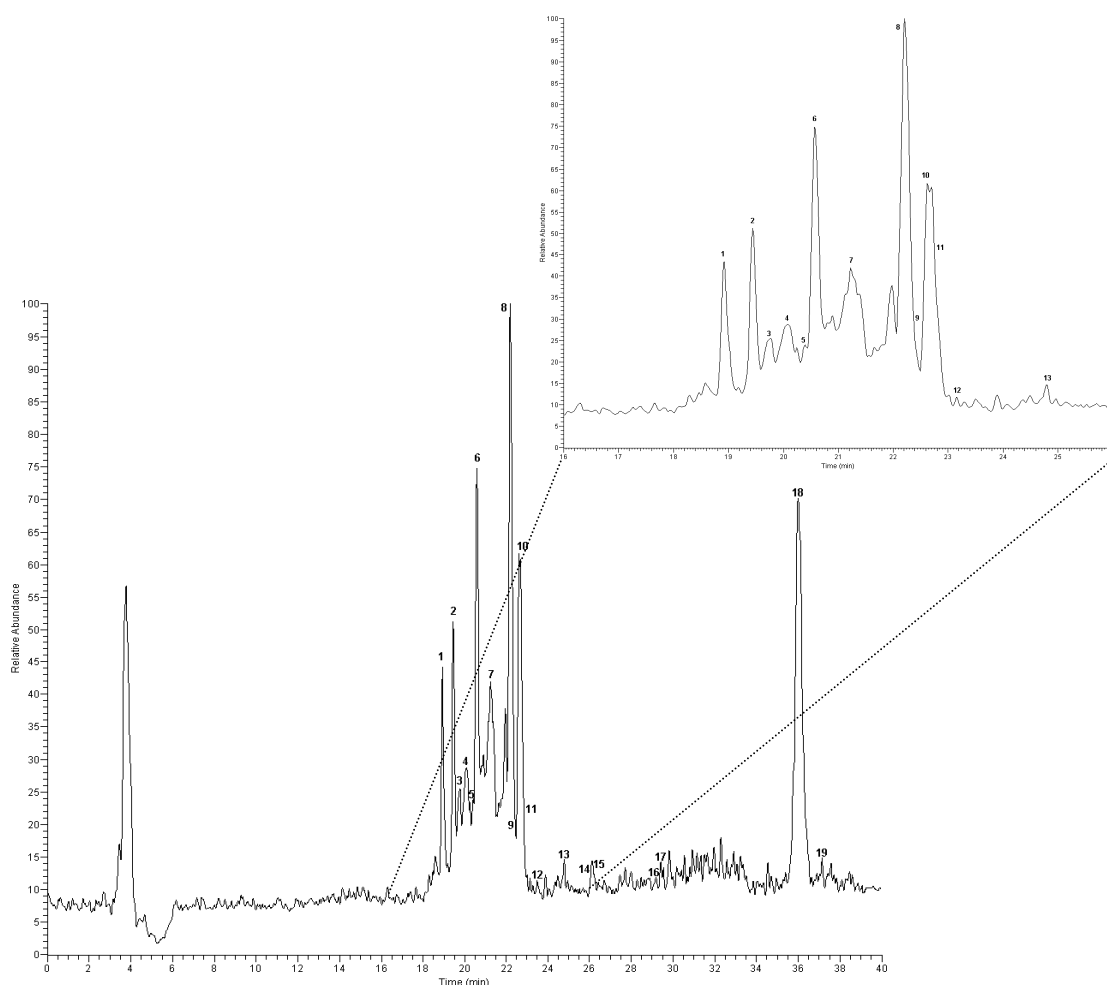


Figura 4 - Perfil por HPLC-MS do extrato metanólico dos capítulos de *Paepalanthus geniculatus*, substâncias numeradas de 1-19 considerar (C) como anteriormente.

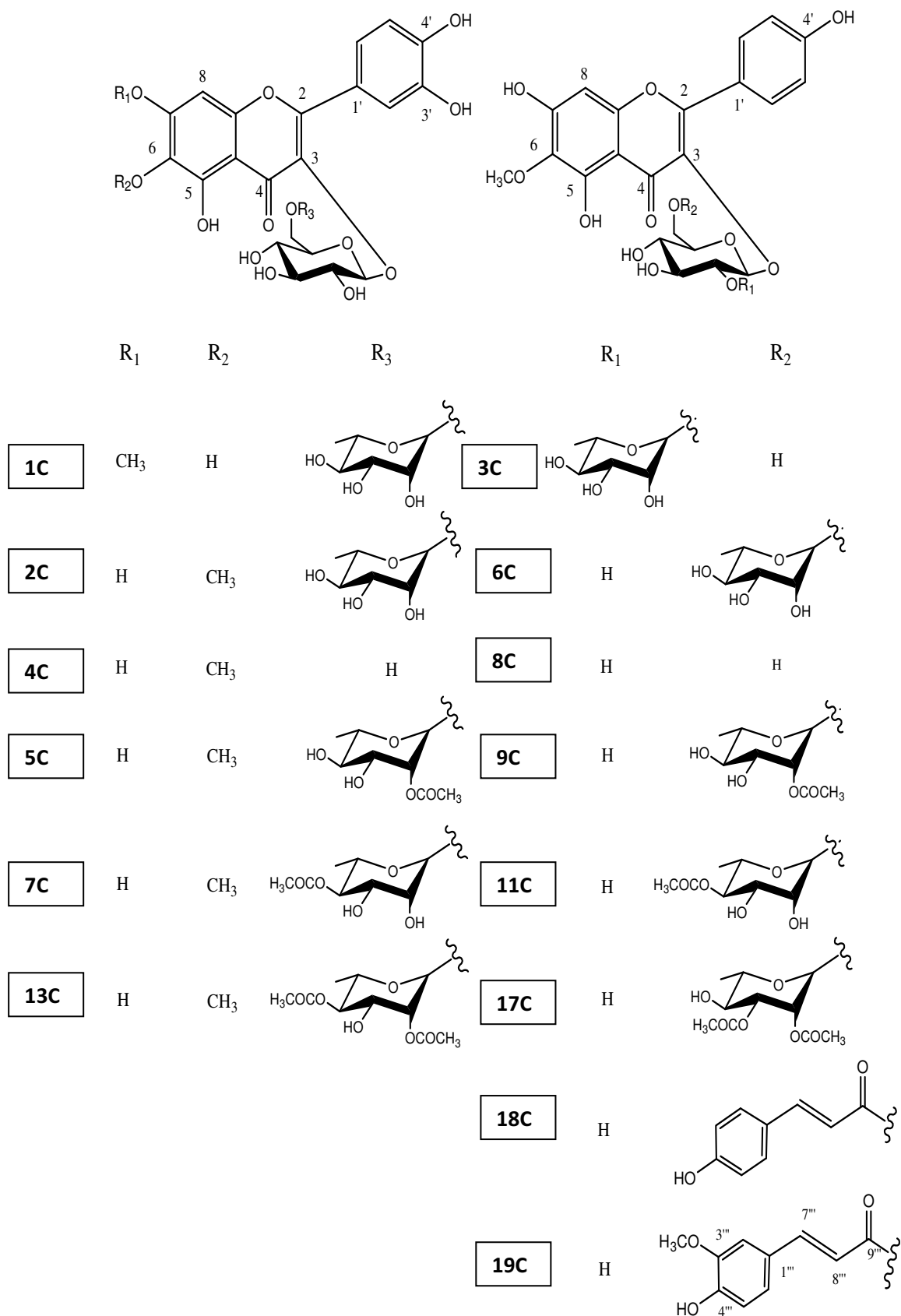
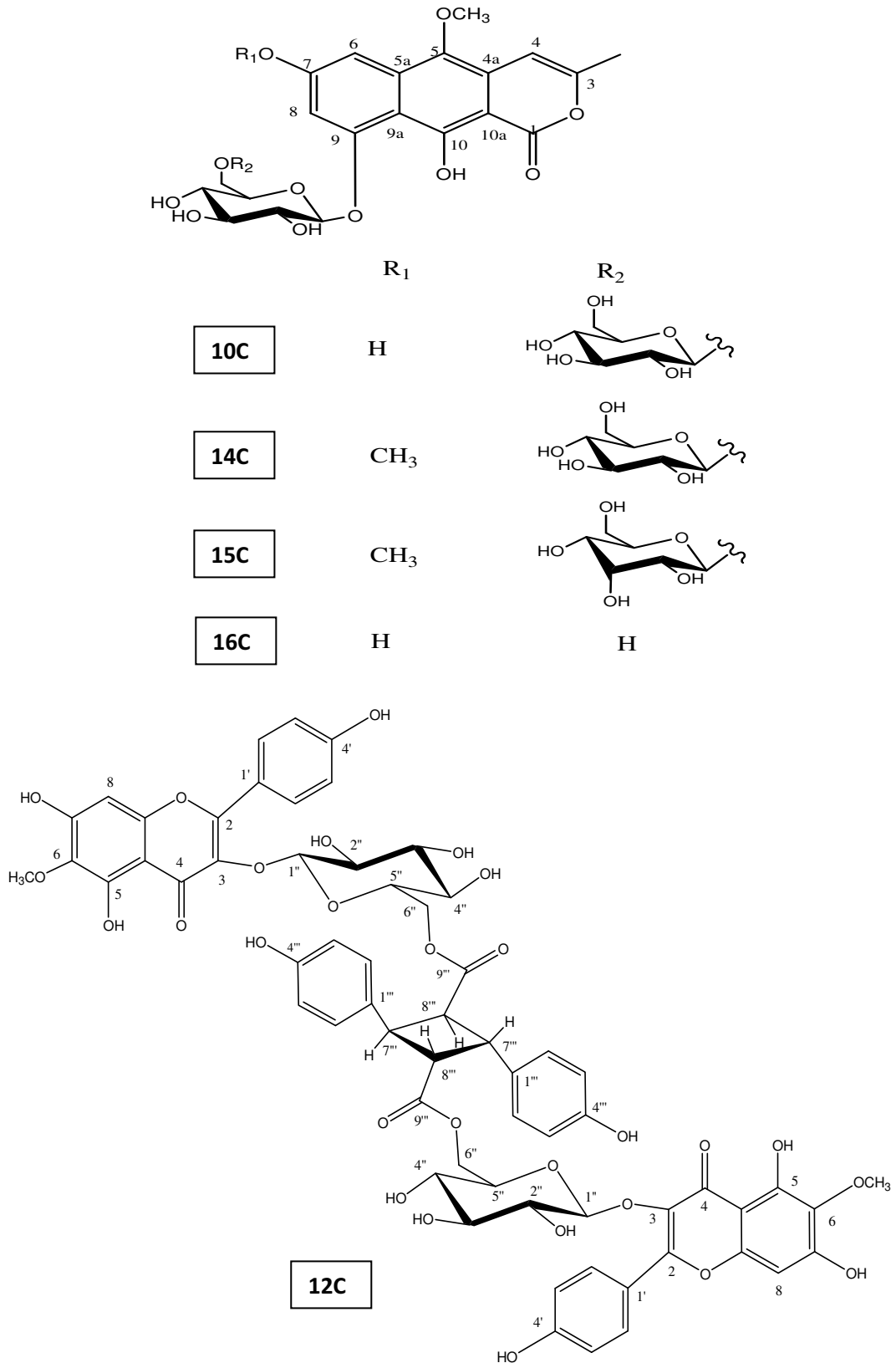


Figura 5 - Substâncias identificadas no extrato metanólico dos capítulos de *Paepalanthus geniculatus*.



Continuação da Figura 5.

4.1 Análise por HPLC-ESI-MSⁿ

O cromatograma obtido por HPLC-ESI-MSⁿ, modo negativo, do extrato metanólico, dos capítulos de *Paepalanthus geniculatus* (Figura 4) evidencia uma boa separação cromatográfica nas condições utilizadas (Tabela 6). Foi detectada a presença das substâncias (**1C-19C**), todas caracterizadas pela presença de um íon majoritário $[M-H]^-$ nos respectivos espectros de massas, conforme discussão individual da determinação estrutural de cada substância. As análises dos espectros de massas em multiestágios ESI-MSⁿ registrados para os picos cromatográficos permitiram identificar duas classes de metabólitos secundários: flavonoides (**1C-9C**, **11C-13C**, **17C-19C**) e as naftopiranonas (**10C**, **14C-16C**) Figura 5.

O padrão de fragmentação ESI-MSⁿ das substâncias permitiu evidenciar a natureza glicosídica de todos os metabólitos existentes no extrato metanólico, com a perda de uma ou duas unidades de açúcares dos respectivos íons precursores $[M-H]^-$. A análise dos espectros de massas ESI-MSⁿ das substâncias **5C**, **7C**, **9C**, **11C**, **13C** e **17C** e dos íons produtos originados pelas perdas neutras das unidades acetilas, possibilitou atribuir a natureza mono ou diacetilada dessas substâncias. Observando o padrão de fragmentação por ESI-MSⁿ, da aglicona dos flavonoides **1C-9C**, **11C-13C** e **17C-19C**, foi possível identificar a localização dos substituintes.

De fato, para qualquer flavonoide, junto a um íon minoritário gerado da perda neutra de uma molécula como H₂O, CO₂ e CO, é possível observar a presença de um íon produto $[(M-15)-H]^-$ formado pela perda neutra de um radical metila. As atribuições dos grupos substituintes dos anéis das agliconas dos flavonóides foram definidas pelas observações nos espectros ESI-MSⁿ dos íons produtos significativos pelo mecanismo de fragmentação retro-Diels-Alder (RDA), ou pelos mecanismos de fragmentações do anel B do flavonóide.

Com estas observações foi possível evidenciar as localizações dos grupos metilas e os números de hidroxilas existentes nos anéis A e B dos flavonóides.

Em particular, e de acordo com dados da literatura, os espectros ESI-MS³ das agliconas das substâncias **1C**, **2C**, **4C**, **5C**, **7C** e **13C**, evidenciaram a presença de íons produtos gerados pela perda de 108 e 122 Da., correspondendo respectivamente a uma cicloexadiendiona e de uma metilcicloexadiendiona, sugerindo a presença de um anel B dihidroxilado e, conseqüentemente, a localização do grupo metila no anel A (McNab *et al.*, 2009; Pacifico *et al.*, 2011). Interessante notar que estes dois últimos mecanismos de

fragmentações possam existir unicamente na presença de uma aglicona que tenha um grupo 3', 4'-diidroxílico no anel B, e portanto, gerando um fragmento quinônico estável (McNab *et al.*, 2009; Pacifico *et al.*, 2011). Por outro lado, a atribuição de uma única hidroxila no anel B das substâncias **3C**, **6C**, **8C**, **9C**, **11C** e **17C-19C**, foi observada nos espectros de ESI-MS³, pelos íons produtos semelhantes da perda de 120 Da. (correspondente a uma molécula de formilcicloexadienona), e dos íons produtos gerados das perdas neutras de 134 Da. verificadas nos mecanismos RDA (McNab *et al.*, 2009; Pacifico *et al.*, 2011). Tais padrões de fragmentações sugeriram que os grupos metila estavam localizados no anel A. Considerações também puderam ser feitas para as agliconas das substâncias **1C**, **2C**, **4C**, **5C**, **7C**, **13C**, que se apresentaram como metil-hidroxi-quercetina e para as agliconas das substâncias **3C**, **6C**, **8C**, **9C**, **11C** e **17C-19C** que se apresentaram como metil-hidroxi-kaempferol. Estes resultados estão de acordo com dados da literatura, que confirmaram a presença de derivados da quercetina e da galeína em várias espécies de *Paepalanthus* (Andrade *et al.*, 1999), e que, em particular, identificaram a quercetina e seus derivados glicosilados 6- e 7-metil eter como marcadores taxonômicos para as espécies de *Paepalanthus* (Vilegas *et al.*, 1999).

O cromatograma apresentado na Figura 4 evidenciou ainda a existência de flavonoides contendo dois grupos estruturais distintos: um contendo um grupo coumaroil (**18C**, $t_r = 36$ min) e outro contendo um grupo feruloil (**19C**, $t_r = 37,3$ min). Esta hipótese pôde ser sugerida devido a relatos na literatura da presença de flavonoides glicosilados contendo grupos acilas em diversas espécies de *Paepalanthus* (Andrade *et al.*, 1999; Santos *et al.*, 2002).

O cromatograma da Figura 4 evidenciou ainda um pico minoritário com $t_r = 24$ min. que apresentou um espectro de massas com $[M-H]^-$ m/z 1247 Da. para a substância **12C**. Mediante as informações obtidas dos espectros multiestágios ESI-MSⁿ, para a substância **12C**, sugerimos a sua natureza flavonoídica dimérica. O espectro ESI-MS² evidenciou íon majoritário $[(M-316)-H]^-$, originado provavelmente da perda de uma aglicona (uma galeína), e de um íon minoritário a m/z 623, obtido da perda de 308 Da. do mesmo íon $[(M-316)-H]^-$, confirmado no espectro de ESI-MS³. A hipótese estrutural do flavonóide dímérico foi observada no espectro ESI-MS³ que mostrou o íon produto $[(M-316-308)-H]^-$ a m/z 623 e um íon principal a m/z 315, provavelmente devido à presença de uma segunda aglicona, originada da perda neutra consecutiva de 146 e 162 Da..

Finalmente, a análise dos espectros ESI-MSⁿ registrados para os picos cromatográficos **10C**, **14C-16C** evidenciaram que se tratava de substâncias pertencentes à

Compostos fenólicos de Paepalanthus geniculatus (Eriocaulaceae).

classe das naftopiranonas. De fato, os padrões de fragmentações obtidos mostravam evidências de íons correspondentes às agliconas de naftopiranonas (A) que são caracterizados principalmente pela presença de íons produtos [(A-15)-H]⁻ e de outros íons produtos minoritários formados da perda de moléculas neutras (CO e H₂) e fragmentos radicalares (CH₃[•] e H[•]).

4.2 Purificação e identificação das estruturas (1C-19C)

Com a finalidade de confirmar as estruturas das substâncias observadas nos espectros de massas, as substâncias foram isoladas e os espectros de RMN (mono e bi-dimensionais) foram registrados. O extrato metanólico dos capítulos de *Paepalanthus geniculatus* foi fracionado por GPC em coluna de Sephadex LH-20 e as frações obtidas foram purificadas por HPLC-UV fornecendo dezenove substâncias (1C-19C). Análises dos espectros de RMN e de massas destas substâncias em comparação com a literatura permitiram identificar oito substâncias: a patuletina 3-*O*-β-D-rutinosídeo (2C) (Thomas and Mabry, 1968), o 6-metoxikaempferol-3-*O*-β-D-glicopiranosil-(2→1)-*O*-α-L-raminopiranosídeo (3C) (Bonina *et al.*, 2002), a patuletina 3-*O*-β-D-glicopiranosídeo (4C) (Thomas and Mabry, 1968), o 6-metoxikaempferol-3-*O*-β-D-glicopiranosil-(6→1)-*O*-α-L-raminopiranosídeo (6C) (Bertrand *et al.*, 2001), 6-metoxikaempferol-3-*O*-β-D-glicopiranosídeo (8C) (Andrade *et al.*, 2002), pepalantina 9-*O*-β-D-glicopiranosil-(6→1)-*O*-β-D-glicopiranosídeo (14C) (Piacente *et al.*, 2001), a pepalantina 9-*O*-β-D-glicopiranosil-(6→1)-*O*-β-D-alopiranosídeo (15C) (Vilegas *et al.*, 1998), e o 6-metoxikaempferol-3-*O*-β-D-(6"-*p*-cumaroil)-glicopiranosídeo (18C) (Andrade *et al.*, 1999). Análises dos experimentos RMN mono- e bidimensionais, juntamente com as informações dos espectros ESI-MSⁿ, permitiram identificar onze substâncias inéditas.

As discussões das elucidações/identificações das substâncias foram agrupadas em classes: derivados da quercetina que apresentam metoxila na posição 7 (Grupo I); derivados da quercetina que apresentam metoxila na posição 6 (Grupo II); derivados da quercetina que apresentam metoxila na posição 6 e açúcar acetilado (Grupo III); derivados do kaempferol que apresentam metoxila na posição 6 (Grupo IV); derivados do kaempferol que apresentam metoxila na posição 6 e açúcar acetilado (Grupo V); flavonóides acil glicosilados (Grupo VI); naftopiranonas (Grupo VII) e flavonóide glicosilado ciclodimérico (Grupo VIII).

4.3 Discussão e determinação das estruturas 1C-19C

4.3.1 Grupo I - Derivado da quercetina que apresentam metoxila na posição 7.

Substância (1C)

A substância **1C** foi obtida na forma de pó de cor amarela e apresentou rotação específica $[\alpha]_D = -20,3$ ($c=0,1$, CH_3OH , 23°C).

O espectro de RMN ^1H (Figura 28 e Tabela 8) da substância **1C** evidencia sinais na região de alta frequência, característicos de um flavonóide derivado da quercetina (Harborne, 1986). Os sinais em δ 7,72 (1H, *d*, $J = 1,9$ Hz) e em δ 7,67 (1H, *dd*, $J = 1,9, 8,5$ Hz) foram atribuídos aos H2' e H6' respectivamente, enquanto que o sinal em δ 6,92 (1H, *d*, $J = 8,5$ Hz) foi atribuído ao H5', caracterizando o anel B do núcleo flavonoídico tetrassubstituído. O sinal em δ 6,79 (1H, *s*) foi atribuído ao H-8 do anel A, confirmando a aglicona da hidroxiquercetina. O espectro de RMN ^1H evidenciou em δ 4,02 (3H, *s*) sinais correspondentes aos hidrogênios metoxílicos (Tabela 8). O grupo metoxila foi localizado no C-7 em função da correlação no HMBC (Figura 30) entre o sinal do hidrogênio em δ 4,02 com o carbono em δ 155,7 (C-7). Além disso, o espectro de RMN ^1H exibiu sinais de dois hidrogênios anoméricos: um em δ 5,16 (1H, *d*, $J = 8,8$ Hz) e outro em δ 4,54 (1H, *d*, $J = 1,2$ Hz) (Tabela 8), sugerindo que esta substância possui duas unidades de açúcares. Os deslocamentos químicos de todos os hidrogênios individuais das unidades de açúcares foram atribuídos a partir da análise do espectro do experimento COSY (Figura 31 e Tabela 8). Os deslocamentos químicos de RMN ^{13}C puderam ser atribuídos a partir dos espectros HSQC (Figura 29) e HMBC (Figuras 30) (Tabela 8). Estes dados mostraram a presença de unidades de β -glicopiranosídeo e α -raminopiranosídeo. As configurações *D*- da unidade da glicose e a *L*-da unidade da raminose foram estabelecidas após a hidrólise de **1C**, seguida por análise de CG (De Marino *et al.*, 2003). As ligações interglicosídicas da aglicona de **1C** foram determinadas pelos experimentos HMBC (Figura 30) que mostraram correlações a longa distância entre o sinal do hidrogênio anomérico em δ 5,16 (H-1_{glc}) com o carbono em δ 135,5 (C-3), e entre o sinal do hidrogênio anomérico em δ 4,54 (H-1_{ram}) com o carbono em δ 68,4 (C-6_{glc}).

O espectro ESI-MSⁿ (Figura 32) no modo negativo de **1C** mostrou o íon da molécula desprotonada em m/z 639 $[\text{M}-\text{H}]^-$. Análise do espectro ESI-MS² (Figura 32) deste último permitiu evidenciar a presença de um íon produto principal em m/z 331, atribuído à aglicona

originado pela perda de 308 Da., provavelmente devido à perda neutra de duas unidades de açúcares. De acordo com os mecanismos de fragmentações descritos, a detecção dos íons diagnosticados dos íons produtos de m/z 181, 209, 223 e 316 no espectro ESI-MS³ e do íon [(M-308)-H]⁻ sugeriram para **1C** a aglicona da hidroxiquercetina, em particular com o grupo metila localizado no anel-A. Assim, **1** foi determinado como sendo 6-hidroxi-7-metoxiquercetina-3-*O*- β -*D*-glicopiranosil-(6 \rightarrow 1)-*O*- α -*L*-raminopiranosídeo (Figura 6). Esta substância já foi identificada em várias espécies do gênero *Paepalanthus* (*Paepalanthus argentus*, *Paepalanthus lalipes*, *Paepalanthus vellozioides*). (Dokkedal, 2000). Não há dados espectrais desta substância na literatura.

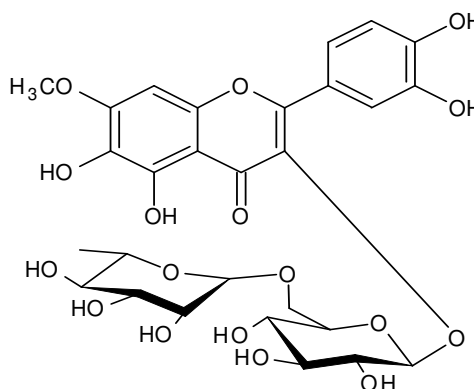


Figura 6 - Estrutura da Substância **1C**

4.3.2 Grupo II - Derivados da quercetina que apresentam metoxila na posição 6.

As substâncias **2C** e **4C** também apresentaram sinais característicos de um flavonóide derivado da quercetina, porém com uma metoxila na posição 6 do flavonóide. Iniciaremos a discussão da elucidação estrutural dessas substâncias pela substância **4C**.

Substância (**4C**)

Análise do espectro de RMN de ¹H da substância **4C** também apresentou sinais característicos de um derivado da quercetina. Foram observados os sinais dos hidrogênios do anel B do flavonóide na região de alta frequência sendo: em δ 7,74, (1H, *d*, $J = 1,9$ Hz) referente ao H2'; em δ 7,68 (1H, *dd*, $J = 1,9$ e 8,5 Hz) referente ao H6' e em δ 6,90 (1H, *d*, $J = 8,5$ Hz) referente ao H5'. O sinal referente ao H-8 do anel A apresentou-se mais blindado, em δ 6,55 (1H, *s*) quando comparado ao deslocamento químico do H-8 da substância **1C** (δ 6,79). Os sinais dos hidrogênios do grupo metoxila de **4C** também apresentaram-se mais blindados δ

3,93 (3H), quando comparados aos hidrogênios da metoxila da substância **1C** (δ 4,02, *s*), evidenciando que a metoxila da substância **4C** não poderia estar localizada em C-7. Análises dos espectros de HMBC possibilitaram atribuir os hidrogênios da metoxila na posição C-6 da aglicona. Observou-se ainda o sinal do hidrogênio anomérico em δ 5,14 (1H, *d*, $J = 8,8$ Hz) que foi atribuído à glicose com configuração em β (Tabela 8).

O espectro ESI-MSⁿ no modo negativo de **4C** mostrou o íon da molécula desprotonada em m/z 493 [M-H]⁻. Análise do espectro ESI-MS² deste último permitiu evidenciar a presença de um íon produto principal em m/z 331, atribuído à aglicona [(M-162)-H]⁻. ESI-MS³ de m/z 493 originou o fragmento em m/z 316, provavelmente devido à perda de uma metila [(M-162-15)-H]⁻.

Comparação dos dados de RMN de ¹H da substância **4C** com dados da literatura (Santos *et al.*, 2001b) levou-nos à identificação da 6-metoxiquercetina-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo (Figura 7). Flavonóides 6-metoxilados são importantes marcadores taxonômicos do gênero *Paepalanthus*. Santos *et al.* (2001b), isolaram esta substância de varias espécies de *Paepalanthus* sect. *Actinocephalus*.

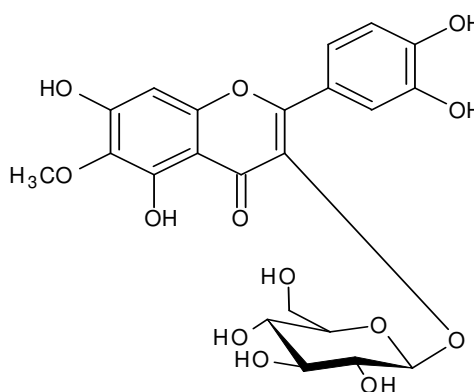


Figura 7 - Estrutura da substância **4C**

Substância (2C)

O espectro de RMN ¹H da aglicona da substância **2C** (Tabela 8) mostrou-se semelhante ao das substância **4C**, evidenciando que esta substância também é um derivado da quercetina com uma metoxila na posição C-6 do flavonóide. Análises dos espectros de RMN ¹H (4,54) de **2C**, quando comparados ao espectro de RMN de ¹H de **1C**, apresentam-se

semelhantes, confirmando que o açúcar da substância **2C** é uma glicose e o sinal de $^1\text{H } \delta$ (0,89) possibilitou confirmar uma segunda unidade de açúcar como uma raminose.

O espectro ESI-MSⁿ no modo negativo de **2C** mostrou o íon da molécula desprotonada em m/z 639 $[\text{M-H}]^-$. Análise do espectro ESI-MS² permitiu evidenciar a presença de um íon produto principal em m/z 493, atribuído à perda de uma unidade de raminose $[(\text{M}-146)\text{-H}]^-$. ESI-MS³ de m/z 639 originou o fragmento em m/z 331, devido à perda de uma raminose e uma glicose $[(\text{M}-146-162)\text{-H}]^-$, originando a aglicona. Finalmente ESI-MS⁴ de **2C** originou o fragmento em m/z 316 $[(\text{M}-146-162-15)\text{-H}]^-$, comprovando que esta substância também possui uma metoxila.

Portanto, esta substância, após comparação com dados da literatura, foi determinada como sendo a 6-metoxiquercetina-3-*O*- β -D-glicopiranosil-(6 \rightarrow 1)-*O*- α -L-raminopiranosideo (Figura 8). Esta substância foi descrita em várias espécies do gênero *Paepalanthus* (Andrade *et al.*, 2001, Santos *et al.*, 2001b)

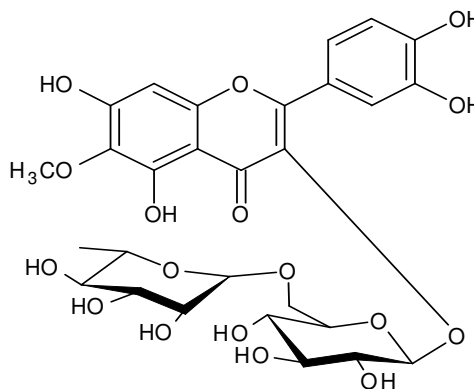


Figura 8 – Estrutura da substância **2C**

4.3.3 Grupo III - Derivados da quercetina que apresentam metoxila na posição 6 e açúcar acetilado.

Os espectros de RMN de ^1H de **5C**, **7C** e **13C** apresentaram-se semelhantes aos de **2C** e **4C**, quanto à região da aglicona, evidenciando que estas substâncias são derivados da quercetina, com uma metoxila na posição 6. Porém, observamos diferenças nos espectros de RMN de ^1H destas substâncias quanto à região dos açúcares, como discutidos a seguir.

Substância (5C)

A substância **5C** foi obtida na forma de pó de cor amarela e apresentou rotação específica $[\alpha]_D = -15,7$ ($c = 0,15$, CH_3OH , 23°C).

No espectro de RMN de ^1H de **5C** (Figura 33 e Tabela 8), sinal em δ 2,11 (s) foi atribuído ao grupo acetil. Os deslocamentos quirais de RMN de ^1H na região dos açúcares de **5C** foram semelhantes aos de **1C**, evidenciando que o açúcar ligado à aglicona é uma glicose com configuração em β . Na região de baixa frequência, um segundo hidrogênio anomérico foi observado, em δ 4,53 (1H, *d*, $J = 1,2$ Hz), comprovando tratar-se de um diglicosídeo. Análise detalhada do espectro de RMN de ^1H (Figuras 33) possibilitou atribuir estes sinais como sendo uma raminose com configuração α , devido à constante de acoplamento do hidrogênio anomérico ($J = 1,2$ Hz) e ainda à presença do sinal de uma metila em δ 1,17 (3H, *d*, $J = 6,5$ Hz). Na região de baixa frequência, um sinal em δ 4,80 foi atribuído ao hidrogênio H-2_{ram}, indicativo de que a hidroxila desta posição da raminose encontrava-se substituída (Tabela 8). A atribuição de cada hidrogênio com seu respectivo carbono foi feita mediante experimentos HSQC (Figura 34). No mapa de correlação de HMBC (Figura 35), observou-se que os sinais dos hidrogênios em δ 4,80 (H-2_{ram}) e 2,11 (grupo acetil em C-2_{ram}) apresentavam correlações 3J e 2J , respectivamente, com o carbono em δ 172,6, confirmando assim, a presença de um grupo acetila em C-2_{ram}. A sequência do sistema de spins dos hidrogênios foi determinada mediante experimento COSY (Figura 36).

O espectro ESI-MSⁿ no modo negativo de **5C** (Figura 37) foi caracterizado pelo pico do íon em m/z 681 referente ao íon $[\text{M}-\text{H}]^-$. O espectro ESI-MS² forneceu um pico abundante em m/z 639, formado pela perda neutra de 42 Da., correspondendo a um grupo acila. A existência de duas hexoses foi confirmada devido à presença de dois outros íons minoritários, um em m/z 493 e outro em m/z 331, correspondendo às duas perdas neutras consecutivas de 146 e 162 Da., respectivamente. O espectro ESI-MS³ registrado para o íon produto em m/z 639 indicou padrão de fragmentação semelhante a **1C**. Este resultado foi confirmado pela análise da ESI-MS⁴ do íon produto em m/z 331, que mais uma vez apresentou o mesmo íon produto principal obtido a partir da aglicona **1C**, pelos mecanismos de fragmentações descritos. Portanto, a substância **5C** foi determinada como o novo 6-metoxiquercetina-3-*O*- β -D-glicopiranosil-(6 \rightarrow 1)-*O*- α -L-2-*O*-acetilraminopiranosídeo (Figura 9).

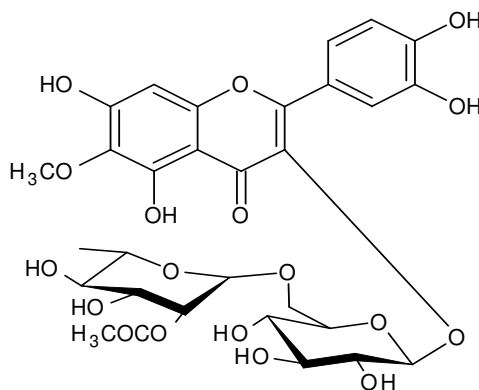


Figura 9 - Estrutura da substância **5C**

Substância (7C)

A substância **7C** foi obtida na forma de pó de cor amarela e apresentou rotação específica $[\alpha]_D = -25,6$ ($c=0,1$, CH_3OH , 23°C).

A substância **7C** também apresentou semelhanças nos espectros de RMN de ^1H com os das substâncias **2C**, **4C** quanto à região de deslocamentos químicos dos hidrogênios da aglicona, (Tabela 8). A existência de uma glicose e uma raminose em **7C** foi confirmada pela análise dos espectros de RMN de ^1H na região dos açúcares, que, quando comparados aos da substância **5C** (Figura 33), mostraram-se semelhantes.

Os espectros de HSQC (Figura 39) possibilitaram também atribuir as correlações diretas de hidrogênios e carbonos de **7C** (Tabela 8). No espectro HMBC (Figura 40), o hidrogênio em δ 3,73 (1 H, *dd*, $J = 1,2$ e $3,2$ Hz) apresentou correlação 3J com o carbono em δ 71,9 atribuídos ao H-2_{ram} e C-2_{ram} , respectivamente. Estes sinais apresentaram-se mais blindados do que H-2_{ram} e C-2_{ram} da substância **5C**. O espectro de RMN de ^1H evidenciou também que o hidrogênio em δ 4,82 (1H, *t*, $J = 4,7$ Hz) apresenta correlação 3J com o carbono em δ 74,9, atribuídos ao H-4_{ram} e C-4_{ram} , respectivamente. Quando comparados aos deslocamentos químicos da raminose da substância **5C**, verifica-se que os valores de hidrogênio e carbono para a substância **7** estão mais blindados, evidenciando que C-4_{ram} possui uma acetilação e que a hidroxila em C-2_{ram} encontra-se livre. Os sinais de hidrogênios em δ 4,82 (H-4_{ram}) e δ 2,04 (hidrogênios da metila do grupo acetila) mostraram correlações no espectro HMBC com o carbono do grupo carboxílico em δ 172,8, confirmando a localização

da função de acetila em C-4_{ram}. O espectro COSY (Figura 41) confirmou a sequência do sistema de spins dos hidrogênios dos açúcares.

A análise do espectro ESI-MSⁿ no modo negativo de **7C** (Figura 42) permitiu prontamente atribuir-lhe o mesmo valor de *m/z* de **5C**. Injeção do extrato bruto por HPLC/ESI-MSⁿ (Figura 4) e co-injeção das substâncias isoladas **5C** e **7C**, possibilitou verificar que a substância **5** eluiu em *t_r* = 20,04 minutos enquanto que a substância **7C** eluiu com 21,04 minutos. Com estas informações foi possível definir que as substâncias **5C** e **7C** são isômeros, sendo diferentes pela posição do grupo acetila nas unidades dos açúcares. Assim, com os dados apresentados, a estrutura da substância **7C** foi estabelecida como o novo 6-metoxiquercetina-3-*O*-β-D-glicopiranosil-(6→1)-*O*-α-L-4-*O*-acetilraminopiranosideo (Figura 10).

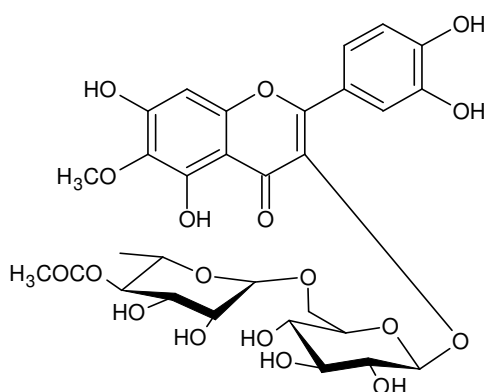


Figura 10 - Estrutura da substância **7C**

Substância (13C)

A substância **13C** foi obtida na forma de pó de cor amarela e apresentou rotação específica $[\alpha]_D = -15,8$ (*c* = 0,1, CH₃OH, 23°C).

Os espectros de RMN de ¹H, HSQC e HMBC (Figura 63 e 64) de **13C** são semelhantes aos de **5C** e **7C**. Contudo, apresentou um sinal adicional em δ 2,04 correspondente a um segundo grupo acetila e alteração na segunda unidade sacarídica. O deslocamento químico observado para H-4_{ram} em δ 4,74 é indicativo da substituição de um grupo hidroxila (Tabela 8). O experimento COSY (Figura 65) confirmou as posições de H-2_{ram} e H-4_{ram} como acetiladas.

A natureza diacetilada da substância **13C** pode ser verificada pela análise dos espectros ESI-MSⁿ (Figura 66) registrados para os íons em m/z 723 [M-H]⁻ ESI-MS² e em m/z 681 [M-H-42]⁻ ESI-MS³, respectivamente, ambas mostrando como pico do íon principal formado pela perda neutra de 42 Da. Além disso, a análise deste espectro ESI-MS³ sugeriu também a presença de duas unidades de açúcares, pela observação dos íons produto em m/z 493 e 331, originadas por perdas consecutivas neutras de 146 e 162 Da. Finalmente, ESI-MS⁵ gerou o íon da aglicona em m/z 331 indicativos de uma estrutura do tipo metil-hidroxi-quercetina, com base na presença de íons produto oriundos do mecanismo de fragmentação por RDA, bem como pelos mecanismos de quebra envolvendo o anel-B. Assim, a estrutura da substância **13C** foi estabelecida como o novo 6-metoxiquercetina-3-*O*- β -*D*-glicopiranosil-(6 \rightarrow 1)-*O*- α -*L*-2,4-di-*O*-acetilaminopiranosideo (Figura 11).

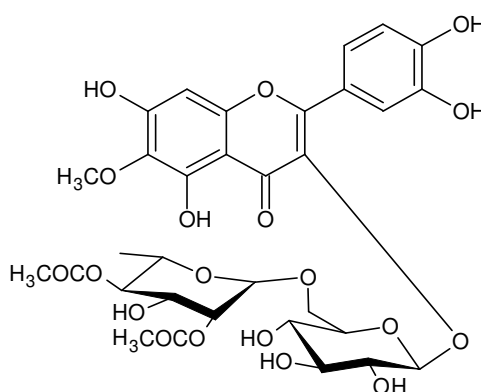


Figura 11 – Estrutura da substância **13C**

Grupo IV - Derivados do kaempferol que apresentam metoxila na posição 6.

As substâncias **3C**, **6C**, **8C**, **9C**, **11C**, **17C**, **18C** e **19C** foram caracterizadas como sendo derivadas do kaempferol, apresentando em comum uma metoxila na posição C-6 do flavonóide.

Substância (**8C**)

O espectro de RMN de ¹H da substância **8C** apresentou sinais de hidrogênios acoplados em *meta* sendo um em δ 8,10 (2 H, *d*, $J = 8,5$ Hz) referente H2'/6' e outro em δ 6,90 (2 H, *d*, $J = 8,5$ Hz) referentes a H3'/5', evidenciando que o anel B do flavonóide é mono-oxigenado. Observou-se ainda o sinal do hidrogênio em δ 6,56 que foi atribuído ao H-8, evidenciando

que o anel A do flavonóide é pentassubstituído. O sinal em δ 5,30 (1H, *d*, $J = 8,8$ Hz) foi atribuído ao hidrogênio anomérico de uma glicose com configuração em β .

O espectro ESI-MSⁿ no modo negativo de **8C** mostrou o íon da molécula desprotonada em m/z 477 [M-H]⁻. Análise do espectro ESI-MS² deste último permitiu evidenciar a presença de um íon produto principal de m/z 315, atribuído a perda de uma unidade de glicose [(M-162)-H]⁻. ESI-MS³ de m/z 477 originou o fragmento em m/z 300, devido à perda de uma metila [(M-162-16)-H]⁻, originando a aglicona do kaempferol. Comparação destes dados com os da literatura (Andrade *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2002) permitiu identificar esta substância como 6-metoxikaempferol-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo (Figura 12).

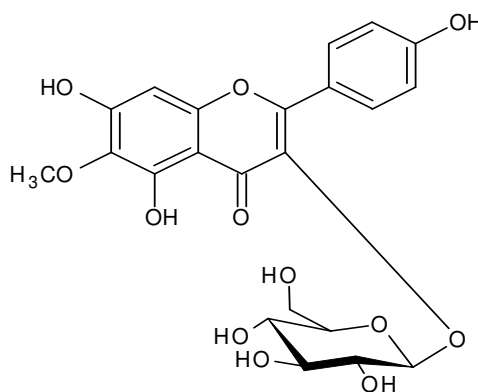


Figura 12 - Estrutura da substância **8C**

Substância (3C)

Os espectros de RMN ¹H de **3C** e **8C** mostraram-se semelhantes, sendo diferenciados apenas pela presença dos sinais de um hidrogênio anomérico em δ 5,26 (1H, *d*, $J = 1,0$ Hz) e dos deslocamentos químicos dos hidrogênios de uma metila em δ 0,80 (3H, *s*) da substância **3C** que foram atribuídos à uma raminose. O deslocamento químico do C-6 da glicose (δ 62,2) também é uma evidência de que a hidroxila na posição C-6 da glicose não está substituída (Tabela 8). Análise do espectro HMBC possibilitou atribuir a ligação da raminose na posição C-2 da glicose.

O espectro ESI-MSⁿ no modo negativo de **3C** mostrou o íon da molécula desprotonada em m/z 623 [M-H]⁻. Análise do espectro ESI-MS² deste último permitiu evidenciar a presença de um íon produto em m/z 477, atribuído à perda de uma unidade de raminose [(M-146)-H]⁻. ESI-MS³ de m/z 623 originou o íon produto de m/z 315 referente à perda consecutiva de uma

raminose e uma glicose [(M-146-162)-H]⁻. ESI-MS⁴ de *m/z* 623 originou o fragmento em *m/z* 300 [(M-146-162-15)H]⁻, evidenciando também que esta substância é um derivado do kaempferol. Comparação destes dados com os da literatura (Bonina, 2002) confirmam que esta substância é o 6-metoxikaempferol-3-*O*-β-D-glicopiranosil-(2→1)-*O*-α-L-raminopiranosídeo (Figura 13). Derivados do 6-metoxikaempferol contendo glicose e raminose são comuns em espécies de *Paepalanthus*, porém contendo glicose ligada à raminose na posição (2→1) ainda não foram descritos em espécies do gênero.

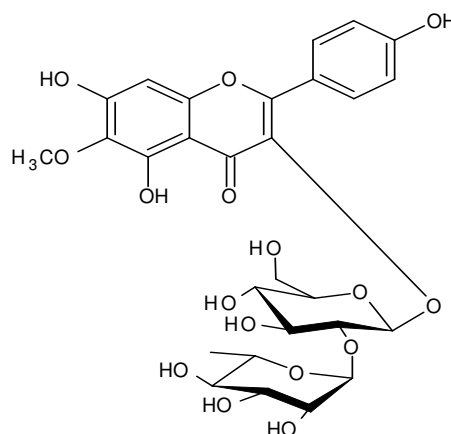


Figura 13 - Estrutura da substância **3C**

Substância (6C)

Análise do espectro de RMN de ¹H da substância **6C** evidenciou tratar-se também de um derivado do kaempferol semelhante a substância **3C**. Todos os deslocamentos químicos dos hidrogênios de **6C** e de **3C** apresentaram-se semelhantes, com exceção do deslocamento químico do C-6_{glc} da substância **3C** em δ 68,2 (mais desblindado) indicando que a hidroxila de C-6 da glicose encontrava-se substituída.

Neste espectro observou-se também que o hidrogênio H-1_{ram} da substância **6C** apresentou-se mais blindado (δ 4,54) que o hidrogênio H-1_{ram} da substância **3C** (δ 5,26), enquanto que os deslocamentos químicos de H-2_{ram} de **3C** (δ 4,03) apresentaram-se mais desblindados que H-2_{ram} de **6C** (δ 3,65) (Tabela 8), evidenciando que a raminose de **3C** possui a hidroxila da posição C-6_{ram} substituída.

Os espectros de ESIMS de **3C** foram semelhantes ao da substância **6C**, evidenciando tratar-se de dois isômeros. Esta substância foi determinada como 6-metoxikaempferol-3-*O*-β-

D-glicopiranosil-(6→1)-O- α -L-raminopiranosídeo (Figura 14), muito comum em espécies *Paepalanthus*.

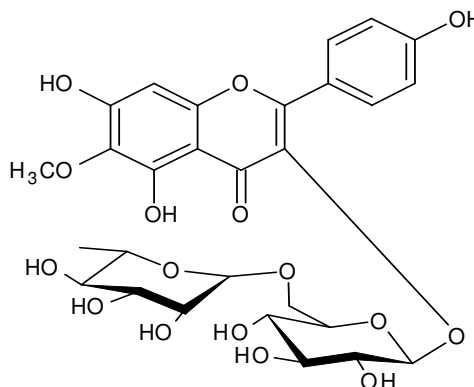


Figura 14 – Estrutura da substância **6C**

Grupo V – Derivados do kaempferol que apresentam metoxila na posição 6 e acetilação no açúcar.

Substância (9C)

A substância **9C** foi obtida na forma de pó de cor amarela e apresentou rotação específica $[\alpha]_D = -15,4$ ($c=0,1$, CH_3OH , 23°C).

O espectro de RMN de ^1H , da substância **9C** (Figura 43) mostrou dois sinais: um em δ 8,09 (2H, d , $J = 8,5$ Hz) e outro em δ 6,91 (2H, d , $J = 8,5$ Hz), correspondentes aos hidrogênios H2'/H6' e H3'/H5' do anel B e um sinal em δ 6,56 (1H, s) atribuído ao H-8 do anel A, indicando tratar-se de um derivado do kaempferol (Tabela 8). O sinal em δ 3,91 (3H, s), foi atribuído a um grupo metoxila, e o sinal em δ 2,11 (3H, s) foi atribuído a um grupo acetila. O grupo metoxila foi localizado em C-6, em função da correlação HMBC (Figura 45) entre o sinal do hidrogênio em δ 3,91 que apresentou correlação com o carbono em δ 132,7. No espectro de RMN ^1H de **9C** a região do açúcar foi semelhante à de **5**, mostrando uma unidade 2-*O*-acetilraminopiranosídeo ligado à função álcool secundário de uma unidade glicopiranosídeo. Esta unidade de açúcar estava ligada, como sugerido pela correlação HMBC (Figura 45), na posição **3C** da aglicona. A atribuição de cada hidrogênio com seu respectivo carbono foi feita mediante experimentos HSQC (Figura 44) e a sequência do sistema de spins dos hidrogênios foi realizada mediante experimento COSY (Figura 46).

Análise do espectro de ESI-MS² no modo negativo (Figura 47), evidenciou o íon em m/z 665 Da., correspondente ao íon $[M-H]^-$ da substância **9C**. As perdas consecutivas neutras de 42, 146 e 162 permitiram definir que a substância **9C** possui duas hexoses e uma acetilação.

O padrão de fragmentação da aglicona indica o íon da molécula desprotonada em m/z 315 $[M-H]^-$, referente à estrutura da aglicona metil-hidroxiikaempferol, destacado pela presença da fragmentação RDA em m/z 181, juntamente com o íon em m/z 195, produzido pela perda neutra de 120 Da. de um formilciclohexadienona, e o íon produto em m/z 300, devido à perda de um grupo metila radicalar. Com este perfil de espectro de massas foi possível localizar o grupo metoxila no anel-A da aglicona.

Portanto, o substância **9C** foi determinada para como sendo o novo 6-metoxikaempferol-3-*O*- β -D-glicopiranosil-(6 \rightarrow 1)-*O*- α -L-2-*O*-acetilaminopiranosideo (Figura 15).

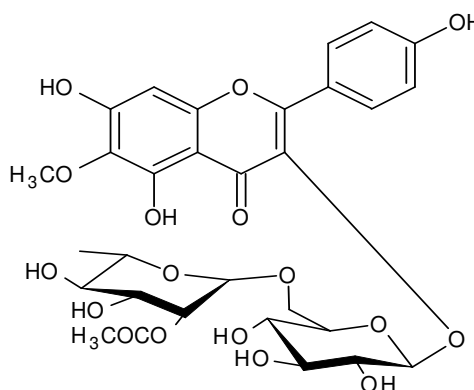


Figura 15 - Estrutura da substância **9C**

Substância (11C)

A substância **11C** foi obtida na forma de pó amorfo de cor amarela e apresentou rotação específica $[\alpha]_D = -40,2$ ($c = 0,1$, CH₃OH, 23°C).

Os deslocamentos químicos de RMN de ¹H da aglicona da substância **11C** (Figura 53) foram sobreponíveis com os de **9C**, enquanto que na região do açúcar foi observada diferença para a localização da função acetila. Pelo experimento RMN de ¹H, a desblindagem do hidrogênio da posição H-4_{ram}, aliada à informação de deslocamento químico do hidrogênio do grupo acetila em δ 2,04, indicativo da acetilação do grupo hidroxila na posição C-4_{ram}. A atribuição

de cada hidrogênio com seu respectivo carbono foi feita mediante experimentos HSQC (Figura 54). Análise do espectro HMBC também possibilitou atribuir a ligação da raminose na posição C-6 da glicose (Figura 55).

Novamente, espectros ESI-MSⁿ (Figura 56) analisados para **11C**, permitindo defini-la como um isômero de **9C**, diferindo desta última apenas pela posição do grupo acetila. Assim, a estrutura da substância **11C** foi estabelecida como o novo 6-metoxikaempferol-3- *O*- β -D-glicopiranosil-(6 \rightarrow 1)-*O*- α -L-6-*O*-acetilraminopiranosideo (Figura 16).

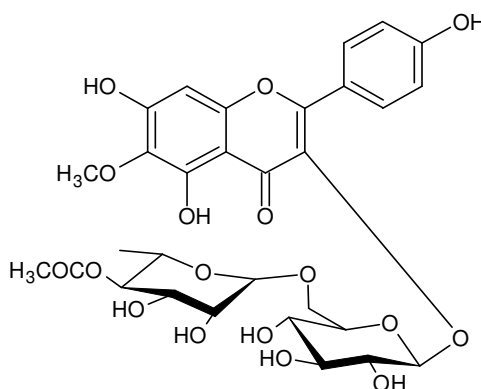


Figura 16 - Estrutura da substância **11C**

Substância (17C)

A substância **17C** foi obtida na forma de pó de cor amarela e apresentou rotação específica $[\alpha]_D = -32,0$ ($c=0,1$, CH₃OH, 23°C).

Os espectros de RMN da substância **17C** (Figura 71) em comparação com as de **9C** mostrou um sinal δ 1,99 (3H, s), correspondendo a um grupo acetila adicional. Os deslocamentos químicos dos hidrogênios anoméricos em δ 5,02 e δ 4,91 sugeriram a acetilação (Tabela 8). Correlações de COSY (Figura 74) entre o hidrogênio anomérico em δ 4,52 da raminose e δ 5,02 que por sua vez apresentam correlação com o sinal em δ 4,91, permitiu localizar os grupos acetilas nas posições C-2_{ram} e C-3_{ram}. A atribuição de cada hidrogênio com seu respectivo carbono foi feita mediante experimentos HSQC (Figura 72). Análise detalhada do espectro HMBC possibilitou atribuir a ligação da raminose na posição C-6 da glicose (Figura 73).

Analogamente a **13C**, a análise dos espectros ESI-MSⁿ de **17C** (Figura 75) forneceu evidências da sua natureza diacetilada. Em particular, o espectro de massas da substância **17C**

gerou o íon produto de m/z 665, por sua vez, mostrando a mesma via de fragmentação de **9C**, **11C** e **13C** contribuíram para sugerir **17C** como a forma acetilada de um deles. Com base nestas evidências, a estrutura da substância **17C** foi estabelecida como o novo 6-metoxikaempferol-3-*O*- β -D-glicopiranosil-(6 \rightarrow 1)-*O*- α -L-2,3-di-*O*-acetilramnopiranosideo (Figura 17).

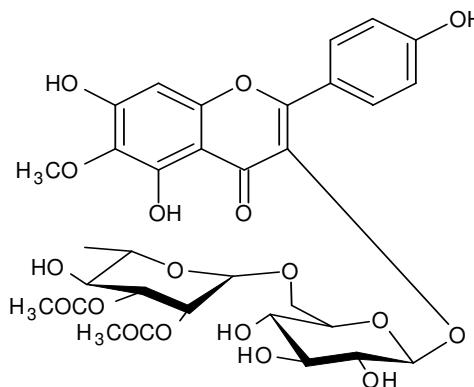


Figura 17 - Estrutura da substância **17C**

4.3.5 Grupo VI – Flavonóides acil glicosilados

Substância (19C)

A substância **19C** foi obtida na forma de pó amorfo de cor amarela e apresentou rotação específica $[\alpha]_D = -32,0$ ($c = 0,1$, CH₃OH, 23°C).

O espectro de RMN de ¹H da substância **19C** (Figura 76) mostrou dois sinais, ambos integrando para dois hidrogênios, a δ 8,03 (2H, *d*, $J = 8,5$ Hz) e 6,85 (2H, *d*, $J = 8,5$ Hz) atribuídos aos hidrogênios do anel B. Os sinais em δ 6,47 (1H, *s*) atribuído ao H-8, e um sinal δ 3,85 (3H, *s*), correspondendo a um grupo metoxila (Tabela 8). Estes dados sugerem uma estrutura de um flavonoide derivado do kaempferol. Experimento HSQC (Figura 77) possibilitou a identificação da aglicona como o 6-metoxikaempferol. No espectro de RMN de ¹H (Figura 76) outros sinais de hidrogênios foram observados em δ 7,10 (1H, *d*, $J = 1,9$), δ 6,84 (1H, *d*, $J = 8,5$ Hz), δ 6,94 (1H, *d*, $J = 1,9, 8,5$ Hz), δ 6,15 (1H, *d*, $J = 16,0$ Hz), e δ 7,43 (1H, *d*, $J = 16,0$ Hz) que foram atribuídos à um grupo feruloil com estereoquímica *trans* (*E*) (Tabela 8). Essa evidência foi confirmada pelas correlações HSQC e COSY (Figuras 77 e 78), respectivamente. O espectro de RMN ¹H exibiu também o sinal de hidrogênio anomérico em δ 5,26 (1H, *d*, $J = 8,8$ Hz). Os experimentos RMN de ¹H, HMBC e COSY, (Figuras 76, 77 e

78) possibilitaram identificar a presença de uma unidade β -glicopiranosídica ligada ao C-3 da aglicona do 6-metoxikaempferol. Os deslocamentos químicos dos hidrogênios das unidades da glicose (δ H 4,31, δ H 4,26) e do carbono δ 63,8) sugeriram que a unidade de *E*-feruloil estava ligada no C-6 da unidade de glicose. A correlação HMBC entre os dois sinais de hidrogênio em δ 4,31 e 4,26 com o carbono carboxílico em δ 168,5 confirmou esta hipótese

A substância **19C** mostrou no espectro ESI-MS² (Figura 79) o íon produto em m/z 477 derivado da perda neutra de 176 Da., provavelmente devido a uma molécula de ácido ferúlico. Portanto, a substância **19C** foi identificada como o novo 6-metoxikaempferol-3-*O*- β -D-(6'''-*E*-feruloil)-glicopiranosídeo (Figura 18).

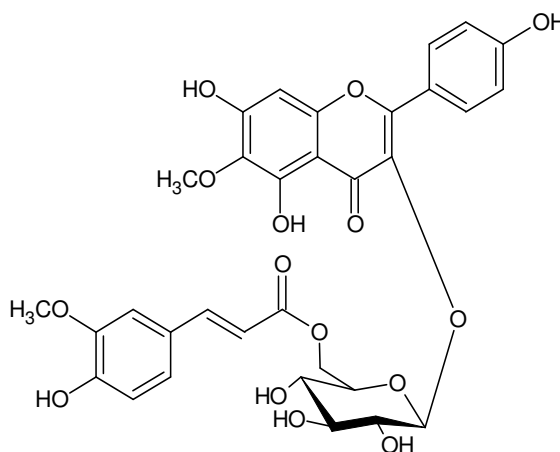


Figura 18 – Estrutura da substância **19C**

Substância (18C)

Os espectros de RMN de ¹H da substância **18C** foram semelhantes aos da substância **19C** (Figura 76). Houve apenas diferenças nos deslocamentos químicos dos hidrogênios referentes à região do ácido ferúlico (para a substância **19C**) enquanto que para a substância **18C**, os deslocamentos químicos em δ 7,35 (2H, *d*, *J* = 8,5 Hz) e δ 6,85 (2H, *d*, *J* = 8,5 Hz) evidenciaram a presença do ácido *p*-cumárico.

O espectro ESI-MS da substância **18C** mostrou o íon da molécula desprotonada em m/z 623 [M-H]⁻. O espectro ESI-MS² de m/z 623 forneceu o íon produto em m/z 459 referente a perda da unidade *p*-cumárico [(M-163)-H]⁻.

Comparação com dados da literatura (Santos *et al.*, 2002) de **18C** possibilitaram estabelecer que esta substância é o 6-metoxikaempferol-3-*O*- β -D-(6'''- *E*-*p*-coumaroil)-glicopiranosídeo (Figura 19).

Como citado anteriormente, flavonóides acil glicosilados já foram descritos em algumas espécies de *Paepalanthus*. Estas estruturas apresentaram tanto uma unidade *p*-coumaroil ligada a uma função secundária alcoólica da glicose da 6-metoxiquercetina-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo e do 6-metoxikaempferol-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo, ou uma unidade *E*-feruloil ligados à CH₂OH da glicose da 6-metoxiquercetina-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo (de Andrade *et al.*, 2001; dos Santos *et al.*, 2002).

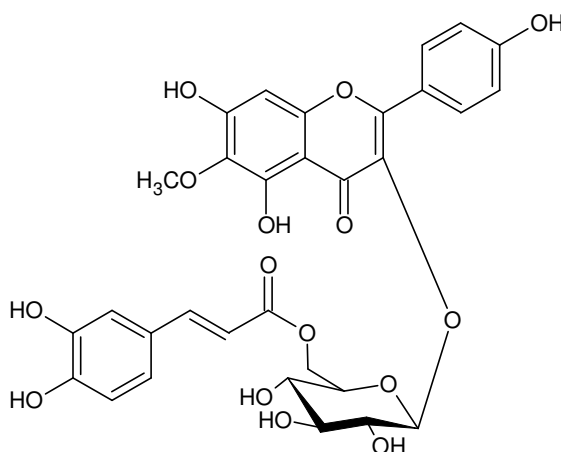


Figura 19 – Estutura da substância **18C**

4.3.6 Grupo VII - Naftopiranonas

O grupo IV contém as substâncias **14C**, **15C**, **10C** e **16C**, apresenta uma classe de substâncias comuns às espécies de *Paepalanthus* conhecidas por naftopiranonas (Vilegas *et al.*, 1989; Santos *et al.*, 2001b; Piacente *et al.*, 2001).

Substância (14C)

O espectro de RMN de ¹H forneceu o perfil básico da molécula: uma aglicona com dois sinais de hidrogênios *meta*-acoplados (1H, *d*, *J* = 1,5 Hz) em δ 7,08 e δ 7,11 e um sinal em δ 6,64 (1H, *s*). É também evidente um sinal δ 2,32 (3H, *d*, *J* = 6,1 Hz), correspondente a um grupo metila, e dois sinais de hidrogênios em região de alta frequência em δ 3,88 (3H, *s*) e δ 4,00 (3H, *s*), correspondentes a dois grupos metoxílicos.

O espectro de RMN de ^1H forneceu os dados que, comparados com valores anteriormente encontrados para a paepalantina (Santos, 2001b), permitiram estabelecer a estrutura da aglicona.

A análise dos experimentos TOCSY feita em duas etapas: 1) Irradiação do hidrogênio anomérico em δ 4,40 mostrando todo o sistema de spin associado a ele e 2) irradiação do hidrogênio anomérico em δ 5,07, mostrando que a ele estão associados outros 6 sinais. A irradiação seletiva nos sinais relativos aos dois hidrogênios anoméricos em δ 5,07 e δ 4,40 (1H , d , $J = 7,5$ Hz) possibilitou individualizar os sistemas de spins de cada glicosídeo, cujas constantes de acoplamento indicam configuração β (Pawan *et al.*, 1992).

O espectro HSQC forneceu as correlações entre os ^1H e ^{13}C da molécula. Especialmente importante é o espectro HMBC, que forneceu as correlações à longa distância. A partir do espectro HMBC verificou-se a correlação entre o sinal de hidrogênio em δ 7,08 (H-8) e os sinais referentes aos carbonos em δ 96,1 (C-6), 111,8 (C-9a), 159,9 (C-9) e 163,6 (C-7); o sinal do hidrogênio em δ 7,11 (H-6) e os carbonos δ 105,2 (C-8), 111,8 (C-9a), 141,1 (C-5) e 163,6 (C-7); o hidrogênio em δ 6,64 (H-4) e o sinal dos carbonos δ 19,4 (C-11), 154,2 (C-3), 99,2 (C-10a), 141,5 (C-5) e 124,7 (C-4a); o sinal da metila em δ 2,32 (CH_3 -11) e o carbono a δ 99,9 (C-4).

A posição do dissacarídeo na aglicona foi estabelecida considerando-se as correlações entre o sinal anomérico δ 5,07 (H-1_{glc'}) e o sinal em δ 159,9 (C-9 da aglicona).

O espectro HMBC também permitiu confirmar a posição dos grupos metoxílicos, mostrando correlações entre os sinais do hidrogênio em δ 4,00 e o C-7 da aglicona (δ 163,6), e entre o sinal do hidrogênio em δ 3,88 e o C-5 da aglicona (δ 141,1).

No espectro HSQC, verificou os sinais relativos a dois hidrogênios (H6a e H6b) de uma unidade de glicose apresentavam correlação com o carbono em δ 70,5. O deslocamento químico (cerca de 8 ppm) com respeito ao C-6 de uma unidade de glicose terminal (Agrawal *et al.* 1989), sugere que a posição 6 de uma das unidades de glicose estava substituída. A Tabela apresenta os valores de ^1H e ^{13}C que foram atribuídos mediante experimentos HSQC e HMBC.

Por outro lado, a correlação do hidrogênio anomérico a δ 4,40 (H-1_{glc''}) e sinal do CH_2 em δ 70,5 (C-6_{glc''}) permitiu confirmar a posição da ligação interglicosídica como (6 \rightarrow 1).

Portanto, a estrutura de **14C** foi determinado como sendo 10-hidroxi-5,7-dimetoxi-3-metil-1H-nafíto [2,3 c] piran-1-ona-9-*O*- β -D-glicopiranosil-(6 \rightarrow 1)-*O*- β -D-glicopiranosídeo (Figura 20).

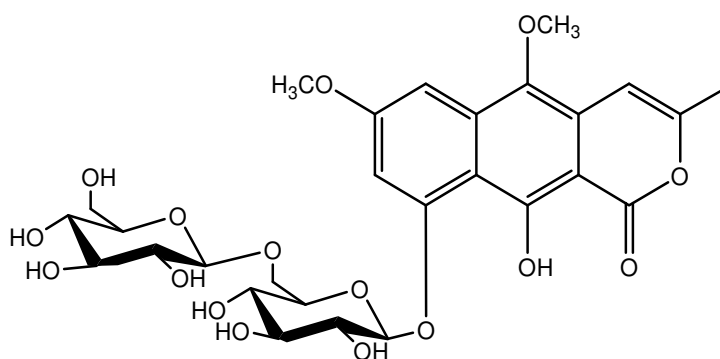


Figura 20 - Estrutura da substância **14C**

Substância (15C)

O espectro de RMN de ^1H de **15C** mostrou-se semelhante ao da substância **14C**, evidenciando tratar-se também de um derivado da paepalantina. As diferenças observadas foram somente para a região do açúcar terminal. As análises dos experimentos TOCSY foram feitas em duas etapas: 1) Irradiação do hidrogênio anomérico em δ 5,08 mostrando todo o sistema de spin associado a ele e 2) irradiação do hidrogênio anomérico em δ 4,75, mostrando que a ele estão associados outros 6 sinais. As irradiações seletivas dos sinais relativos aos dois hidrogênios anoméricos em δ 5,08 e δ 4,75 (d , $J = 7,9$ e $7,4$ Hz) possibilitaram individualizar os sistemas de spins de cada glicosídeo, cujas constantes de acoplamento indicam configuração β (Pawan *et al.*, 1992).

No experimento TOCSY, quando irradiado o hidrogênio em δ 4,75, exibiu interações com os hidrogênios em (δ 3,42 H-2_{alo}; 4,08 H-3_{alo}) evidenciando tratar-se de uma alose. Por outro lado, a correlação do hidrogênio anomérico a δ 4,51 (H-1_{alo}) e sinal do CH₂ em δ 70,2 (C-6_{glc}) permitiu confirmar a posição da ligação interglicosídica como (6 \rightarrow 1). Portanto, a estrutura de **15C** foi determinado como 10-hidroxi-5,7-dimetoxi-3-metil-1H-nafíto [2,3 c] piran-1-ona-9-*O*- β -D-glicopiranosil-(6 \rightarrow 1)-*O*- β -D-alopiranosídeo (Figura 21).

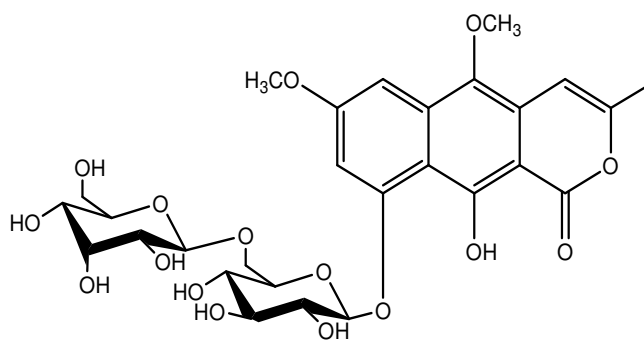


Figura 21 - Estrutura da substância **15C**

Substância (10C)

A substância **10C** foi obtida na forma de pó amorfo de cor amarela e apresentou rotação específica $[\alpha]_D = -70,5$ ($c = 0,1$, CH_3OH , 23°C).

Comparando os sinais de RMN de ^{13}C com a literatura a substância **10C** apresentou 27 sinais, dos quais 12 foram atribuíveis a uma unidade de dissacarídica. O espectro de RMN ^1H (Figura 48) exibiu dois sinais de hidrogênios-*meta* acoplados em δ 7,06 (1H, *d*, $J = 1,5$ Hz), e δ 7,12 (1H, *d*, $J = 1,5$ Hz), um sinal em δ 6,62 (1H, *s*), e integração para três hidrogênios em δ 3,85 correspondente a um grupo metoxila e em δ 2,31 para um grupo metila (Tabela 8). As atribuições de todos os sinais ^1H e ^{13}C foram baseadas em experimentos HSQC (Figura 49), HMBC (Figura 50). O espectro HSQC (Figura 49) e apresentou as correlações de todos os ^1H com os ^{13}C correspondentes, e permitiu deduzir que a estrutura da aglicona de **10C** é semelhante aos da paepalantina, previamente relatados em espécies *Paepalanthus* (Vilegas *et al.*, 1998), exceto pela ausência de um grupo metoxila em C-7. A atribuição da metoxila na posição C-5 foi possível mediante a correlação no espectro HMBC (Figura 50) dos hidrogênios em δ 3,85 com o carbono em δ 140,2. Dados da literatura (Vilegas *et al.*, 1989; Santos *et al.*, 2001b) também demonstraram que quando a posição C-7 da naftopiranona está metoxilada, o deslocamento químico do carbono na posição 7 é de δ 163,6 (mais desblindado), quando comparado ao da naftopiranona **10C** que apresentou deslocamento químico do C-7 em δ 161,5 (mais blindado). O espectro de RMN ^1H (Figura 48) apresentou dois sinais de hidrogênios anoméricos em δ 5,03 (1H, *d*, $J = 8,8$ Hz), e δ 4,48 (1H, *d*, $J = 8,8$ Hz) atribuídos a duas unidades β -glicopiranosídicas. O ponto da ligação da molécula do açúcar da aglicona de **10C**, bem como a posição da ligação interglicosídica foram

determinados pelo experimento HMBC (Figura 50), que mostraram correlações a longa distância entre o sinal de hidrogênio anomérico em δ 5,03 ($H-1_{\text{glc1}}$) e com o do carbono em δ 160,0 (C-9) e entre o sinal do hidrogênio anomérico em δ 4,48 ($H-1_{\text{glc2}}$) e o sinal do carbono em δ 69,6 (C-6 $_{\text{glc1}}$). A sequência do sistema de spins dos hidrogênios foi realizada mediante experimento COSY (Figura 51).

A análise do espectro ESI-MSⁿ (Figura 52) no modo negativo da substância **10C** apresentou o íon produto m/z 611 [M-H]⁻. Sua refragmentação apresentou dois íons produtos: m/z 449 e 287, originados pelas perdas consecutivas neutras de 162 Da., provavelmente duas hexoses. O padrão da fragmentação resultante da análise ESI-MS³ (Figura 52) deste último íon a partir dos espectros obtidos de íons ESIMSⁿ e seu produto sugeriu a estrutura de uma naftopiranona. Destacam-se perdas consecutivas de pequenos fragmentos radiculares (CH₃[•] e H[•]), juntamente com as perdas de moléculas neutras (CO e H₂) (Figura 23). Assim a estrutura de **10C** foi determinada como sendo a nova 7,10-diidroxi-5-metoxi-3-metil-1H-nafto [2,3 c] piran-1-ona-9-O- β -D-glicopiranosil-(6 \rightarrow 1)-O- β -D-glicopiranosídeo (Figura 22).

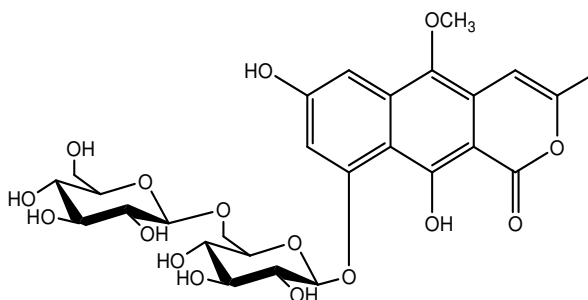


Figura 22 - Estrutura da substância **10C**

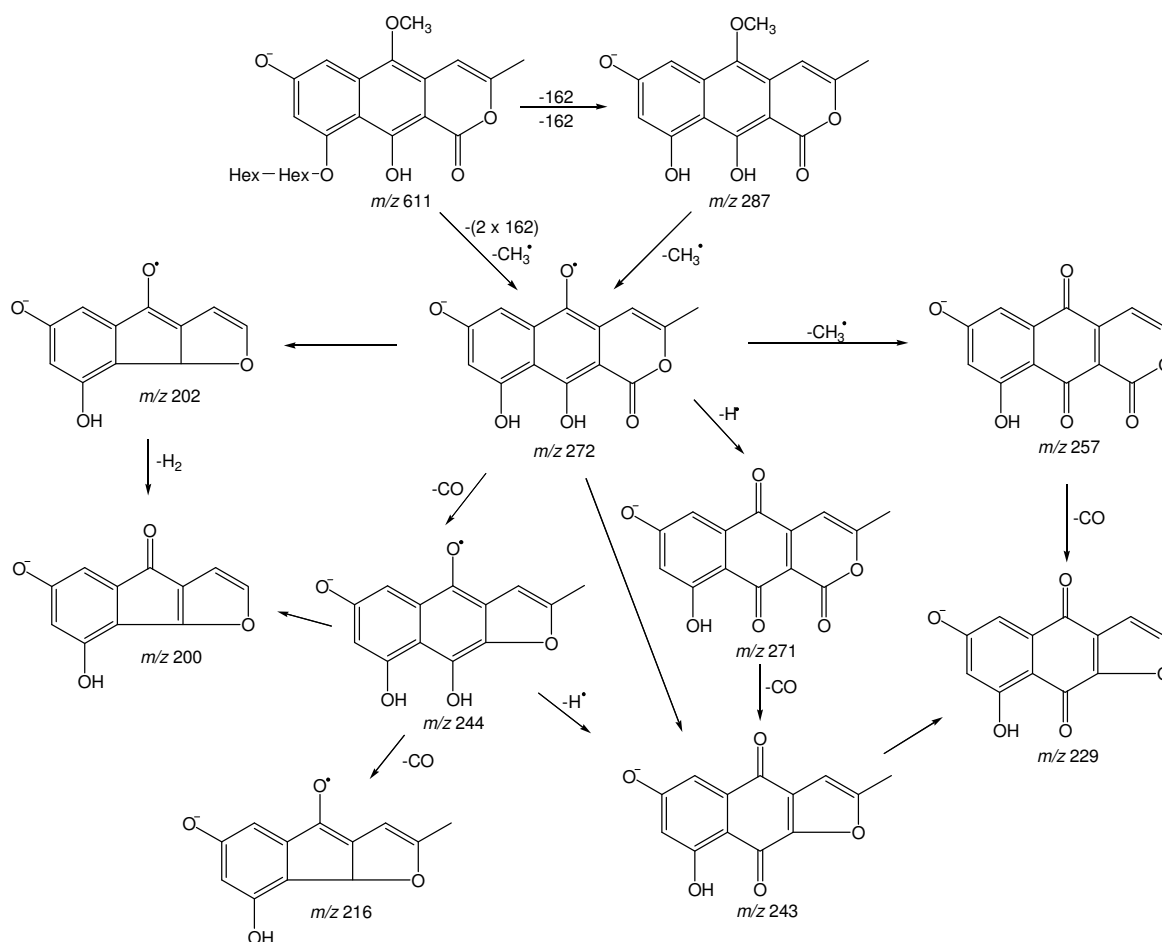


Figura 23 - Padrão de fragmentação das naftopiranas

Substância (16C)

A substância **16C** foi obtida na forma de pó amorfo de cor amarela e apresentou rotação específica $[\alpha]_D = -82,3$ ($c = 0,1$, CH_3OH , 23°C).

O espectro de RMN ^1H (Figura 67) de **16C** quando comparado a de **10C**, apresentou como diferença apenas um sinal de deslocamento químico de hidrogênio anomérico em $\delta 5,15$ (1H, *d*, $J = 8,8$) atribuído a uma unidade β -glicopiranosídeo (Tabela 8).

O espectro de massa ESIMSⁿ (Figura 70) no modo negativo registrado para a substância **16** apresentou o íon da molécula desprotonada em m/z 449 $[\text{M}-\text{H}]^-$. Espectro de MS² do íon em m/z 449 produziu o íon produto principal a m/z 287, provavelmente formado pela perda neutra de uma molécula de hexose. Analogamente a **10C**, análise dos espectros de

massas em múltiplos estágios registrados para este íon e para o seu íon produto m/z 272 foram decisivos para definir que a substância **16C** é derivada de uma naftopiranona.

Análise dos dados de RMN ^1H , HSQC e HMBC (Figuras 67, 68 e 69), permitiu identificar a substância **16C** como uma nova 7,10-diidroxi-5-metoxi-3-metil-1H-nafto [2,3 *c*]piran-1-ona-9-*O*- β -D-glicopiranosídeo (Figura 24).

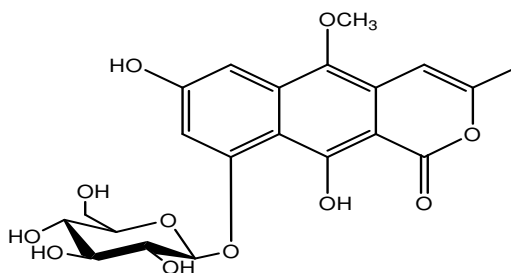


Figura 24 – Estrutura da substância **16C**

4.3.7 VIII - Flavonóide acil glicosilado ciclodimérico

Substância (12C)

A substância **12C** foi obtida na forma de pó amorfo de cor amarela e apresentou rotação específica $[\alpha]_D = -7,4$ ($c = 0,1$, CH_3OH , 23°C).

O espectro de RMN de ^1H da substância **12C** (Figura 57) evidenciou sinais de deslocamentos químicos de hidrogênios na região de alta frequência a δ 8,11 (2H, *d*, $J = 8,6$), δ 7,97 (2H, *d*, $J = 8,5$), 6,80 (2H, *d*, $J = 8,6$ Hz), 6,76 (2H, *d*, $J = 8,5$ Hz), atribuídos aos hidrogênios acoplados em *para* do anel B de um flavonóide, além dos sinais na região de δ 6,32 e δ 6,27, atribuídos aos hidrogênios H-8 dos anéis A do flavonóide. Observamos ainda, dois sinais de hidrogênios correspondentes a grupos metoxílicos em δ 3,87 (3H, *s*) e 3,83 (3H, *s*), (Tabela 8). Na região de hidrogênios anoméricos foram identificados os sinais a δ 5,33 (1H, *d*, $J = 8,8$ Hz) e 5,03 (1H, *d*, $J = 8,8$ Hz), que foram confirmados pelos experimentos COSY, HSQC e HMBC, como sendo duas unidades de β -glicopiranosídeos. Análises detalhadas dos espectros de RMN bi-dimensionais de HSQC, HMBC e COSY confirmaram a presença de duas unidades do 6-metoxikaempferol (Figuras 58, 59, 60).

Os deslocamentos químicos dos hidrogênios metilênicos (desblindados) ligados nas posições C-6 das glicoses, sugeriram que as hidroxilas destas posições estavam aciladas. O espectro de RMN de ^1H indicava ainda a presença de hidrogênios pertencentes às unidades lignânicas, identificadas como di-(4-hidroxifenil)-ciclobutano-dicarboxílico. Em particular, o espectro de RMN de ^1H evidenciou ainda sinais de hidrogênios na região aromática a δ 6,60 (2H, *d*, *J* = 8,5 Hz), 6,56 (2H, *d*, *J* = 8,5 Hz), δ 6,85 (2H, *d*, *J* = 8,5 Hz), 6,66 (2H, *d*, *J* = 8,5 Hz), correspondentes a dois grupos 4-hidroxifenil, e sinais de hidrogênios metínicos a δ 4,07, 3,69, 3,47 e 3,44 (*ddd*, *J* = 10,2; 8,6; 2,3Hz) (Tabela 8), característicos de hidrogênios de um anel ciclobutil tetrasubstituído (Montaudou and Caccamese, 1973). No espectro de HSQC (Figura 58) observa-se os sinais de carbonos a δ 172,2 e 171,4, referentes às carbonilas dos grupos acilas e outros quatro carbonos sp^3 em δ 48,5, 47,2, 41,9 e 40,9. O experimento COSY, mostrou a sequência δ 4,07, 3,47, 3,69, 3,44 e este último sinal correlacionou com o sinal à δ 4,07, confirmando a ocorrência do anel ciclobutano.

O espectro HSQC (Figura 58) apresentou as correlações entre os sinais dos hidrogênios a δ 4,07, 3,47, 3,69, 3,44 com os carbonos correspondentes a δ 40,9, 48,5, 41,9 e 47,2 respectivamente. Com estas informações foi possível deduzir que a unidade acila da substância **12** poderia ser do tipo truxinil ([7/7', 8/8']-lignana) ou do tipo truxilil ([7/8', 8/7'-lignana) (Ben-Efraim and Green, 1974).

As correlações no espectro de HMBC (Figura 59) mostraram que os sinais a δ 48,5 e 47,2 foram atribuídos aos carbonos ligados aos grupos das carboxilas, enquanto que os sinais a δ 41,9 e 40,9 foram atribuídos aos carbonos ligados às unidades 4-hidroxifenil. As correlações dos sinais dos hidrogênios δ 4,07 (H-7''') com o carbono a δ 128,8 (H-2'''/H-6'''); δ 3,69 (H-7''') com o carbono δ 129,4 (H-2'''/H-6''') e ambos os hidrogênios δ 4,07 e 3,69 com os carbonos das carboxilas em δ 173,2 e 171,4 posicionaram as localizações das unidades dos grupos acilas no derivado truxilil (Figura 25A). Esta hipótese foi confirmada também com os experimentos de correlação COSY (Figura 60) que apresentaram correlações entre os hidrogênios a δ 4,07, δ 3,47 e 3,44, e à ausência no espectro ROESY (Figura 61) de correlações entre os sinais dos hidrogênios aromáticos H-2'''/H-6''' do grupo 4-hidroxifenil com os H-2'''/H-6''' do outro grupo 4-hidroxifenil (Figura 25A).

As correlações apresentadas nos espectros HMBC da substância **12C** de ambos os H-7''' com ambos os carbonos dos grupos carboxílicos não deviam estar presentes em um derivado truxinil, (monocaetina utilizada como modelo na Figura 25A). A orientação dos

substituintes do ciclobutano foi estabelecida pelo experimento ROESY (Figura 61), que mostrou que as correlações dos H-2'''/H-6''' a 6,85 com ambos H-7''' e com H-8''' a δ 3,47. Outras correlações foram observadas entre H-2'''/H-6''' (δ 6,60) e ambos H-7''' e com H-8''' a δ 3,47.

As presenças de duas unidades de 6-metoxikaempferol glicosilados ligados ao anel ciclobutânico foram determinadas devido ao deslocamento químico dos hidrogênios observados (desblindados) no anel ciclobutânico, quando confrontados com valores dos hidrogênios correspondentes aos do ácido truxilato (Chi *et al.*, 2006). No entanto, a não equivalência dos sinais de RMN de ^1H foi devido à presença de uma glicose quiral, como apresentado por (El-Ansari *et al.*, 1995) que identificaram um dímero da apigenina-7-O-(6"-*p*-cumaroil)-O- β -D-glicopiranosídeo em um truxinato (Figura 25B).

O espectro de ESI-MS (Figura 62) no modo negativo de **12C** mostrou o íon em m/z 1247 referente à $[\text{M-H}]^-$ evidenciando a natureza dimérica do flavonoide. O espectro ESI-MS² mostrou um íon a m/z 931 referente a $[\text{M}-316-\text{H}]^-$, originário da perda neutra de uma galletina e de um íon minoritário a m/z 623 referente a perda do fragmento 308 Da. O espectro ESI-MS³ do íon m/z 623 forneceu o íon produto majoritário a m/z 315 atribuído a perda de outro fragmento 308 Da., comprovando a natureza dimérica de **12C**, contendo as partes da molécula proposta na Figura 62.

Portanto a substância **12C** foi chamada de geniculatina, representando um dímero formado pelas ligações cabeça-cauda da substância **18C**, formada através de um processo de cicloadição [2 + 2] de dois ácidos cinâmicos. Na literatura são descritos alguns produtos diméricos provenientes de anéis ciclobutânicos derivados de vários ácidos fenilpropanóicos (Isaza *et al.*, 2001). No entanto, são descritos poucos ésteres de diflavonoides de ácidos dicarboxílicos (Horie *et al.*, 1986; Itokawa *et al.*, 1981), entre eles, estão as substâncias isoladas de *Stachys aegyptiaca* (Chi *et al.*, 2006), e as isoladas de *Monochaetum multiflorum* (Isaza *et al.*, 2001). Este é o primeiro relato de um éster diflavonoídico de ácido dicarboxílico contendo um arranjo truxilato (Figura 25).

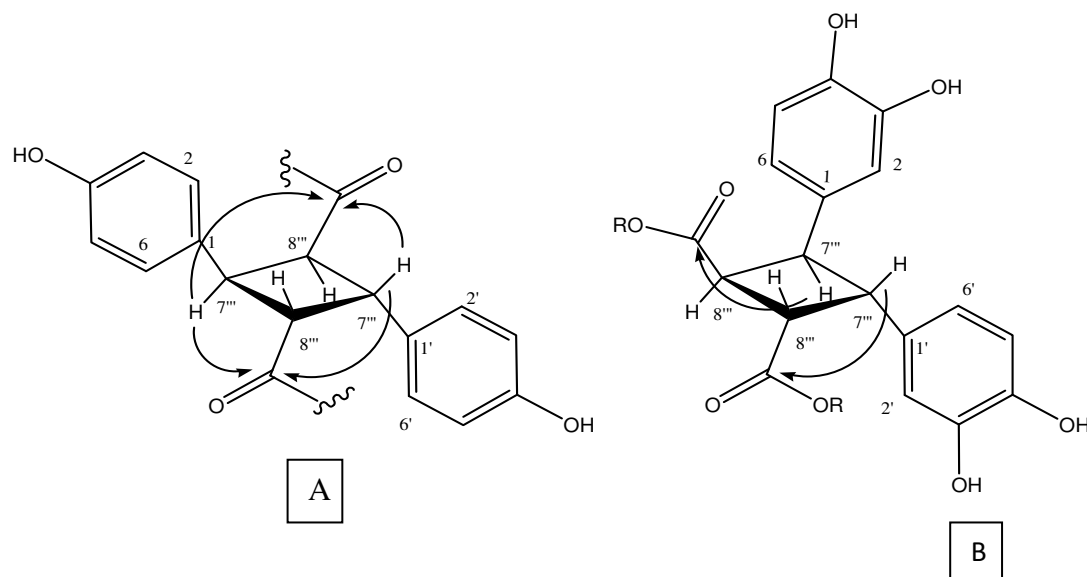


Figura 25 - Correlações do experimento HMBC referente ao anel ciclobutânico (**12C**): (A) parte truxilato e da (B) parte truxinato.

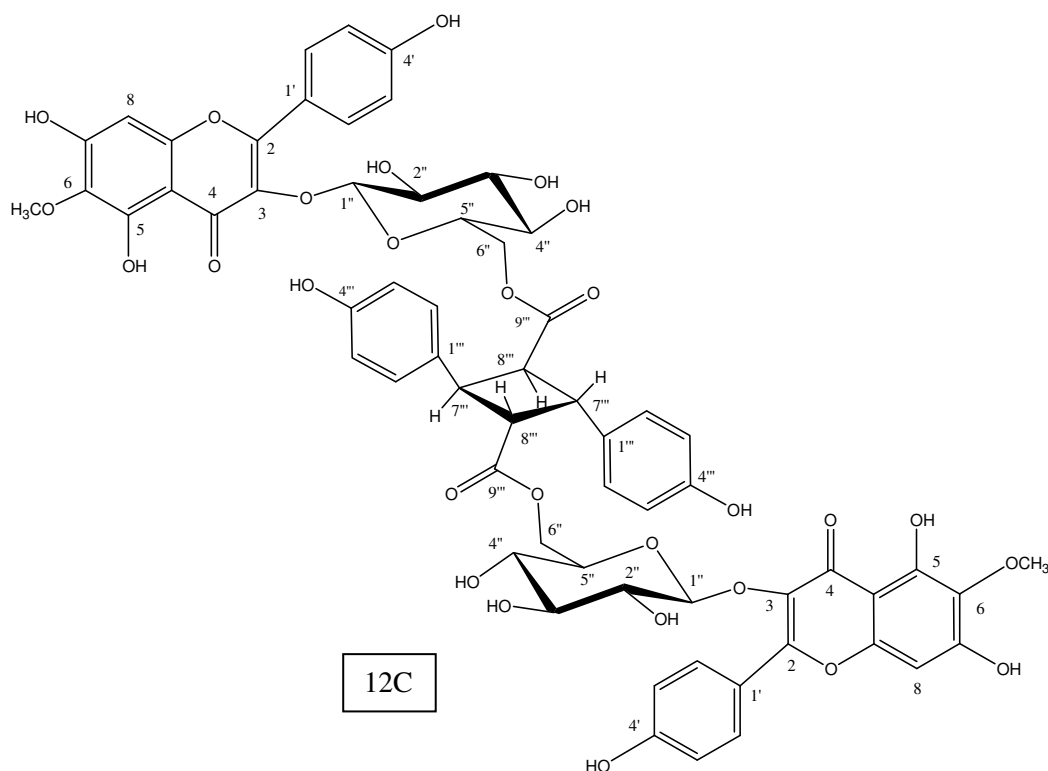


Figura 26 - Estrutura da Substância **12C**

4.4 Atividade antioxidante

Considerando a importância da interdisciplinaridade no nosso trabalho fitoquímico e o trabalho de colaboração existente entre a UNESP e a Universidade de Estudos de Salerno,

Itália em colaboração com o grupo do Prof. Cosimo Pizza e da Profa. Dra. Sonia Piacente onde foi possível a realização dos ensaios biológicos com as substâncias (**1C-19C**), naftopiranas e flavonóides, isolados de *Paepalanthus geniculatus*, conhecidos por Ensaio TEAC. A Tabela 7 apresenta a atividade antioxidante das substâncias **1C-19C** investigadas pelo ensaio TEAC. O método é descrito como um ensaio de descoloração aplicável a antioxidantes lipofílicos e hidrofílicos, incluindo os flavonóides, carotenóides, hidroxicinamatos e plasma. O valor TEAC é baseado na capacidade do antioxidante capturar o cátion radical ABTS⁺ (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) por espectrofotometria. Os valores TEAC são definidos como a concentração da solução Trolox com potencial antioxidante equivalente a 1 mM da amostra testada (Re *et al.*, 1999 e Piacente *et al.*, 2004). Os valores TEAC de **1C-19C** foram comparados com os valores da quercetina, quercetina-3-O-glicosídeo e kaempferol-3-O-glicosídeo (Tabela 7).

Os resultados evidenciaram que os flavonoides (**1C-3C, 5C-9C, 11C, 13C, 17C-19C**) apresentaram maior atividade sequestradora de radicais livres quando comparados com as naftopiranas (**14C-16C**). Os flavonoides **2C, 6C e 7C** foram mais ativos que as substâncias antioxidantes de referência, sendo que a substância **7C** apresentou a maior atividade (2,160 mM). O dímero **12C** apresentou menos atividade antioxidante quando comparado ao flavonoide **18C**, que seu monômero.

Dentre as naftopiranas, **10C e 16C** foram as que apresentaram maiores valores TEAC. Esta atividade pôde ser atribuída à presença do grupo hidroxila livre em C-7. Shukla *et al.* (2005) descrevem que a capacidade antioxidante de muitos fenólicos identificados em plantas podem diminuir a progressão do câncer de próstata pela prevenção da oxidação celular. A atividade citotóxica e a habilidade de todas as substâncias em afetar os níveis intracelulares ROS portanto em controlar o câncer de próstata em linhagens de células PC3 ou em células PC3 simultaneamente expostas a t-BuOOH, um conhecido pró-antioxidante, foram avaliadas. Os resultados com TEAC evidenciaram que o pré-tratamento de células PC3 com 24 h com 10 µM, das substâncias **2C, 6C e 7C** respectivamente preveniram a elevação de ROS induzido por t-BOOH, sugerindo uma potencial atividade destas substâncias em proteger as células do *stress* oxidativo. Nenhuma das substâncias apresentou efeito citotóxico significativo em células de câncer PC3. Nenhum efeito antioxidante significativo foi observado para as outras substâncias analisadas.

Tabela 7. Atividade antioxidante das substâncias **1C-19C** do extrato metanólico dos capítulos da *Paepalanthus geniculatus* do ensaio TEAC.

Substância	Valores TEAC (mM ± SD)
1C	1.545 ± 0.075
2C	2.017 ± 0.111
3C	1.529 ± 0.038
4C	0.525 ± 0.025
5C	1.373 ± 0.034
6C	2.059 ± 0.027
7C	2.160 ± 0.031
8C	1.267 ± 0.075
9C	1.000 ± 0.134
10C	1.038 ± 0.017
11C	0.968 ± 0.036
12C	0.738 ± 0.009
13C	1.214 ± 0.015
14C	0.706 ± 0.049
15C	0.570 ± 0.021
16C	0.898 ± 0.030
17C	1.397 ± 0.059
18C	1.279 ± 0.191
19C	0.984 ± 0.041
Quercetina	1.866 ± 0.008
Quercetina-3- <i>O</i> - β -D-glicopiranosídeo	1.780 ± 0.004
Kaempferol-3- <i>O</i> - β -D-glicopiranosídeo	1.780 ± 0.010
	Valor TEAC (mg/mL ± SD)
<i>Paepalanthus. geniculatus</i> extrato MeOH	1.479 ± 0.0155

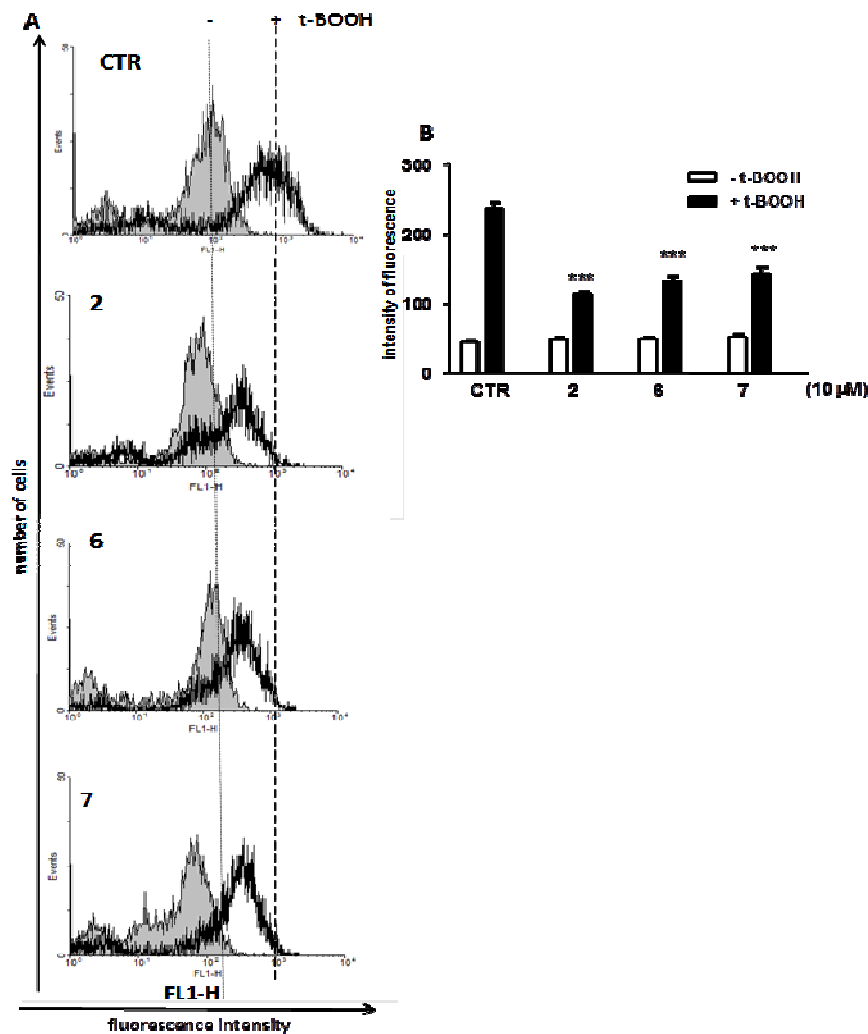


Figura 27. Produção de ROS analisado pela intensidade da fluorescência de DCFH-DA por fluxo de análise citométrica (A). Média dos valores de intensidade de fluorescência, resultados estão expressos como valores médios de experimentos representativos realizados em triplicatas ($n = 3$, $P < 0,001$ x células tratadas com t-BuOOH) (B).

Células pré-tratadas com as substâncias **1C-19C** (1-10 μ M) por 24 horas foram incubadas com 5 mM de DCHF-DA, com ou sem o agente pró-oxidante t-BuOOH (300 mM por 30 minutos). A produção de ROS foi analisada pela medida da intensidade de fluorescência de DCFH-DA por fluxo de análise citométrica (27A) e a média dos valores de intensidade de fluorescência está apresentado no gráfico (27B). Os resultados estão expressos como valores médios de experimentos representativos realizados em triplicatas ($n = 3$, $P < 0,001$ x células tratadas com t-BuOOH).

Muitos estudos já foram realizados na tentativa de se identificar substâncias antioxidantes com propriedades farmacológicas e com limite de toxicidade (Scartezzini *et al.*,

2000). As análises fitoquímica das espécies de Eriocaulaceae têm apresentado um grande número de flavonóides, naftopiranonas e xantonas. Os flavonóides já são considerados substâncias com potentes propriedades antioxidantes (Saija *et al.*, 1995; Van den Berg, 1996). Porém, modelos de outras substâncias fenólicas como xantonas e naftopiranonas ainda são pouco conhecidos. Por este motivo, é importante a continuidade na realização destes testes e a busca de novos modelos de compostos fenólicos que apresentem atividade antioxidante.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Compostos fenólicos de Paepalanthus geniculatus (Eriocaulaceae).

5. Considerações finais

De *Paepalanthus geniculatus*, pertencente à *Paepalanthus* subg. *Platycaulon*, isolamos e identificamos os flavonoides (**1C**, **2C**, **3C**, **4C**, **5C**, **6C**, **7C**, **8C**, **9C**, **11C**, **12C**, **13C**, **17C**, **18C**, **19C**) e as naftopiranonas derivadas da paepalantina (**10C**, **14C-16C**). As substâncias **1C**, **5C**, **7C**, **9C**, **10C**, **11C**, **12C**, **13C**, **16C**, **17C**, **19C** não haviam sido até então detectadas em outras espécies pertencentes à Eriocaulaceae. Porém, percebe-se que o padrão de flavonóis e naftopiranonas continuam a definir a taxonomia do gênero *Paepalanthus*.

Quanto ao padrão de glicosilação, como nas demais espécies de *Paepalanthus* estudadas anteriormente, glicose, raminose e alose foram encontradas em *Paepalanthus geniculatus*. Na quimiotaxonomia, os flavonóides glicosilados fornecem mais informações do que as suas agliconas, especialmente a níveis inter e intraespecíficos (Saleh, 1979 *apud* Bonfim, 1993). O número e a natureza dos açúcares presentes em uma planta são importantes, pois indicam a complexidade das enzimas envolvidas na biossíntese daquelas substâncias. Percebe-se, portanto, que *Paepalanthus geniculatus* é uma espécie quimicamente similar às até então estudadas dentro de *Paepalanthus* subg. *Platycaulon*.

A presença majoritária de flavonóides 6-oxigenados, 7-oxigenados e de flavonóides acilados também são informações relevantes para o estudo do gênero *Paepalanthus*. Em *Paepalanthus geniculatus* foram identificados todos estes flavonoides com metoxilações tanto em C-6 como em C-7, além dos flavonoides acilados contendo unidades *p*-cumaroil e feruloil. Espécies de *Paepalanthus* sect. *Actinocephalus* apresentam flavonoides 6-oxigenados que é mais uma evidência da homogeneidade da seção, enquanto que em *Paepalanthus* sect. *Platycaulon* enquanto que a predominância de flavonoides 6-oxigenados e 7-oxigenados também é esperada.

A presença das naftopiranonas **10C**, **14C-16C** em *Paepalanthus geniculatus* foi também muito importante, uma vez que a aglicona é a mesma da paepalantina existente em quase todas as espécies de *Paepalanthus* estudadas, corroborando, portanto, com as considerações realizadas até então por Vilegas *et al.*, 1989; Giulietti *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2001b; Dokkedal *et al.*, 2008; e Pacífico *et al.*, 2011.

O ensaio de autoxidação, utilizando-se os teste TEAC, revelou que as naftopiranonas e flavonoides isolados de *Paepalanthus geniculatus* possuem significativa atividade antioxidante.

Embora os resultados encontrados contribuíram com a elucidação de problemas taxonômicos dentro da família eriocaulaceae, os resultados obtidos neste trabalho satisfazem o objetivo inicial quanto à classe de substâncias químicas encontradas na espécie *Paepalanthus geniculatus*. As substâncias encontradas em espécies de Eriocaulaceae apresentam grande importância como marcadores taxonômicos, fornecendo maiores informações químicas para a família. Estes dados também reforçam os estudos morfológicos (Sano, 1999; Scatena *et al.*, 1996; Giulietti *et al.*, 2000; Dokkedal *et al.*, 2008), mostrando a integração dos caracteres morfológicos, químicos e anatômicos na tentativa de elucidar os problemas em Eriocaulaceae.

REFERÊNCIAS

Compostos fenólicos de Paepalanthus geniculatus (Eriocaulaceae).

Referências

- AGRAWAL, P. K. **Carbon 13 NMR of flavonoids**. Amsterdam: Elsevier, 1989. v. 39.
- ANDRADE, F. D. P. **Investigação química de plantas da família Eriocaulaceae**. 1999. 109 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1999.
- ANDRADE, F. D. P.; SANTOS, L. C.; DOKKEDDAL, A. L.; VILEGAS, W. Acyl glucosylated flavonols from *Paepalanthus* species. **Phytochemistry**, v. 51, p. 411-415, 1999.
- ANDRADE, F. D. P.; RASTRELLI, L.; PIZZA, C.; SANO, P. T.; VILEGAS, W. Flavonol glycosides and a naphthopyranone glycoside from *Paepalanthus macropodus* (Eriocaulaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, p. 275-277, 2002.
- AUGIER, J. Les glucides de quèques monocotylédones de l'ordre des farinosae. **Bulletin de la Société Botanique de France**, v. 103, p. 251-252, 1956.
- BATE-SMITH, E. C.; HARBORNE, J. B. Comparative biochemistry of the flavonoids XI. Quercetagenin and patuletin in *Eriocaulon*. **Phytochemistry**, v. 8, p. 1035-1037, 1969.
- BEN-EFRAIM, D. A.; GREEN, B. S. Use of mid-points or average nmr chemical shifts in stereochemical assignments. **Tetrahedron**, v. 30, p. 2357-2364, 1974.
- BERTRAND, C.; FABRE, N.; MOULIS, C. Constituents of *Pilocarpus trachylophus*. **Fitoterapia**, v. 72, p. 844-847, 2001.
- BIODIVERSITAS. **Listas vermelhas de espécies ameaçadas de extinção**. Disponível em: <<http://www.biodiversitas.org.br/conservacao>>. Acesso em: 10 fev. 2010.
- BONFIM, M. C. P. **Distribuição flavonóica das seções *Eulepis* Bong. e *Thysanocephalus* Koern. e a taxonomia de *Syngonanthus* Ruhl. (Eriocaulaceae)**. 1993. 168 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1993.
- BONINA, F.; PUGLIA, C.; VENTURA, D.; AQUINO, R.; TORTORA, S.; SACCHI, A.; SAIJA, A.; TOMAINO, A.; PELLEGRINO, M. L.; DE CAPRARIIS, P. *In vitro* antioxidant and *in vivo* photo protective effects of a lyophilized extract of *Capparis spinosa* L. buds. **Journal of Cosmetic Science**, v. 53, p. 321-335, 2002.
- CHI, Y. M.; NAKAMURA, M.; ZHAO, X-Y.; YOSHIZAWA, T.; YAN, W-M.; HASHIMOTO, F.; KINJO, J.; NOHARA, T.; SAKURADA, S. Anti-inflammatory activity of 4,4-dihydroxy- α -truxillic acid. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, p. 489-493, 2006.
- COELHO, R. G. **Estudo químico de “Sempre Vivas” brasileiras: *Syngonanthus bisulcatus***. 2000. 106 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2000.

- COSTA, F. N.; TROVÓ, M.; SANO, P. T. Eriocaulaceae na Cadeia do Espinhaço: riqueza, endemismo e ameaças. **Megadiversidade**, v. 4, p. 117-125, 2008.
- DE MARINO, S.; BORBONE, N.; IORIZZI, M.; ESPOSITO, G.; McCLINTOCK, J. B.; ZOLLO, F. Isolation and structure characterization by two-dimensional NMR spectroscopy. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 515-519, 2003.
- DOKKEDAL, A. L. **Estudo fitoquímico e implicações taxonômicas de *Paepalanthus Kunth* (Eriocaulaceae)**. 2000. 94 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2000.
- DOKKEDAL, A. L.; SALATINO, A. Flavonoids of brazilian species of *Leiothrix*. (Eriocaulaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 20, p. 31-32, 1992.
- DOKKEDAL, A. L.; LAVARDA, F.; SANTOS, L. C.; VILEGAS, W. Xeractinol - a new flavanonol C-glucoside from *Paepalanthus argenteus* var. *argenteus* (Bongard) Hensold (Eriocaulaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, p. 437-439, 2007.
- DOKKEDAL, A. L.; SANTOS, L. C.; SANO, P. T.; VILEGAS, W. Chemistry Eriocaulaceae. **Zeitschrift fur Naturforschung**, v. 63, p. 169-175, 2008.
- EL-ANSARI, M. A.; NAWWAR, M. A.; SALEH, N. A. M. Studies in natural products chemistry: bioactive natural products. **Phytochemistry**, v. 40, p. 1543-1548, 1995.
- ELIX, J. A.; BENNETT, S. A. 6-O-methylarthothelin and 1,3,6-tri-O-methylarthothelin, two new xanthenes from a *Dimelaena kichen*. **Australian Journal of Chemistry**, v. 43, p. 1587-1590, 1990.
- GARCIA, A. C. L. **Aplicações técnicas analíticas na determinação dos constituintes de “sempre-vivas”**. 1997. 73 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1997.
- GIBBS, R. **Chemotaxonomy of flowering plants**. Montreal: McGill-Queen's. University Press, 1974. v. 2, p. 681-1274,
- GIULIETTI, A. M. **Os gêneros *Eriocaulon L.* e *Leiothrix Ruhl.* (Eriocaulaceae) na Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil**. 1978. 357 f. Tese (Doutorado em Botânica) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1978.
- GIULIETTI, A. M. **Análise crítica da evolução da morfologia e da sistemática das Eriocaulaceae**. 1997. 161 f. Tese (Titular em Sistemática de Vegetais Superiores)- Departamento de Ciências Biológicas, Universidade de Feira de Santana, Feira de Santana, 1997.
- GIULIETTI, A. M.; HENSOLD, N. D. Padrões de distribuição geográfica dos gêneros de Eriocaulaceae. **Acta Botanica Brasilica**, v. 4, p. 133-159, 1990.

- GIULIETTI, N.; GIULIETTI, A. M.; PIRANI, J. R.; MENEZES, N. L. Estudo em sempre-vivas: importância econômica do extrativismo em Minas Gerais, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**, v. 1, p. 179-193, 1988.
- GIULIETTI, A. M.; HARLEY, R. M.; QUEIROZ, L. P.; WANDERLEY, M. G.; VAN DEN BERG, C. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, p. 52-61. 2005.
- GIULIETTI, A. M.; SCATENA, V. L. ; SANO, P. T. ; PARRA, L. R. ; QUEIROZ, L. P. ; HARLEY, R. M. ; MENEZES, N. L. ; YSEPON, A. M. B. ; SALATINO, A. ; SALATINO, M. L.; VILEGAS, W. ; SANTOS, L. C. ; RICCI, C. V. ; BONFIM, M. C. P. ; MIRANDA, E. B. Multidisciplinary studies of Neotropical Eriocaulaceae. In: WILSON, K. L.; MORRISON, D. A. (Ed.). **Monocots: systematics and evolution**. Meulbourne: CSIRO, 2000. v. 1, p. 580-589.
- HARBORNE, J. B. **The flavonoids: advances in research since**. London: Chapman and Hall, 1986. 676 p.
- HENSOLD, N.; GIULIETTI, A. M. Revision and redefinition of the genus *Rondonanthus* Herzog (Eriocaulaceae). **Annals Missouri Botanical Garden**, v. 78, p. 441-459, 1991.
- HORIE, T.; TSUKAYAMA, M.; YAMADA, T.; MIURA, I.; NAKAYAMA, M. Three flavone glycosides from citrus sudachi. **Phytochemistry**, v. 25, p. 2621-2624, 1986.
- ISAZA, J. H.; ITO, H.; YOSHIDA, T. A flavonol glycoside-lignan ester and accompanying acylated glucosides from *Monochaetum multiflorum*. **Phytochemistry**, v. 58, p. 321-327, 2001.
- ITOKAWA, H.; SUTO, K.; TAKEYA, K. Structures of isoagastachoside and agastachin, new glucosylflavones isolated from *Agastache rugosa*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, p. 1777-1779, 1981.
- KITAGAWA, R. R.; RADDI, M. S. G.; KHALIL, N. M.; VILEGAS, W.; FONSECA, L. M. Effect of the isocoumarin paepalantine on the luminol and lucigenin amplified chemiluminescence of rat neutrophils. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, p. 905-908, 2003.
- KOERNICKE, F. Eriocaulaceae. In: MARTIUS, K. F. P. (Comp.). **Flora Brasiliensis**. New York: Stichert Hafner, 1863. v. 3, p. 312-320.
- MAYWORM, M. A.; SALATINO, A. Flavonoides de quatro espécies de *Paepalanthus* Ruhl. (Eriocaulaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 7, p. 129-133, 1993.
- NEHME, C. J. **Estudo químico de plantas da família Eriocaulaceae: escapos de *Paepalanthus bromelioides* e *Paepalanthus latipes***. 1997. 102 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1997.

OLIVEIRA, M. T. L. **Sistemática de Paepalanthoideae (Eriocaulaceae) Filogenia, morfologia e taxonomia de Diphyomene (Ruhland)**. 2010. 245 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

PACIFICO, M.; NAPOLITANO, A.; MASULLO, M.; HILARIO, F.; VILEGAS, W.; PIACENTE, S.; SANTOS, L. C. dos. Metabolite fingerprint of “capim dourado” (*Syngonanthus nitens*), a basis of Brazilian handcrafts. **Industrial Crops and Products**, v. 33, p. 488-496, 2011.

PAWAN, K. A. NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. **Phytochemistry**, v. 31, p. 3307-3330, 1992.

PBASE. **Paepalanthus**. 2011. Disponível em:
<<http://www.pbase.com/marciocabral/image/39240959/>>. Acesso em: 21 nov. 2011.

PIACENTE, S.; MONTORO, P.; OLESZEK, W.; PIZZA, C. *Yucca schidigera* Bark: Phenolic constituents and antioxidant activity. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 882-885, 2004.

PIACENTE, S.; SANTOS, L. C. dos.; MAHMOOD, N.; ZAMPELLI, A.; PIZZA, C.; VILEGAS, W. Naphthopyranone glycosides from *Paepalanthus microphyllus*. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 680-682, 2001.

PROVOST, J.; GARCIA, M. First report on the detection of viioxanthin from a plant source: occurrence in *Paepalanthus* species. **Planta Medica**, v. 56, p. 647-649, 1990.

RAVEN, H. P.; EVERT, F. R.; EICHHORN, E. S. **Biologia vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 478-485.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n 9-10, p 1231-1237, 1999.

RICCI, C. V.; PATRÍCIO, M. C.; SALATINO, M. L.; SALATINO, A.; GIULIETTI, A. M. Flavonoids of *Syngonanthus* Ruhl. (Eriocaulaceae): taxonomic implications. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 24, p. 577-583, 1996.

RUHLAND, W. **Eriocaulaceae**. In: ENGLER, A. **Das Pflanzenreich**. Weinheim: H. R. Engelmann, 1903. v. 13.

SAIJA, A.; SCALESE, M.; LANZA, M.; MARZULLO, D.; BONINA, F.; CASTELLI, F. Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembrane. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 19, n. 4, p. 481-486, 1995.

SALATINO, A.; SALATINO, M. L.; GIULIETTI, A. M. Contents of soluble phenolic compounds of capitulla of Eriocaulaceae. **Química Nova**, v. 13, p. 289-294, 1990.

- SALEH, N. A. M. The biosynthesis of flavonoid glycosides and their importance in chemosystematics. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 7, p. 37-45, 1979.
- SANO, P. T. **Revisão de Actinocephalus (Koern.) Sano – Eriocaulaceae**. 1999. 241 f. Tese (Doutorado em Botânica) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.
- SANO, P. T. Actinocephalus (Körn.) Sano (Paepalanthus sect. Actinocephalus), a new genus of Eriocaulaceae, and other taxonomic and nomenclatural changes involving Paepalanthus Mart. **Taxon**, v. 53, p. 99-107, 2004.
- SANTOS, L. C. **Estudo químico de Paepalanthus hilairi (Koern.) – Eriocaulaceae**. 1997. 115 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1997.
- SANTOS, L. C.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; TORO, R.; SANO, P. T.; VILEGAS, W. 6-Methoxyquercetin-3-O-(6''-E-feruloyl)- β -D-glucopyranoside from *Paepalanthus polyanthus* (Eriocaulaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, p. 451-456, 2002.
- SANTOS, L. C.; PIACENTE, S.; RICCARDIS, F.; ELETTO, A. M.; PIZZA, C.; VILEGAS, W. Xanthonés and flavonoids from *Leiothrix curvifolia* and *leiothrix flavescens*. **Phytochemistry**, v. 56, p. 853-856, 2001a.
- SANTOS, L. C.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; ALBERT, K.; DACHTLER, M.; VILEGAS, W. Planifolin, a new naphthopyranone dimer and flavonoids from *Paepalanthus planifolius*. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 122-124, 2001b.
- SANTOS, L. C.; SILVA, M. A.; RODRIGUES, C. M.; CARBONE, V.; NAPOLITANO, A.; BASSARELLO, C. M.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; VILEGAS, W. Characterization of flavonoid and naphthopyranone derivatives from *Eriocaulon ligulatum* using liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Natural Product Communications**, v. 4, p. 1651-1656, 2009.
- SCARTEZZINI, P.; SPERONI, E. Review on some plants traditional medicine with antioxidant activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, p. 23-43, 2000.
- SCATENA, V. L.; MORAES, A. R. S. Anatomia de raízes, folhas e escapos de *Paepalanthus*, subgênero *Platycaulon* (Eriocaulaceae). **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 39, n. 4, p. 1021-1035, 1996.
- SCHMIDT, I. B.; FIGUEIREDO, I. B.; SCARIOT, A. Ethnobotany and effects of harvesting on the population ecology of *Singonanthus nitens* (Bong.) Ruhland (Eriocaulaceae), a NTFP from Jalapão region, central Brazil. **Economic Botany**, v. 61, p. 73-85, 2007.
- SHUKLA, S.; GUPTA, S. Dietary agents in the chemoprevention of prostate cancer. **Nutrition and Cancer**, v. 53, p. 18-32, 2005.

- SILVA, M. A.; SANTOS, L. C.; OLIVEIRA, A. P. S.; SANNOMIYA, M.; SANO, P. T.; VARANDA, E. A.; VILEGAS, W. Flavonoids and a naphthopyranone from *Eriocaulon ligulatum* and their mutagenic activity. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 55, p. 1635-1639, 2007.
- STÜTZEL, T. Eriocaulaceae. In: KUBITZKI, K. (Ed.). **The families and genera of vascular plants flowering plants: monocotyledons-alismatanae and commelinanae (except Gramineae)**. Berlin: Springer, 1998. v. 4, p. 197-207.
- THOMAS, M. B.; MABRY, T. J. Flavonoid constituents of *Hymenoxys scaposa* DC. **Phytochemistry**, v. 7, p. 787-790, 1968.
- VAN DEN BER, R.; HAENEN, G. R. M. M.; VAN DEN BERG, H.; VANDER V. W.; BAST, A. The predictive value of the antioxidant capacity of structurally related flavonoids using the trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay. **Food Chemistry**, v. 703, p. 391-395, 2000.
- VILEGAS, W.; ALVARENGA, M. A.; ROQUE, N. F. Ent-kaurene diterpenes from the fruits of *xylopia brasiliensis*. **Revista Latinoamericana de Química**, v. 20, p. 98, 1989.
- VILEGAS, W.; ROQUE, N. F.; SALATINO, A.; GIESBRECHT, A. M.; DAVINO, S. Isocoumarin from *Paepalanthus bromelioides*. **Phytochemistry**, v. 29, p. 2299-2301, 1990.
- VILEGAS, W.; DOKKEDDAL, A. L.; PIACENTE, S.; RASTRELLI, L.; PIZZA, C. New naphthopyranone glycosides from *Paepalanthus vellozioides* and *Paepalanthus latipes*. **Journal Natural Products**, v. 62, p. 746-749, 1999a.
- VILEGAS, W.; NEHME, C. J.; DOKKEDDAL, A. L.; PIACENTE, S.; RASTRELLI, L.; PIZZA, C. Quercetagetin 7-methyl ether glycosides from *Paepalanthus vellozioides* and *Paepalanthus latipes*. **Phytochemistry**, v. 51, p. 403-409, 1999b.
- VILEGAS, W.; SANTOS, L. C.; ALECIO, A. C.; PIZZA, C.; PIACENTE, S.; PAUW, E.; SANO, P. T. Naphthopyranone glycosides from *Paepalanthus bromelioides*. **Phytochemistry**, v. 49, p. 207-210, 1998.

ANEXOS

Compostos fenólicos de Paepalanthus geniculatus (Eriocaulaceae).

Tabela 8. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (CD_3OD , ppm, 14,2 τ) das substâncias identificadas nos capítulos de *Paepalanthus geniculatus*.

Posição	^1H (J = Hz)	^{13}C	2C ^1H (J = Hz)	^{13}C	3C ^1H (J = Hz)	^{13}C	4C ^1H (J = Hz)	^{13}C	5C ^1H (J = Hz)	^{13}C
2	-	159,7	-	159,7	-	161,2	-	159,7	-	159,7
3	-	135,5	-	135,5	-	134,3	-	133,5	-	135,5
4	-	179,0	-	179,0	-	179,4	-	179,0	-	179,0
5	-	150,5	-	150,7	-	150,8	-	150,7	-	150,7
6	-	131,4	-	132,4	-	132,4	-	131,2	-	132,4
7	-	155,7	-	158,6	-	158,3	-	157,5	-	158,6
8	6,79, <i>s</i>	91,3	6,55, <i>s</i>	95,0	6,53, <i>s</i>	94,3	6,55, <i>s</i>	94,7	6,55, <i>s</i>	95,0
9	-	151,3	-	153,8	-	153,8	-	152,3	-	153,8
10	-	106,8	-	106,0	-	106,2	-	104,5	-	106,0
1'	-	123,5	-	123,2	-	122,9	-	123,2	-	123,2
2'	7,72, <i>d</i> (1,9)	117,4	7,68, <i>d</i> (1,9)	117,4	8,08, <i>d</i> (8,5)	131,8	7,74, <i>d</i> (1,9)	117,4	7,68, <i>d</i> (1,9)	117,4
3'	-	146,0	-	146,0	6,92, <i>d</i> (8,5)	115,8	-	148,0	-	146,0
4'	-	149,9	-	149,9	-	158,6	-	144,5	-	149,9
5'	6,92, <i>d</i> (8,5)	115,7	6,91, <i>d</i> (8,5)	115,8	6,91, <i>d</i> (8,5)	115,9	6,90, <i>d</i> (8,5)	115,8	6,91, <i>d</i> (8,5)	115,8
6'	7,67, <i>dd</i> (1,9, 8,5)	123,3	7,66, <i>dd</i> (1,9, 8,5)	123,5	8,09, <i>d</i> (8,5)	132,0	7,62, <i>dd</i> (1,9, 8,5)	123,0	7,66, <i>dd</i> (1,9, 8,5)	123,5
1"	Glicose 5,16, <i>d</i> (8,8)	104,1	Glicose 5,16, <i>d</i> (8,8)	104,1	Glicose 5,77, <i>d</i> (8,8)	99,8	Glicose 5,30, <i>d</i> (8,8)	104,0	Glicose 5,14, <i>d</i> (8,8)	103,4
2"	3,51, <i>dd</i> (8,8, 9,0)	75,3	3,51, <i>dd</i> (8,8, 9,0)	75,3	3,65, <i>dd</i> (8,8, 9,0)	79,8	3,51, <i>dd</i> (8,8, 9,0)	75,4	3,51, <i>dd</i> (8,8, 9,0)	75,4
3"	3,45, <i>dd</i> (9,0, 9,0)	77,8	3,45, <i>dd</i> (9,0, 9,0)	77,8	3,59, <i>dd</i> (9,0, 9,0)	78,6	3,44, <i>dd</i> (9,0, 9,0)	78,0	3,44, <i>dd</i> (9,0, 9,0)	76,6
4"	3,30, <i>dd</i> (9,0, 9,0)	71,8	3,30, <i>dd</i> (9,0, 9,0)	71,8	3,32, <i>dd</i> (9,0, 9,0)	72,5	3,37, <i>dd</i> (9,0, 9,0)	71,0	3,27, <i>dd</i> (9,0, 9,0)	70,9
5"	3,35, <i>m</i>	77,0	3,35, <i>m</i>	77,0	3,26, <i>m</i>	78,0	3,24, <i>m</i>	78,2	3,38, <i>m</i>	77,8
6"	3,83, <i>dd</i> (2,5, 12,0) 3,41, <i>dd</i> (4,5, 12,0)	68,4	3,83, <i>dd</i> (2,5, 12,0) 3,41, <i>dd</i> (4,5, 12,0)	68,4	3,76, <i>dd</i> (2,5, 12,0) 3,54, <i>dd</i> (4,5, 12,0)	62,4	3,74, <i>dd</i> (2,5, 12,0) 3,60, <i>dd</i> (4,5, 12,0)	62,2	3,88, <i>dd</i> (2,5, 12,0) 3,40, <i>dd</i> (4,5, 12,0)	67,8
1'''	Raminose 4,54, <i>d</i> (1,2)	102,0	Raminose 4,54, <i>d</i> (1,2)	102,0	Raminose 5,26, <i>d</i> (1,2)	102,2	-	-	Raminose 4,53, <i>d</i> (1,2)	101,8
2'''	3,63, <i>dd</i> (1,2, 3,2)	71,8	3,63, <i>dd</i> (1,2, 3,2)	71,8	4,03, <i>dd</i> (1,2, 3,2)	72,1	-	-	4,80, <i>dd</i> (1,2, 3,2)	71,9
3'''	3,56, <i>dd</i> (3,2, 9,7)	71,8	3,56, <i>dd</i> (3,2, 9,7)	71,8	3,81, <i>dd</i> (3,2, 9,7)	71,9	-	-	3,75, <i>dd</i> (3,2, 9,7)	70,0
4'''	3,31, <i>t</i> (9,7)	73,7	3,31, <i>t</i> (9,7)	73,7	3,37, <i>t</i> (9,7)	73,7	-	-	3,50, <i>t</i> (9,7)	74,9
5'''	3,46, <i>m</i>	69,4	3,46, <i>m</i>	69,4	4,06, <i>m</i>	69,6	-	-	3,58, <i>m</i>	67,2
6'''	1,14, <i>d</i> (6,5) 4,02, <i>s</i>	17,6 56,5	1,14, <i>d</i> (6,5) 4,02, <i>s</i>	17,6 56,5	0,98, <i>d</i> (6,5)	17,3	-	-	1,17, <i>d</i> (6,5)	17,4
OCH ₃ (C7)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OCH ₃ (C6)	-	-	-	-	-	-	3,93	-	-	60,7
COOCH ₃ (C-2 _{thb})	-	-	-	-	-	-	-	-	-	172,6
COOCH ₃ (C-2 _{thb})	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20,9

() Constantes de acoplamento em Hz; Espectros obtidos em CD_3OD , 14,2 τ .

Posição	¹ H (J = Hz)	¹³ C	7C	¹ H (J = Hz)	¹³ C	8C	¹ H (J = Hz)	¹³ C	9C	¹ H (J = Hz)	¹³ C	11C	¹ H (J = Hz)	¹³ C
2	-	159,8	-	-	159,8	-	-	159,8	-	-	159,4	-	-	159,4
3	-	135,3	-	-	135,3	-	-	135,3	-	-	134,9	-	-	134,5
4	-	179,4	-	-	179,0	-	-	179,4	-	-	179,4	-	-	179,4
5	-	150,8	-	-	150,7	-	-	150,8	-	-	150,8	-	-	150,8
6	-	132,6	-	-	132,4	-	-	132,6	-	-	132,7	-	-	132,5
7	-	158,2	-	-	158,6	-	-	158,2	-	-	158,6	-	-	158,6
8	6,56, s	94,7	6,54, s	94,6	94,6	6,56, s	6,56, s	94,7	6,56, s	6,55, s	95,0	6,55, s	6,55, s	95,0
9	-	154,4	-	-	153,8	-	-	154,4	-	-	153,6	-	-	153,6
10	-	105,9	-	-	106,0	-	-	105,9	-	-	105,9	-	-	105,9
1'	-	122,8	-	-	123,2	-	-	122,8	-	-	122,4	-	-	122,4
2'	8,09, d (8,5)	132,0	7,65, d (1,9)	117,2	132,0	8,09, d (8,5)	8,09, d (8,5)	132,0	8,09, d (8,5)	8,09, d (8,5)	132,0	8,09, d (8,5)	8,09, d (8,5)	132,0
3'	6,92, d (8,5)	115,8	-	146,0	115,8	6,91, d (8,5)	6,91, d (8,5)	115,8	6,91, d (8,5)	6,94, d (8,5)	116,0	6,94, d (8,5)	6,94, d (8,5)	116,0
4'	-	161,7	-	149,9	161,7	-	-	161,7	-	-	161,3	-	-	161,3
5'	6,92, d (8,5)	115,9	6,91, d (8,5)	115,7	115,9	6,90, d (8,5)	6,90, d (8,5)	115,9	6,91, d (8,5)	6,91, d (8,5)	115,9	6,91, d (8,5)	6,91, d (8,5)	116,0
6'	8,09, d (8,5)	132,0	7,67, dd (1,9, 8,5)	123,3	132,0	8,10, d (8,5)	8,10, d (8,5)	132,0	8,09, d (8,5)	8,09, d (8,5)	132,0	8,09, d (8,5)	8,09, d (8,5)	132,0
1''	Glicose	103,4	Glicose	103,4	103,4	Glicose	Glicose	103,4	Glicose	Glicose	103,4	Glicose	Glicose	103,6
2''	5,18, d (8,8)	75,4	5,36, d (8,8)	75,4	75,4	5,30, d (8,5)	5,30, d (8,5)	75,4	5,14, d (8,8)	5,35, d (8,8)	75,4	5,35, d (8,8)	5,35, d (8,8)	75,5
3''	3,46, dd (8,8, 9,0)	76,6	3,54, dd (8,8, 9,0)	76,6	76,6	3,47, dd (8,8, 9,0)	3,47, dd (8,8, 9,0)	77,8	3,51, dd (8,8, 9,0)	3,47, dd (8,8, 9,0)	76,6	3,47, dd (8,8, 9,0)	3,47, dd (8,8, 9,0)	77,8
4''	3,45, dd (9,0, 9,0)	70,9	3,40, dd (9,0, 9,0)	70,9	70,9	3,45, dd (9,0, 9,0)	3,45, dd (9,0, 9,0)	71,2	3,44, dd (9,0, 9,0)	3,41, dd (9,0, 9,0)	71,0	3,41, dd (9,0, 9,0)	3,41, dd (9,0, 9,0)	71,0
5''	3,28, dd (9,0, 9,0)	77,8	3,41, dd (9,0, 9,0)	77,8	77,8	3,27, dd (9,0, 9,0)	3,27, dd (9,0, 9,0)	78,2	3,27, dd (9,0, 9,0)	3,40, dd (9,0, 9,0)	77,8	3,40, dd (9,0, 9,0)	3,40, dd (9,0, 9,0)	76,9
6''	3,36 m	68,2	3,47 m	68,2	68,2	3,24 m	3,24 m	62,2	3,38 m	3,47 m	67,8	3,47 m	3,47 m	68,0
1'''	3,83, dd (2,5, 12,0)	102,0	3,84, dd (2,5, 12,0)	101,8	101,8	3,74, dd (2,5, 12,0)	3,74, dd (2,5, 12,0)	101,8	3,88, dd (2,5, 12,0)	3,85, dd (2,5, 12,0)	101,8	3,85, dd (2,5, 12,0)	3,85, dd (2,5, 12,0)	103,6
2'''	3,41, dd (4,5, 12,0)	71,7	3,54, dd (4,5, 12,0)	71,9	71,9	3,60, dd (4,5, 12,0)	3,60, dd (4,5, 12,0)	71,9	3,40, dd (4,5, 12,0)	3,54, dd (4,5, 12,0)	71,9	3,54, dd (4,5, 12,0)	3,54, dd (4,5, 12,0)	75,5
3'''	Raminose	71,9	Raminose	70,0	70,0	Raminose	Raminose	70,0	Raminose	Raminose	70,0	Raminose	Raminose	77,8
4'''	4,54, d (1,2)	73,5	4,60, d (1,2)	74,9	74,9	4,53, d (1,2)	4,53, d (1,2)	74,9	4,82, f (9,7)	4,82, f (9,7)	74,9	4,82, f (9,7)	4,82, f (9,7)	71,0
5'''	3,30, f (9,7)	69,4	3,60, m	67,2	67,2	3,60, m	3,60, m	67,2	3,50, f (9,7)	3,60, m	67,2	3,60, m	3,60, m	76,9
6'''	3,47, m	17,6	0,90 d (6,5)	17,4	17,4	0,90 d (6,5)	0,90 d (6,5)	17,4	1,17, d (6,5)	0,90 d (6,5)	17,4	0,90 d (6,5)	0,90 d (6,5)	68,0
OCH ₃ (C 7)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OCH ₃ (C 6)	3,92, s	-	-	-	-	-	-	-	3,93, s	-	60,7	-	-	-
COOCH ₃ (C-2 _{tha})	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	172,6	-	-	-
COOCH ₃ (C-2 _{pha})	-	-	-	-	-	-	-	-	2,11, s	-	20,9	-	-	-
COOCH ₃ (C-3 _{tha})	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
COOCH ₃ (C-3 _{pha})	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
COOCH ₃ (C-3 _{tha})	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
COOCH ₃ (C-4 _{tha})	-	-	-	-	172,8	-	-	-	-	-	-	-	-	172,8
COOCH ₃ (C-4 _{pha})	-	-	2,04, s	20,8	20,8	-	-	-	-	2,04	-	-	2,04	20,8

Posição	13C		17C		18C		19C	
	¹ H (J = Hz)	¹³ C	¹ H (J = Hz)	¹³ C	¹ H (J = Hz)	¹³ C	¹ H (J = Hz)	¹³ C
2	-	159,7	-	159,4	-	159,4	-	159,6
3	-	135,5	-	134,9	-	134,9	-	135,5
4	-	179,0	-	179,4	-	179,4	-	179,0
5	-	150,7	-	150,8	-	150,8	-	150,7
6	-	132,4	-	132,7	-	132,5	-	132,5
7	-	158,6	-	158,6	-	159,0	-	159,0
8	6,54, s	94,6	6,55, s	94,9	6,47, s	95,5	6,32, s	95,5
9	-	153,8	-	153,6	-	153,4	-	153,4
10	-	106,0	-	105,9	-	105,6	-	105,6
1'	-	123,2	-	122,4	-	122,4	-	123,2
2'	7,66, d (1,9)	117,0	8,07 d (8,5)	131,8	8,03, d (8,5)	131,9	8,03, d (8,6)	131,9
3'	-	146,0	6,90, d (8,5)	115,8	6,85, d (8,5)	116,0	6,85, d (8,6)	116,0
4'	-	149,9	-	161,3	-	161,3	-	161,3
5'	6,90, d (8,5)	115,8	6,90, d (8,5)	115,8	6,85, d (8,5)	116,0	6,85, d (8,5)	116,0
6'	7,66, dd (1,9, 8,5)	123,4	8,07, d (8,5)	131,8	8,03, d (8,5)	131,9	8,03, d (8,5)	131,9
1''	Glicose		Glicose		Glicose		Glicose	
2''	5,36, d (8,8)	103,3	5,15, d (8,8)	104,0	5,27, d (8,8)	103,6	5,26, d (8,8)	103,5
3''	3,54, dd (8,8, 9,0)	75,3	3,49, dd (8,8, 9,0)	75,4	3,49, dd (8,8, 9,0)	75,5	3,49, dd (8,8, 9,0)	75,5
4''	3,40, dd (9,0, 9,0)	76,9	3,39, dd (9,0, 9,0)	77,1	3,48, dd (9,0, 9,0)	77,8	3,47, dd (9,0, 9,0)	77,8
5''	3,42, dd (9,0, 9,0)	70,8	3,25, dd (9,0, 9,0)	71,3	3,36, dd (9,0, 9,0)	71,5	3,37, dd (9,0, 9,0)	71,5
6''	3,46 m	77,7	3,44, m	77,7	3,47, m	76,8	3,47 m	75,5
	3,82, dd (2,5, 12,0)	68,0	3,86, dd (2,5, 12,0)	68,2	4,33, dd (2,5, 12,0)	64,0	4,31, dd (2,5, 12,0)	63,8
	3,60, dd (4,5, 12,0)		3,43, dd (4,5, 12,0)		4,26, dd (4,5, 12,0)		4,26, dd (4,5, 12,0)	
	Raminose		Raminose		p-coumaroil		E-feruloil	
1'''	4,62, d (1,2)	99,4	4,52, d (1,2)	99,1	-	126,8	-	127,5
2'''	4,97, dd (1,2, 3,2)	73,7	5,02, dd (1,2, 3,2)	70,7	6,85, d (8,0)	116,0	7,10, d (1,9)	111,5
3'''	3,91, dd (3,2, 9,7)	68,0	4,91, dd (3,2, 9,7)	72,7	7,35, d (8,0)	131,0	-	149,5
4'''	4,74, t (9,7)	74,9	3,40, t (9,7)	70,9	-	-	-	149,8
5'''	3,62, m	67,5	3,60, m	69,5	7,35, d (8,0)	131,0	6,84, d (8,5)	116,3
6'''	0,90, d (6,5)	17,4	1,17, d (6,5)	17,7	6,85, d (8,0)	116,0	6,94, dd (1,9, 8,5)	123,5
7''' (α)	-	-	-	-	6,12, d (16,0)	114,7	6,15, d (16,0)	114,5
8''' (β)	-	-	-	-	7,44, d (16,0)	146,4	7,43, d (16,0)	146,4
9''' (C=O)	-	-	-	-	-	168,5	-	168,5
OCH ₃ (C 7)	-	170,5	-	171,9	-	-	-	-
OCH ₃ (C 6)	2,09, s	20,6	2,09, s	20,5	-	-	3,85, s	60,8
COOCH ₃ (C-2 _{thia})	-	-	-	172,4	-	-	-	-
COOCH ₃ (C-2 _{thia})	-	-	-	20,6	-	-	-	-
COOCH ₃ (C-3 _{thia})	-	171,0	1,99, s	20,6	-	-	-	-
COOCH ₃ (C-3 _{thia})	2,04, s	20,7	-	-	-	-	-	-

Posição	¹ H (J = Hz)	¹³ C	¹⁴ C ¹ H (J = Hz)	¹³ C	¹⁵ C ¹ H (J = Hz)	¹³ C	¹⁶ C ¹ H (J = Hz)	¹³ C
1	-	169,2	-	169,2	-	169,2	-	169,0
3	-	153,4	-	154,2	-	154,2	-	152,5
4	6,62, s	99,7	6,64 s	99,9	6,65 s	98,9	6,65, s	99,5
4 ^a	-	124,7	-	124,7	-	124,7	-	124,7
5	-	140,2	-	141,1	-	141,0	-	139,0
5 ^a	-	137,2	-	137,6	-	137,5	-	137,0
6	7,06, d (1,5)	99,3	7,11, d (1,5)	96,1	7,11, d (1,5)	96,1	7,07, d (1,5)	99,3
7	-	161,5	-	163,6	-	163,6	-	160,5
8	7,12, d (1,5)	104,7	7,08, d (1,5)	105,2	7,09, d (1,5)	105,1	7,00, d (1,5)	104,7
9	-	160,0	-	159,9	-	159,5	-	159,0
9 a	-	110,7	-	111,8	-	111,7	-	109,6
10	-	160,8	-	160,8	-	160,8	-	160,0
10 a	-	98,2	-	99,2	-	98,3	-	97,0
11	2,31, s	19,3	2,32 d (6,1)	19,4	2,30 d (6,0)	19,3	2,31, s	19,30
OCH ₃ -5	3,85, s	61,8	3,88, s	62,3	3,89 s	61,9	3,86, s	61,5
OCH ₃ -7	-	-	4,00, s	56,2	4,00 s	56,0	-	-
	Glicose		Glicose		Glicose		Glicose	
1'	5,03, d (8,8)	103,7	5,07, d (7,5)	103,7	5,08, d (7,9)	103,4	5,15, d (8,8)	104,0
2'	3,69, dd (8,8, 9,0)	74,6	3,69, dd (7,5; 9,0)	75,2	3,70, dd (7,9;9,0)	75,3	3,49, dd (8,8, 9,0)	75,4
3'	3,55, dd (9,0, 9,0)	77,1	3,56, dd (9,0; 9,0)	77,6	3,55, dd (9,0;9,0)	77,3	3,39, dd (9,0, 9,0)	77,1
4'	3,47, dd (9,0, 9,0)	71,2	3,48, dd (9,0; 9,0)	71,6	3,49, dd (9,0;9,0)	71,2	3,25, dd (9,0, 9,0)	71,3
5'	3,81 m	77,7	3,85, ddd (2,5; 5,0, 9,0)	77,5	3,84 m	77,34	3,44, m	77,7
6'	4,24, dd (2,5, 12,0) 3,89, dd (4,5, 12,0)	69,6	4,21, dd (2,5; 11,0) 3,92, dd (5,0; 11,0)	70,5	4,02, dd (2,5;11,0) 3,87, dd (5,0; 11,4)	70,2	3,86, dd (2,5, 12,0) 3,43, dd (4,5, 12,0)	68,2
	Glicose		Glicose		Alose		-	-
1''	4,48, d (8,8)	104,6	4,40, d (1,5)	105,1	4,75, d (7,4)	102,8	-	-
2''	3,31, dd (8,8, 9,0)	74,9	3,30, dd (7,5; 9,0)	75,2	3,42, dd (7,4;2,5)	72,3	-	-
3''	3,27, dd (9,0, 9,0)	77,7	3,38, dd (9,0; 9,0)	78,0	4,08, dd (2,4;4,0)	72,7	-	-
4''	3,34, dd (9,0, 9,0)	71,2	3,33, dd (9,0; 9,0)	71,7	3,52 dd (4,0; 9,2)	68,7	-	-
5''	3,39 m	77,4	3,28, ddd (2,5; 5,0; 9,0)	78,0	3,72 m	75,4	-	-
6''	3,89, dd (2,5, 12,0) 3,70, dd (4,5, 12,0)	62,4	3,89 dd (2,5; 11,0) 3,67 dd (5,0; 11,0)	62,8	3,88 dd (3,0; 12,0) 3,67 dd (5,0; 12,0)	62,9	-	-

Posição	12C	
	¹ H (J = Hz)	¹³ C
2	-	160,1 160,1
3	-	133,6 133,6
4	-	178,0 178,0
5	-	150,0 150,1
6	-	131,0 131,0
7	-	157,1 157,1
8	6,32 s 6,27 s	94,9 95,3
9	-	152,0 152,0
10	-	104,6 104,6
1'	-	121,0 121,0
2'	8,11, <i>d</i> (8,6) 7,97, <i>d</i> (8,5)	132,1 131,9
3'	6,80, <i>d</i> (8,6) 6,76, <i>d</i> (8,5)	115,8 115,8
4'	-	157,1 157,1
5'	6,80, <i>d</i> (8,6) 6,76, <i>d</i> (8,5)	115,8 115,8
6'	8,11, <i>d</i> (8,6) 7,97, <i>d</i> (8,5)	132,1 131,9
OCH ₃ (C6)	3,87 s 3,83 s	60,7 60,7
	Glucose	
1"	5,33, <i>d</i> (8,8) 5,03, <i>d</i> (8,8)	103,1 103,1
2"	3,54, <i>dd</i> (8,8, 9,0) 3,48, <i>dd</i> (8,8, 9,0)	75,4 75,3
3"	3,46, <i>dd</i> (9,0, 9,0) 3,46, <i>dd</i> (9,0, 9,0)	77,4 77,4
4"	3,15, <i>dd</i> (9,0, 9,0) 3,05, <i>dd</i> (9,0, 9,0)	71,5 71,5

Posição	12C	
	¹ H (<i>J</i> = Hz)	¹³ C
5"	3,25, <i>m</i>	76,1
	2,75, <i>m</i>	75,7
6"	3,95, <i>dd</i> (2,5, 12,0)	65,5
	3,79, <i>dd</i> (4,5, 12,0)	64,5
	4,41, <i>dd</i> (2,5, 12,0)	
	3,37, <i>dd</i> (4,5, 12,0)	
Truxinil		
1'''	-	114,6
1'''	-	114,6
2'''	6,60, <i>d</i> (8,5)	128,8
2'''	6,85, <i>d</i> (8,5)	129,4
3'''	6,56, <i>d</i> (8,5)	115,7
3'''	6,66, <i>d</i> (8,5)	115,7
4'''	-	156,9
4'''	-	157,2
5'''	6,56, <i>d</i> (8,5)	115,7
5'''	6,66, <i>d</i> (8,5)	115,7
6'''	6,60, <i>d</i> (8,5)	128,8
6'''	6,85, <i>d</i> (8,5)	129,4
7''''	4,07, <i>ddd</i> (10,2, 8,6, 2,3)	40,9
7'''	3,69, <i>ddd</i> (10,2, 8,6, 2,3)	41,9
8'''	3,47, <i>ddd</i> (10,2, 8,6, 2,3)	48,5
8'''	3,44, <i>ddd</i> (10,2, 8,6, 2,3)	47,2
9'''	-	173,2
9'''	-	171,4

Figura dos espectros das substâncias dos capítulos de *Paepalanthus geniculatus*.

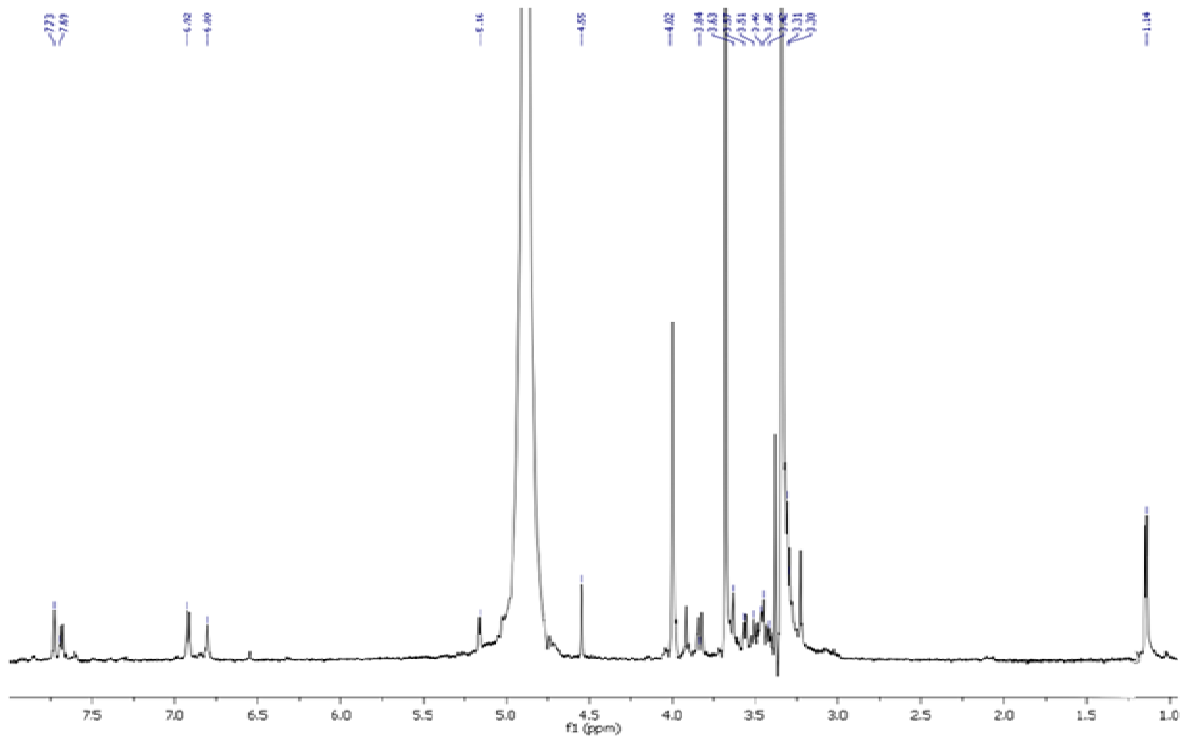


Figura 28 - Espectro de RMN de ^1H da substância **1C** (14,2 τ , CD_3OD).

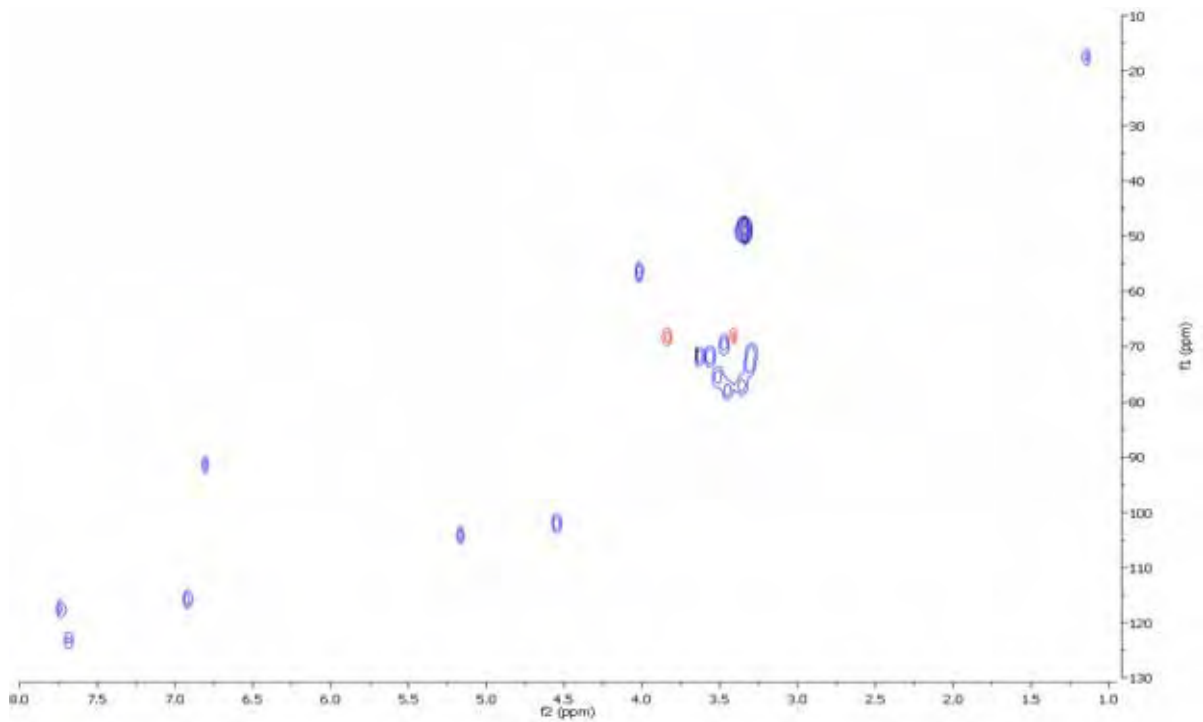


Figura 29 - Espectro de HSQC da substância **1C** (CD_3OD).

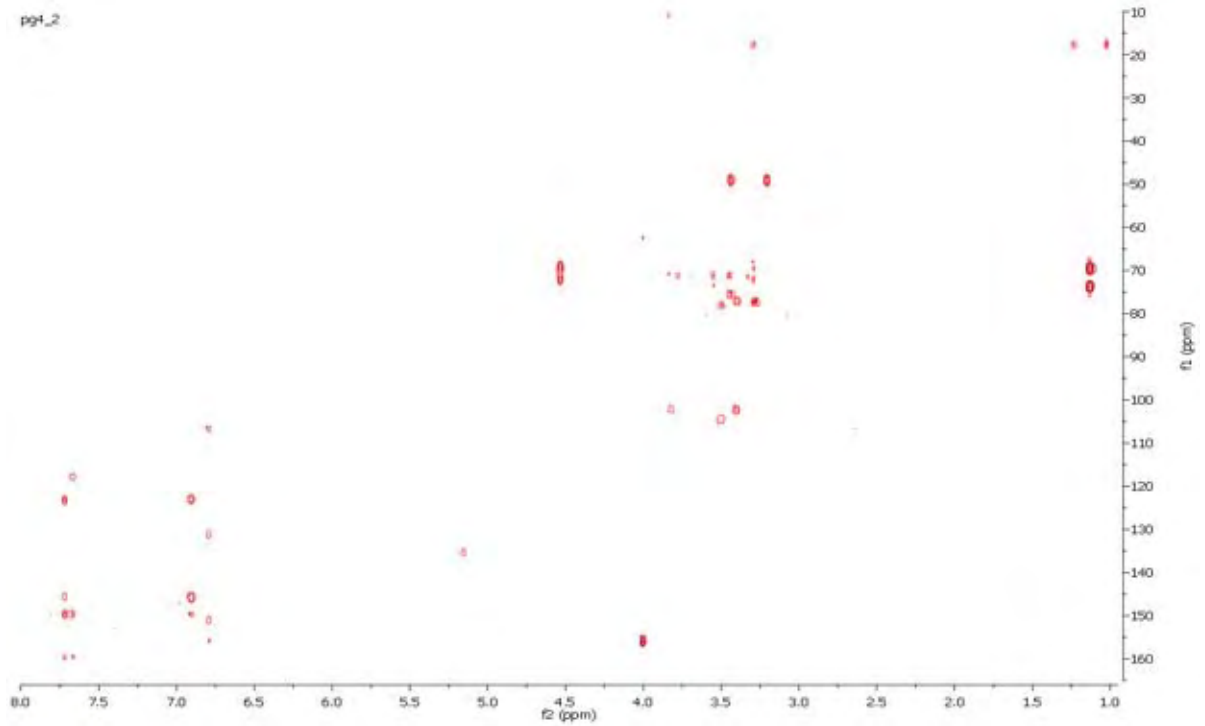


Figura 30 - Espectro HMBC da substância **1C** (CD₃OD).

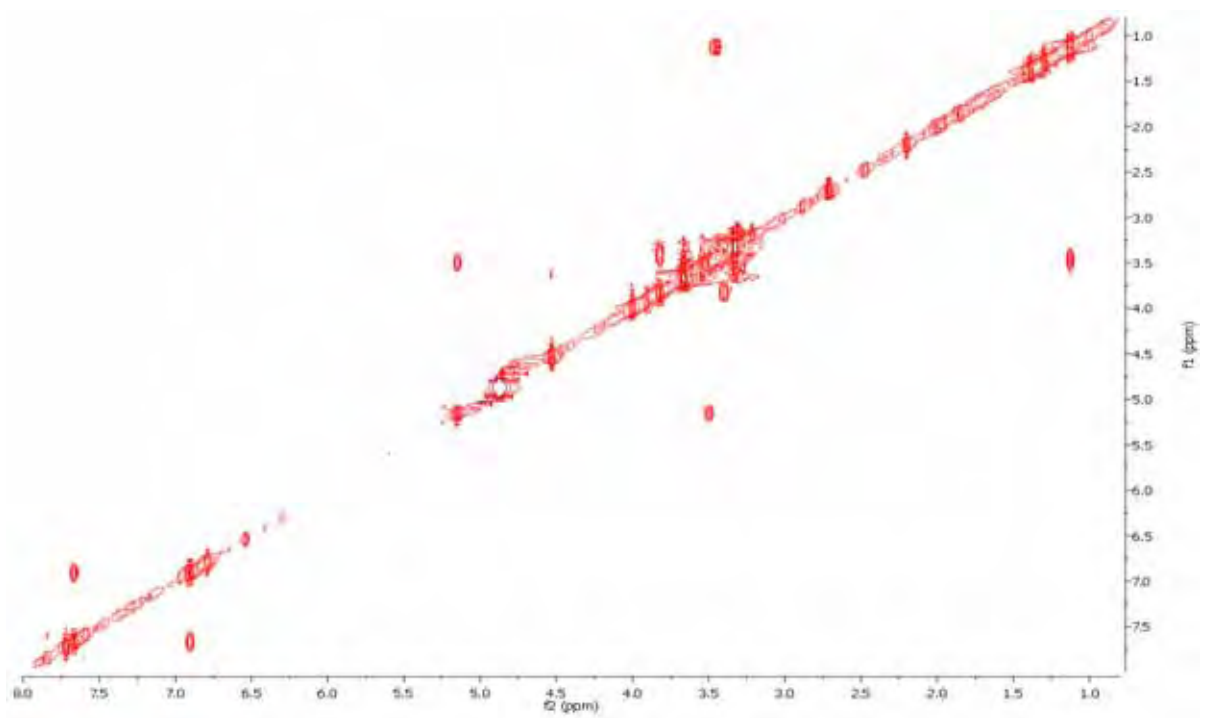


Figura 31 - Espectro de COSY da substância **1C** (CD₃OD).

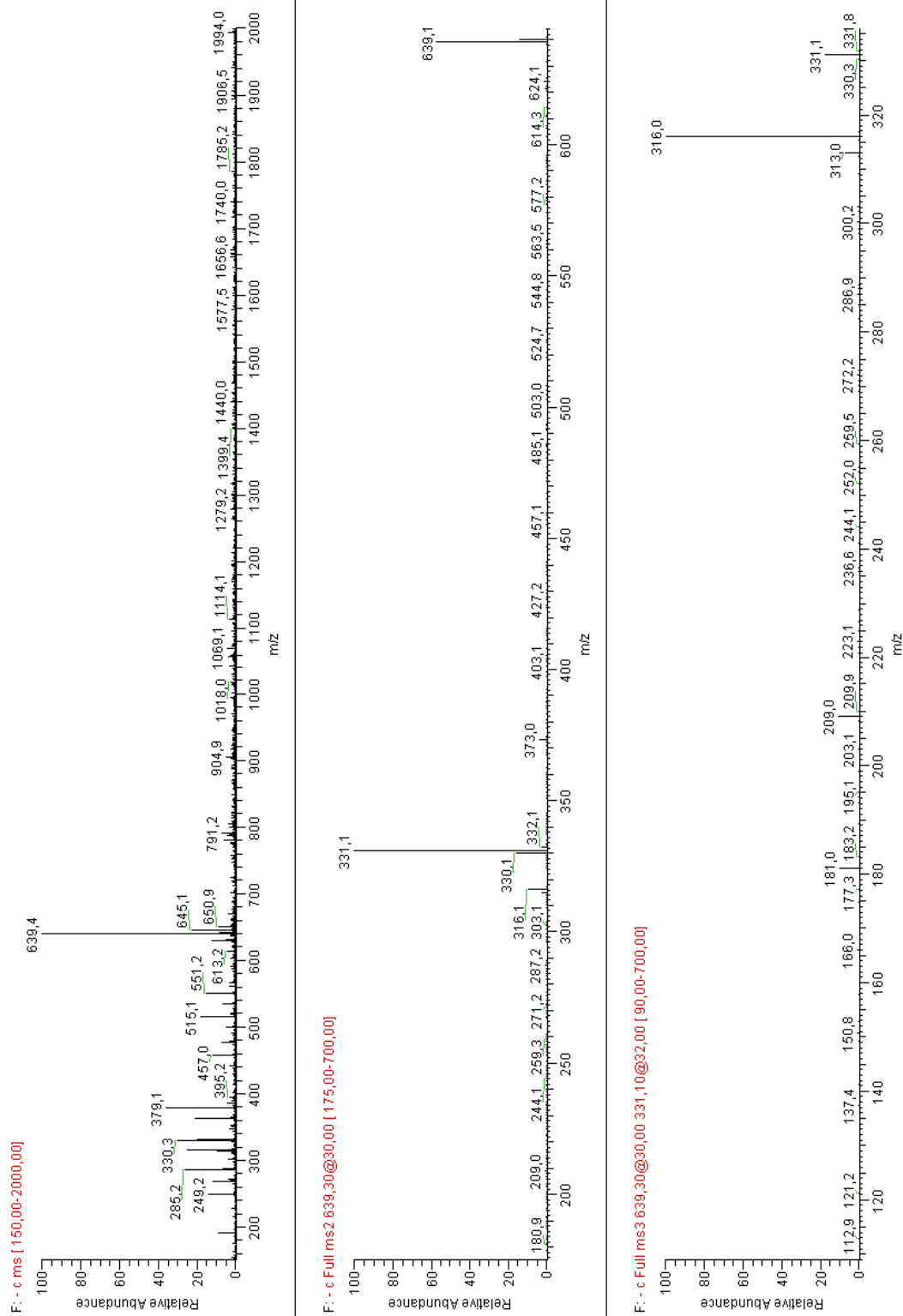


Figura 32 - Espectros de HPLC-ESI-MSⁿ (modo negativo) registrados para o íon [MH]⁻ de m/z 639,4 e precursores da substância **1C**.

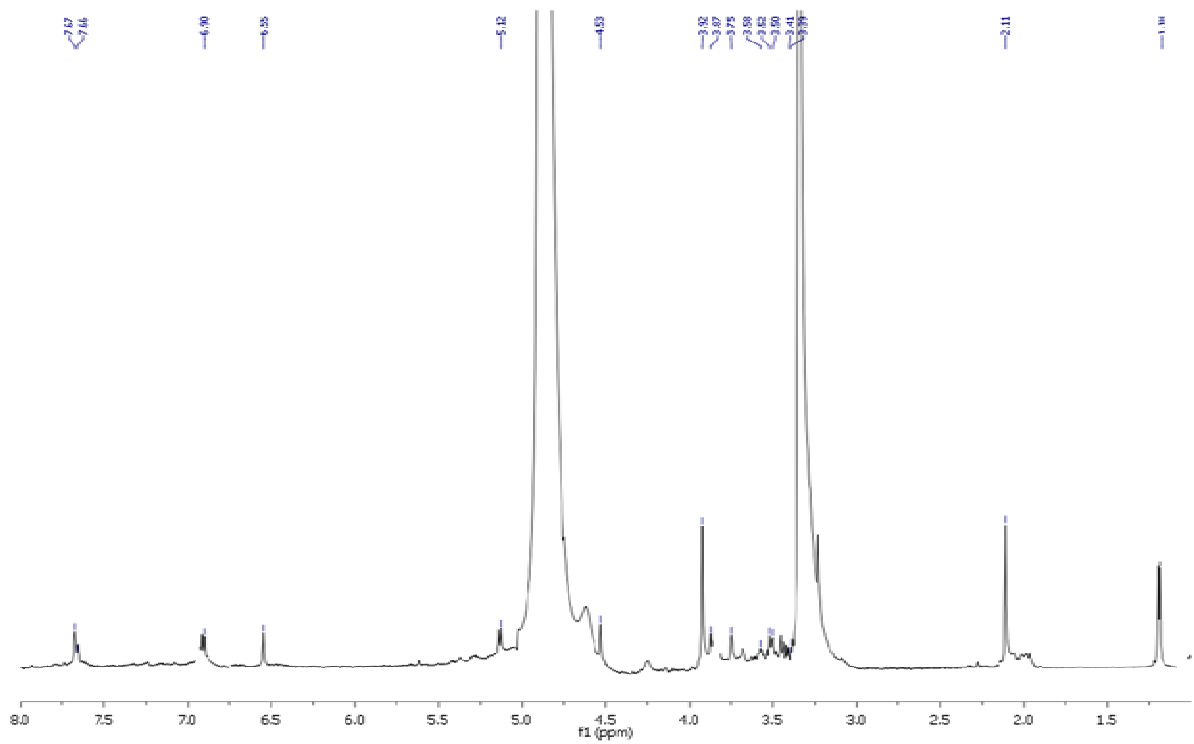


Figura 33 - Espectro de RMN de ^1H da substância **5C** (14,2 τ , CD_3OD).

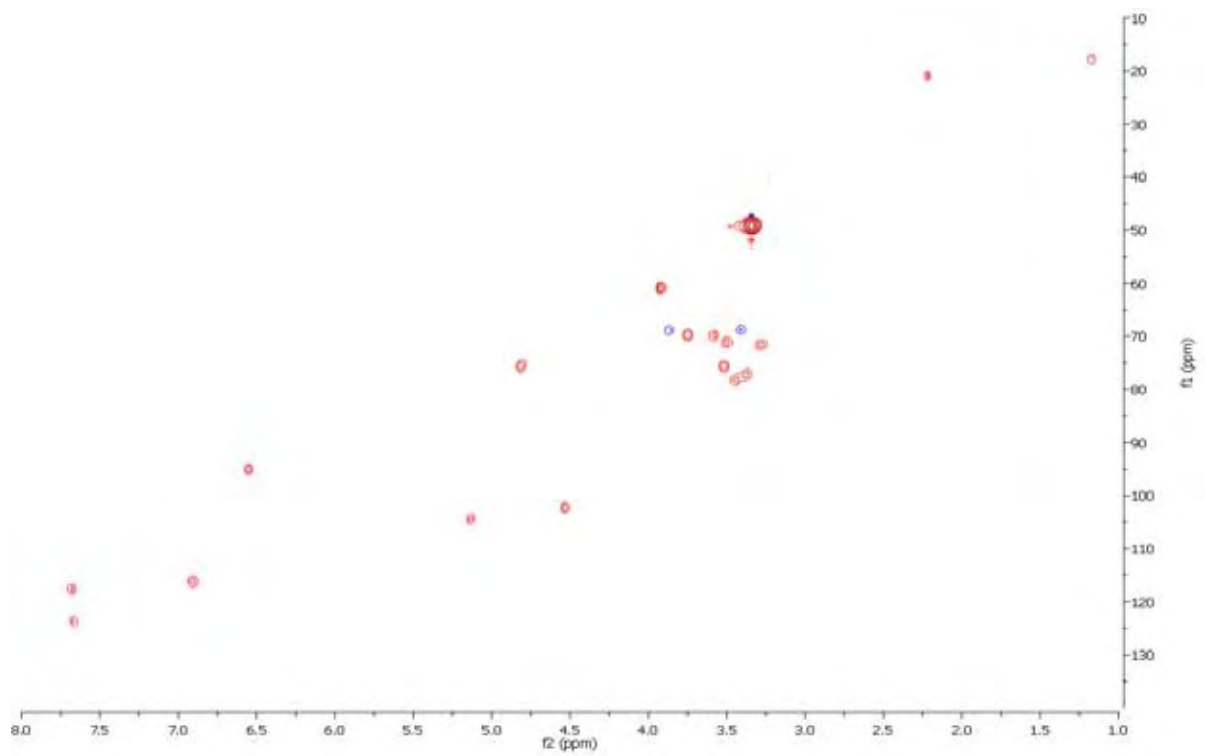


Figura 34 - Espectro de HSQC da substância **5C** (CD_3OD).

Compostos fenólicos de Paepalanthus geniculatus (Eriocaulaceae).

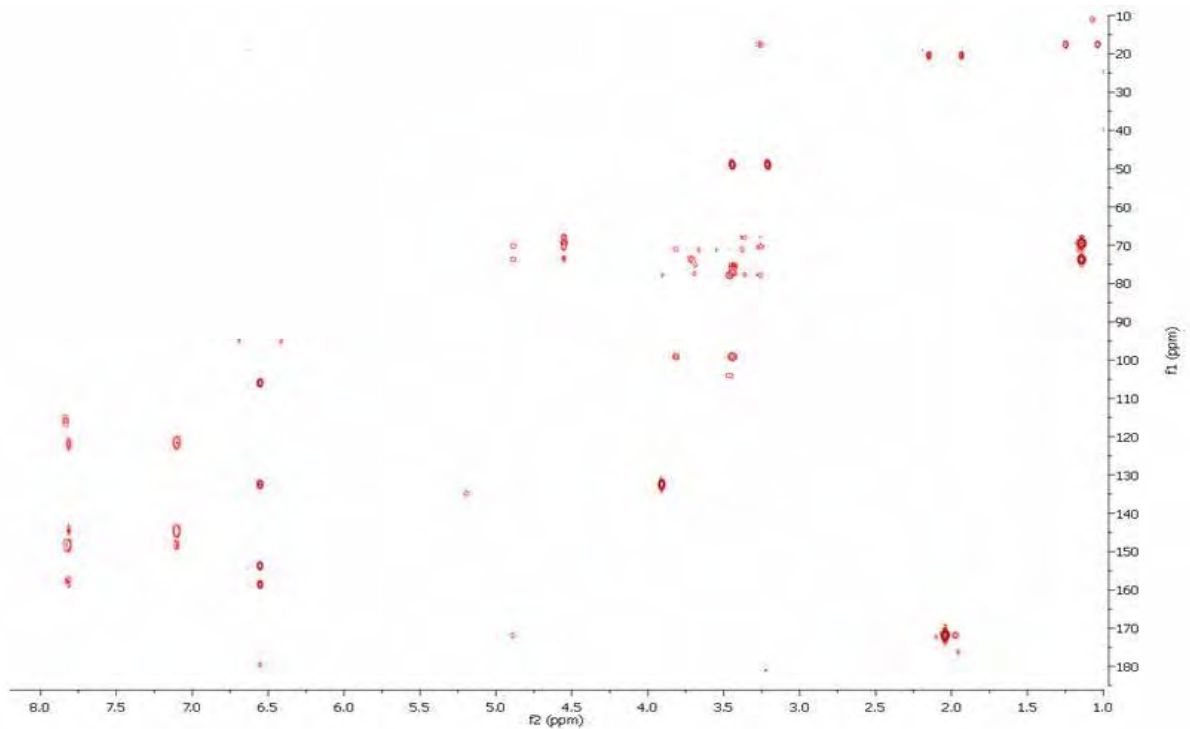


Figura 35 - Espectro de HMBC da substância **5C** (CD₃OD).

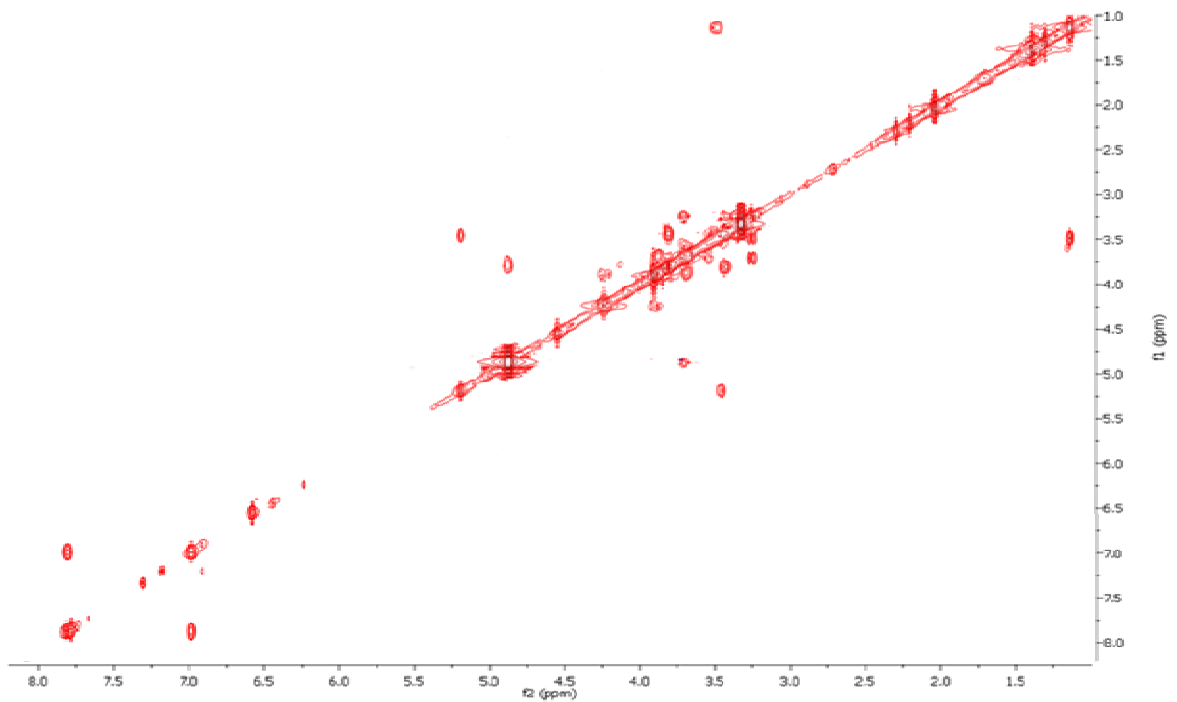
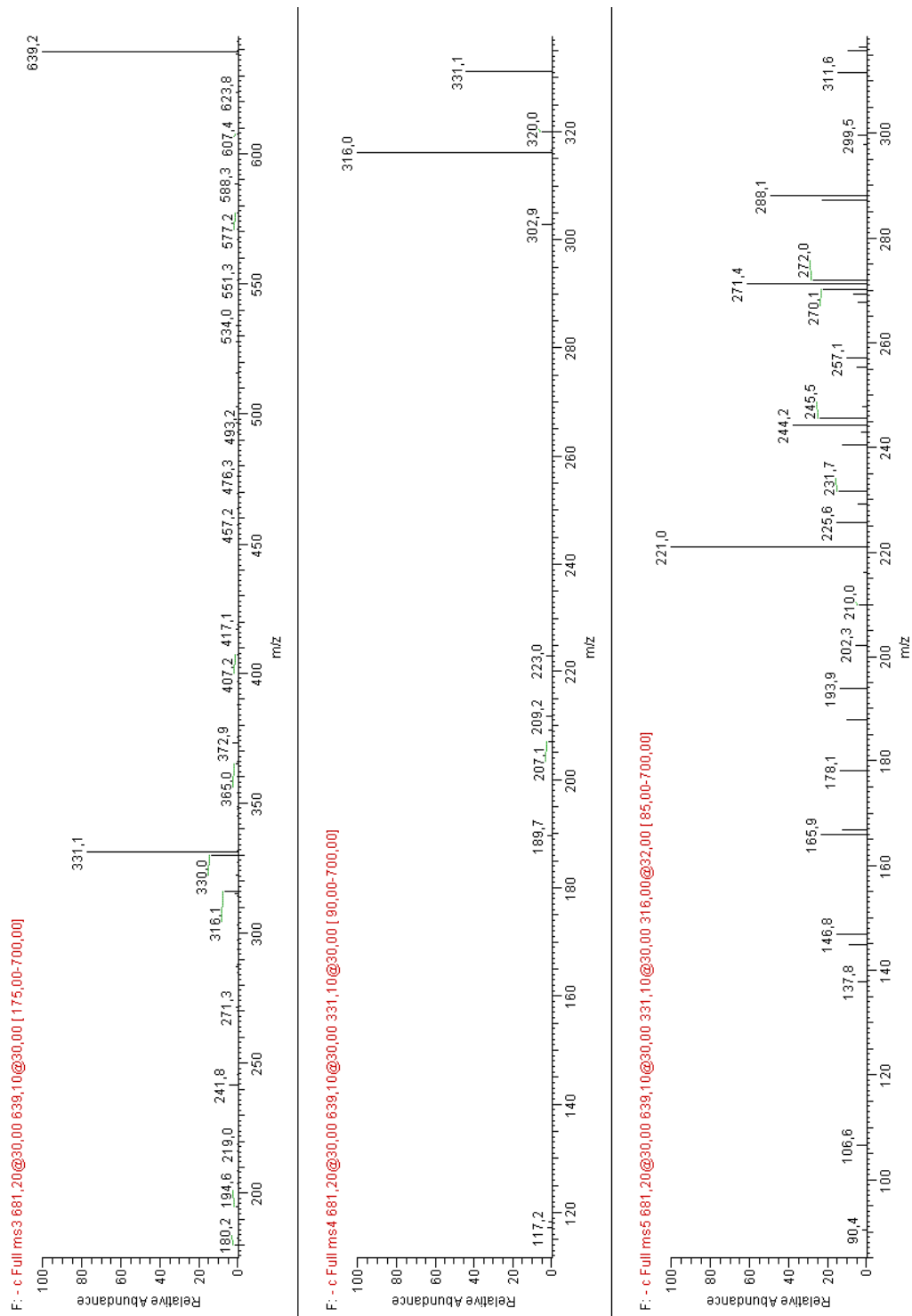
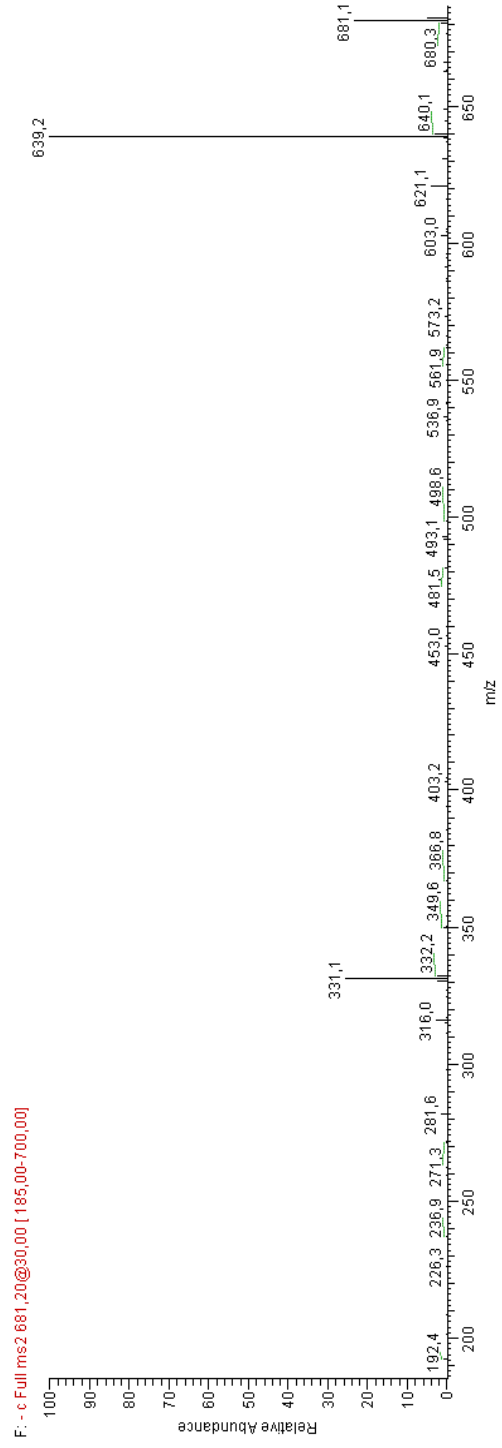
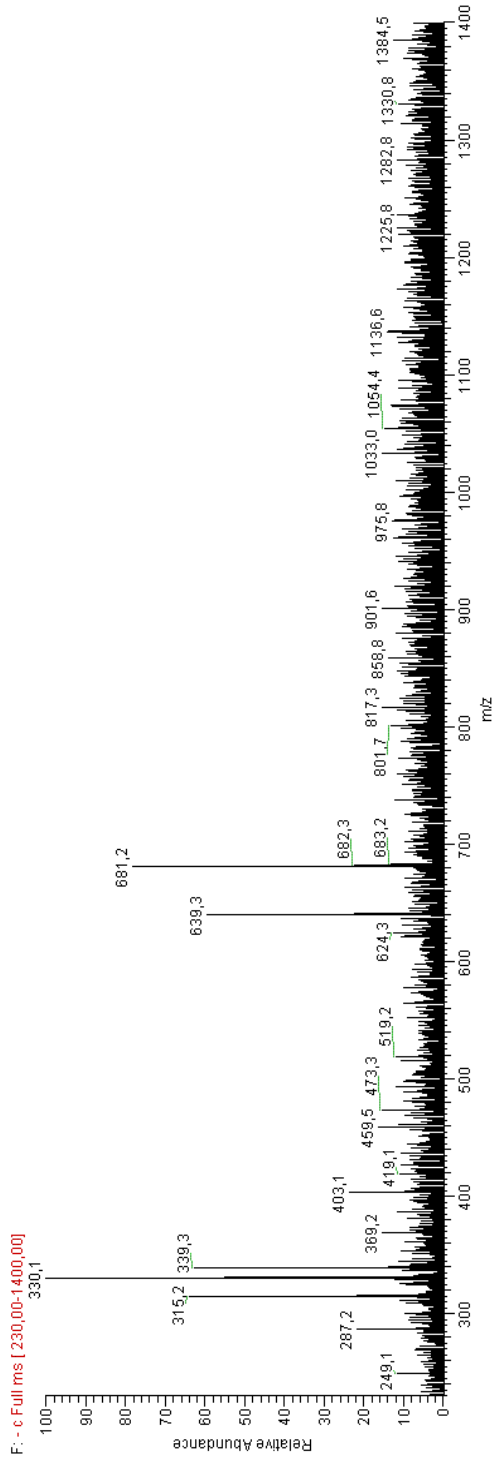


Figura 36 - Espectro de COSY da substância **5C** (CD₃OD).

Compostos fenólicos de Paepalanthus geniculatus (Eriocaulaceae).

Figura 37 - Espectros de HPLC-ESI-MSⁿ (modo negativo) registrados para o íon [MH]⁻ de *m/z* 681,2 e precursores da substância **5C**.





Compositos fenólicos de Paepalantius geniculatus (Eriocaulaceae)

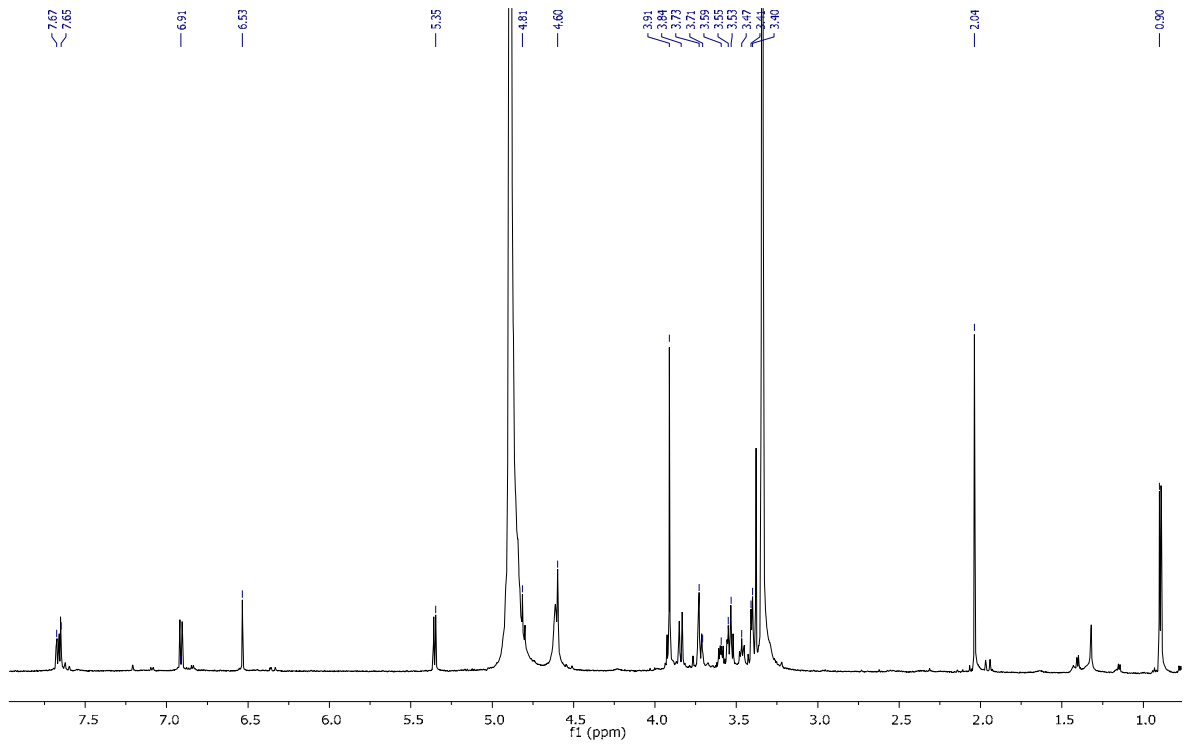


Figura 38 - Espectro de RMN de ^1H da substância **7C** (14,2 τ , CD_3OD).

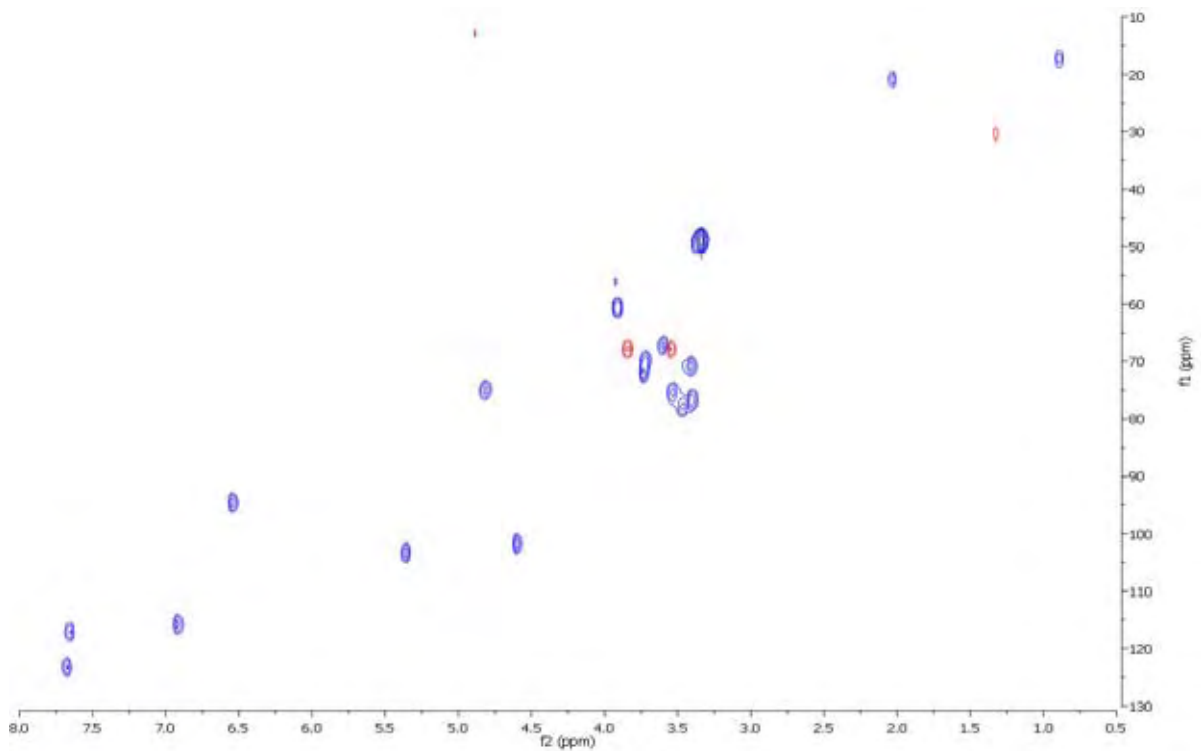


Figura 39 - Espectro de HSQC da substância **7C** (CD_3OD).

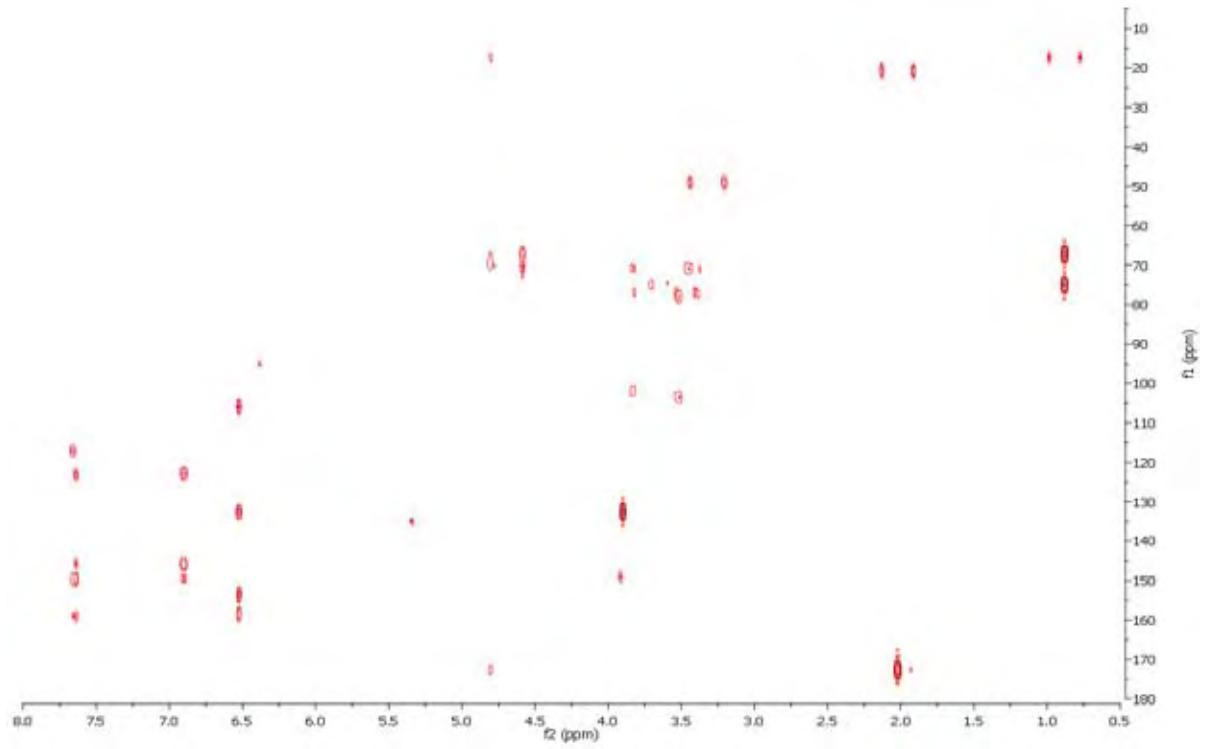


Figura 40 - Espectro de HMBC da substância **7C** (CD₃OD).

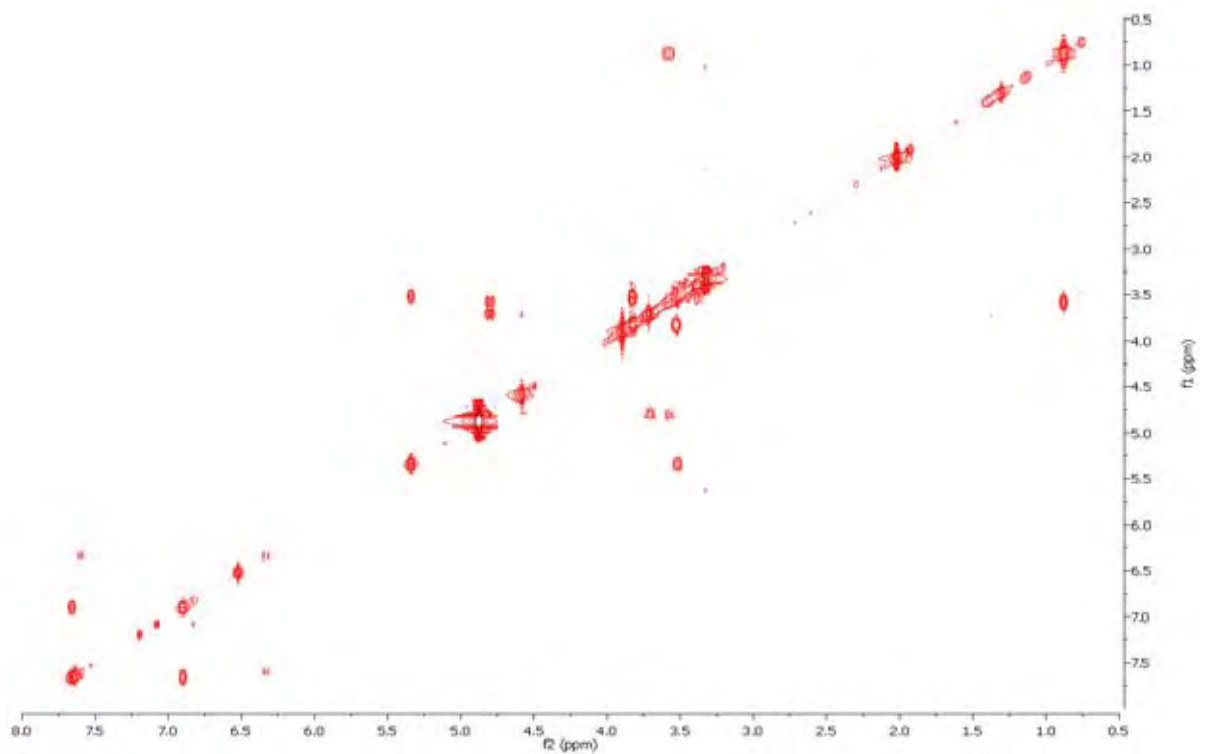


Figura 41 - Espectro de COSY da substância **7C** (CD₃OD).

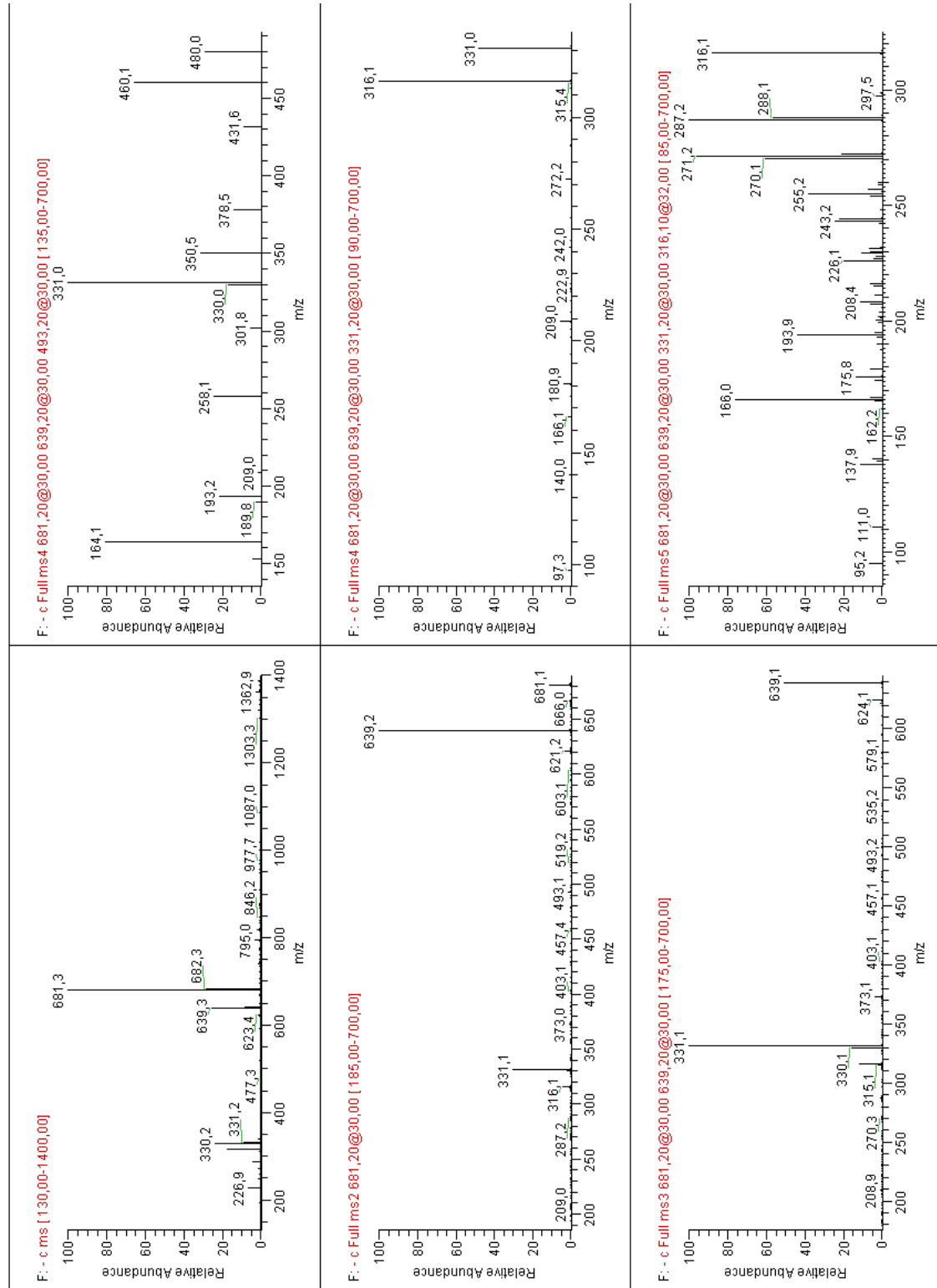


Figure 42 - Espectros de HPLC-ESI-MSⁿ (modo negativo) registrados para o íon [MH]⁻ de m/z 681,2 e precursores da substância 7C.

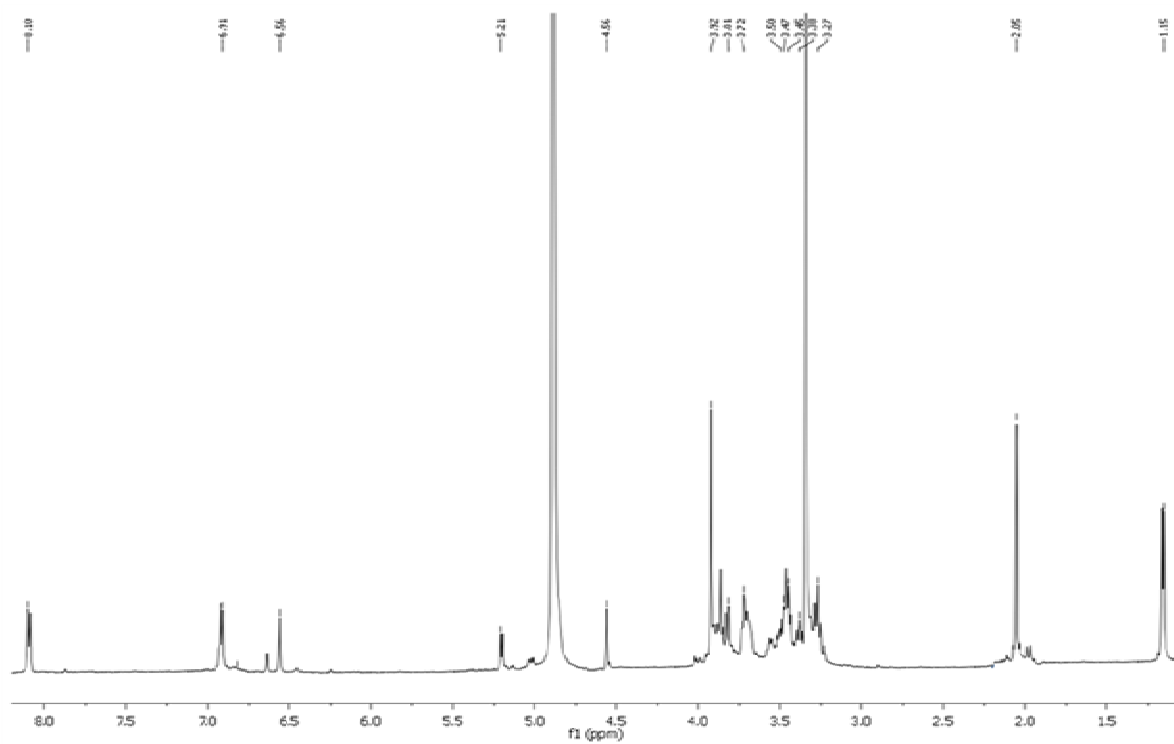


Figura 43 - Espectro de RMN de ^1H da substância **9C** (14,2 τ , CD_3OD).

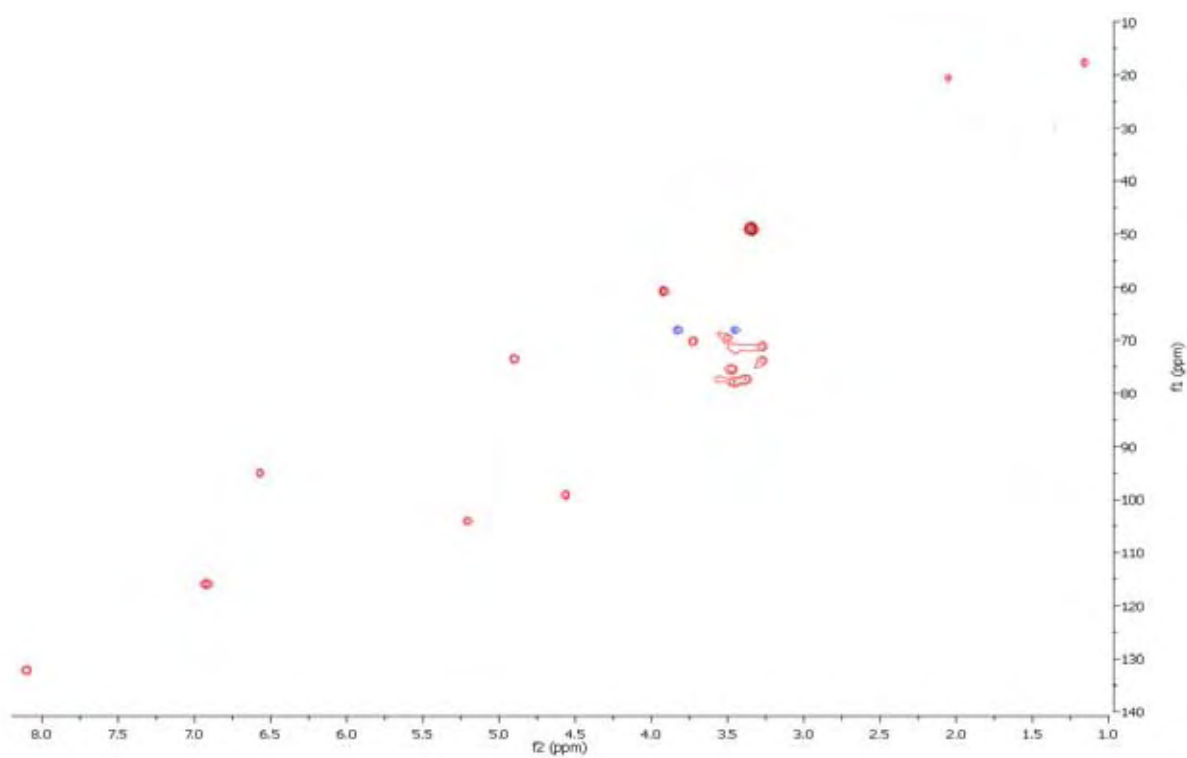


Figura 44 - Espectro de HSQC da substância **9C** (CD_3OD).

Compostos fenólicos de Paepalanthus geniculatus (Eriocaulaceae).

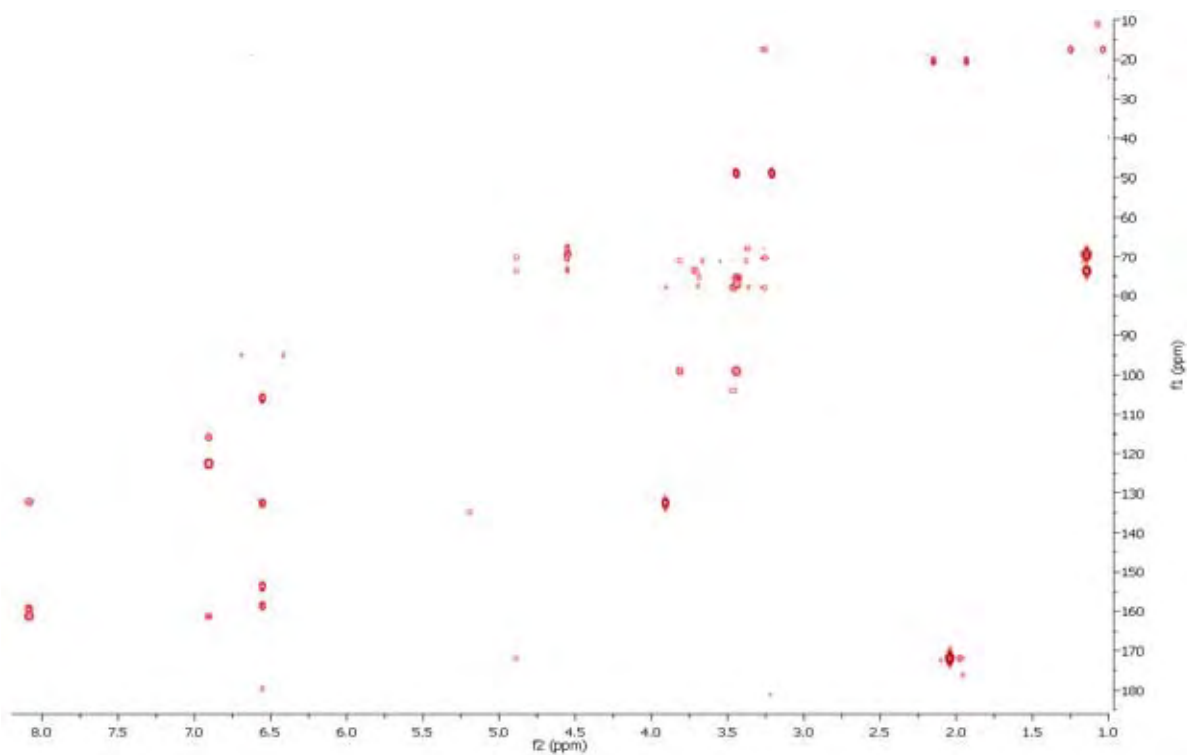


Figura 45 - Espectro de HMBC da substância **9C** (CD₃OD).

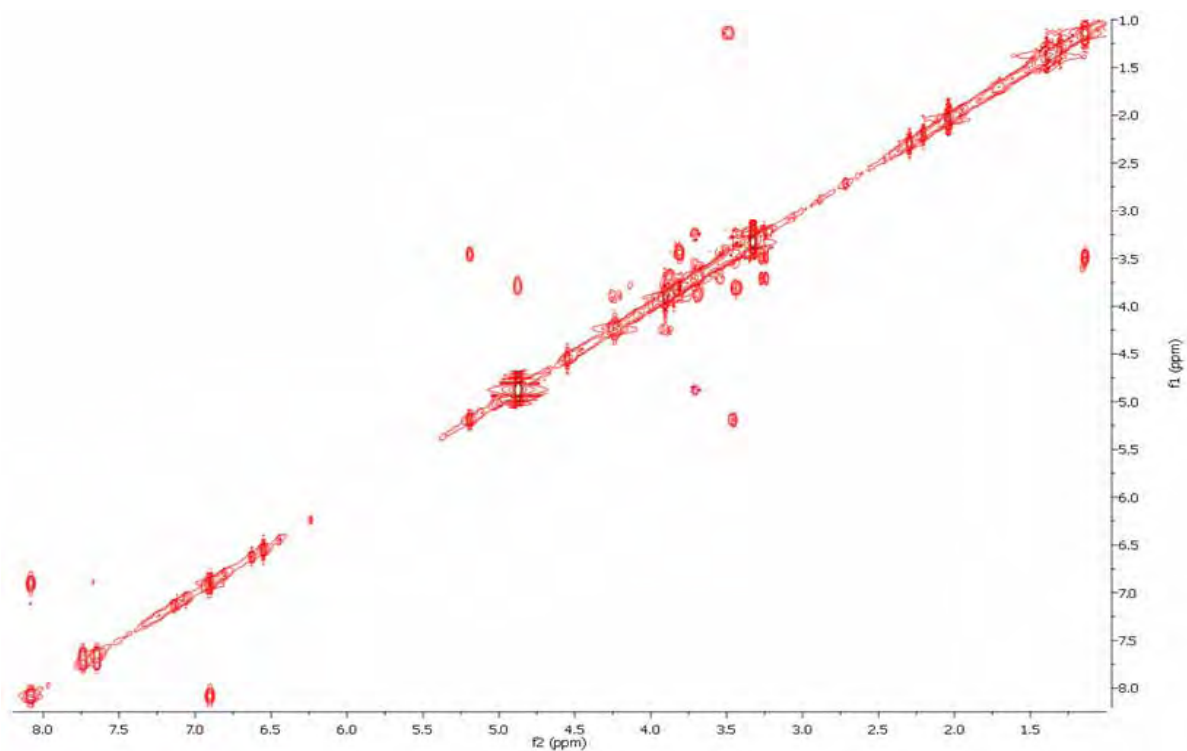


Figura 46 - Espectro de COSY da substância **9C** (CD₃OD).

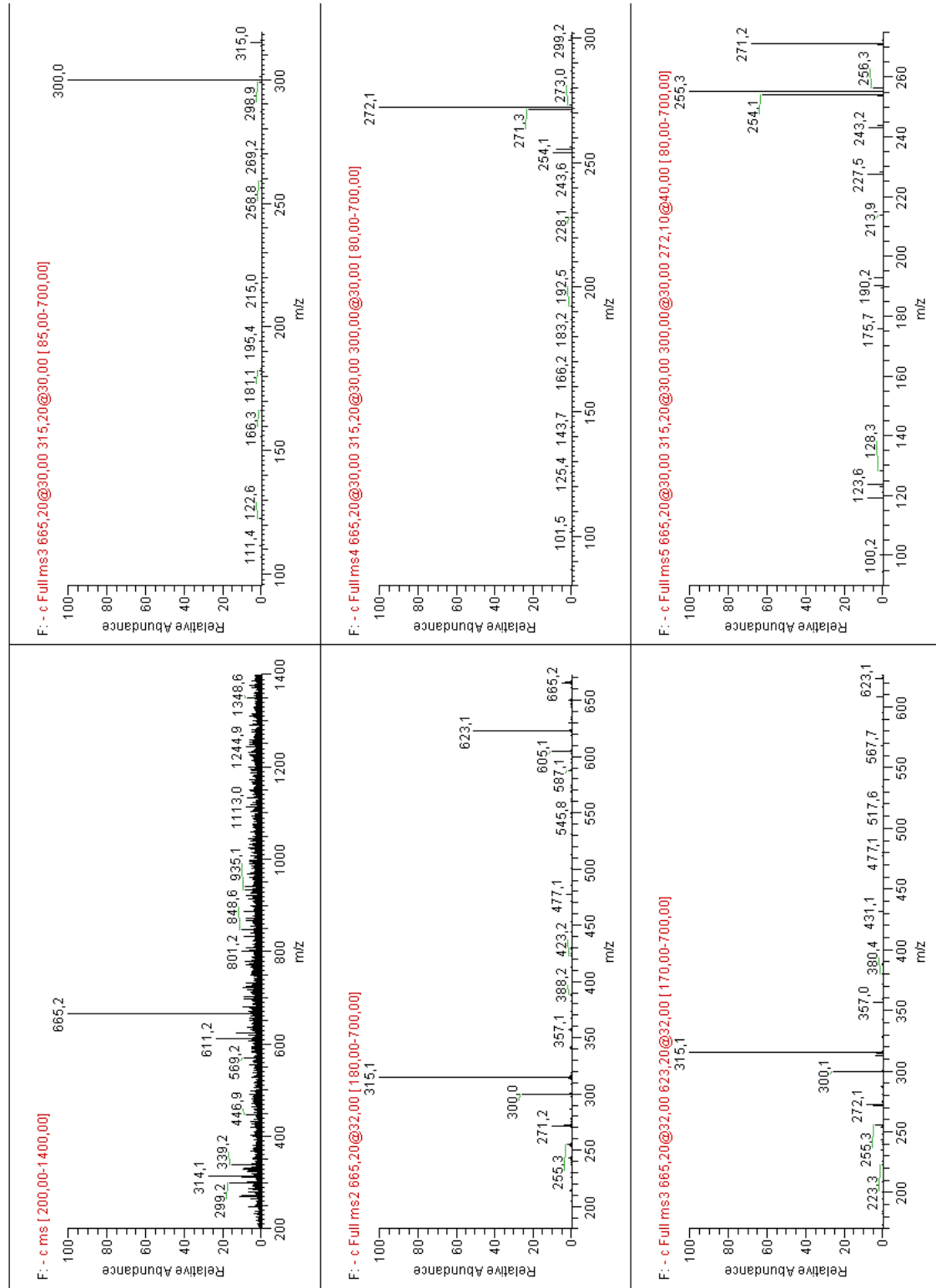


Figure 47 - Espectros de HPLC-ESI-MSⁿ (modo negativo) registrados para o íon [MH]⁻ de m/z 665,2 e precursores da substância **9C**.

Compostos fenólicos de Paepalantius geniculatus (Eriocaulaceae)

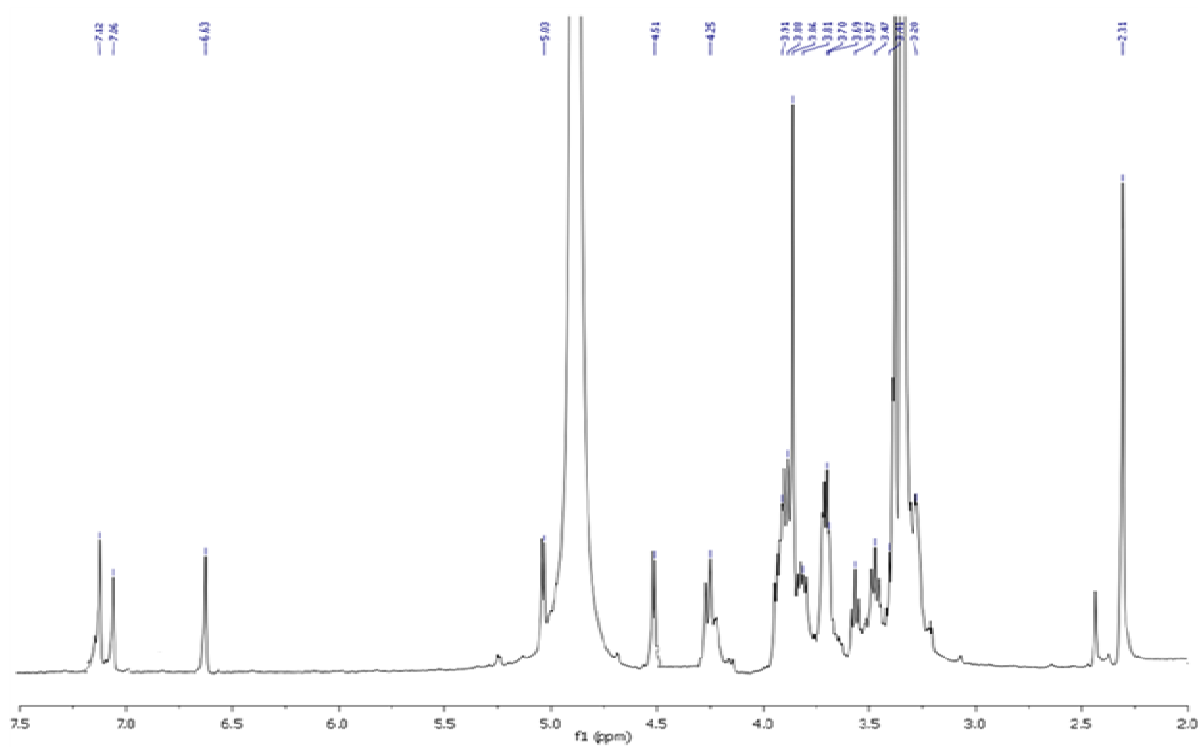


Figura 48 - Espectro de RMN de ^1H da substância **10C** (14,2 τ , CD_3OD).

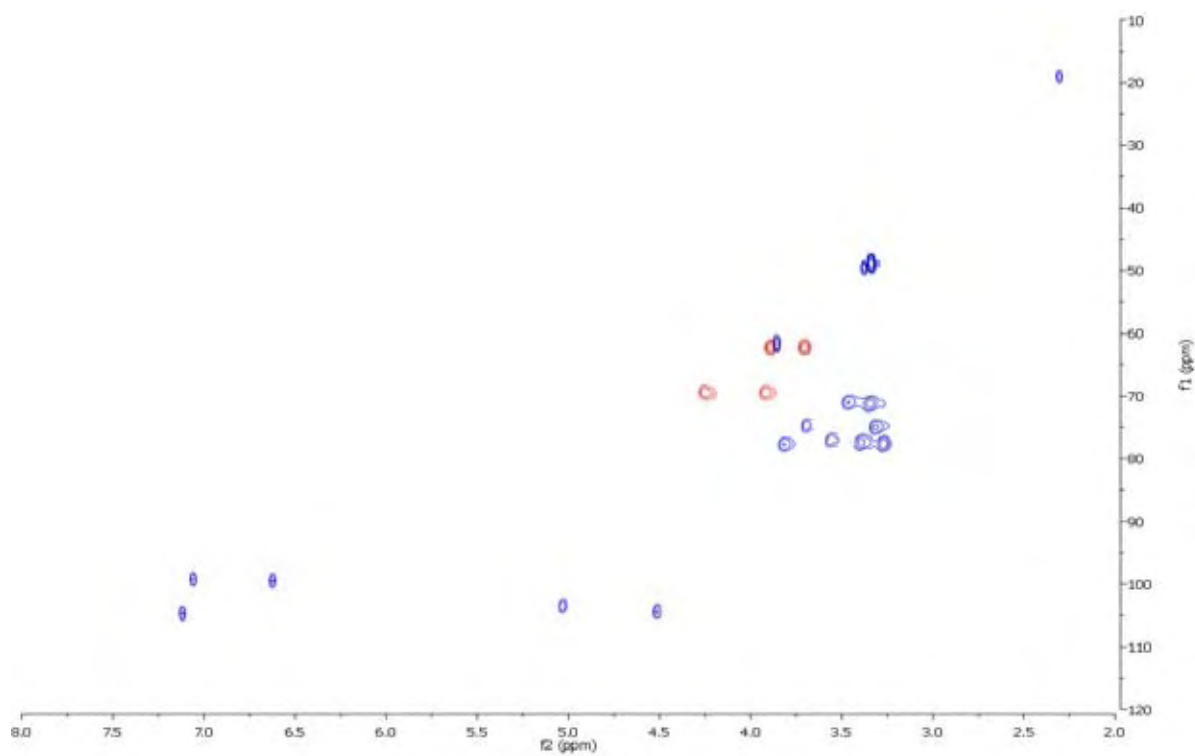


Figura 49 - Espectro de HSQC da substância **10C** (CD_3OD).

Compostos fenólicos de Paepalanthus geniculatus (Eriocaulaceae).

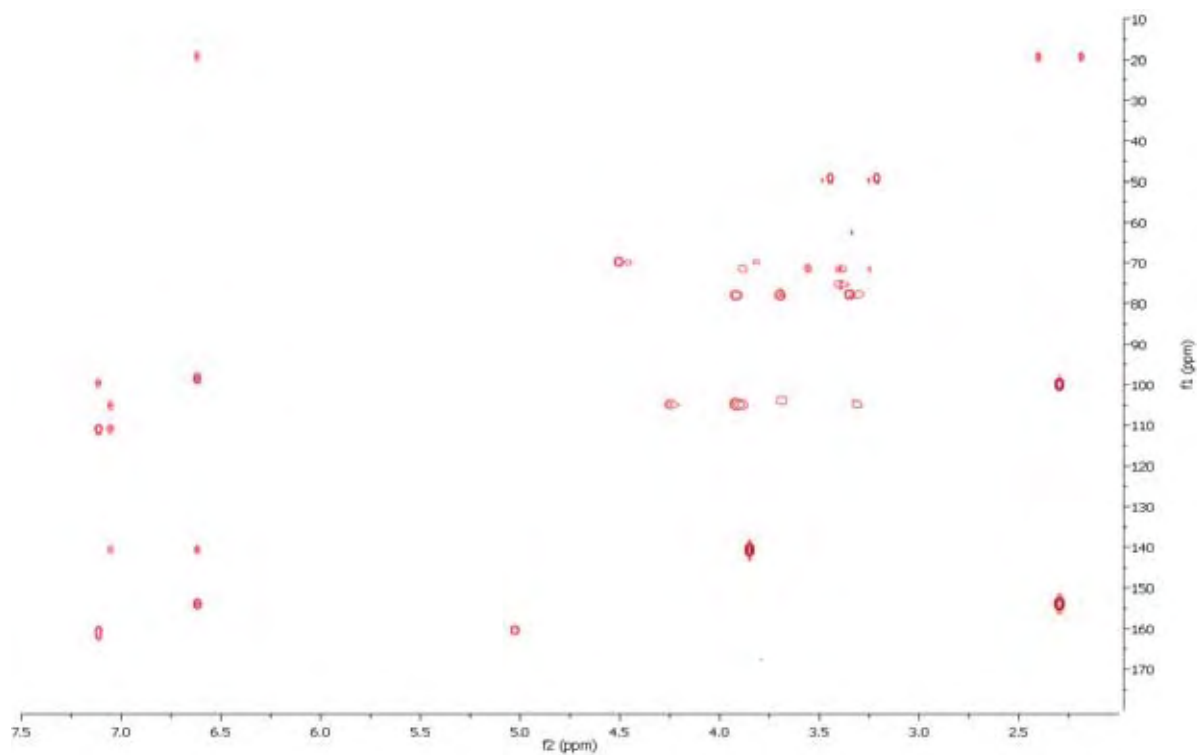


Figura 50 - Espectro de HMBC da substância **10C** (CD₃OD).

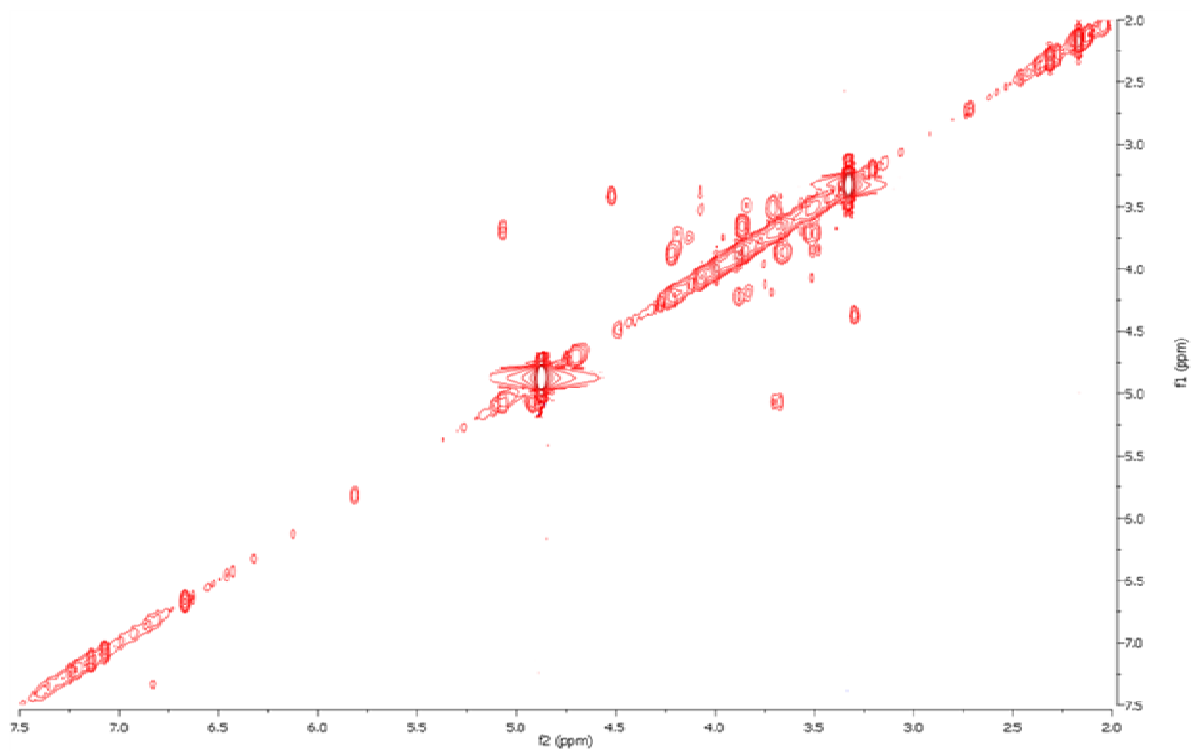
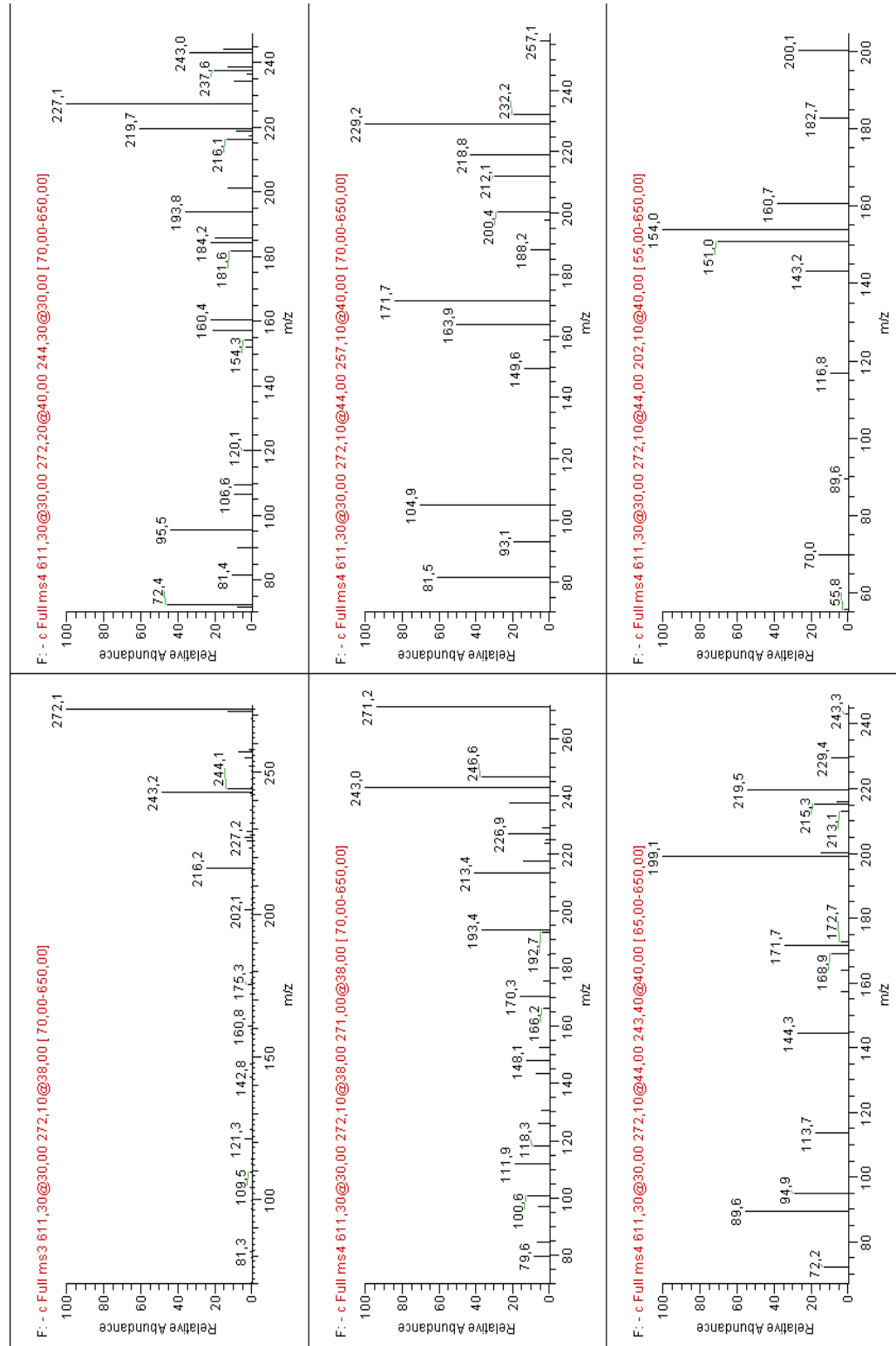
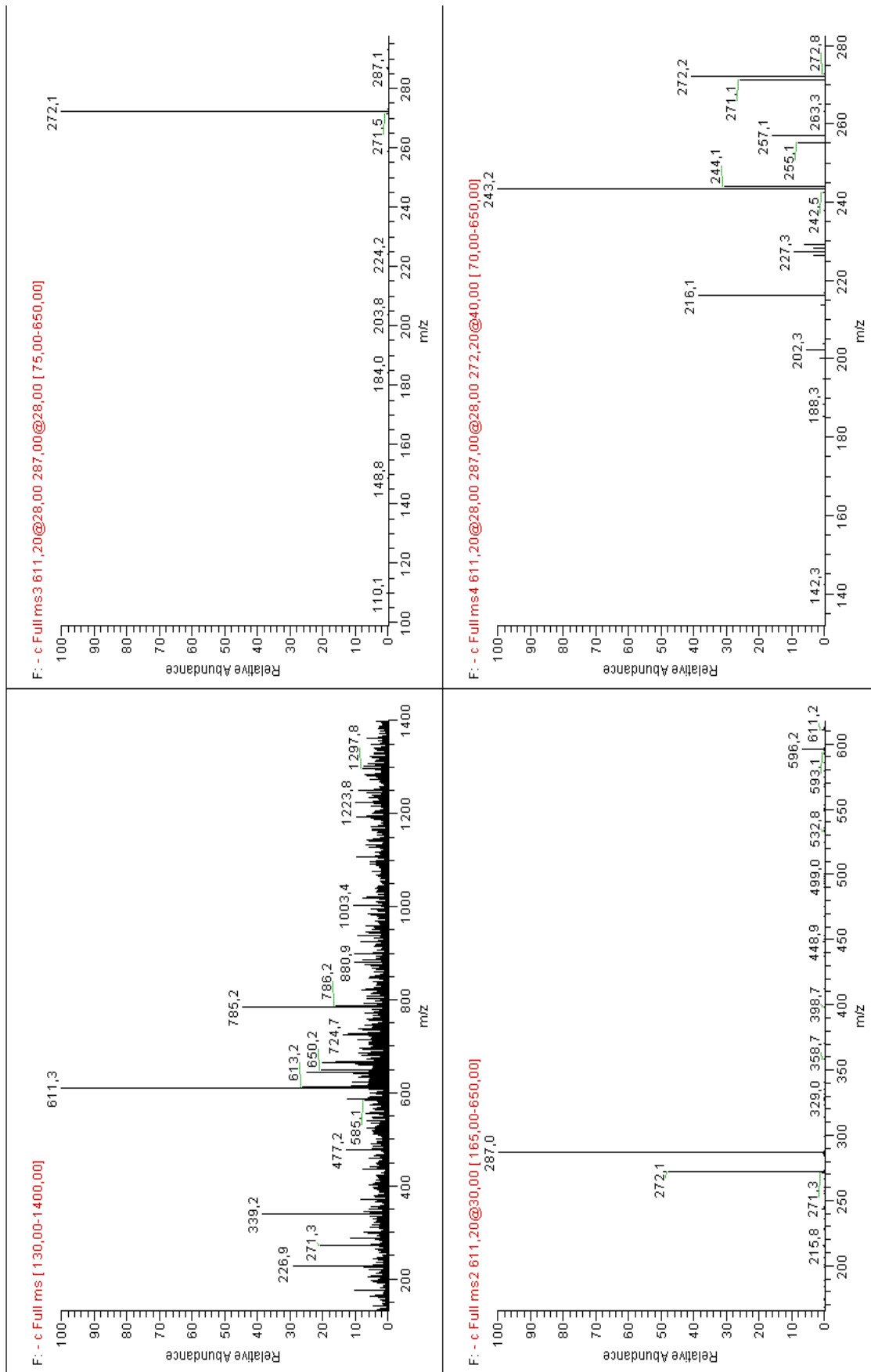


Figura 51 - Espectro de COSY da substância **10C** (CD₃OD).

Figura 52 - Espectros de HPLC-ESI-MSⁿ (modo negativo) registrados para o íon [MH]⁻ de *m/z* 611,2 e precursores da substância **10C**.





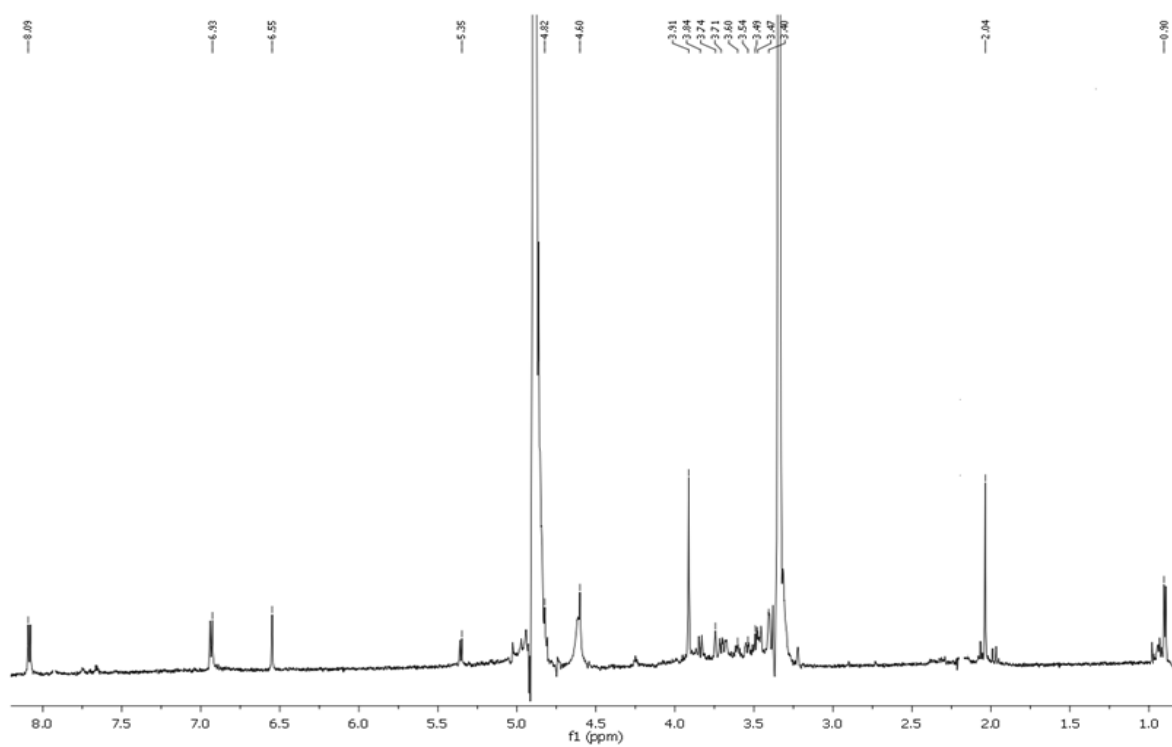


Figura 53 - Espectro de RMN de ^1H da substância **11C** (14,2 τ , CD_3OD).

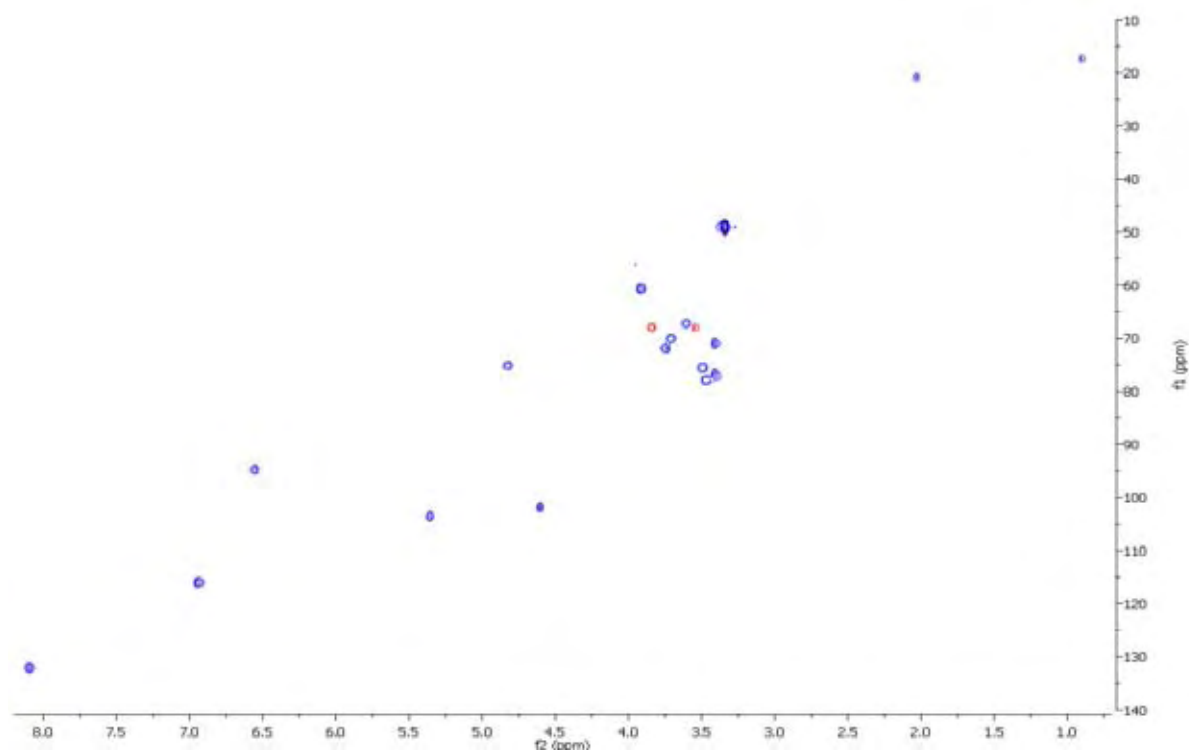


Figura 54 - Espectro de HSQC da substância **11C** (CD_3OD).

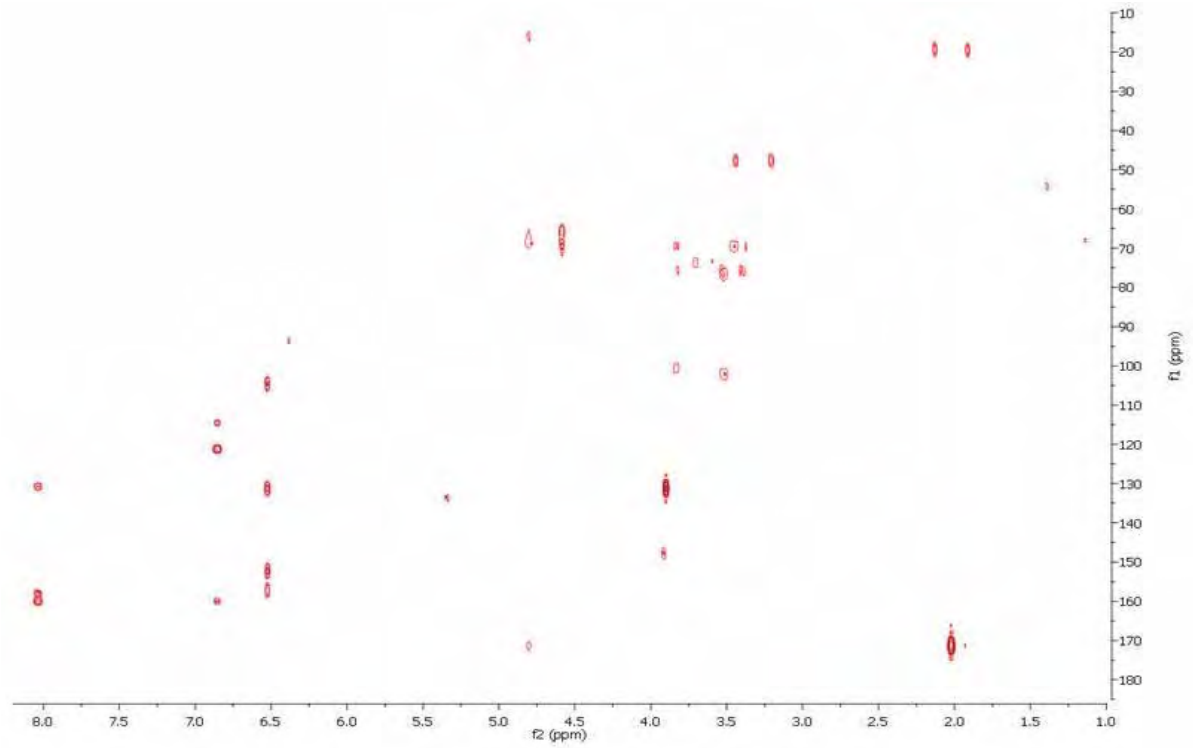


Figura 55 - Espectro de HMBC da substância **11C** (CD₃OD).

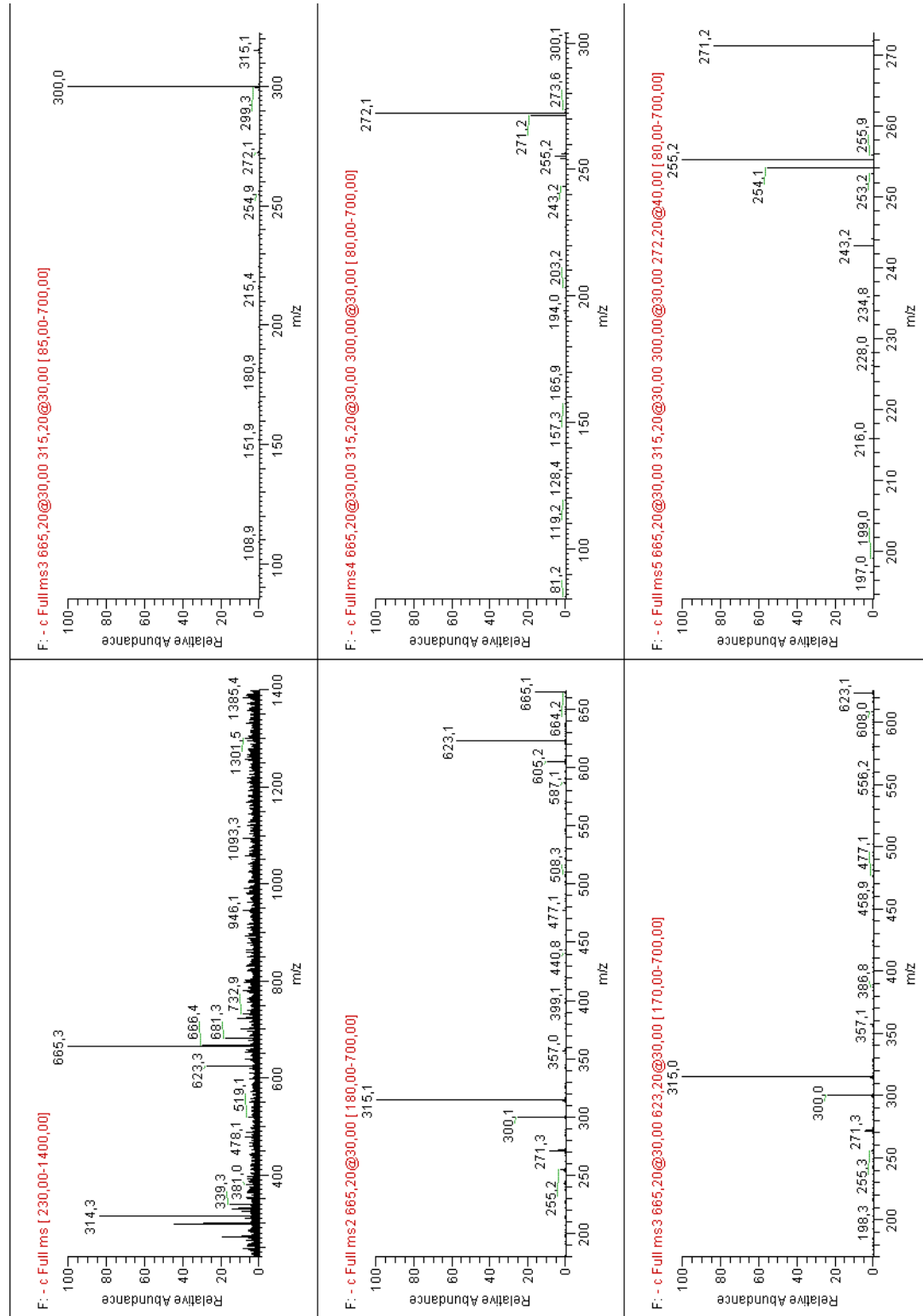


Figura 56 - Espectros de HPLC-ESI-MSⁿⁱ (modo negativo) registrados para o íon [MH]⁻ de m/z 665,3 e precursores da substância **11C**.

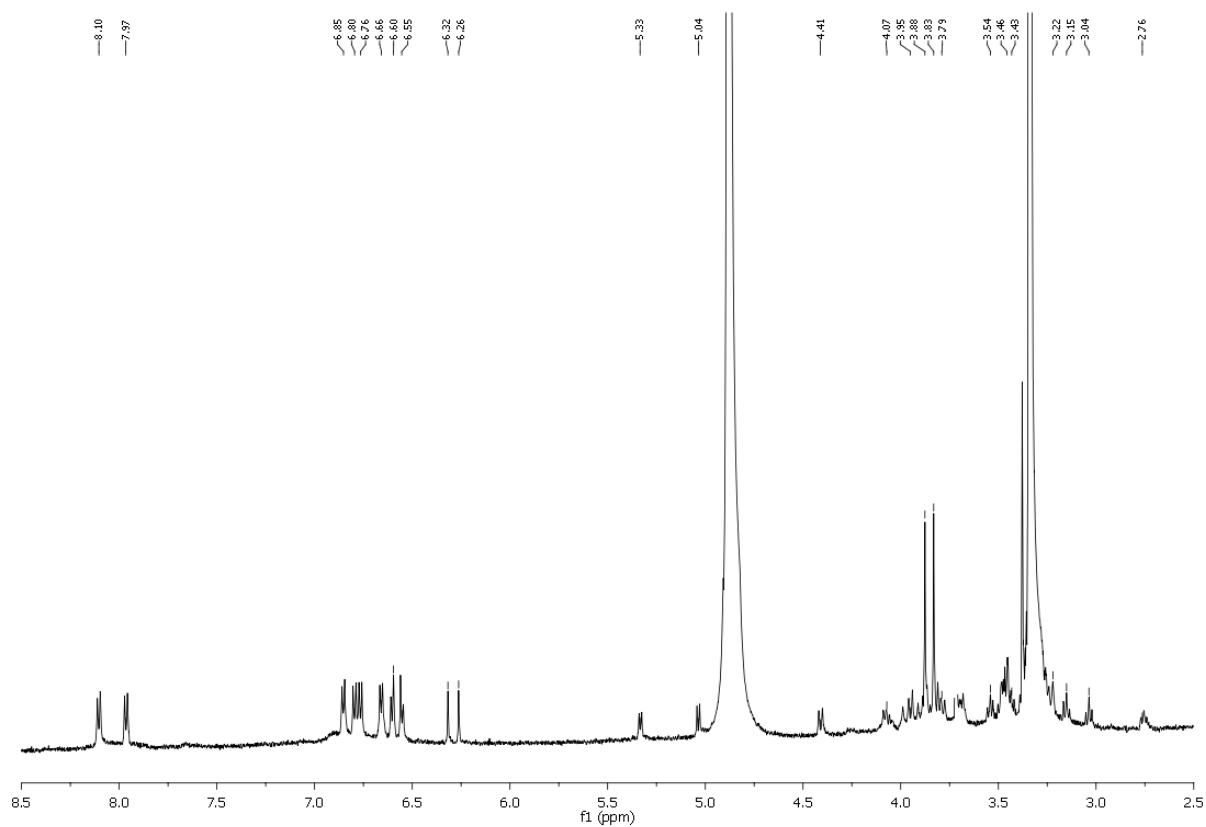


Figura 57 - Espectro de RMN de ^1H da substância **12C** (14,2 τ , CD_3OD).

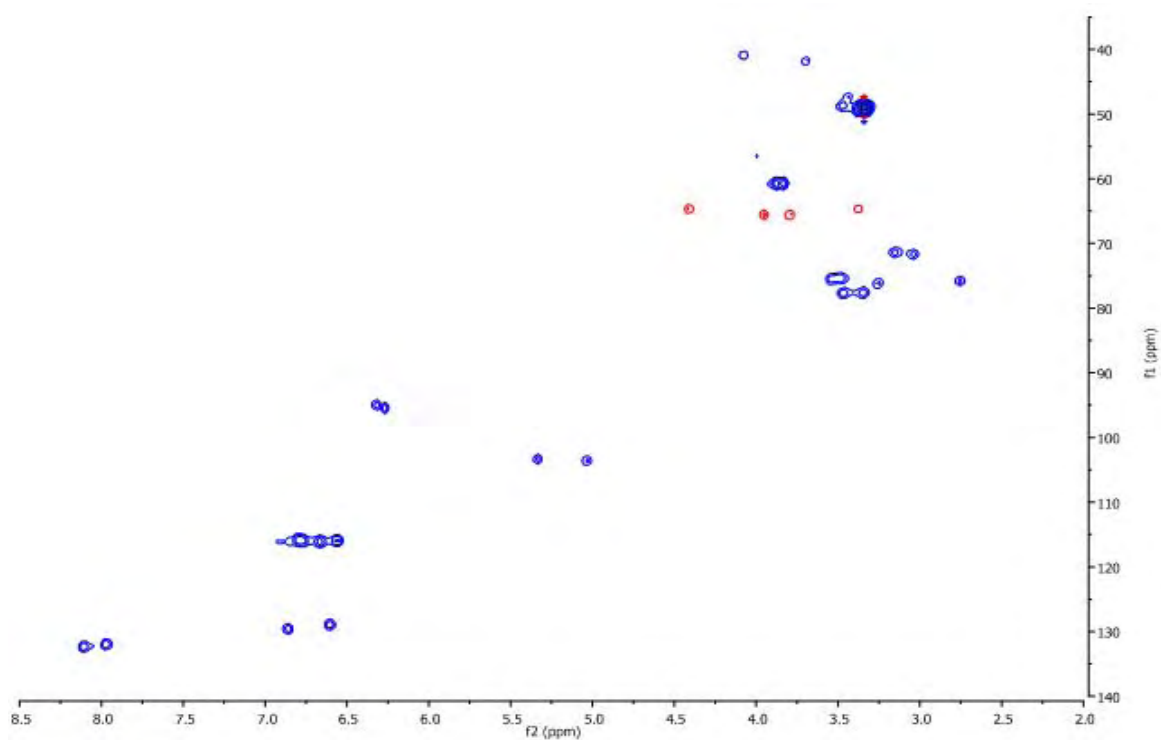


Figura 58 - Espectro de HSQC da substância **12C** (CD_3OD).

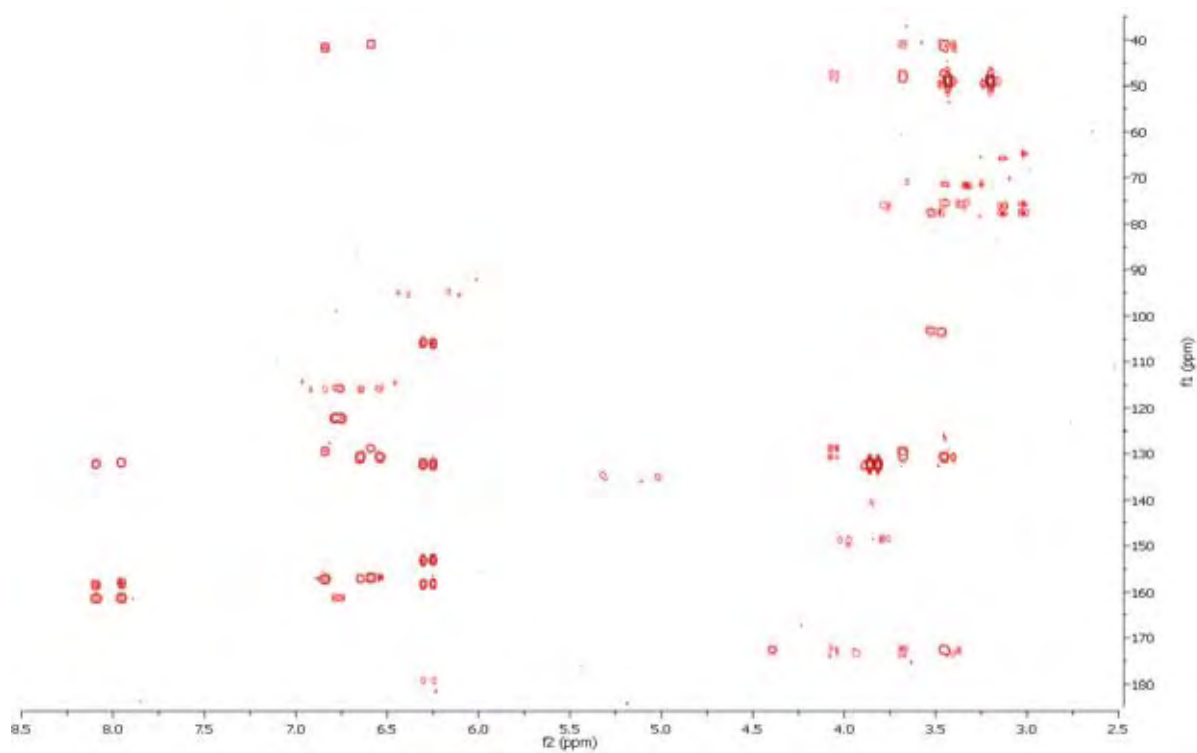


Figura 59 - Espectro de HMBC da substância **12C** (CD₃OD).

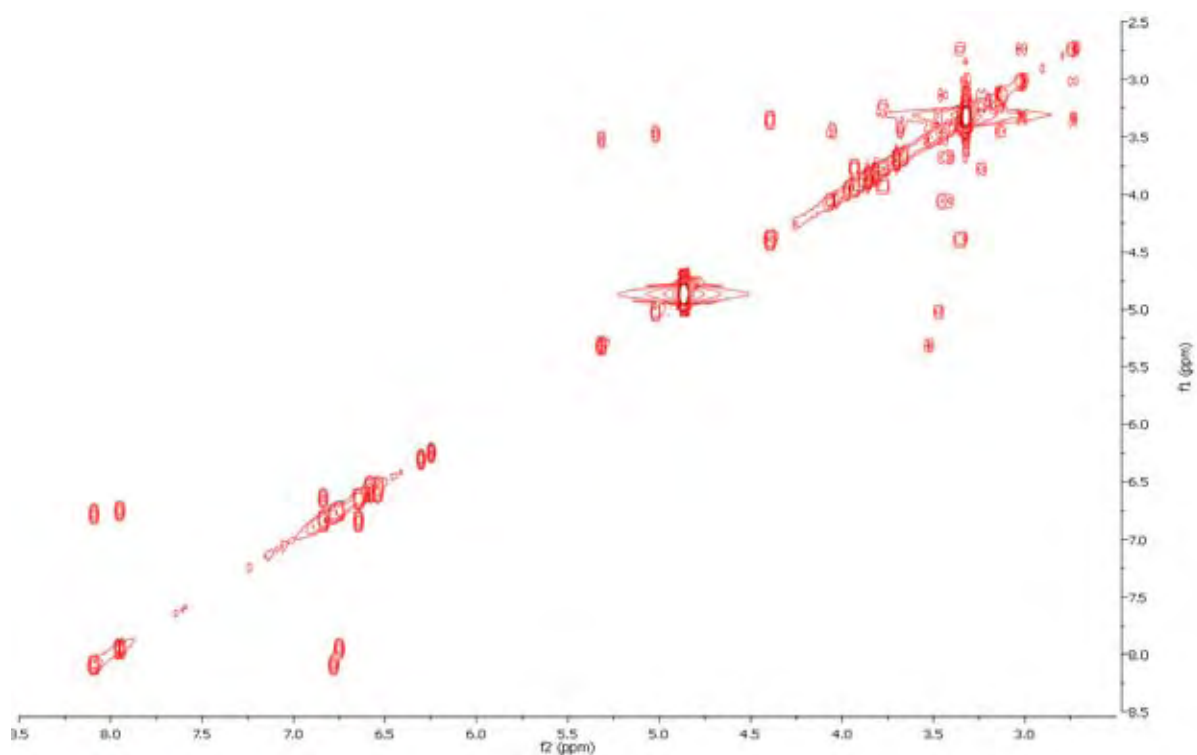


Figura 60 - Espectro de COSY da substância **12C** (CD₃OD).

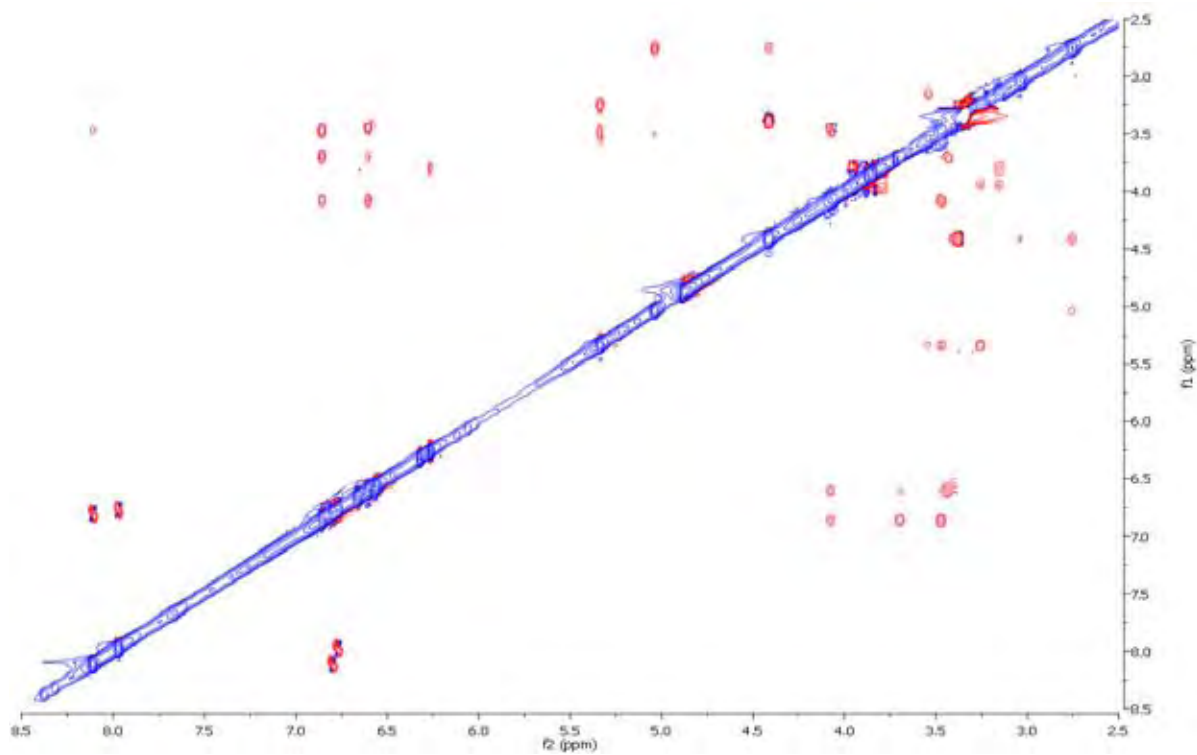


Figura 61 - Espectro de ROESY da substância **12C** (CD₃OD).

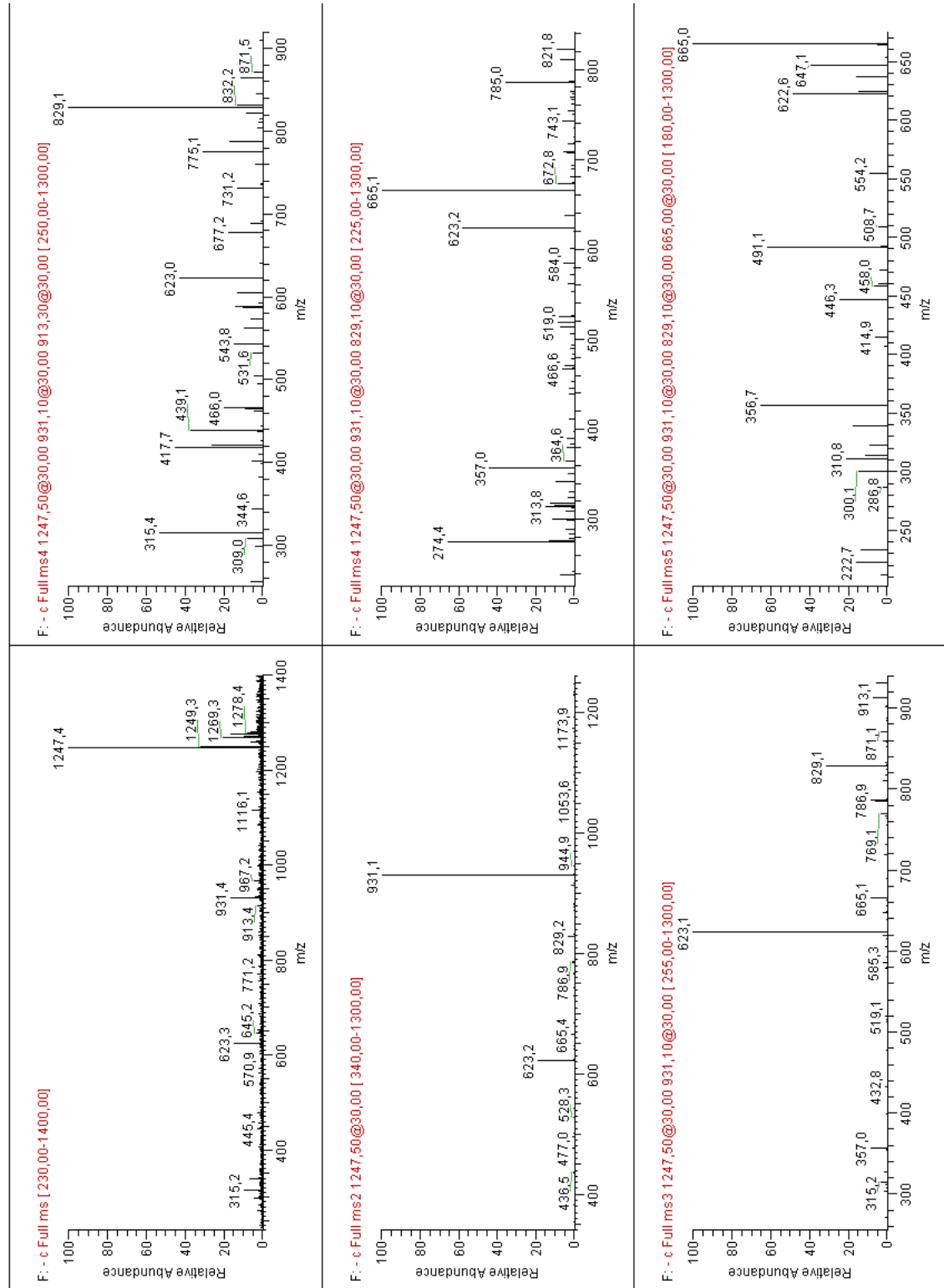
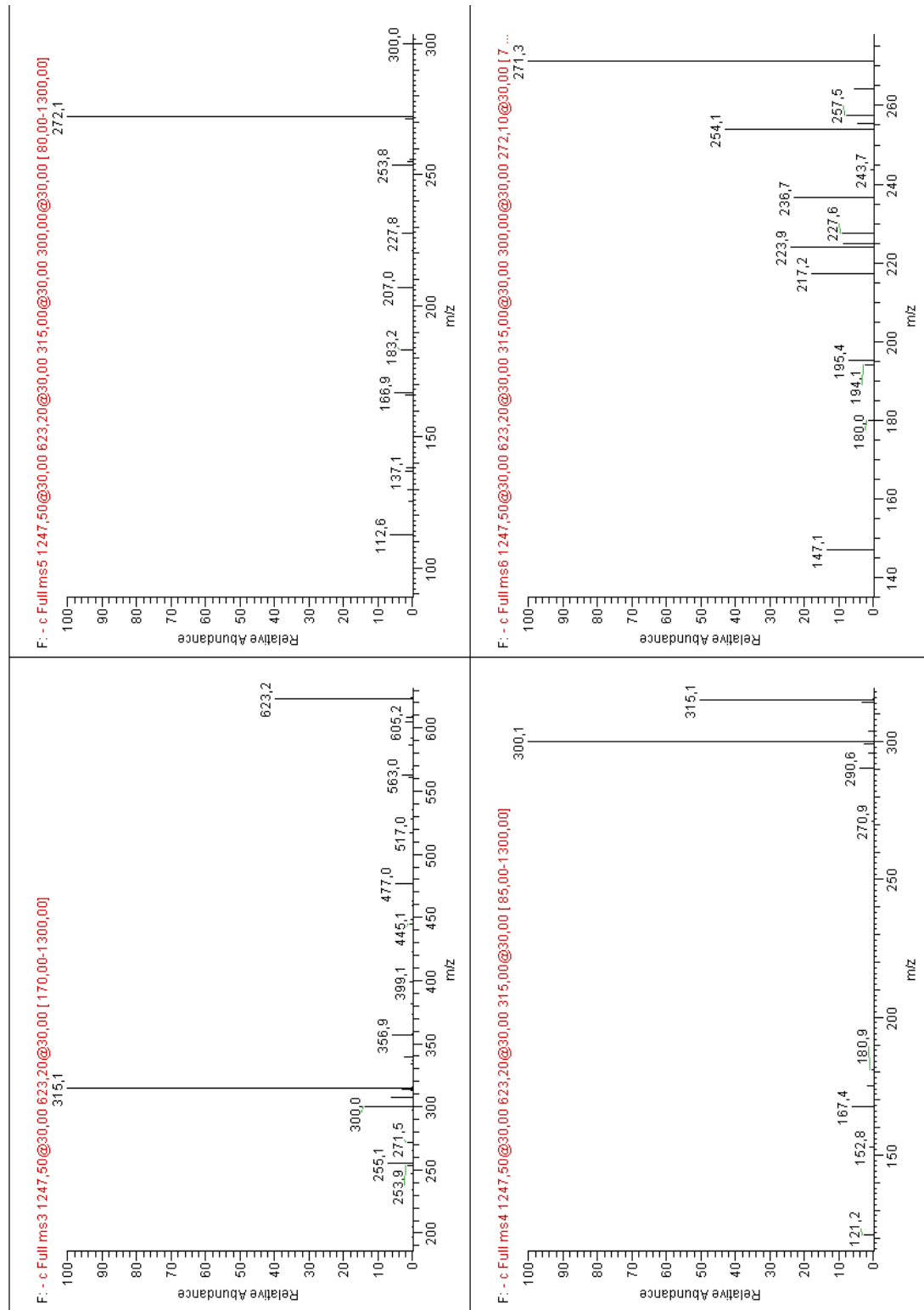


Figura 62 - Espectros de HPLC-ESI-MSⁿ (modo negativo) registrados para o íon [MH]⁻ de m/z 1247,4 e precursores da substância **12C**.

Compostos fenólicos de Paepalantius geniculatus (Eriocaulaceae)

(continue)



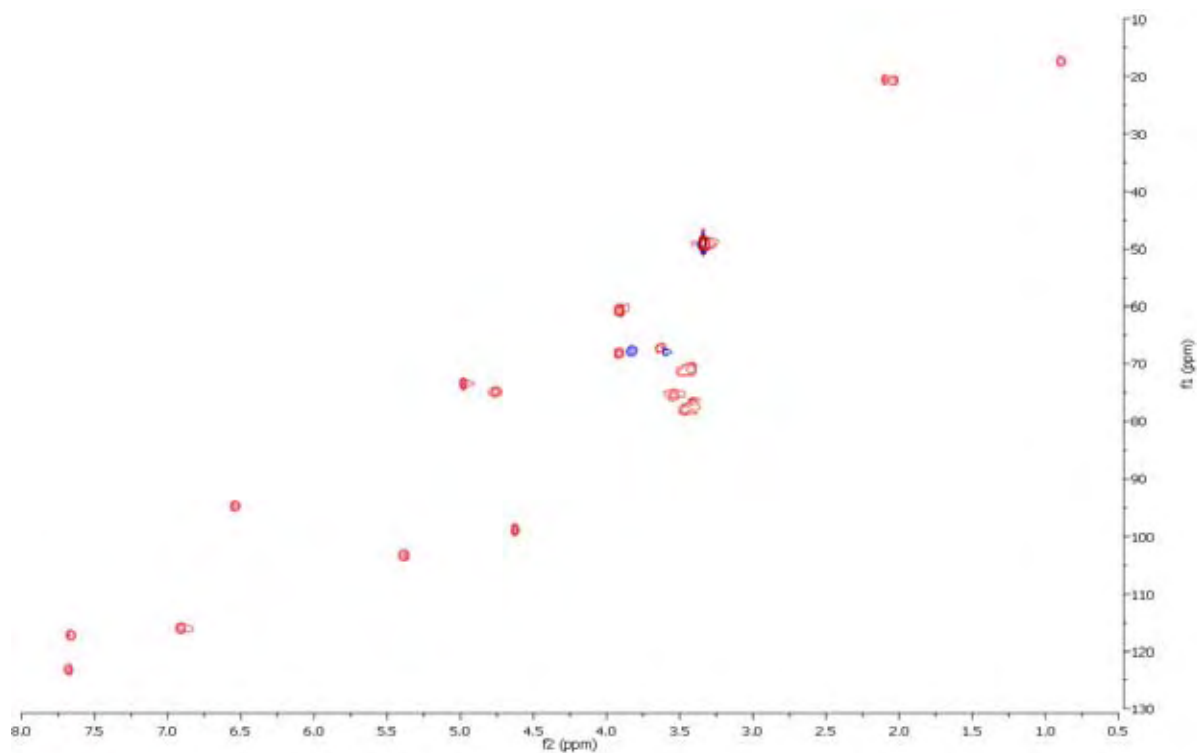


Figura 63 - Espectro de HSQC da substância **13C** (CD₃OD).

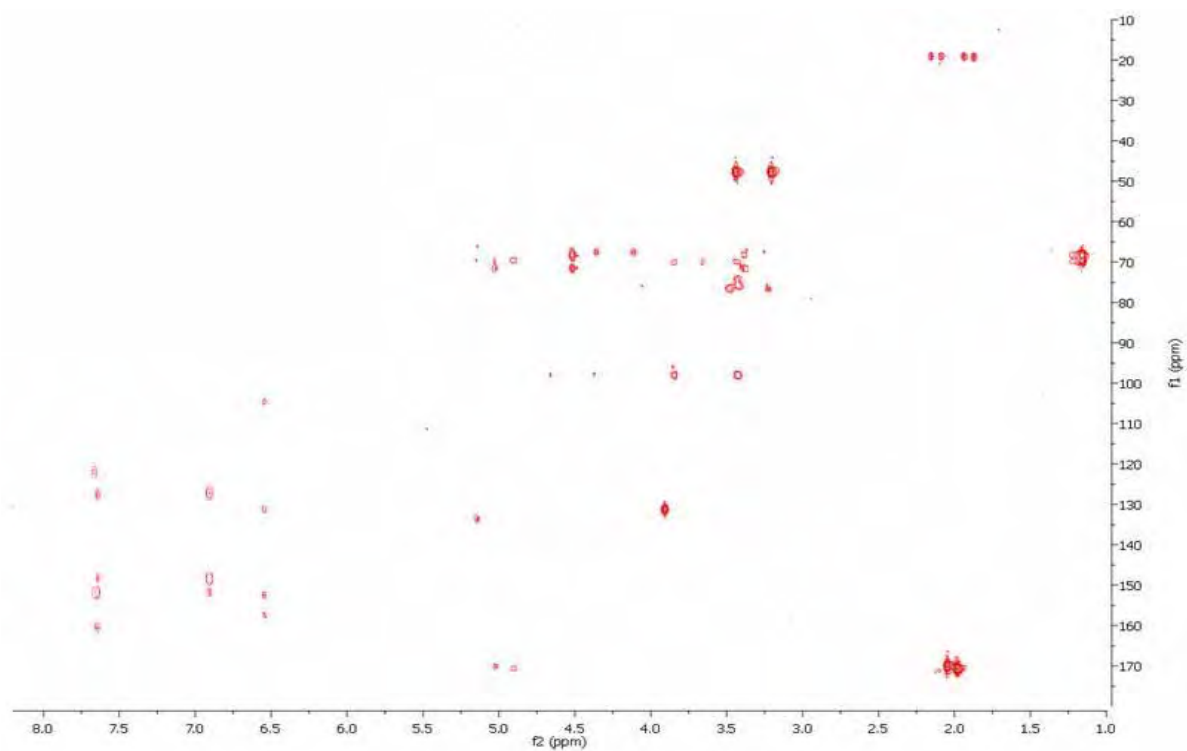


Figura 64 - Espectro de HMBC da substância **13C** (CD₃OD).

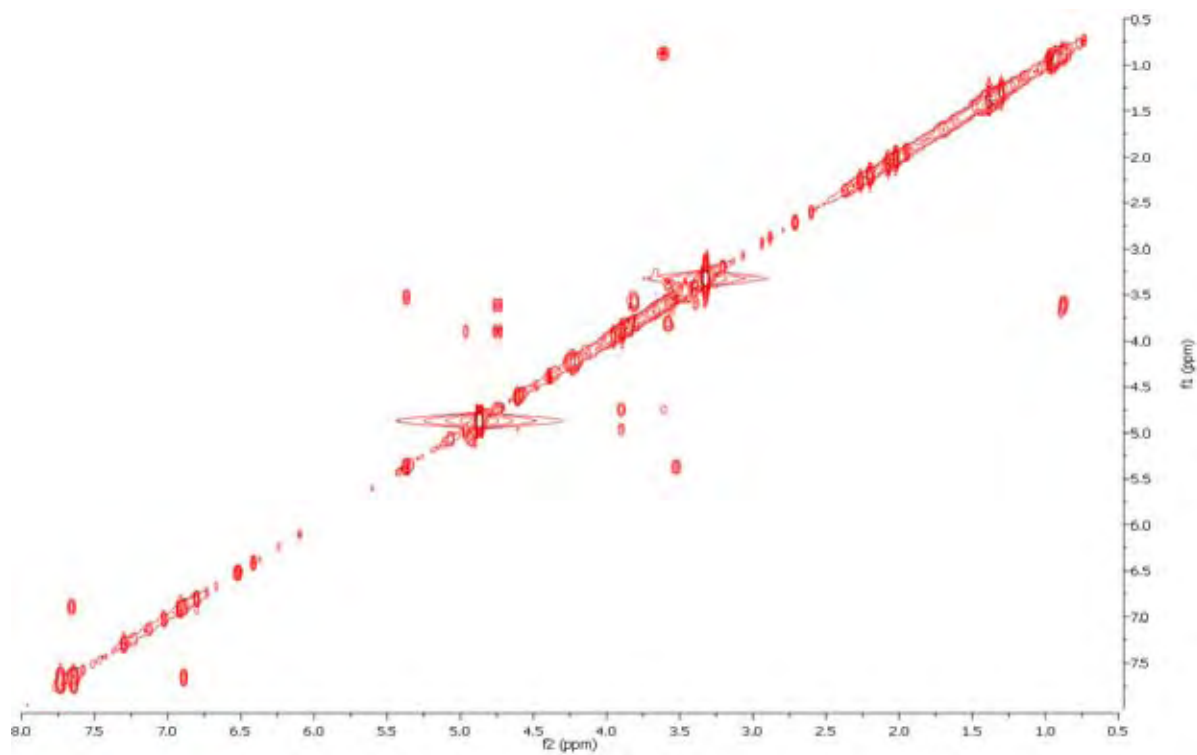


Figura 65 - Espectro COSY da substância **13C** (CD₃OD).

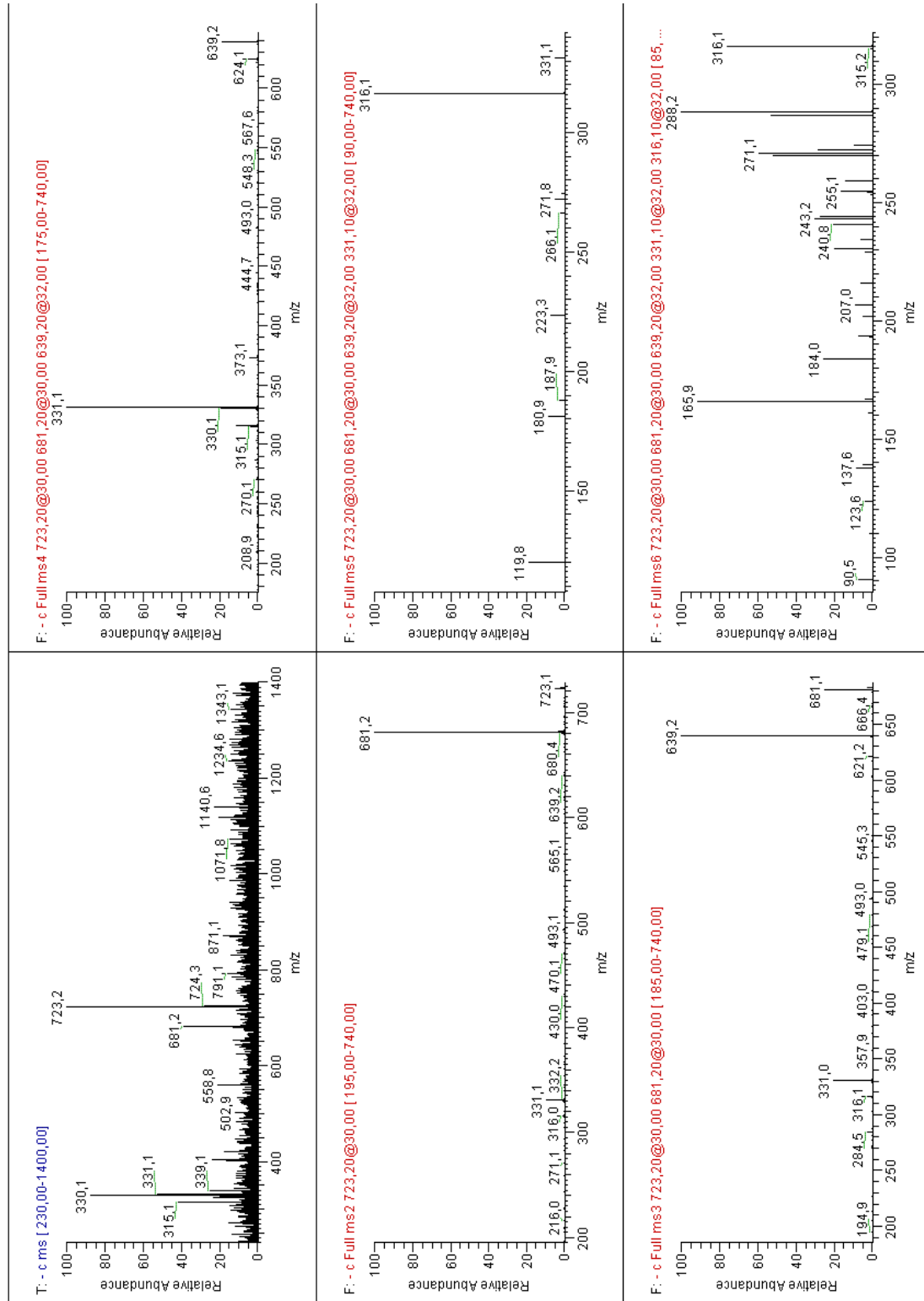


Figura 66 - Espectros de HPLC-ESI-MSⁿⁱ (modo negativo) registrados para o íon [MH]⁻ de *m/z* 681,2 e precursores da substância **13C**.

Compostos fenólicos de Paepalantius geniculatus (Eriocaulaceae)

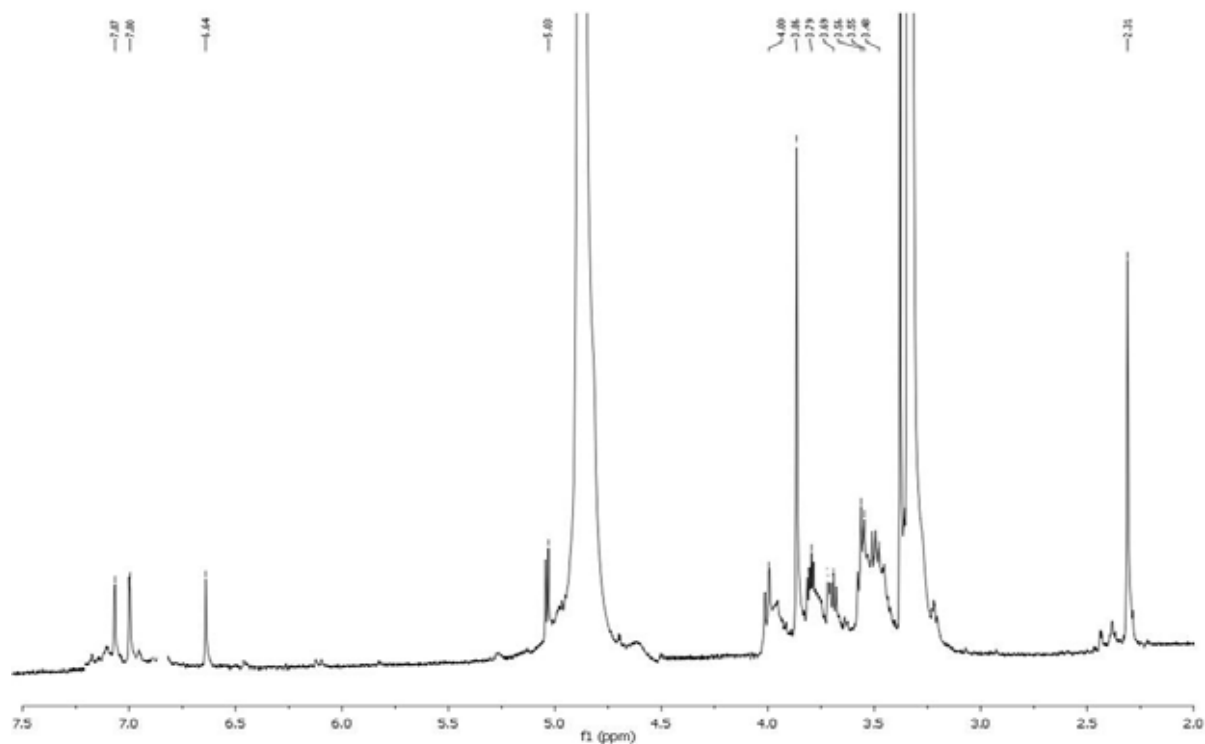


Figura 67 - Espectro de RMN de ^1H da substância **16C** (14,2 τ , CD_3OD).

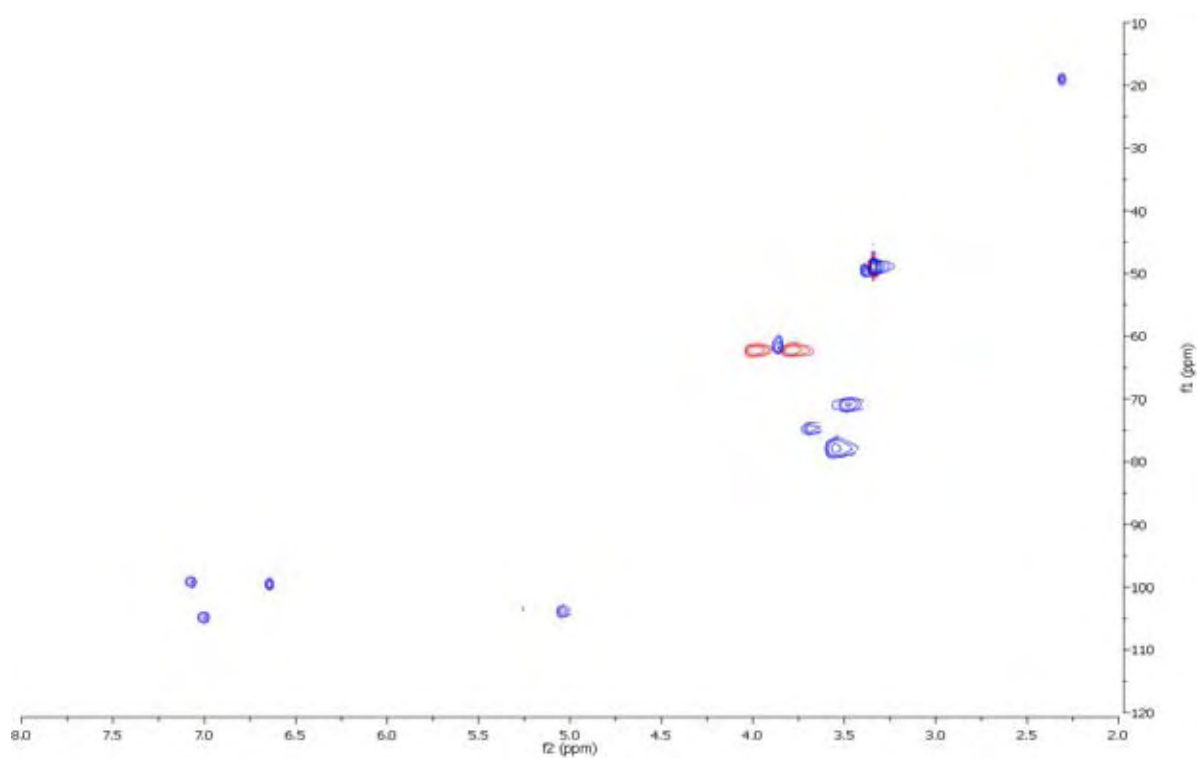


Figura 68 - Espectro de *HSQC* da substância **16C** (CD_3OD).

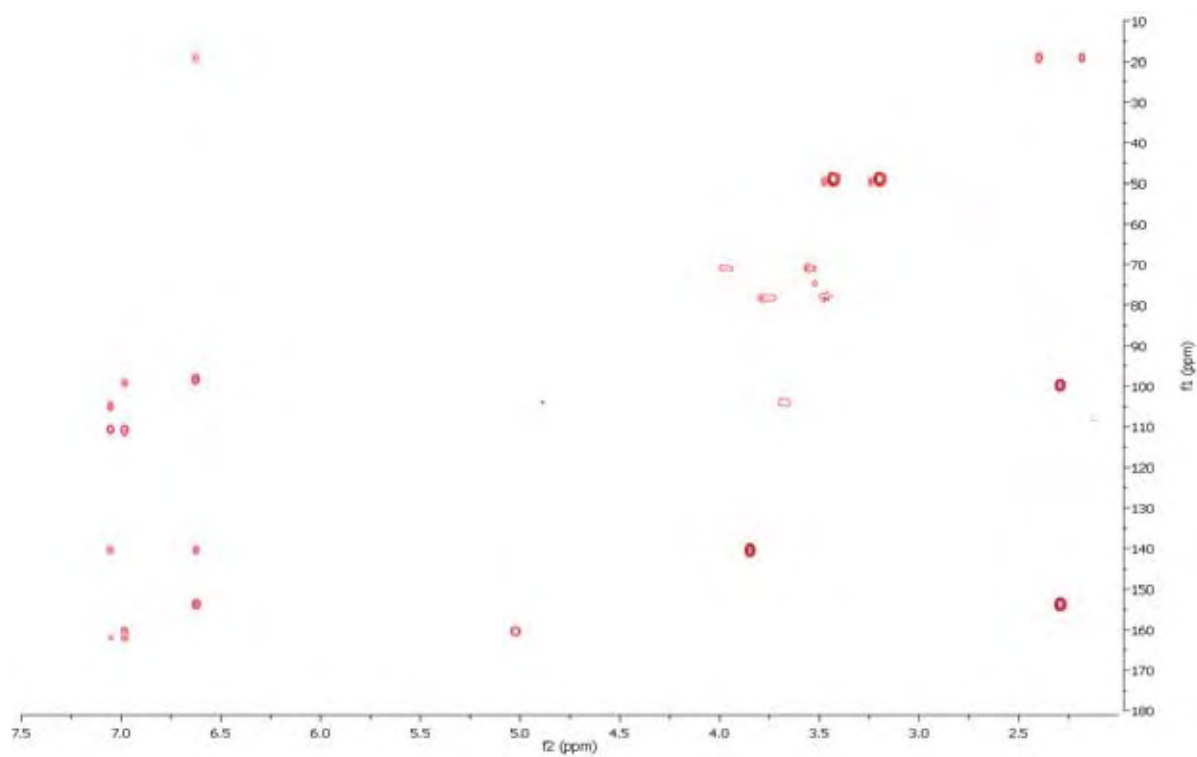


Figura 69 - Espectro de HMBC da substância **16C** (CD₃OD).

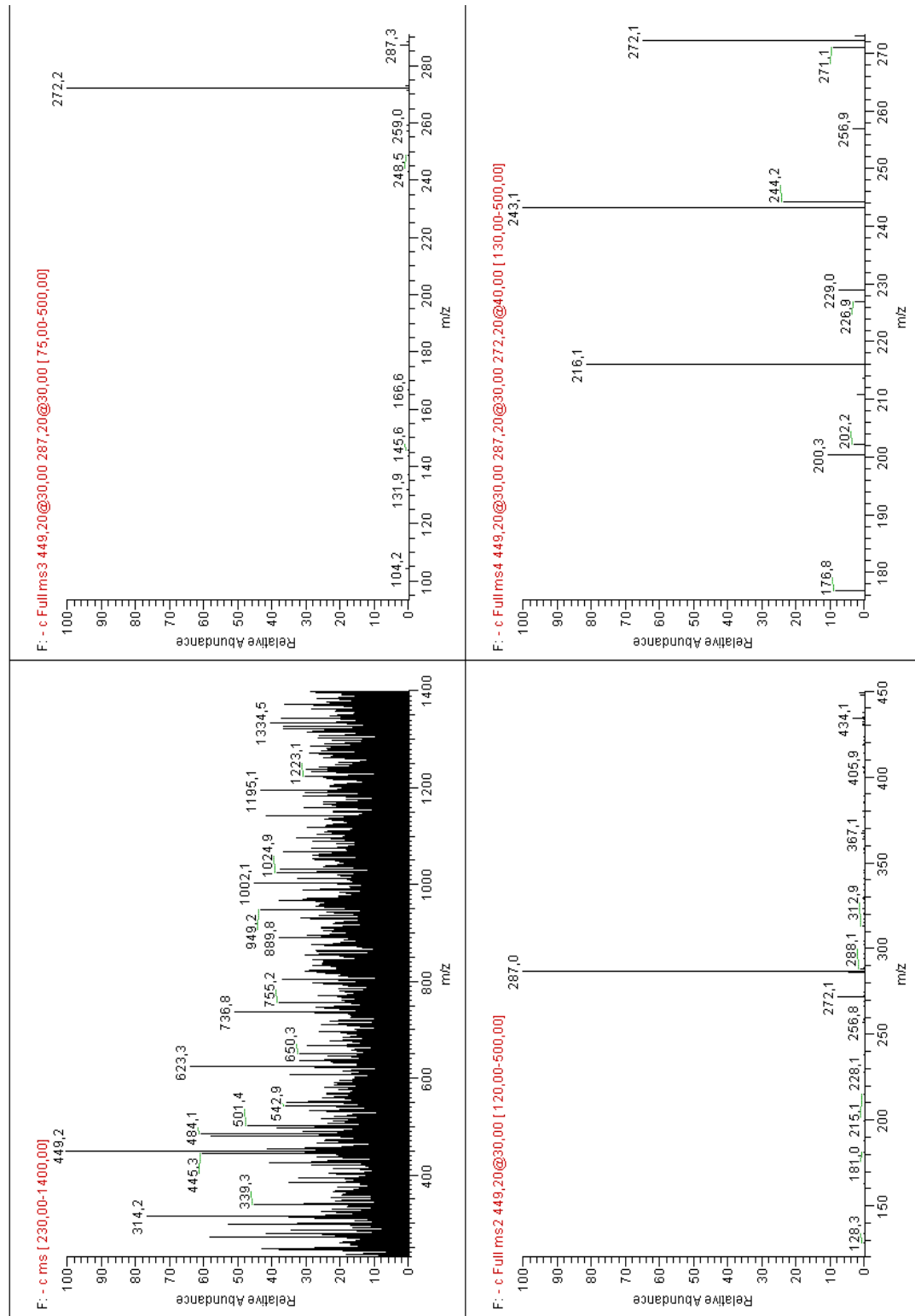


Figura 70 - Espectros de HPLC-ESI-MSⁿ (modo negativo) registrados para o íon [MH]⁻ de m/z 681,2 e precursores da substância **16C**.

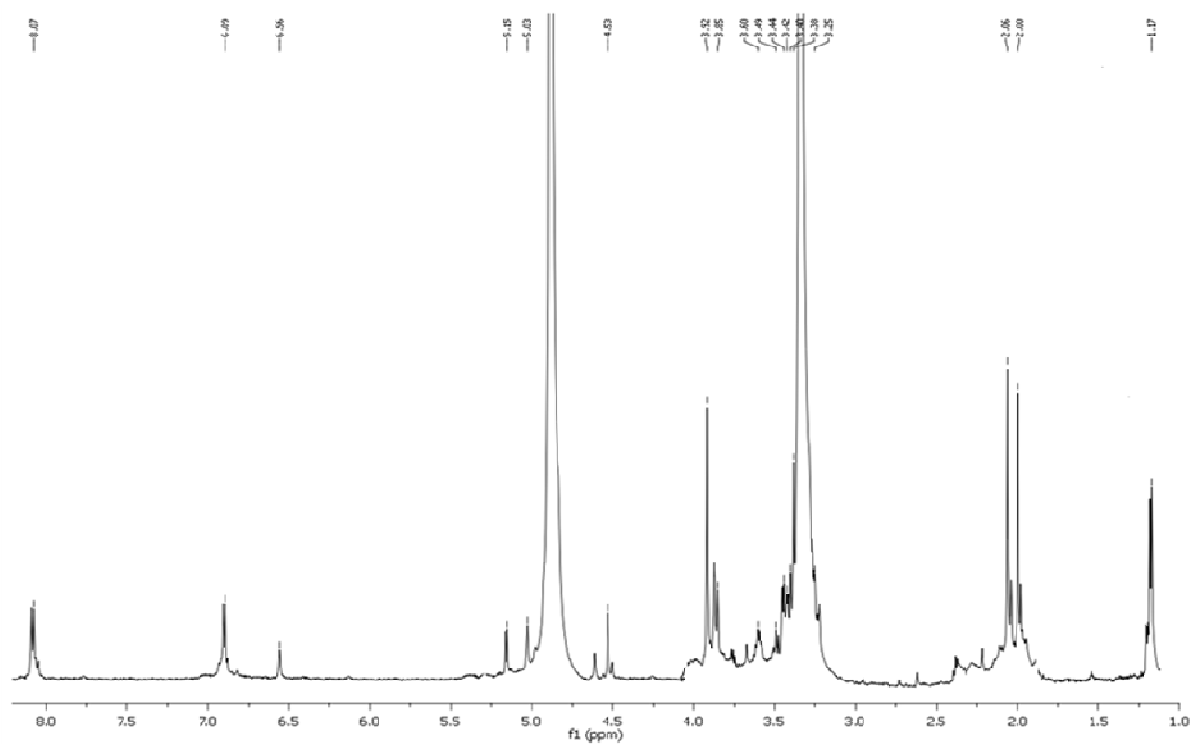


Figura 71 - Espectro de RMN de ^1H da substância **17C** (14,2 τ , CD_3OD).

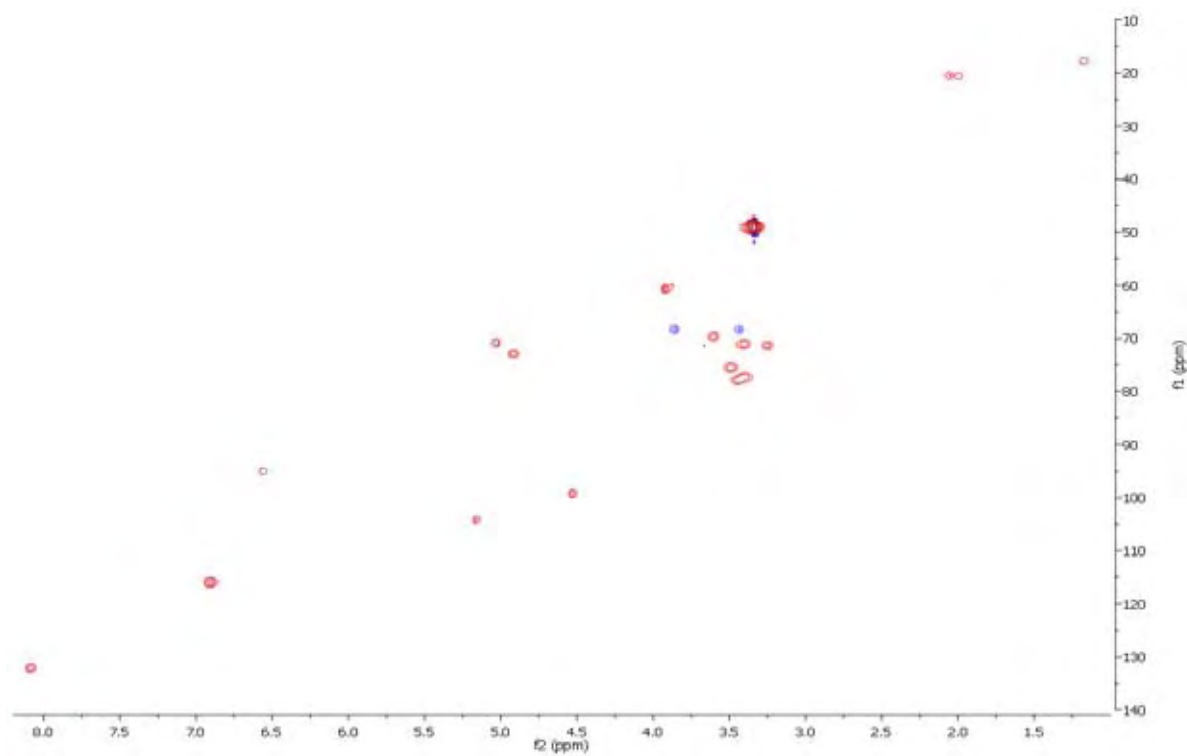


Figura 72 - Espectro de HSQC da substância **17C** (CD_3OD).

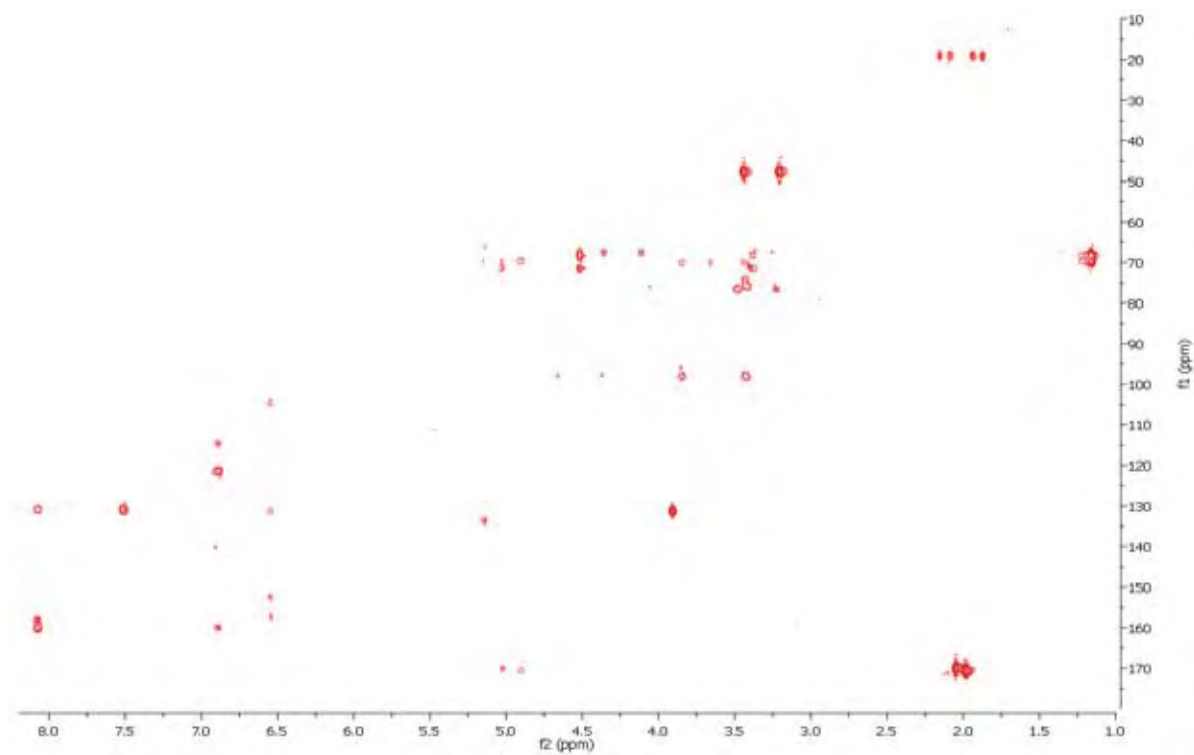


Figura 73 - Espectro de HMBC da substância 17C (CD₃OD).

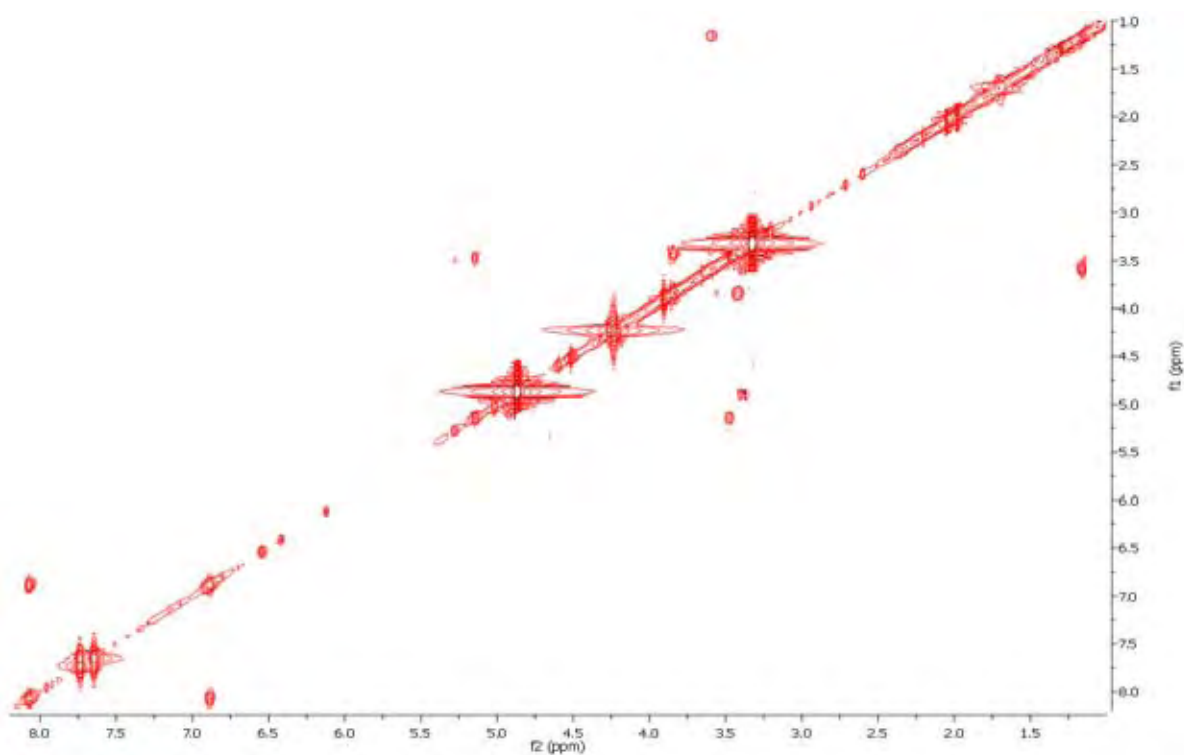


Figura 74 - Espectro de COSY da substância 17C (CD₃OD).

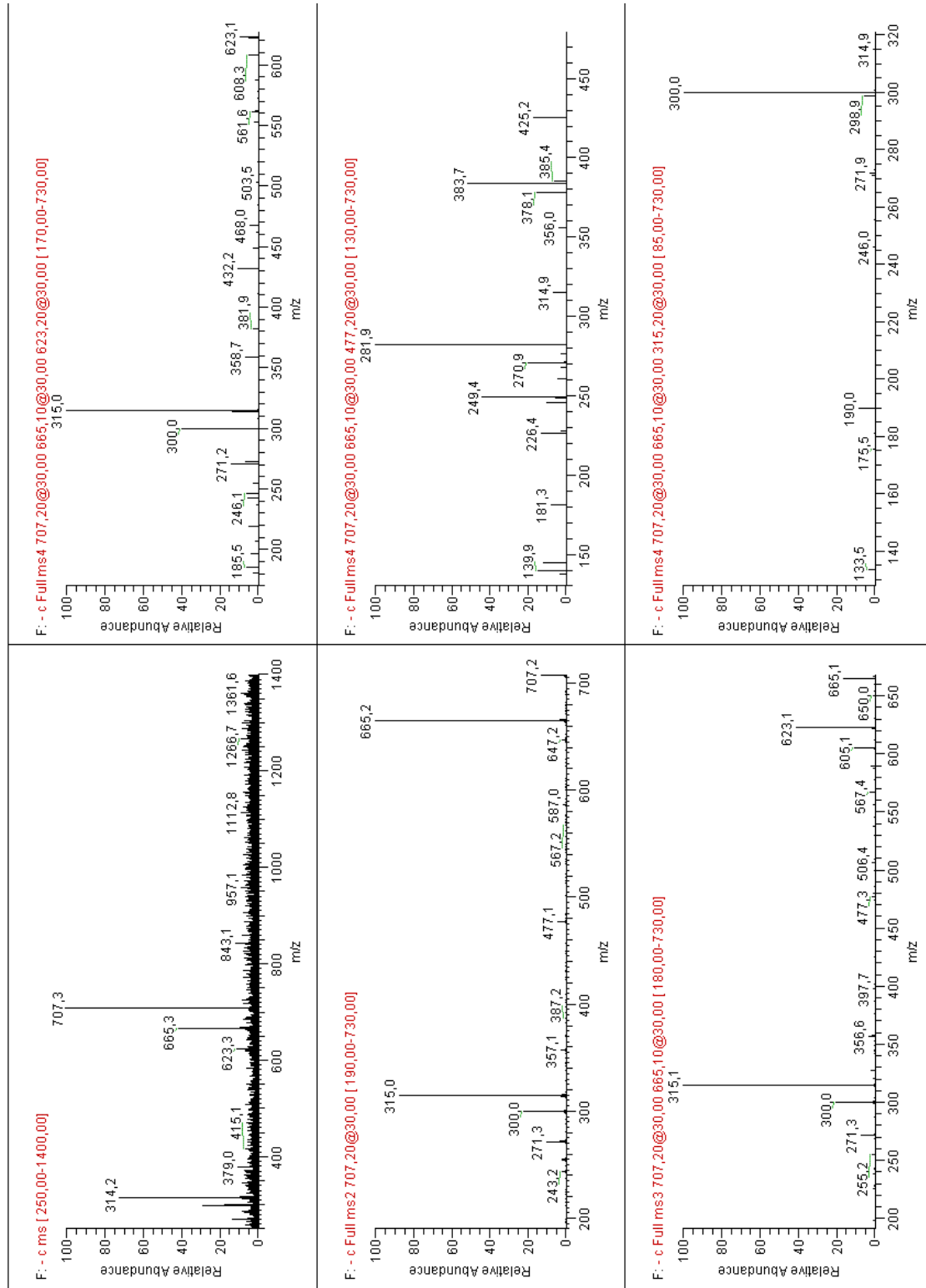


Figura 75 - Espectros de HPLC-ESI-MSⁿ (modo negativo) registrados para o íon [MH]⁻ de *m/z* 681,2 e precursores da substância **17C**.

Compostos fenólicos de Paepalantius geniculatus (Eriocaulaceae)

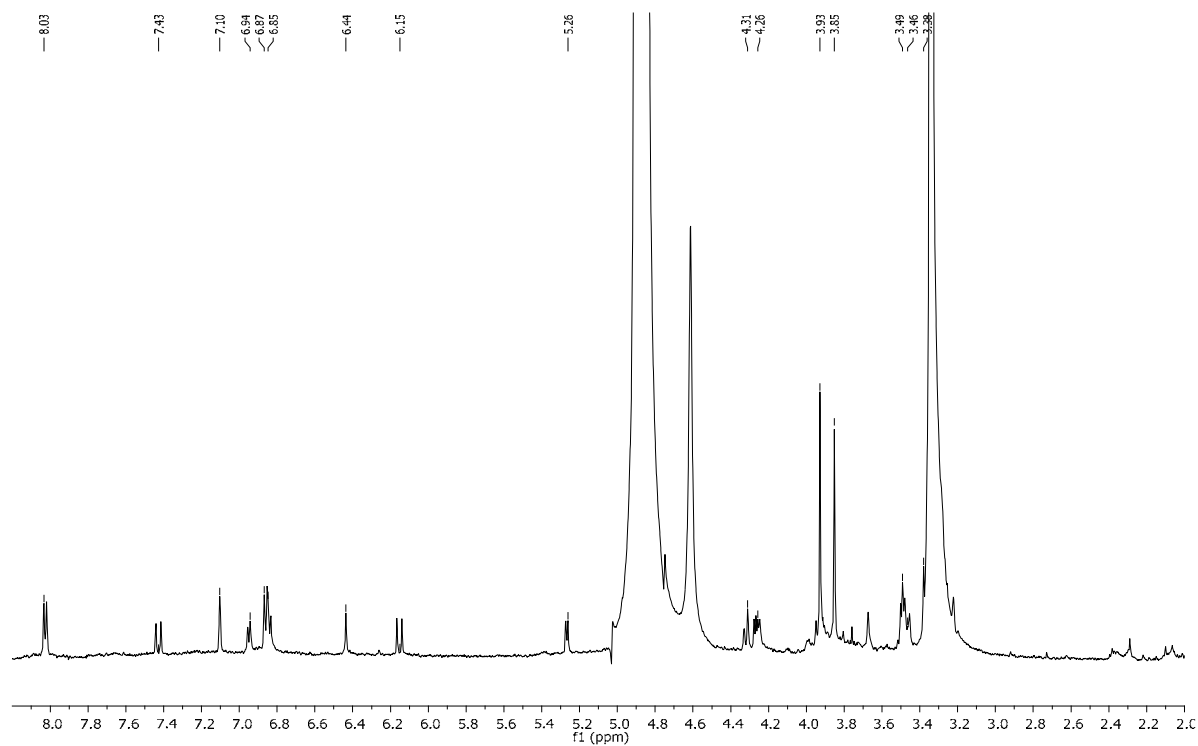


Figura 76 - Espectro de RMN de ^1H da substância **19C** (14,2 τ , CD_3OD).

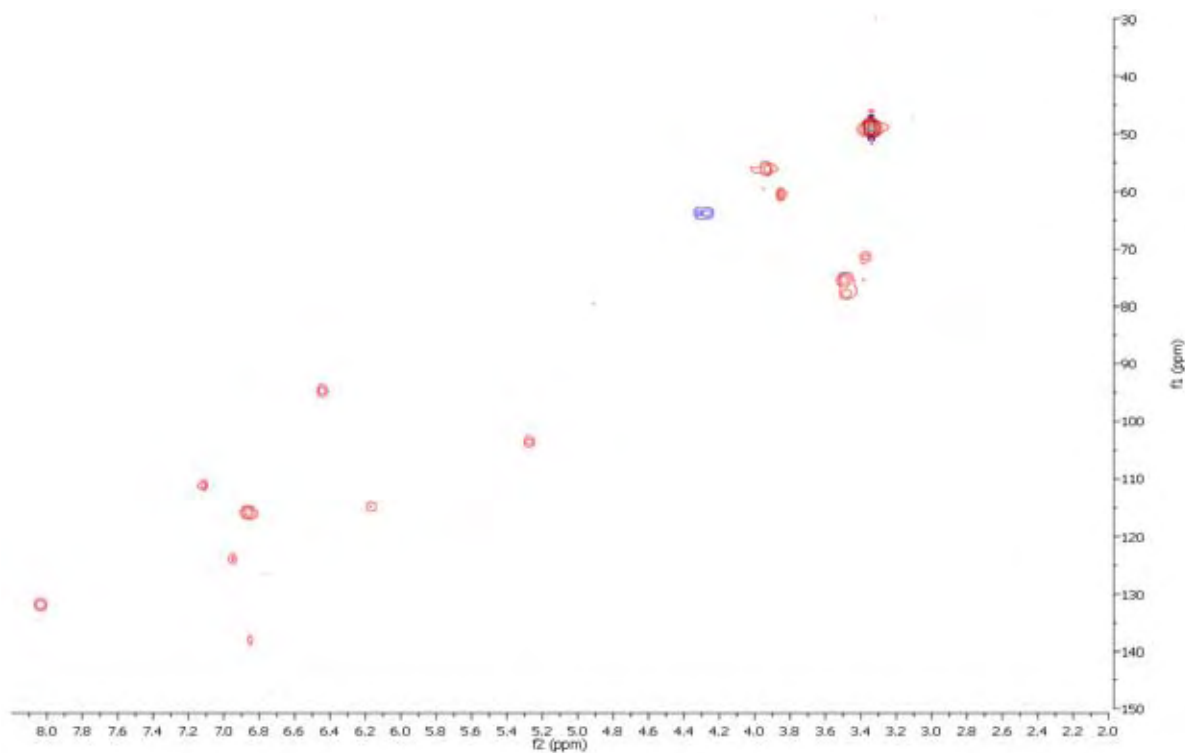


Figura 77 - Espectro de HSQC da substância **19C** (CD_3OD).

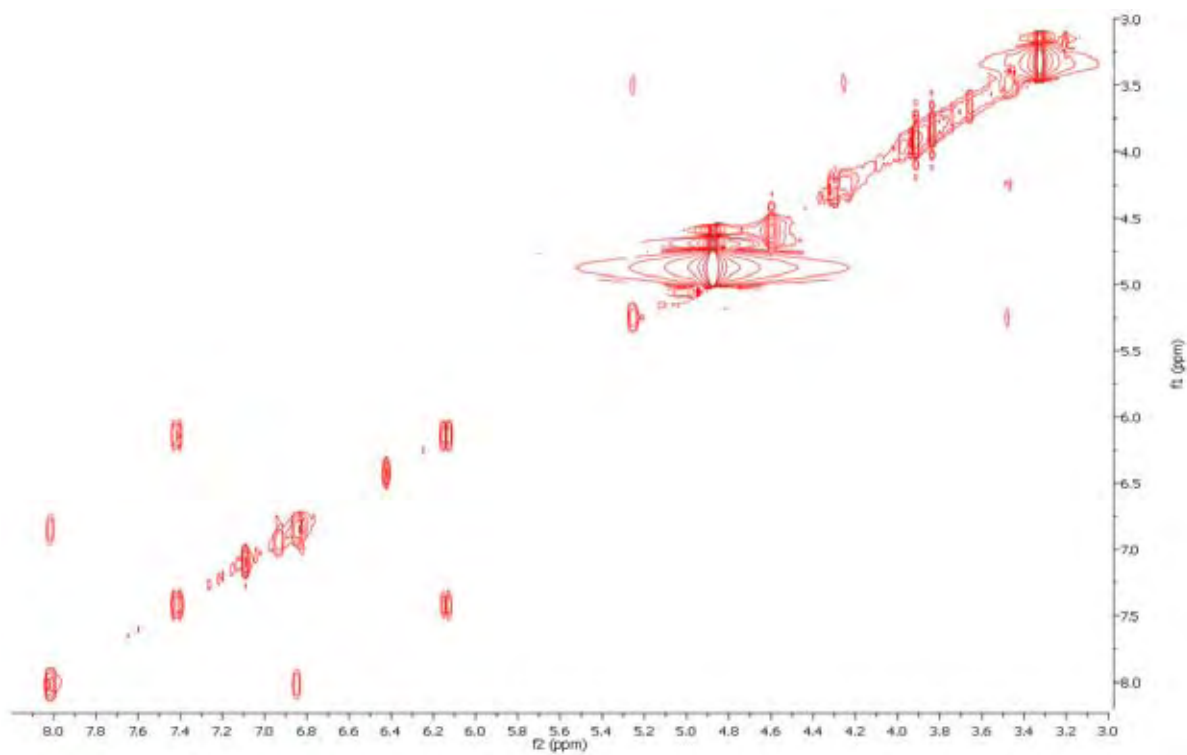


Figura 78 - Espectro de COSY da substância **19C** (CD₃OD).

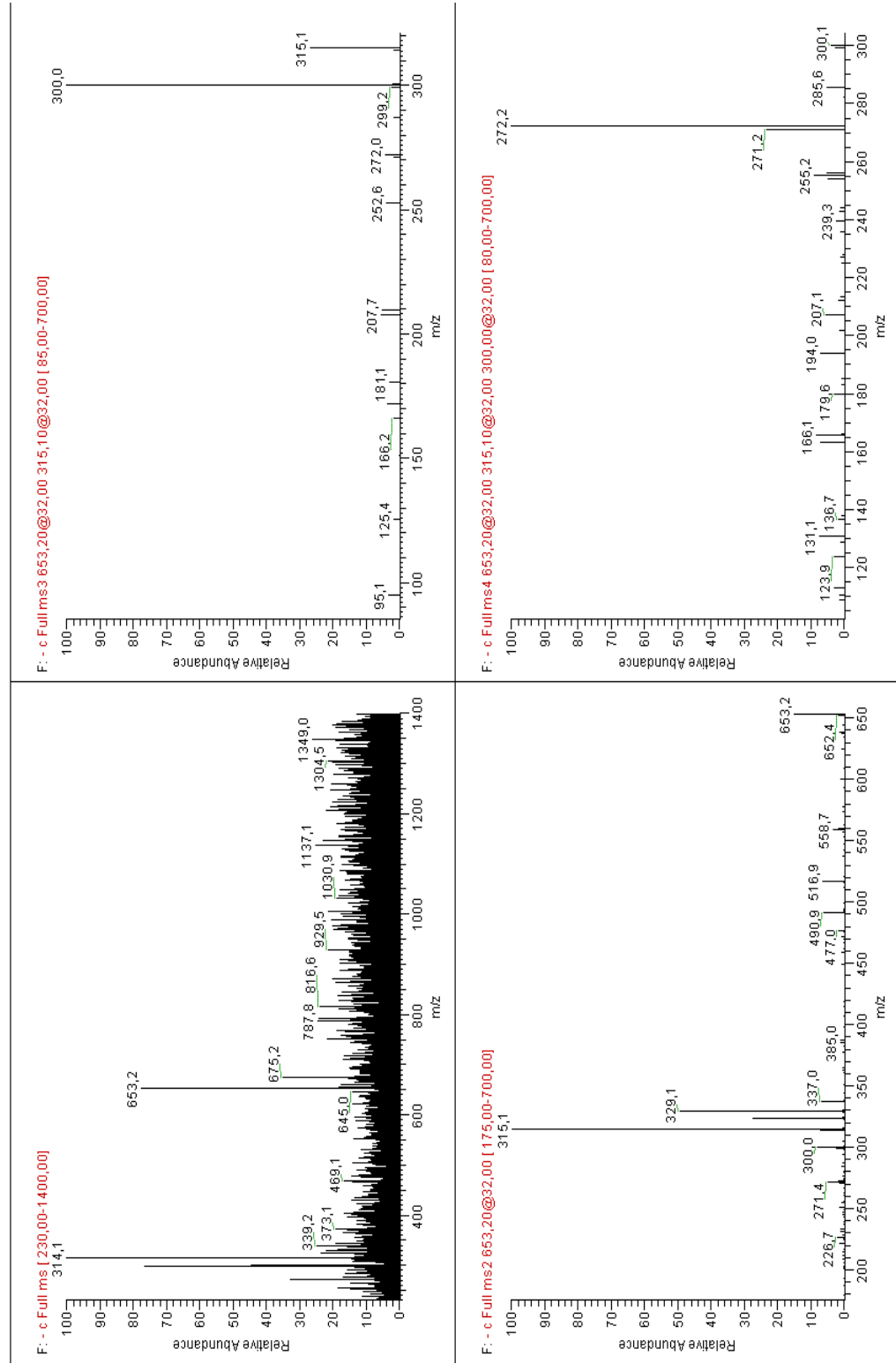


Figura 79 - Espectros de HPLC-ESI-MS^{II} (modo negativo) registrados para o íon [MH]⁻ de m/z 681,2 e precursores da substância **19C**.

