

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

**Estudo químico e biológico de
plantas da família Eriocaulaceae**

Marcelo Aparecido da Silva

Araraquara
2008

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

Estudo químico e biológico de
plantas da família Eriocaulaceae

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

Aluno: Marcelo Aparecido da Silva

Orientador: Prof. Dr. Wagner Vilegas

Araraquara
2008

FICHA CATALOGRÁFICA

S586e Silva, Marcelo Aparecido da
Estudo químico e biológico de plantas da família Eriocaulaceae / Marcelo
Aparecido da Silva. – Araraquara : [s.n], 2008
157 f. : il.

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

1. Produtos naturais. 2. Cromatografia contracorrente. 3. Sempre vivas -
Eriocaulaceae. I. Título.


Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

MARCELO APARECIDO DA SILVA

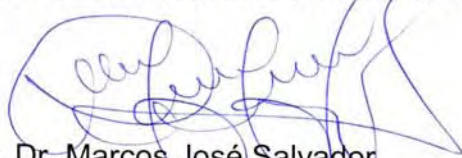
Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química.


Araraquara, 04 de julho de 2008.

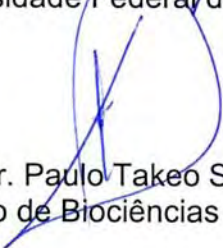
BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Wagner Vilegas (Orientador)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara


Prof.ª Dr.ª Cleópatra da Silva Planeta
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara


Prof. Dr. Marcos José Salvador
Instituto de Biologia - UNICAMP, Campinas


Prof. Dr. Marcelo Henrique dos Santos
Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL, Alfenas


Prof. Dr. Paulo Takeo Sano
Instituto de Biociências - USP, São Paulo

Súmula curricular

1. Dados pessoais

Nome: Marcelo Ap. da Silva

Filiação: Paulo Roberto da Silva e Cinira Ap. Camolezi da Silva

Naturalidade: Pitangueiras SP

E-mail: marcamosilva@yahoo.com.br

2. Formação acadêmica

Graduação

Instituição: Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas.

Local: Alfenas MG.

Curso: Farmácia – Modalidade Fármacos e Medicamentos.

Período: 1997 – 2001.

Pós-graduação:

Mestrado

Instituição: Universidade Paulista “Julio de Mesquita Filho”, UNESP, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Mestre em Ciências Farmacêuticas – Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Título da dissertação: Estudo químico e biológico de *Strychnos pseudoquina* (Loganiaceae).

Orientador: Prof. Dr. Wagner Vilegas

Bolsista: CAPES (período 07/2002 – 11/2003)

Local: Araraquara SP

Período: 03/2002 – 11/2003

Doutorado

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

Título da tese: Estudo químico e biológico de plantas da família Eriocaulaceae.

Orientador: Prof. Dr. Wagner Vilegas

Bolsista: CAPES (período 01/2006 – 07/2008)

Local: Araraquara SP

Período: 08/2004 – 07/2008

3. Atuação profissional

-) Bolsista didático da disciplina de Botânica, curso de farmácia-bioquímica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara SP, 06/2005 – 12/2005.

-) Responsável pela disciplina de Bioativos de origem vegetal, curso de farmácia, Faculdade Santa Giúlia, Taquaritinga SP, 01/2005 – 07/2006.
-) Responsável pela disciplina de Farmacobotânica, curso de farmácia, Faculdade Santa Giúlia, Taquaritinga SP, 01/2005 – 07/2006.
-) Responsável pela disciplina de Farmacognosia II, curso de farmácia, Faculdade Santa Giúlia, Taquaritinga SP, 01/2005 – 07/2006.
-) Responsável pela disciplina de Farmacognosia I, curso de farmácia, Faculdade Santa Giúlia, Taquaritinga SP, 01/2005 – 07/2006.
-) Responsável pela disciplina de Botânica I, curso de ciências biológicas, Faculdade Santa Giúlia, Taquaritinga SP, 07/2004 – 12/2004.

4. Publicações

- 1) **Silva, M.A.**; Sumitami, L. S. A.; Vilegas, W.; Santos, L. C. Compostos fenólicos e atividade antioxidante de *Leiothrix flavescens* (Bong) Ruhland (Eriocaulaceae). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. 28 (3): 319-324, 2008.
- 2) **Silva, M.A.**; Oliveira, A.P.S.; Sannomiya, M.; Sano, P.; Varanda, E.A.; Vilegas, W.; Santos, L.C. Flavonoids and a naphthopyranone from *Eriocaulon ligulatum* and their mutagenic activity. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**. v. 55, n. 11, p. 1635-1639, 2007.
- 3) Sannomiya, M.; Figueiredo, M.E.; **Silva, M.A.**; Rodrigues, C.M.; Santos, L.C.; Souza-Brito, A.R.M.; Vilegas, W. Preparative isolation of a nove flavonoids from na infusion of *Byrsonima basiloba* leaves by high-speed-counter-current chromatography. **Natural Product Communications**. v. 2, n. 8, p. 829-834, 2007.
- 4) Santos, F.V.; Colus, I.M.S.; **Silva, M.A.**; Vilegas, W.; Varanda, E.A. Assessment of DNA damage by extracts and fractions of *Strychnos pseudoquina*, a Brazilian medicinal plant with antiucerogetic activity. **Food and Chemical Toxicology**. v. 44, p. 1585-1589, 2006.
- 5) Rinaldo, D.; **Silva, M.A.**; Rodrigues, C.M.; Calvo, T.R.; Sannomiya, M.; Santos, L.C.; Vilegas, V. Fast Preparative separation of flavonoids from the aerial parts of *Davilla elliptica* by high-speed counter-current chomatography. **Química Nova**. v. 29, n. 5, p. 947-949, 2006.
- 6) Figueiredo, M.E.; Michelin, D.C.; Sannomiya, M.; **Silva, M.A.**; Santos, L.C.; Almeida, L.F.R.; Souza-Brito, A.R.M.; Salgado, H.N.; Vilegas, W. Avaliação química e da atividade anti-diarréica

das folhas de *Byrsonima cinera* DC. (Malpighiaceae). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 41, n. 1, p. 79-83, 2005.

7) Santos, L.C.; **Silva, M.A.**; Rodrigues, C.M.; Rodrigues, J.; Rinaldo, D.; Sannomiya, M.; Vilegas, W. Fast preparative separation of flavones from capitula of *Eriocaulon ligulatum* (Vell.) L.B.Smith (Eriocaulaceae) by high-speed countercurrent chromatography (HSCCC). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v. 26, n 2, p. 101-103, 2005.

8) Santos, L.C.; Rodrigues, C.M.; **Silva, M.A.**; Coelho, R.G.; Sannomiya, M.; Vilegas, W. Chemical profile of *Eriocaulon ligulatum* (Eriocaulaceae). **Biochemical Systematic and Ecology**. v. 33, p. 1159-1166, 2005.

9) **Silva, M.A.**; Rafacho, B.P.M.; Hiruma-Lima, C.A.; Rocha, L.R.M.; Santos, L.C.; Sannomiya, M.; Souza-Brito, A.R.M.; Vilegas, W. Evaluation of *Strychnos pseudoquina* ST. Hil. leaves extract on gastrointestinal acitivity. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**. v. 53, n. 8, p. 881-885, 2005.

10) **Silva, M.A.**; Hiruma-Lima, C.A.; Sannomiya, M.; Souza-Brito, A.R.M.; Santos, L.C.; Vilegas, W. *Strychnos* L. da América do Sul e Central. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 15, n. 3, p. 256-267, 2005.

11) Sannomiya, M.; Fonseca, V.B.; **Silva, M.A.**; Rocha, L.R.M.; Santos, L.C.; Hiruma-Lima, C.A.; Souza-Brito, A.R.M.; Vilegas, W. Flavonoids and antiulcerogenic activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 97, p. 01-06, 2005.

5. Publicação didática

-) Publicação do livro “**Cromatografia em Contracorrente**”. Autores: **Marcelo Ap. da Silva**; Wagner Vilegas e Lourdes Campaner dos Santos. Publicado pela Editora do Instituto de Química de Araraquara em 2008 (1º Edição). ISBN 978-85-60322-03-9.

6. Trabalhos submetidos à publicação

1) **High-Performance Liquid Chromatography Quantification of Flavonoids in the Eriocaulaceae Genus and the Antimicrobial Activity**. Autores: **Marcelo Ap. da Silva**; Claudia A. Lima Cardoso; Lourdes C. dos Santos e Wagner Vilegas. Phytochemical Analysis, 2008, submetido.

2) Effect of methanolic extract of *leiothrix flavescens* on rodent gastrointestinal tract.

Autores: Thiago M. Moraes; **Marcelo Ap. da Silva**; Clenilsom M. Rodrigues; Lourdes C. dos Santos; Miriam Sannomiya; Lucia R. M. Rocha; Alba R. M. S. Brito; Wagner Vilegas, Clélia A. Hiruma-Lima. Phytoterapia Research, 2008, submetido.

3) Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the chemical composition of *Eriocaulon ligulatum* (Vell.) L.B.Smith (Eriocaulaceae)

Autores: **Marcelo Ap. da Silva**, Lourdes C. dos Santos, Clenilson M. Rodrigues, Virginia Carbone, Angela Mari, Susel Anapoli, Sonia Piacente, Cosimo Pizza e Wagner Vilegas. Artigo em fase de reestruturação.

7. Participação em eventos científicos

Participamos de 12 eventos internacionais e 24 eventos nacionais, com a apresentação de 36 resumos, todos em forma de pôsteres.

8. Orientações

1) Orientação da bolsista técnica Danielle Cristina Baldo, estudante do curso de Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UNESP, no período de Janeiro de 2006 a Junho de 2007, onde desenvolveu o projeto intitulado “Uso sustentável da biodiversidade brasileira avaliação químico-farmacológica de plantas superiores”. A aluna foi bolsista FAPES durante a realização do treinamento (processo: 06/51043-8).

2) Colaborou na orientação no desenvolvimento da monografia da aluna Juliana Sayuri de Araújo Sumitani, estudante do curso de Bacharelado em Química do Instituto de Química de Araraquara, no período de Dezembro de 2006 a Dezembro de 2007, onde desenvolveu o projeto intitulado “Estudo química de eriocaulaceae - capítulos de *Leiothrix spiralis* e *Leiothrix flavescens*”. A aluna foi bolsista CNPq durante a realização da monografia.

Quero falar de uma coisa
Adivinha onde ela anda
Deve estar dentro do peito
Ou caminha pelo ar
Pode estar aqui do lado
Bem mais perto que pensamos
A folha da juventude
É o nome certo desse amor
Já podaram seus momentos
Desviaram seu destino
Seu sorriso de menino
Quantas vezes se esconderam
Mas renova-se a esperança
Nova aurora a cada dia
E há que se cuidar do broto
Pra que a vida nos dê flor e fruto
Coração de estudante
Há que se cuidar da vida
Há que se cuidar do mundo
Tomar conta da amizade
Alegria e muito sonho
Espalhados no caminho
Verdes, plantas e sentimento
Folhas, coração, juventude e fé.

Milton Nascimento

Aos meus pais, **Paulo e Cinira,**

Que sempre me apoiaram nas horas incertas com paciência e muita sabedoria, me mostraram as lições que não se aprendem na escola.

Muito obrigado, Pai e Mãe, pelo amor e confiança que sempre depositaram em mim.

As minhas irmãs, **Margareth e Maria Amália ,**

Pelo carinho, amizade, compreensão, amor e apoio. Obrigado.

Ao meu tio **João,**

Pelas muitas palavras sábias proferidas. Pelos exemplos de luta e perseverança naquilo que acreditamos. Muito obrigado Tio.

Às minhas **Avós** e aos meus **Avôs,**

Não vou fingir que parou de doer, mas um dia isto vai passar. Eu não consigo me convencer, que essa vida não foi injusta. Tanta falta me faz vocês... Queria ver vocês lá em casa...

Dedico esse trabalho com muito carinho

Agradecimentos

Em especial ao meu orientador e amigo Wagner Vilegas pela oportunidade oferecida desde o início, ensinando-me os primeiros passos na química de produtos naturais. Lembra Wagner, quando você me ensinou como montar a minha primeira coluna cromatográfica durante o mestrado... Depois, me ofereceu a oportunidade de realizar o doutorado. Obrigado pela confiança depositada durante todos esses anos de trabalho que estivemos juntos. Além de orientador você foi e será, sempre um grande amigo.

À professora Lourdes, a grande amiga Lourdes, percebo que neste momento me faltam palavras para expressar tamanha gratidão por você Lourdes... Quero te dizer que " Amigo é coisa pra se guarda debaixo de sete chaves, dentro do coração, assim falava a canção.....Amigo é coisa pra se guarda no lado esquerdo do peito, mesmo que o tempo e a distância digam não....." Lourdes, obrigado pelo apoio, dedicação, paciência, pelos ensinamentos e por tantas outras coisas que você me proporcionou durante os anos de convivência. Muito Obrigado.

Aos amigos e amigas de laboratório, Angélica (FCF-Botânica), Ana Carolina Benfatti, Ana Lucia, Adriana Moura, Carolina Gomes, Clenilson Rodrigues, Daniel Rinaldo, Danielle Baldo, Danielly, Fabio Andrade, Flávia, Felipe, Juliana Rodrigues, Juliana Severi, Juliana Sayuri, Miriam Sanommya, Micheli, Márcio Andreo, Roberta Coelho Tamara Calvo, Tiago Nakamura, Viviane Cândida, agradeço pela convivência. Obrigado a todos.

Ao Professor e amigo Luis Vitor, da FCF-Unesp, pelas longas conversas enriquecedoras durante estes anos e também pela grande oportunidade de ministrar aulas de Botânica para o curso de Farmácia. Muito Obrigado.

À Prof. Dr^a. Clélia A. Hiruma Lima e sua orientada Catharine Ferrazoli, do IB-Botucatu, Unesp, pelos ensaios de motilidade intestinal, atividade gastoprotetoras e de toxicidade aguda realizados com as espécies. Obrigado, Clélia pela grande ajuda e amizade durante esses anos de trabalho.

À Prof. Dr^a. Eliana Ap. Varanda e à Ana Paula de Oliveira, da FCF-Unesp, pela realização dos ensaios de mutagenicidade e pelas enriquecedoras discussões.

Ao Prof. Dr. Paulo Sano, do IB-USP, pelas coletas e identificações das espécies de Eriocaulaceae. Obrigado, também, por me a apresentar à belíssima e cativante Serra do Cipó.

À Dr^a. Virginia Carbone, do Centro de Spettrometria di Massa Proteomica e Biomolecolare, Istituto di Scienze dell' Alimentazione, Avellino. Ao Prof Cosimo Pizza e à Prof^a. Sonia Piacente, da Università degli Studi di Salerno, pela realização dos experimentos de HPLC-MS.

Ao Dr. Nivaldo Boralle, pelas realizações dos espectros de RMN e por seus valiosos ensinamentos.

Aos demais professores do departamento de Química Orgânica do Instituto de Química de Araraquara, por todo o conhecimento transmitido durante suas aulas.

À Prof^a. Dr^a. Claudia A. I. Cardoso, da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, pela colaboração no estudo dos extratos das espécies de Eriocaulaceae.

À Prof^a. Dr^a. Alba R. M. Souza Brito, do departamento de Fisiologia e Bioquímica, Instituto de Biociências da Unicamp, pela amizade e ensinamentos durante esses anos de convivência.

A todos da biblioteca do IQ, pela ajuda e orientação durante a minha pós-graduação.

A todos da seção de pós-graduação, pela ajuda e orientações prestadas.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho.

À Capes, Fapesp-Biota e CNPq pela ajuda financeira.

Lista de abreviaturas

<i>n</i> -BuOH	<i>n</i> -Butanol
<i>n</i> -PrOH	<i>n</i> -Propanol
CC	Cromatografia em coluna
CCC	Cromatografia em contracorrente
CCD	Cromatografia em camada delgada comparativa
CFCR	Coleção da flora de campos rupestres
d	Dubleto
dd	Duplo dubleto
DAINEs	Droga antiinflamatória não esteroidal
DCM	Diclorometano
d.i.	Diâmetro interno
DMSO <i>d</i> ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
DPPH	1,1-difenil-1-picril-hidrazila
EtOAc	Acetato de etila
Ex - MeOH	Extrato metanólico
Ex - DCM	Extrato diclorometânico
Fr-BuOH	Fração butanólica
Fr-EtOAc	Fração acetato de etila
gCOSY	Gradient correlate spectroscopy
gHMBC	Gradient heteronuclear multiple bond correlations
gHMQC	Gradient heteronuclear through multiple quantum coherence
HPLC-UV-PDA	High performance liquid chromatography-Ultraviolet visible-Photodiode array
HPLC/MS	High performance liquid chromatography-Mass spectrometry
HPLC/ESI-IT-MS	High performance liquid chromatography-Electrospray-Ion Trap-Mass spectrometry
HSCCC	High Speed Countercurrent Chromatography (cromatografia em contracorrente de alta velocidade)
<i>J</i>	Constante de acoplamento
<i>m</i>	Multiplete
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
MeOH	Metanol
NO	Óxido nítrico
NP/PEG	Natural product/Polyethylenoglicol reagent
<i>R</i> _f	Fator de retenção
RMN de ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono treze
RMN de ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
Ss 1	Solvente CHCl ₃ :MeOH: <i>n</i> -propanol:H ₂ O (5:6:1:4), fase inferior
Ss 2	Solvente CHCl ₃ :MeOH:H ₂ O (43:37:20), fase inferior
Ss 3	Solventes Hex:EtOAc (95:05)
Ss 4	Solventes Hex:EtOAc (80:20)
<i>s</i>	Singleto
T	Tesla
TFA	Ácido trifluoracético
TMS	Tetrametilsilano
TOCSY-1D	Total correlation spectroscopy
UV	Ultravioleta
δ	Deslocamento químico
v.o.	Via oral

Sumário

Resumo.....	17
Abstract.....	18
1. Eriocaulaceae	19
A família Eriocaulaceae.....	20
A química da família Eriocaulaceae.....	25
O gênero <i>Eriocaulon</i>	27
O gênero <i>Syngonanthus</i>	28
Foto das espécies de Eriocaulaceae estudadas nesse trabalho.....	30
Panorama químico das espécies pertencentes à família Eriocaulaceae.....	31
2. Objetivos	36
3. Estudo químico	38
Cromatografia em contracorrente de alta velocidade – HSCCC.....	39
Escolha do sistema de solvente.....	42
Coleta do material vegetal e preparo dos extratos.....	45
Estudo químico dos capítulos das espécies.....	46
Estudo químico das frações obtidas de <i>E. ligulatum</i>	47
Purificação da fração acetato de etila (Fr-EtOAc) por HSCCC.....	47
Purificação da fração butanólica (Fr-BuOH) por HSCCC.....	48
Fracionamento do Ex-MeOH usando cromatografia de permeação em gel.....	50
Análise do extrato diclorometânico (Ex-DCM).....	51
Estudo químico das frações obtidas de <i>S. suberosus</i>	52
Purificação da fração acetato de etila (Fr-EtOAc) por HSCCC.....	52
Purificação da fração butanólica (Fr-BuOH) por HSCCC.....	53
Perfil do extrato metanólico dos capítulos de <i>Syngonanthus</i> spp.....	55
Purificação da fração butanólica (Fr-BuOH) por HSCCC.....	57
4. Elucidação estrutural e identificação	60
Identificação das substâncias isoladas das espécies de Eriocaulaceae.....	62
Determinação estrutural de substâncias isoladas das espécies de Eriocaulaceae.....	65
Elucidação estrutural de El 3.....	65
Elucidação estrutural de El 5.....	79
5. HPLC-MS e FIA-EIS-IT-MS dos extratos das espécies de Eriocaulaceae	90
Estudo do Ex-MeOH dos capítulos de <i>E. ligulatum</i> utilizando HPLC/MS.....	91
Análises por FIA-ESI-IT-MS dos extratos metanólicos de <i>Syngonanthus</i> sp.....	103
6. Ensaios químicos e biológicos	110
Ensaios biológicos.....	111
Teste da toxicidade aguda e “screening” hipocrático.....	111

Motilidade intestinal.....	114
Avaliação da atividade gastroprotetora.....	115
Ensaio antioxidante com DPPH.....	125
Quantificação de fenóis totais.....	127
Avaliação da mutagenicidade.....	130
7. Considerações finais.....	140
8. Materiais e métodos.....	144
9. Referências bibliográficas.....	149

Resumo

As Eriocaulaceae constituem uma família característica de monocotiledôneas pantropicais. Apesar de a maioria das espécies serem encontradas na América do Sul, principalmente nos “Campos Rupestres” brasileiros, ainda são poucos os estudos químicos e biológicos sobre essas plantas.

Por isso, neste trabalho nós contribuimos para aprofundar o conhecimento a respeito dessa família, investigando plantas dos gêneros *Eriocaulon* (*E. ligulatum*) e *Syngonanthus* (*S. suberosus* e *S. dealbatus*).

Os extratos foram preparados por maceração e/ou percolação com solventes orgânicos (hexano, diclorometânico e metanol). Em seguida, foram fracionados usando técnicas cromatográficas convencionais (colunas de sílica gel ou permeação em gel) ou cromatografia em contracorrente.

As estruturas foram determinadas usando infravermelho, ultravioleta, técnicas mono- e bidimensionais de RMN, além de espectrometria de massas com fonte electrospray e analisador íon trap.

A investigação química de *E. ligulatum* levou à identificação e elucidação de um novo flavonóide acilado (6,4'-dimetoxiquercetina-3-*O*- β -D-6''[(*E*)-3,4,5-triidroxicinamato]glicopirano_sídeo), uma nova naftopiranona dimérica (Eriocaulina), e de três flavonas (6-metoxiapigenina-7-*O*- β -D-glicopiranosídeo, 6-metoxiapigenina-7-*O*- β -D-alopiranosídeo e 6-metoxiapigenina). No estudo químico das espécies de *Syngonanthus* identificou-se flavonóides *O*- e *C*-glicosilados.

O extrato metanólico bruto de *E. ligulatum* não demonstrou atividade tóxica em camundongos e exibiu promissor efeito gastroprotetor. O extrato bruto não foi mutagênico no teste de Ames, mas frações contendo apenas agliconas de flavonóides e/ou naftopiranonas foram mutagênicas para algumas cepas de *Salmonella typhimurium*.

Este estudo químico também adiciona novos dados úteis para a discussão da complexa taxonomia de Eriocaulaceae.

Abstract

The Eriocaulaceae comprises a characteristic family of pantropical monocotyledons. In spite most of the species are found in South America, mainly at the Brazilian “Campos Rupestres”, chemical and biological knowledge of these plants are still scarce.

Thus, in this work we contributed to improve the knowledge about this family, investigating plants from the genera *Eriocaulon* (*E. ligulatum*) and *Syngonanthus* (*S. suberosus* and *S. dealbatus*).

Extracts were prepared with organic solvents (hexane, dichloromethane and methanol). The methanol and dichloromethane extracts were fractionated and the isolated compounds were purified by several chromatographic techniques, including high speed countercurrent chromatography (HSCCC), silica gel column chromatography and gel permeation chromatography.

Structures were determined by infrared and ultraviolet spectroscopy, as well as mono- and bidimensional NMR techniques, besides electrospray – ion trap – mass spectrometry.

The chemical investigation of *E. ligulatum* led to the identification of the new acylated flavonoid 6,4'-dimethoxyquercetin-3-*O*- β -D-6''[(*E*)-3,4,5-trihydroxy-cinnamate]glucopyranoside and a naphthopyranone dimer, named eriocauline, together with other known flavonoids, 6-methoxyapigenin-7-*O*- β -D-glucopyranoside, 6-methoxyapigenin-7-*O*- β -D-allopyranoside and 6-methoxyapigenin, while *Syngonanthus* species afforded mainly flavonoids *O*- and *C*-glycosides.

Pharmacological assays demonstrated that the crude methanol extract of *E. ligulatum* did not present acute toxic effect in mice and that it displayed promising gastroprotective activity. The crude extract was not mutagenic in the Ames assay, but fractions containing only flavonoid aglycones and/or naphthopyranones were mutagenic to some *Salmonella*/microsome strains.

The chemical data obtained in this work also added more data to the discussion of the complex taxonomy of Eriocaulaceae.

1 .Eriocaulaceae

Eriocaulaceae

As plantas pertencentes à Eriocaulaceae são perenes e possuem tamanhos que variam de poucos centímetros a metros de altura. A família pertence à classe das monocotiledôneas. As monocotiledôneas são bem distintas, incluindo plantas como as gramíneas, orquídeas e as palmeiras (Raven *et al*, 2001).

As Eriocaulaceae possuem distribuição pantropical, com cerca de 1200 espécies reunidas em onze gêneros (Tab. 1.1), segundo a proposta de Ruhland (1903), que é o mais consistente e ainda se encontra em vigor nos dias atuais. Cabe destacar que Ruhland fez a última grande revisão mundial da família, estabelecendo assim a base da sistemática das Eriocaulaceae utilizada até o presente (Sano, 1999).

Tabela 1.1. Gêneros pertencentes à família Eriocaulaceae segundo a proposta de Ruhland (1903). (número aproximado de espécies de cada gênero, Giulietti, 1997 e Sano, 1999).

<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>Blastocaulon</i> (10)	<i>Actinocephalus</i> (29)
<i>Philodice</i> (10)	<i>Lachnocaulon</i> ⁺⁺ (10)	<i>Syngonanthus</i> (200)	

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

Eriocaulaceae possui uma complexa divisão que envolve gêneros, subgêneros, seções e subseções. Estas subdivisões ocasionam certa dificuldade na classificação taxonômica das espécies. A figura 1.1 apresenta a classificação dos *taxa* proposta para Eriocaulaceae, segundo Giulietti *et al* (2000).

Subfamílias	Gêneros	Subgêneros	Seções	Subseções
Eriocauloideae	<i>Eriocaulon</i>			
	<i>Mesanthemum</i>			
Paepalanthoideae	<i>Tonina</i>			
	<i>Blastocaulon</i>			
	<i>Eulepsis</i>			
	<i>Lachnocaulon</i>			
	<i>Leiothrix</i>	<i>Leiothrix</i>		
		<i>Rheocaulon</i>		
		<i>Eleutherandra</i>		
		<i>Stephanophyllum</i>		
	<i>Paepalanthus</i>	<i>Platycaulon</i>		
		<i>Thelxinoe</i>		
		<i>Xeractis</i>	<i>Xeractis</i>	
			<i>Crysostegis</i>	
			<i>Gymnostegis</i>	
			<i>Pleutophyllum</i>	
		<i>Paepalocephalus</i>	<i>Actinocephalus</i>	
			<i>Diphymene</i>	
			<i>Eriocaulopsis</i>	
	<i>Philodice</i>			
	<i>Rondonanthus</i>			
	<i>Syngonanthus</i>			
				<i>Syngonanthus</i>
				<i>Carpocephalus</i>
				<i>Trysanocephalus</i>
				<i>Eulepis</i>

Figura 1.1. Classificação dos *taxa* de Eriocaulaceae (Giulietti *et al*, 2000).

Os espécimens de Eriocaulaceae são distribuídos no mundo (Fig. 1.2) e no Brasil (Fig. 1.3), (Giulietti, 1978a). Crescem principalmente em solos arenosos, juntamente com espécimens das famílias Poaceae, Cyperaceae e Xyridaceae, constituindo com isso a comunidade herbácea dominante (Scatena & Menezes, 1996).

A família é caracterizada morfológicamente pelas folhas em forma de roseta, de onde partem os escapos e destes escapos surgem às inflorescências do tipo capítulos envolvidos por brácteas (Fig. 1.4) (Monteiro *et al*, 1976).

Os capítulos e escapos permanecem com aparência de vivos durante muitos anos, mesmo depois de retirados do solo. Por esta razão, muitas espécies desta família são conhecidas popularmente como “sempre-vivas”.

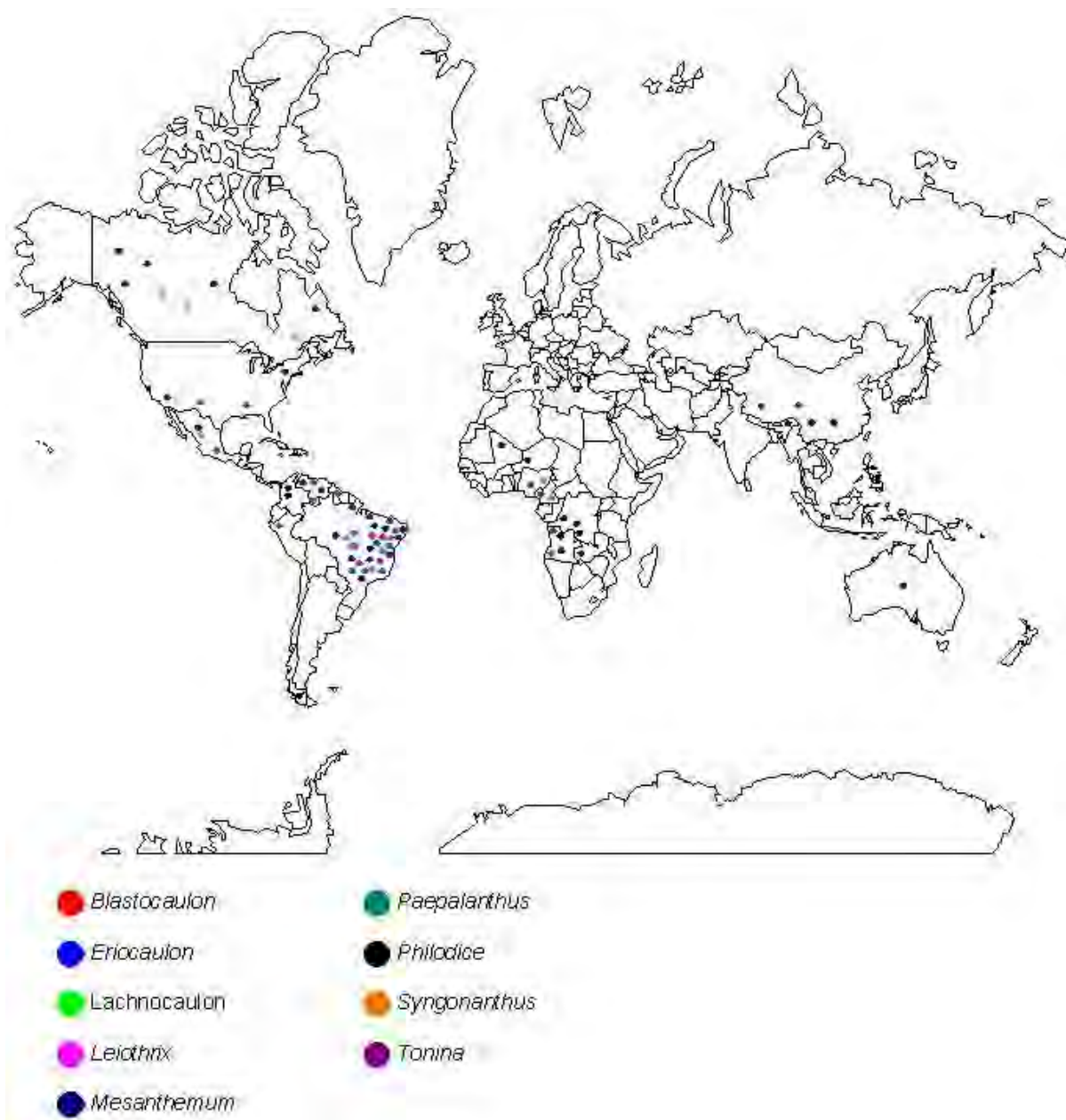


Figura 1.2. Distribuição geográfica da família Eriocaulaceae (baseado em Giulietti, 1978a).



Figura 1.3. Distribuição geográfica da família Eriocaulaceae no Brasil (baseado em Giulietti, 1978a).

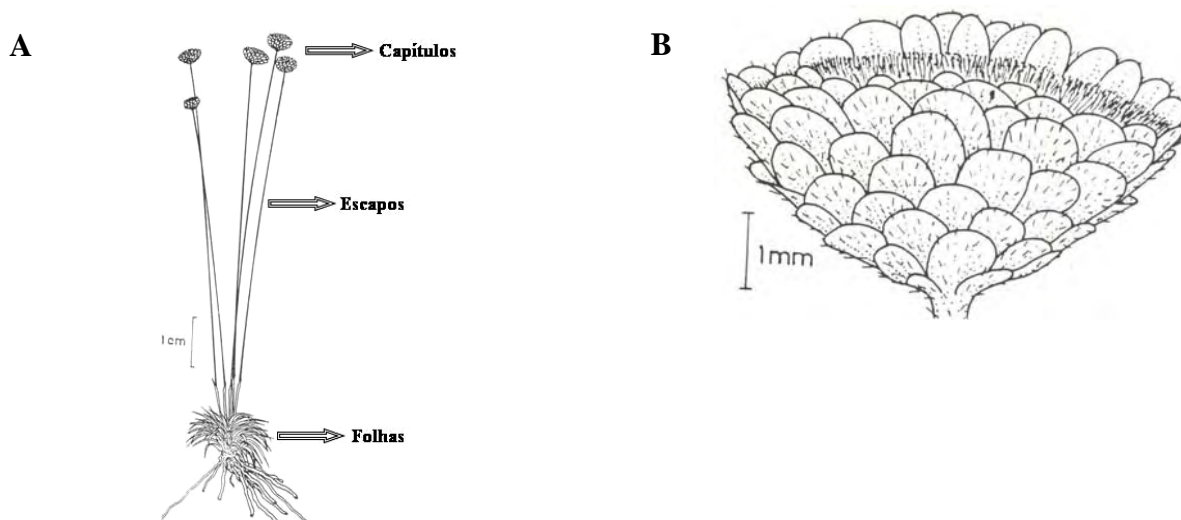


Figura 1.4. (A) Esquema dos capítulos, escapos e folhas em Eriocaulaceae. (B) Detalhe do capítulo envolto por brácteas de *Syngonanthus fuscescens* Ruhland (Parra, 1998).

A comercialização de “sempre-vivas” pela população que vive na Cadeia do Espinhaço (Fig. 1.5) (Minas Gerais, Goiás e Bahia) desenvolveu-se principalmente nas últimas décadas e certamente é decorrente do declínio da atividade mineradora nestas áreas, que conheceram grandes riquezas durante os ciclos do ouro e do diamante (Menezes & Giulietti, 1986).

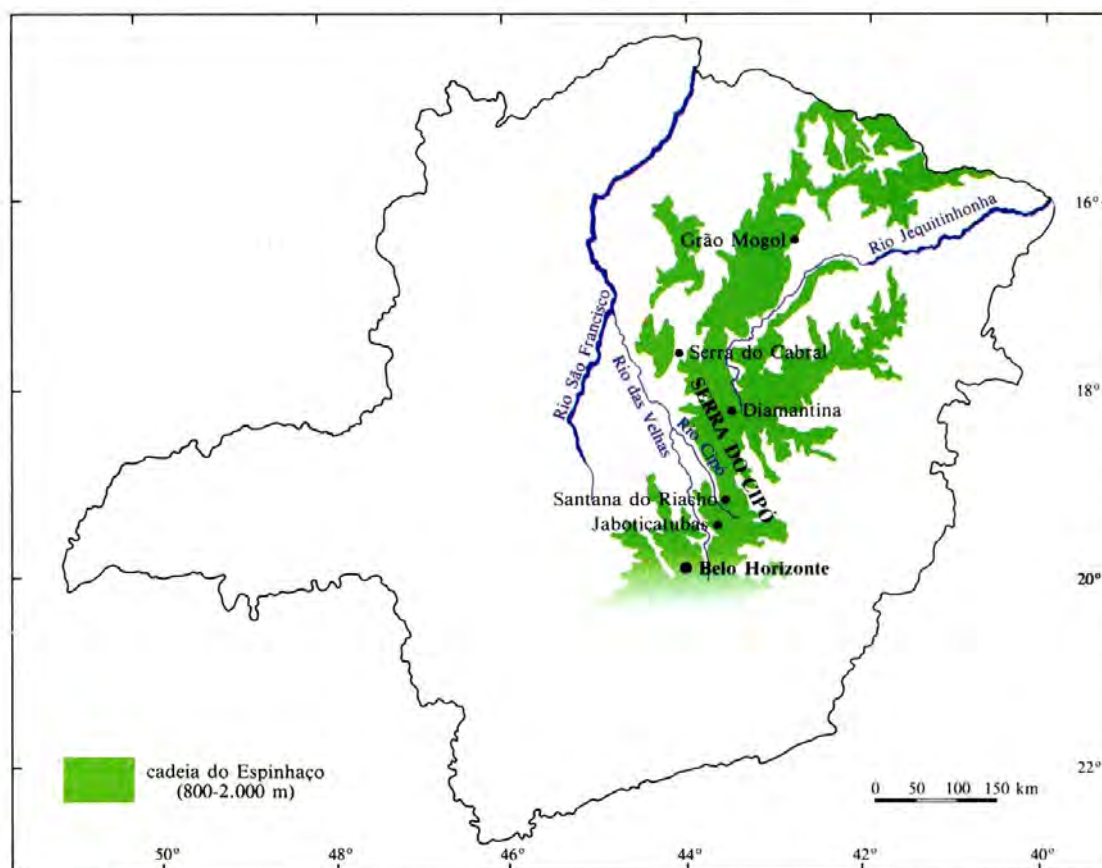


Figura 1.5. Mapa do Estado de Minas Gerais em que se destaca a porção da Cadeia do espinhaço compreendida entre Belo Horizonte e o Estado da Bahia (Menezes & Giulietti, 1986).

Nas últimas décadas, devido à escassez do ouro e do diamante, a população existente nestas regiões viu-se obrigada a procurar novas fontes de sobrevivência. Com isso, o enorme volume de exportações dessas plantas para países da América do Norte e Europa têm tornado estas espécies uma fonte de recurso financeiro. A coleta das “sempre-vivas” é inteiramente baseada em extrativismo a partir das populações naturais, feitas por pessoas da própria região (Fig. 1.6), (Schmidt, 2005).

No entanto, a exportação das “sempre-vivas” conduz a uma situação altamente predatória, pois as coletas podem acarretar numa diminuição das populações das espécies, especialmente porque as flores são retiradas antes da formação das sementes (Giulietti, 1978a).



Figura 1.6. Obtenção de matéria-prima e confecção artesanal das “capim-dourado”
(Schmidt, 2005).

Este grande volume de exportação também despertou a curiosidade de pesquisadores brasileiros, levando a especulações sobre as possíveis utilizações para outros fins, além da decoração.

Entre os usos populares das espécies de *Eriocaulaceae*, está a de repelir insetos. Esta característica faz com que sejam colocadas em armários e gavetas para afugentar baratas e traças (Menezes & Giuliatti, 1986).

A química de Eriocaulaceae

Os estudos químicos com Eriocaulaceae iniciaram-se com Bate Smith & Harborne (1969), que relataram a presença da quercetagetina em *Eriocaulon nilagirens* Steud. e *E. septangulare*. Os mesmos autores detectaram a presença do mesmo flavonol 6-oxigenado nas folhas de *E. decangulare* L., *E. brownianum* Mart., *E. sexangulare* L. e *E. wightianum* Mart. e sua ausência em *E. truncatum* Ham.

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

Salatino *et al* (1990) realizaram o estudo do 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 a *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*, *P. albovaginatus*, *P. argentus*, *P. ramosus* e *P. 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* (*P. hilairei*, *P. robustus*, *P. planifolius* e *P. 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-hidroxi-luteolina, 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.

Os trabalhos tiveram início com a investigação dos capítulos de espécies de *Paepalanthus*. O estudo de *P. 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), além de outra naftopiranona, a vioxantina, e um dímero da paepalantina, ligado pelas posições 8-8' (Coelho *et al*, 2000). Outro dímero, constituído por uma unidade de paepalantina e outra de semi-vioxantina, foi isolado de *P. planifolius* (Santos *et al*, 2001b). Derivados glicosilados da semi-vioxantina (3,4-diidro-10-hidroxi-7-metoxi-3-(*R*)-metil-1H-3,4-diidronafto-[2,3c]-piran-1-ona-9-*O*- β -D-glicopiranosídeo, 3,4-diidro-10-hidroxi-7-metoxi-3-(*R*)-metil-1H-3,4-diidronafto [2,3c]-piran-1-ona-9-*O*- β -D-glicopiranosil(1' \rightarrow 6''))glicopiranosídeo e 3,4-diidro-10-hidroxi-7-metoxi-3-(*R*)-metil-1H-3,4-diidronafto-[2,3c]-piran-1-ona-9-*O*- β -D-alopiranosil(1'' \rightarrow 6')glicopiranosídeo) foram encontrados também em *P. vellozioides* e *P. latipes* (Vilegas *et al*, 1999a). A 5-desmetoxipaepalantina e seus derivados glicosilados foram encontrados em *P. macrocephalus* (Bong.) Koernicke (*P. sect. Eriocaulopsis* subs. *Aphorocaulon*), em conjunto com derivados 6-metoxilados da quercetina e seus glicosídeos (Dokkedal, 2000).

Flavonóis acilados e glicosilados derivados da quercetina foram encontrados em *Paepalanthus hilairi*, *P. robustus*, *P. denudatus*, *P. ramosus*, *P. polyanthus* (Andrade *et al*, 1999).

Tendo em vista que em muitas espécies o escapo é uma parte abundante e bastante utilizada na confecção de peças artesanais, foi iniciada a investigação dos escapos de *P. bromelioides* e *P. latipes*. Deles, Nehme (1997) obteve derivados 7-metoxilados da quercetina, enquanto que Santos (1997) encontrou naftopiranonas nos capítulos e flavonóis 6-metoxilados derivados do kaempferol e da quercetina nos escapos de *P. hilairi*.

Iniciando o estudo de folhas, foram isoladas diidronaftopiranonas glicosiladas de *P. vellozioides* e *P. latipes*, acompanhadas de flavonóides 7-metoxilados e seus glicosídeos (Vilegas *et al*, 1999a e 1999b).

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).

O gênero *Eriocaulon*

Segundo Bongard (1831), *Eriocaulon* é um nome de origem grega que significa caule lanoso. Como nome genérico, foi usado pela primeira vez por Plukenet em 1696, para designar *Eriocaulon noveboracense* Plunk.

O gênero *Eriocaulon* apresenta aproximadamente 450 espécies distribuídas pela América, África, Ásia e Europa (Moldenke, 1971).

Eriocaulon é o único gênero da família de ocorrência no continente Asiático, com poucas espécies na Ex-União Soviética e Mongólia, e com maior número no Sul e Sudeste, especialmente Índia, onde ocorrem 66 espécies (Moldenke, 1971). As plantas nessa região ocorrem geralmente em locais montanhosos, com altitudes em torno de 1.000 m. Algumas espécies, como *E. pumilio* Hook. F., ocorrem no Himalaia, em até 3.000 m de altitude. As espécies habitam, em geral, locais muito úmidos ou são plantas aquáticas.

A primeira monografia sobre as espécies brasileiras de *Eriocaulon* foi elaborada por Bongard (1831), que descreveu sucintamente 80 espécies do gênero. Dessas, apenas *E. crassiscapum* Bong., *E. pubigerum* Bong., *E. elichrysoides* Bong. e *E. sparganioides* Bong. ainda permanecem entre os *Eriocaulon* de acordo com o conceito atual de classificação taxonômica deste gênero. As 76 restantes são consideradas hoje representantes de outros gêneros.

No Brasil são conhecidas 59 espécies, distribuídas desde o Amazonas até o sul do Paraná. No entanto, a maior concentração está nos Estados de São Paulo, Goiás, e principalmente em Minas Gerais, onde 31 espécies foram encontradas (Giulietti, 1978a).

No Brasil ocorrem dois grupos de espécies bem distintas: aquelas cujas rosetas medem entre 5-15 cm de diâmetro, com os capítulos pequenos e escuros, como *E. modestum* Kunth. e *E. crassicapum* Bong., e as espécies com rosetas desenvolvidas, com 20-60 cm de diâmetro, e capítulos claros e com diâmetros maiores que 1 cm, como *E. elichrysoides* Bong. *E. ligulatum* Vell. (Giulietti, 1997).

Do ponto de vista químico, Bate Smith *et al* (1969) analisaram extratos de folhas frescas de algumas espécies de *Eriocaulon*, e detectaram a presença do flavonóide quercetagetina em *E. septangulare* With., *E. brownianum* Mart., *E. nilagirensis* Steud., *E. decangulare* L., *E. sexangulare* L., e *E. wrightianum* Mart. Nesse mesmo trabalho, o erioflavonol foi isolado dos capítulos de *E. brownianum* Mart.

Ho *et al* (2002) identificaram 4 flavonóides dos capítulos de *E. buergerianum* Koern., dentre eles a (2*S*)-3',4'-metilenodioxo-5,7-dimetoxiflavona e a hispidulina-7-(6-*E-p*-coumaroil- β -D-glucopiranosídeo), e o tocoferol.

Santos *et al* (2005) isolaram 10 flavonas 6-metoxiladas e 2 naftopiranonas glicosiladas do extrato metanólico dos capítulos e escapos de *E. ligulatum*.

Fang *et al* (2008) isolaram uma xantona, uma isoflavona, um flavonóide acilado derivado da 6-metoxiquercetina e 19 derivados fenólicos e flavonoídicos do extrato metanólico dos capítulos de *E. buergerianum*, usada na medicina tradicional Chinesa para combater inflamações oftálmicas e bacterianas.

O gênero *Syngonanthus*

O gênero *Syngonanthus* inclui aproximadamente 200 espécies, distribuídas nas Américas e África. Dessas, somente sete ocorrem na África, duas ocorrem na América do Norte e doze na América Central. O maior número encontra-se na América do Sul, principalmente no Brasil, nos Estados de Minas Gerais e Bahia, com aproximadamente 180 espécies (Giulietti, 1997).

Quanto à química do gênero, 25 espécies representativas dos quatro subgêneros que ocorrem no Brasil (*Carpocephalus*, *Dimorphocaulon* [= *Syngonanthus*], *Eulepis* e *Thysanocephalus*) foram estudadas (Ricci, 1993; Ricci *et al*, 1996; Bonfim, 1993). Nelas foram identificadas grande quantidade de flavonas, com predominância de *O*-glicosídeos e *C*-glicosídeos derivados da luteolina, e com menor frequência *O*-glicosídeos derivados da apigenina. Os derivados da 6-hidroxiluteolina ocorrem predominantemente em espécies de *Syngonanthus* sect. *Carpocephalus* e sect. *Dimorphocaulon*, enquanto que nas espécies de *Syngonanthus* sect. *Eulepis* e sect. *Thysanocephalus* predominam os *C*-glicosídeos, mais frequentemente como derivados de luteolina (Fig. 1.7). Como resultado, os autores concluíram que existe semelhança química entre *Syngonanthus* sect. *Carpocephalus* e sect. *Dimorphocaulon* de um lado, e *Syngonanthus* sect. *Eulepis* e sect. *Thysanocephalus* do outro lado (Fig. 1.7). Tal similaridade química concorda com os padrões morfológicos e anatômicos da flor, auxiliando a caracterizar os dois agrupamentos formados pelas seções de *Syngonanthus*.

Esses estudos, em conjunto com a análise do teor dos compostos fenólicos mencionados anteriormente (Salatino *et al*, 1990), sugeriram a evolução a partir de um ancestral comum (Fig. 1.8).

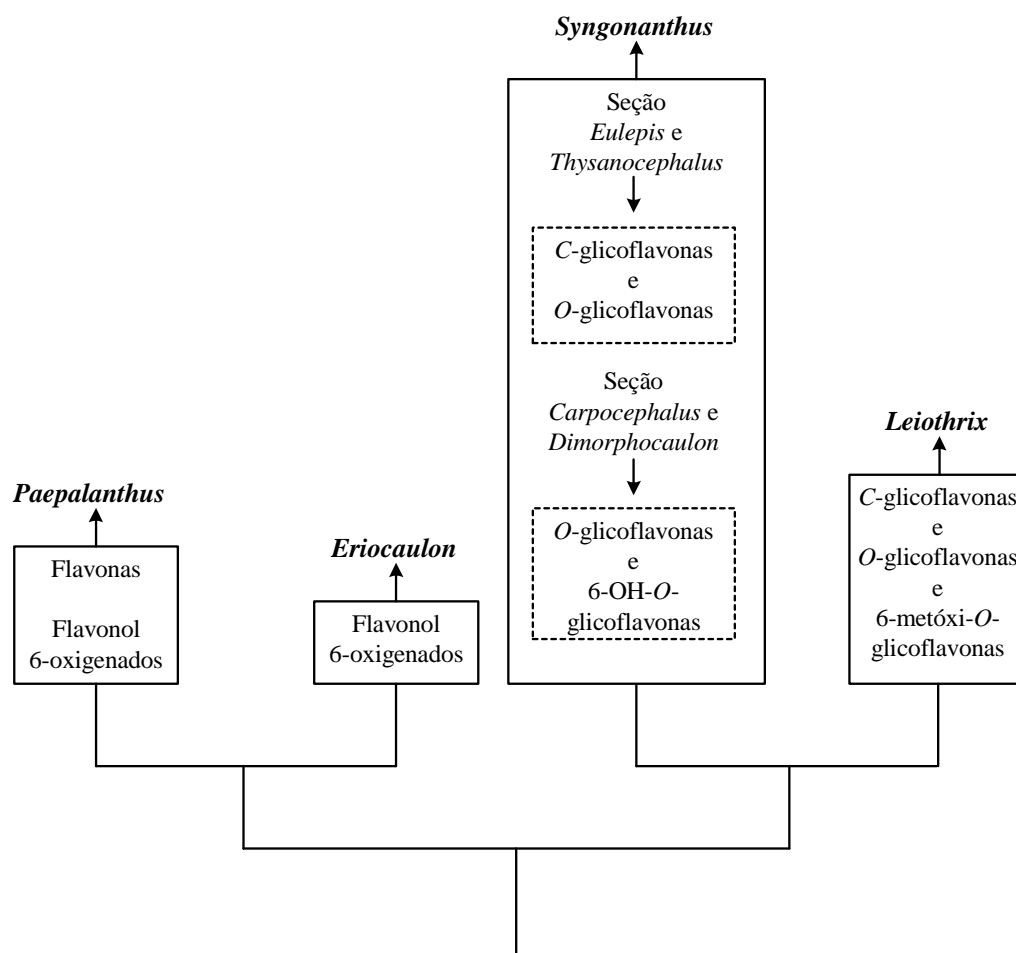


Figura 1.7. Relação de afinidade entre os gêneros pertencentes à família Eriocaulaceae baseado na presença de flavonóides (Ricci *et al*, 1996).

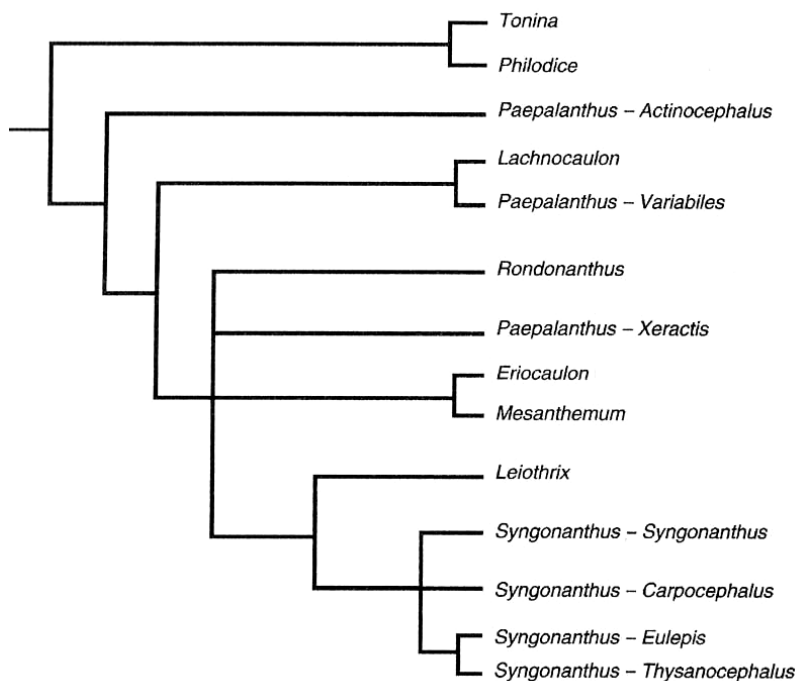


Figura 1.8. Cladograma geral da evolução das espécies da família Eriocaulaceae (Giulietti *et al*, 2000).

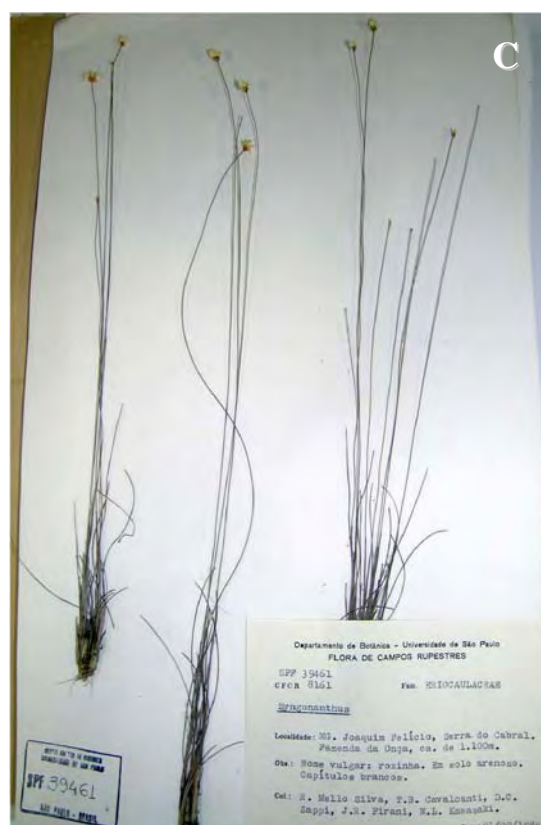
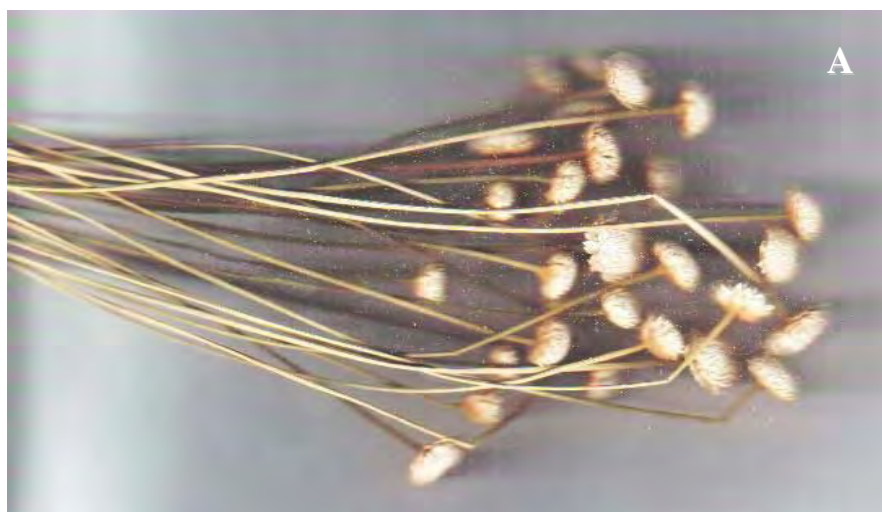


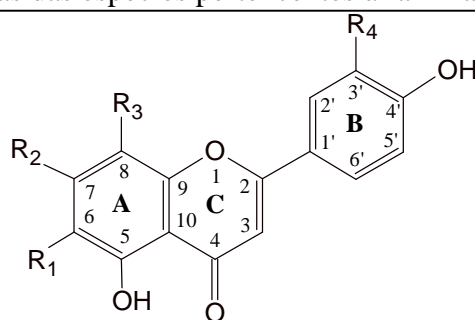
Figura 1.9. Fotos das espécies estudadas neste trabalho. (A) Detalhe dos capítulos e escapos de *E. ligulatum* Sano nº 2978 (CFCR 7996). (B) Foto da exsicata de *S. suberosus* CFR 4463 (Sano nº 2976). (C) Foto da exsicata de *S. dealbatus* CFR 8161 (Sano nº 2975).

Panorama químico das espécies pertencentes à família Eriocaulaceae

Várias espécies pertencentes à família Eriocaulaceae foram investigadas, tendo-se isolado majoritariamente flavonóides, naftopiranonas e xantonas (tabelas 1.2 e 1.3.).

Tabela 1.2. Panorama químico das espécies pertencentes à família Eriocaulaceae.

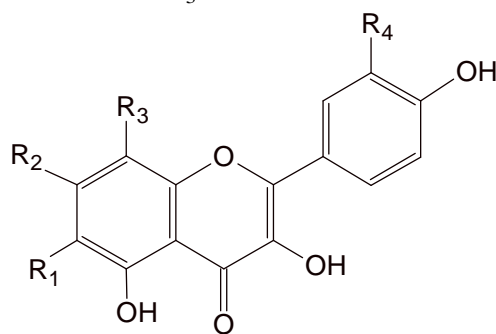
Espécies	Substâncias	Referências
<i>Paepalanthus</i>		
<i>P. subg. Xeractis</i>		
<i>P. chlorocephalus</i>	01, 10, 14, 30, 39, 44, 46	Dokkedal, 2000.
<i>P. argenteus</i> var. <i>argenteus</i>	02, 08, 17, 27	Dokkedal, 2000.
<i>P. sect. actinocephalus</i>		
<i>P. polyanthus</i>	14, 15, 17, 20, 21, 22, 31, 33	Andrade <i>et al.</i> , 1999; Santos <i>et al.</i> , 2002.
<i>P. hilairi</i>	14, 19, 20, 21, 22, 30, 36, 37	Santos, 1997 e 2001; Andrade <i>et al.</i> , 1999.
<i>P. robustus</i>	04, 15, 19, 21, 30, 31, 36, 37	Andrade <i>et al.</i> , 1999.
<i>P. ramosus</i>	14, 15, 19, 20, 30, 34, 36, 37	Andrade <i>et al.</i> , 1999; Santos, 2001.
<i>P. denudatus</i>	14, 15, 19, 30, 31, 36, 37	Andrade <i>et al.</i> , 1999; Dokkedal, 2000.
<i>P. microphyllus</i>	35, 36, 37, 41, 42, 43	Santos, 2001.
<i>P. brachypus</i>	14, 21	Santos, 2001.
<i>P. subsect. aphoro caulon</i>		
<i>P. macrocephalus</i>	14, 17, 28, 30, 36, 39, 40, 44, 45	Dokkedal, 2000.
<i>P. sect. diphyomene</i>		
<i>P. speciosus</i>	35, 36, 38, 44	Garcia, 1997.
<i>P. subg. Platycaulon</i>		
<i>P. vellozioides</i>	18, 24, 25, 26, 27, 32, 35, 37, 44, 45, 46	Vilegas <i>et al.</i> , 1999a e 1999b.
<i>P. latipes</i>	18, 24, 25, 26, 27, 32, 35, 37, 44, 45	Dokkedal, 2000; Vilegas <i>et al.</i> , 1999a e 1999b; Nehme, 1997.
<i>P. bromelioides</i>	02, 17, 18, 25, 28, 35, 36, 37, 47	Vilegas <i>et al.</i> , 1990 e 1998; Coelho <i>et al.</i> , 2000.
<i>P. macropodus</i>	14, 16, 17, 23, 37	Andrade <i>et al.</i> , 2002.
<i>P. planifolius</i>	04, 06, 09, 12, 19, 24, 33, 35, 36, 37, 46, 47, 48	Santos <i>et al.</i> , 2001b.
<i>Leiothrix</i>		
<i>L. curvifolia</i>	02, 03, 05, 29, 50, 51	Santos <i>et al.</i> , 2001a.
<i>L. flavescens</i>	05, 07, 09, 10, 13, 28, 49	Santos <i>et al.</i> , 2001a.
<i>Syngonanthus</i>		
<i>S. bisulcatus</i>	03, 05, 09, 10, 11, 13	Coelho, 2000.

Tabela 1.3. Substâncias isoladas das espécies pertencentes à família Eriocaulaceae.**Agliconas de flavonas**

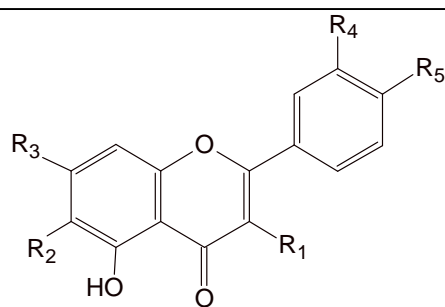
Substância	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
01	OCH ₃	OH	H	OH
02	OCH ₃	OH	H	OCH ₃
03	H	OH	H	OH
04	OH	OH	H	OH
05	H	OH	H	H
06	OH	OCH ₃	H	H
07	H	OH	OH	OH

Glicosídeos de flavonas

Substância	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
08	OCH ₃	O-glic	H	OCH ₃
09	H	O-glic	H	OH
10	C-glic	OH	H	OH
11	C-glic	O-glic	H	OH
12	C-glic	OH	C-glic	H
13	C-glic	OCH ₃	H	OH

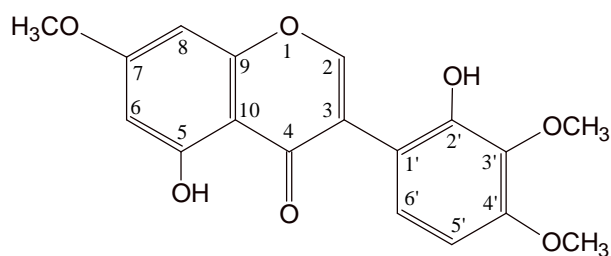
**Aglicona de flavonois**

Substância	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
14	OCH ₃	OH	H	H
15	OH	OH	H	OH
16	OH	OH	OH	OH
17	OCH ₃	OH	H	OH
18	OH	OCH ₃	H	OH



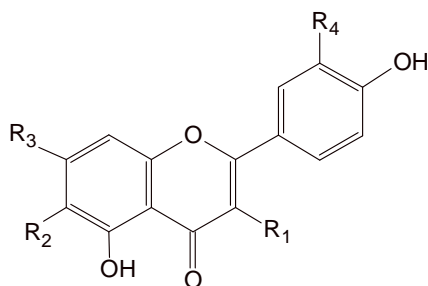
Glicosídeos de flavonóis

Substância	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
19	<i>O</i> -glic	OCH ₃	OH	H	OH
20	OH	OH	<i>O</i> -glic	OH	OH
21	<i>O</i> -glic	OCH ₃	OH	OH	OH
22	<i>O</i> -glic(1→6)rham	OCH ₃	OH	OH	OH
23	<i>O</i> -glic(4→1)glic	OCH ₃	OH	OH	OH
24	<i>O</i> -glic	OH	OCH ₃	OH	OH
25	OH	OH	OCH ₃	OH	<i>O</i> -glic
26	<i>O</i> -glic(1→6)glic	OH	OCH ₃	OH	OH
27	<i>O</i> -glic(1→2)rham	OH	OCH ₃	OH	OH
28	OH	OCH ₃	<i>O</i> -glic	OCH ₃	OH



29

Isoflavona

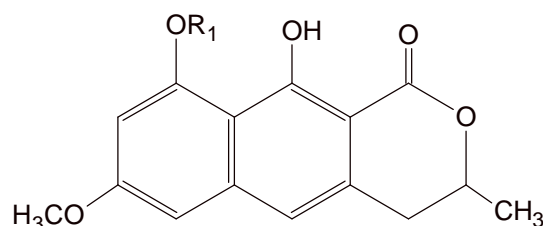
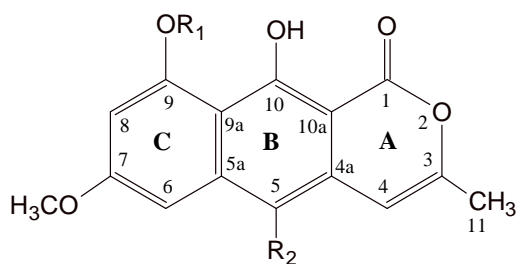
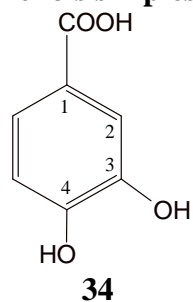


Flavonóis acilados

Substância	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
30	<i>O</i> -glic(6)- <i>p</i> -coum	OCH ₃	OH	H
31	<i>O</i> -glic(6)- <i>p</i> -coum	OCH ₃	OH	OH
32	<i>O</i> -glic(1→4)glic(2)-caf	OH	OCH ₃	OH
33	<i>O</i> -glic(6)-fer	OCH ₃	OH	OH

Continuação da tabela 1.3.

Fenóis simples



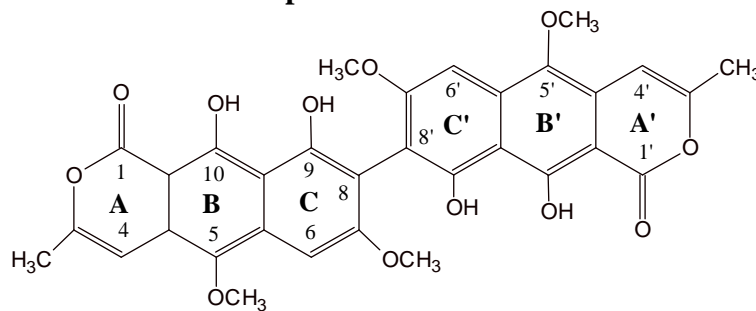
Naftopiranonas

Substância	R ₁	R ₂
35	H	OCH ₃
36	-glic	OCH ₃
37	-glic(1→6)allo	OCH ₃
38	-glic	H
39	-glic(1→6)glic	H
40	H	H
41	-glic(1→6)glic	OCH ₃
42	-ara(1→6)glic	OCH ₃
43	-rham(1→6)glic	OCH ₃

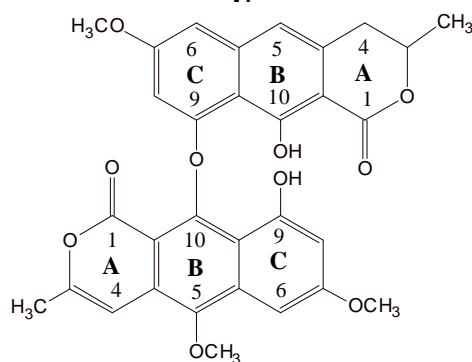
³Δ-diidronaftopiranonas

Substância	R ₁
44	-glic
45	-glic(1→6)glic
46	-allo(1→6)glic

Naftopiranonas diméricas

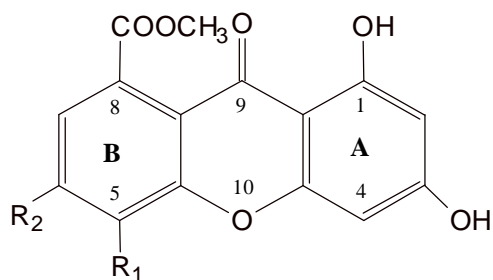


47



48

Continuação da tabela 1.3.



Xantonas

Substância	R ₁	R ₂
49	OH	OH
50	OH	OCH ₃
51	OCH ₃	OCH ₃

Continuação da tabela 1.3.

Legenda: Glic → glicopiranosídeo; Rham → rhamnopiranosídeo; Allo → alopiranosídeo; Ara → arabinopiranosídeo
 O-Glic → O-glicosídeo; C-Glic → C-glicosídeo; *p*-Coum → *p*-Cumaroil; Caf → Cafeoil; Fer → Feruloil;

2.Objetivos

Objetivos

Realizar o estudo químico dos capítulos de *Eriocaulon ligulatum* (Vell.) L.B.Smith, *Syngonanthus suberosus* Giul. e *Syngonanthus dealbatus* Silv.

Determinar o teor de fenóis totais do extrato e das frações dos capítulos de *Eriocaulon ligulatum*.

Avaliar a ação biológica de extratos e/ou frações dos capítulos de *Eriocaulon ligulatum*, incluindo a atividade tóxica, antimutagênica, antioxidante, antiúlcera e a motilidade intestinal.

3. Estudio Químico

A separação de produtos naturais geralmente é a etapa mais difícil do trabalho fitoquímico. As avançadas técnicas de determinação estrutural facilitaram, em muito, a determinação das estruturas das moléculas orgânicas. Porém, a determinação das estruturas só é viável quando precedida de processos eficientes de separação e purificação.

Em geral, os grupos que atuam em fitoquímica utilizam as técnicas cromatográficas e, dentre essas, a cromatografia de adsorção é a mais usada. Apesar de altamente eficiente, em alguns casos ela apresenta desvantagens, como perda de algumas substâncias, ocasionado pela adsorção irreversível da amostra na fase estacionária. Por esses motivos, foram desenvolvidas técnicas baseadas em partição líquido-líquido (Conway, 1989). A técnica de cromatografia em contracorrente é um método totalmente líquido, que se caracteriza pela ausência de suporte sólido. Sendo por isso muito empregada na separação de compostos polares de amostras complexas. Neste trabalho, utilizamos a cromatografia em contracorrente de alta velocidade (High Speed Countercurrent Chromatography – HSCCC) técnica cada vez mais usada em laboratórios de pesquisa. Explicitaremos a seguir alguns dos pontos mais relevantes da técnica.

Cromatografia em contracorrente de alta velocidade – HSCCC (High Speed Countercurrent Chromatography)

A cromatografia em contracorrente de alta velocidade (HSCCC) é uma técnica baseada na partição de um soluto entre dois líquidos imiscíveis. A proporção do soluto que passa para cada uma das fases é determinada pela constante de distribuição (K_D) de cada uma das substâncias presentes na amostra. A constante de distribuição é uma constante física, característica de cada substância, e é dada pela fórmula:

$$(K_D)_S = \frac{[S]_{\text{da substância de interesse na fase orgânica}}}{[S]_{\text{da substância de interesse na fase aquosa}}}$$

Cada substância dissolvida reparte-se em equilíbrio entre as duas fases líquidas não miscíveis de uma forma constante e reprodutível, dependente da temperatura. A K_D é o principal parâmetro usado na otimização do sistemas de solventes utilizado nas separações cromatográficas (Hostettmann *et al*, 2003; Foucault & Chevolut, 1998; Thomas & Robert, 1991).

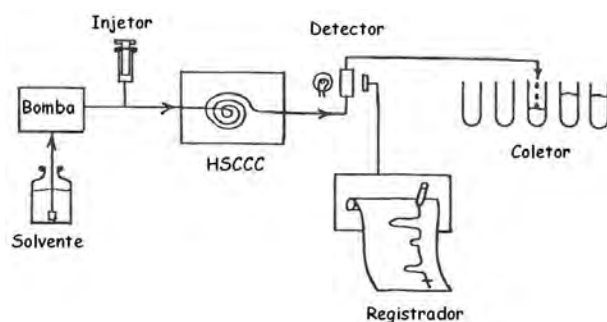


Figura 3.1. Esquema geral dos itens que constitui um sistema de separação por HSCCC.

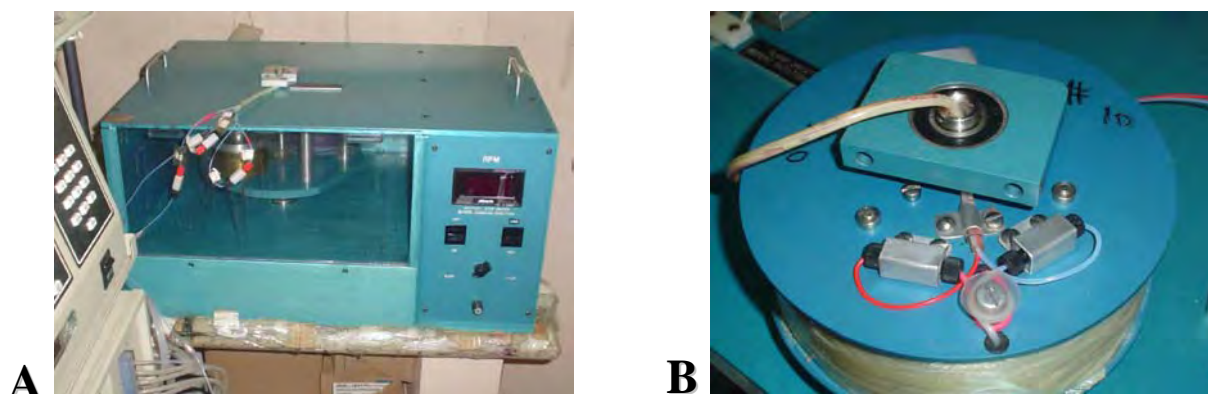


Figura 3.2. A) Foto do equipamento de HSCCC. B) Foto da coluna semi-preparativa usada no equipamento de HSCCC.

A cromatografia em contracorrente de alta velocidade é um método de separação que emprega somente líquidos durante as separações, com ausência de suporte sólido e, por isso, tem algumas vantagens em comparação com outras técnicas cromatográficas convencionais:

- Não ocorre adsorção irreversível da amostra.
- Há recuperação total da amostra introduzida na coluna do aparelho.
- Redução do risco de degradação das substâncias.
- Rapidez e eficiência do método.
- Apresenta uma versatilidade na escolha do sistema de solventes usados nas separações.
- Economia de solventes e colunas.
- Boa resolução em separações semi-preparativa.
- Aumento da área de interfase entre as duas fases líquidas usadas nas separações.

No equipamento de HSCCC (Fig. 3.1 e 3.2), a bobina (coluna) (Fig. 3.2B) é construída com tubos de PTFE (politetrafluoroetileno) envolto em torno de um suporte central para formar camadas múltiplas (Fig. 3.3) (Ito, 2005; Shinomiya *et al*, 2002).

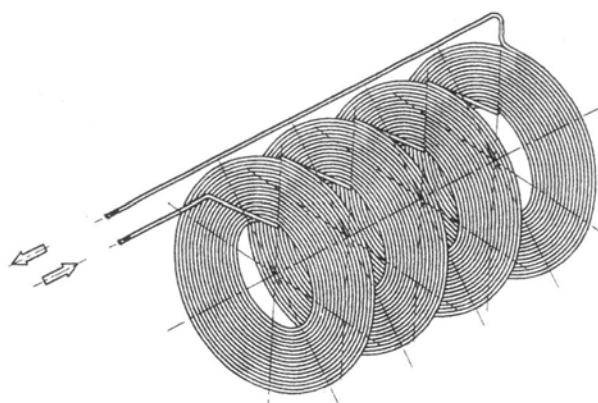


Figura 3.3. Esquema de distribuição dos tubos PTFE em torno de um eixo central (Shinomiya *et al*, 2002).

A coluna gira em torno do eixo central da centrífuga e, simultaneamente, ao redor de seu próprio eixo (Fig. 3.4A). O movimento da coluna provoca uma agitação vigorosa das fases do sistema de solvente, provocando um processo de mistura repetitiva, além de proporcionar zonas de mistura e separação das fases (Foucault & Chevlot, 1998; Mandava & Ito, 1988). Esse intercâmbio rápido leva a separações eficazes com pequeno volume de solvente.

Um dos parâmetros experimentais importante no HSCCC é o (β), responsável pelo equilíbrio hidrodinâmico dos solventes, definido como a proporção entre o raio da coluna (r) e o raio do giro da coluna no movimento planetário (R), (Fig. 3.4B).

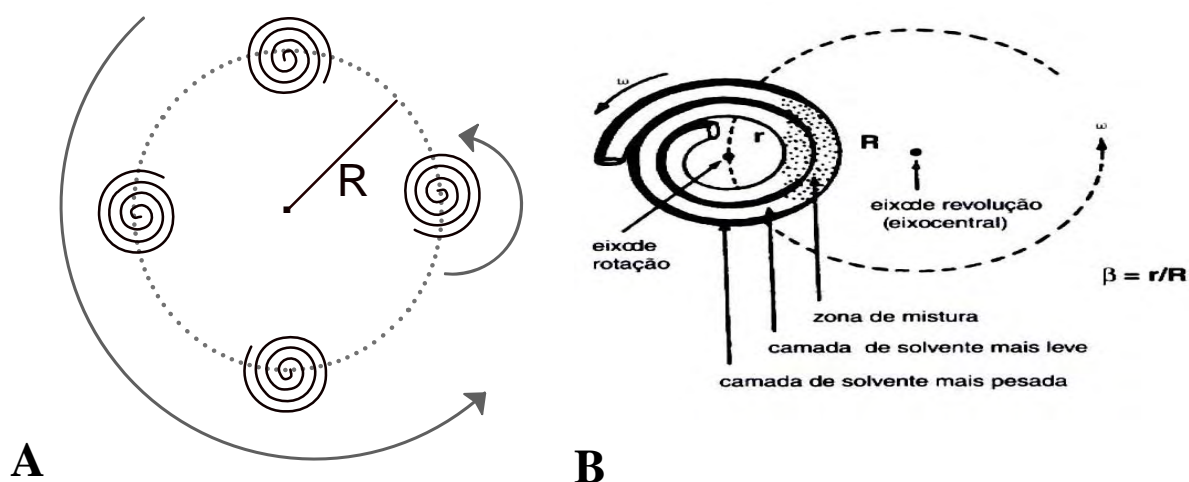


Figura 3.4. A) Esquema do movimento da coluna no aparelho de HSCCC. B) Distribuição dos solventes dentro da coluna do HSCCC (Hostettmann *et al*, 2003).

Atualmente, HSCCC vem sendo uma técnica preparativa amplamente aplicada em laboratórios de universidades e indústrias. No campo dos produtos naturais, HSCCC pode ser usada para fracionar extratos brutos, assim como frações semipuras, em quantidades que variam de

miligramas a gramas (Hostettmann *et al*, 2001; Marston *et al*, 1990). HSCCC é muito utilizada nas separações de substâncias com polaridade elevada, pois evita a adsorção irreversível da amostra na fase estacionária, como acontece frequentemente com o uso de sílica, que causa perda parcial ou total da amostra. Além dessas aplicações, a técnica é bastante promissora na obtenção de padrões químicos de alta pureza, com rapidez, eficiência e economia de solventes (Leitão, 2005; Zhang *et al*, 2003).

Escolha do sistema de solvente

A correta escolha dos sistemas de solventes é crucial para o êxito das separações no HSCCC. As combinações de solventes mais eficazes são aquelas que proporcionam uma constante de distribuição próxima de 1 das substâncias presentes na amostra (Foucault & Chevolut, 1998; Conway, 1989). A escolha tem que obedecer a alguns pré-requisitos para que ocorra uma separação eficiente:

- As misturas devem formar sistemas imiscíveis.
- O sistema de solventes deve solubilizar a amostra.
- As duas fases devem se separar rapidamente após agitação vigorosa (< 30 seg.).
- Se possível, formar volume igual de fase superior e inferior.
- Proporcionar uma constante de distribuição próxima de 1 das substâncias de interesse.
- Não formar emulsão.
- Formar mistura pouco viscosa.
- Apresentar pequena diferença de densidade entre a fase aquosa e a fase orgânica.

As misturas de solventes podem ser binárias, mas estas são pouco usadas, pois devido à grande diferença de polaridade entre os solventes, faria com que os analitos se distribuíssem preferencialmente apenas numa das fases. A adição de um terceiro ou de um quarto solvente, miscível com os outros componentes da mistura, diminui a diferença de polaridade entre as duas fases (Hostettmann *et al*, 1984). Assim, consegue-se aumentar a seletividade do sistema, permitindo as separações de substâncias com R_f 's próximos. A adição de um solvente auxiliar (Fig. 3.5) provoca, ainda, uma diminuição da tensão interfacial e da viscosidade do sistema (Ito, 2005; Conway, 1989; Mandava & Ito, 1988).

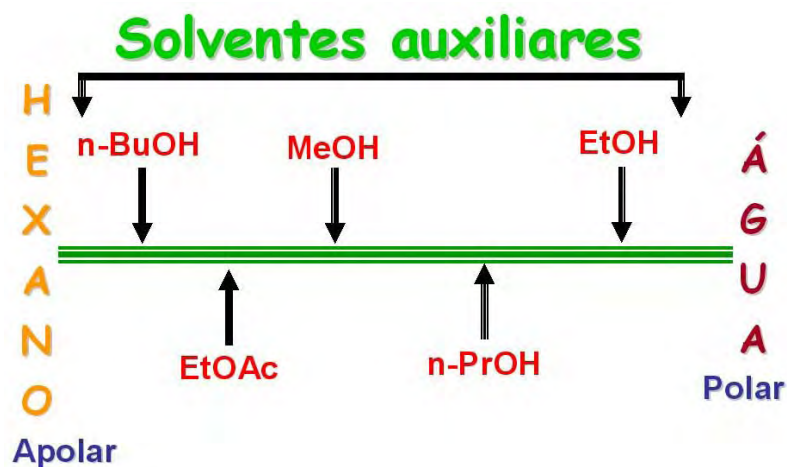


Figura 3.5. Alguns solventes auxiliares usados nas otimizações de sistemas de solventes aplicados em HSCCC.

A constante de distribuição (K_D) pode ser facilmente determinada analisando a fase superior e inferior de uma mistura de solventes, após a dissolução da amostra, cujas etapas estão resumidas na figura 3.6.

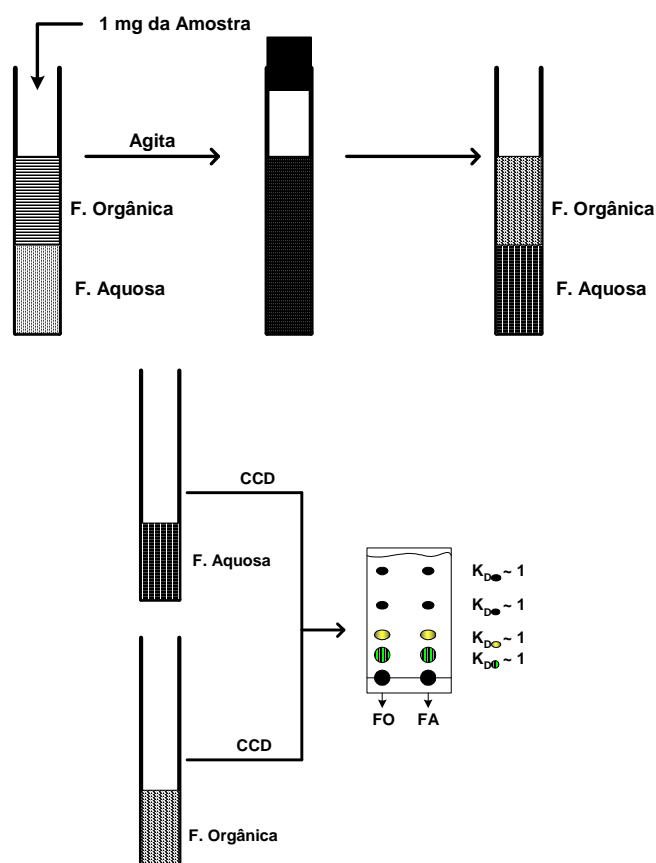


Figura 3.6. Etapas para a determinação da constante de distribuição de uma amostra no sistema de solvente escolhido usando a cromatografia em camada delgada (Conway, 1989).

Aproximadamente 1 mg da amostra é dissolvido no sistema de solvente escolhido previamente preparado em um tubo de ensaio. Após agitação e separação das fases (decantação), as duas fases são analisadas separadamente. Várias técnicas podem ser utilizadas para essa análise, sendo a mais comum e menos onerosa a cromatografia em camada delgada (CCD). A fase inferior e superior são aplicadas em proporções iguais na placa. A eluição da placa é feita em um sistema de solvente que proporcione boa resolução. Após a eluição, ela é analisada com revelador adequado. A constante de distribuição é estimada comparando-se visualmente as proporções das substâncias em cada fase. As substâncias devem estar distribuídas aproximadamente nas mesmas proporções tanto na fase superior quanto na fase inferior (Fig. 3.6) (Ito, 2005; Hostettmann *et al*, 2003; Foucault & Chevolot, 1998).

Exemplos de sistemas de solventes usados nas separações de produtos naturais por cromatografia em contracorrente incluem principalmente misturas de hexano / acetato de etila / n-propanol / n-butanol / metanol / etanol / água (Ito, 2005; Hostettmann. *et al*, 2003; Foucault & Chevolot, 1998; Oka *et al*, 1998; Marston & Hostettmann, 1991; Marston *et al*, 1990; Conway, 1989).

Coleta do material vegetal e preparo dos extratos

Escapos e capítulos de *Eriocaulon ligulatum* (Vell.) L.B. Smith. (nome vulgar: botão dourado), *Syngonanthus suberosus* Giul. (nome vulgar: margarida) e *Syngonanthus dealbatus* Silv. (nome vulgar: roxinha) foram coletados no mês de maio de 1999, em Diamantina, MG pelo prof. Dr. Paulo Takeo Sano, do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. As identificações foram feitas pelo mesmo, catalogadas com os números de exsicatas CFCR 7996 (*E. ligulatum*), CFCR 4463 (*S. suberosus*) e CFCR 8161 (*S. dealbatus*), depositadas no herbário do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

O material vegetal foi seco em estufa a 40°C por 4 dias. Após a secagem, foram triturados em moinho de facas. Os extratos foram preparados por maceração e/ou percolação de acordo com a figura 3.7. e obteve-se os rendimentos descritos na tabela 3.1.

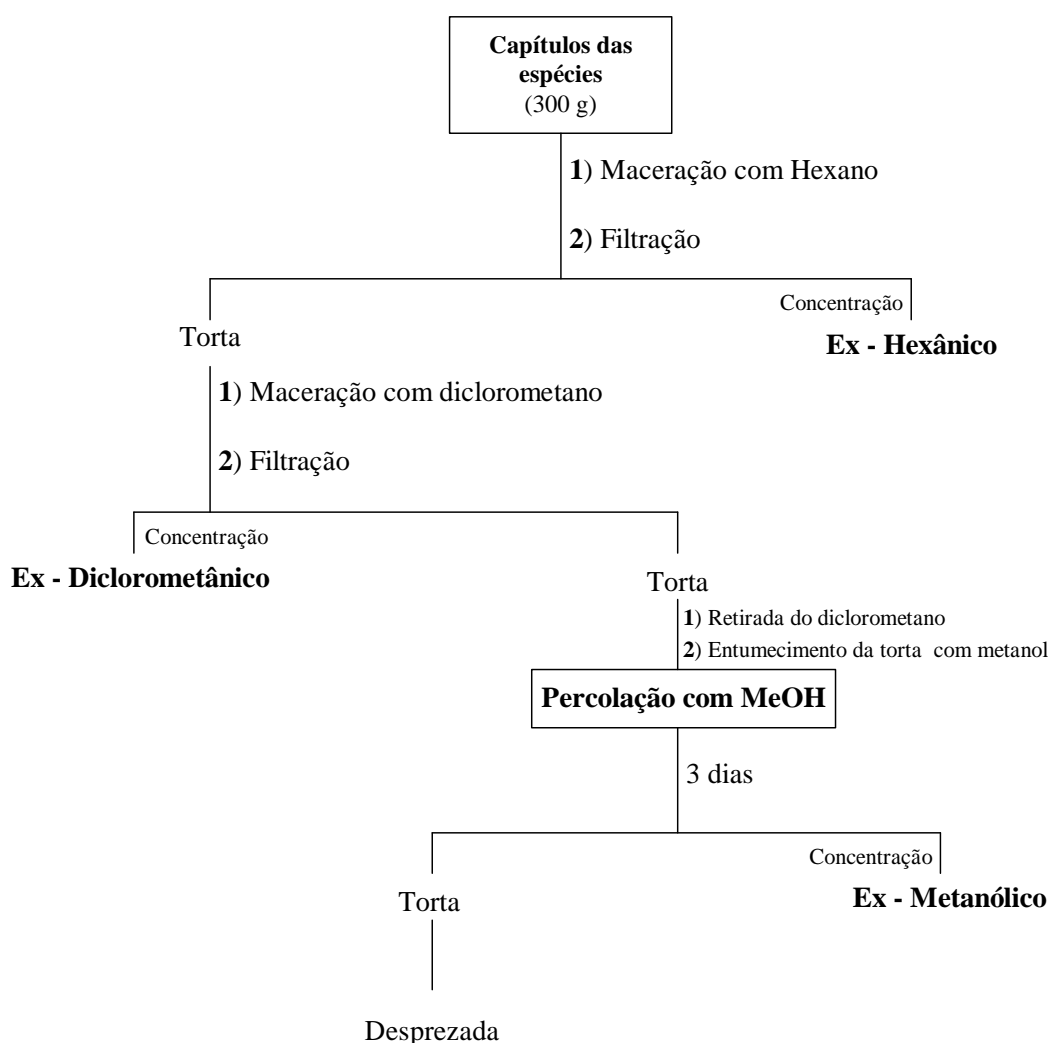


Figura 3.7. Obtenção dos extratos das espécies de Eriocaulaceae.

Tabela 3.1. Quantidade obtida de extratos e seus rendimentos das espécies estudadas.

Espécies	Ex-Hex	Ex-DCM	Ex-MeOH
	Rendimento %	Rendimento %	Rendimento %
<i>E. ligulatum</i> (El)	2,8 g	4,3 g	10,6 g
	0,9 %	1,4 %	3,5 %
<i>S. suberosus</i> (Ss)	3,2 g	3,2 g	5,4 g
	1,1 %	1,1 %	1,8 %
<i>S. dealbatus</i> (Sd)	3,6 g	3,8 g	4,9 g
	1,2 %	1,3 %	1,6 %

Estudo químico dos capítulos das espécies

Os Ex-MeOH das três espécies foram submetidos à partição líquido-líquido com solventes de polaridade crescente, obtendo frações semipurificadas. Este tipo de metodologia proporciona um adequado *clean up* dos extratos polares (Calixto & Yunes, 2001). Aproximadamente 4 g de cada Ex-MeOH foram particionados entre 60 mL de água e 20 mL de acetato de etila em um funil de separação por 3 vezes. Em seguida, a fase aquosa foi particionada também com 20 mL de *n*-butanol (3 vezes) (Fig. 3.8, e Tabela 3.2).

As frações obtidas nas partições foram analisadas por CCD, usando como fase móvel Ss 1 e padrões de rutina, 6-metoxiapigenina-7-*O*- β -D-glicopiranosídeo, apigenina, quercetina e paepalantina. Utilizou-se como revelador luz UV (254 e 366 nm), anisaldeído/ H₂SO₄ e NP/PEG (Wagner *et al*, 1984).

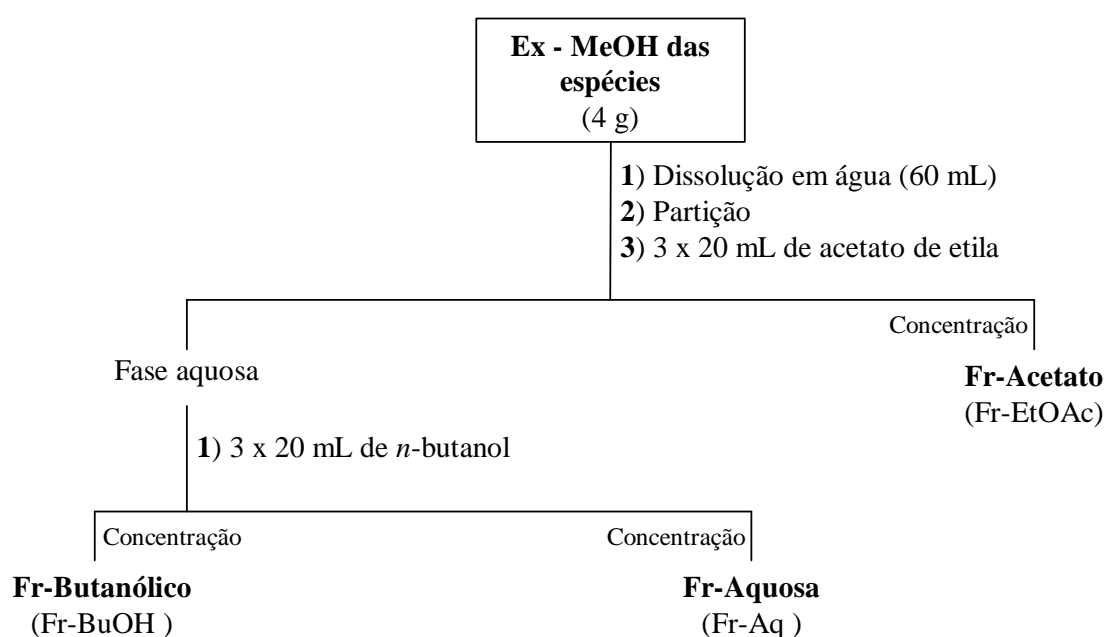
**Figura 3.8.** Partição dos Ex-MeOH dos capítulos das espécies.

Tabela 3.2. Quantidade obtida de frações e seus rendimentos.

Espécies	Fr-EtOAc	Fr-BuOH
	Rendimento %	Rendimento %
<i>E. ligulatum</i> (El)	1,2 g	1,1 g
	31,2 %	28,7 %
<i>S. suberosus</i> (Ss)	1,3 g	0,9 g
	32,0 %	21,7 %
<i>S. dealbatus</i> (Sd)	1,1 g	1,3 g
	26,7 %	33,2 %

Estudo químico das frações obtidas de *E. ligulatum*

A fração acetato de etila apresentou perfil flavonoídico constituído por agliconas e alguns monoglicosídeos, enquanto que a fração butanólica apresentou flavonóides mais polares. A fração aquosa continha uma grande quantidade de açúcares livres. Por isso, iniciamos o trabalho com a fração acetato de etila, por ser menos complexa.

Purificação da fração acetato de etila (Fr-EtOAc) por HSCCC em fase normal com eluição isocrática (Fig. 3.9)

Foram testadas várias proporções da mistura de hexano:acetato de etila:*n*-butanol:água, segundo metodologia descrita no item cromatografia em contracorrente de alta velocidade (Pág. 42). Não obtendo resultados satisfatórios, testamos então uma mistura de acetato de etila:*n*-propanol:água (14:0,8:8 v/v). Esta fase mostrou bons resultados K_D próxima de 1. Em seguida, os solventes foram misturados em funil de separação e deixados em repouso por doze horas, para saturação prévia dos mesmos. A fase inferior do sistema foi usada como fase estacionária e a superior como fase móvel. O sentido do bombeamento das fases foi da cauda → cabeça da coluna, com vazão de 1 mL min⁻¹ e rotação de 850 rpm. O volume eluído de fase estacionária foi de 55 mL, restando 83 % de fase estacionária dentro da coluna. Após esta etapa, 600 mg da Fr-EtOAc foram solubilizados em 16 mL de mistura de 1:1 das fases superior e inferior do sistema de solventes. A mistura foi filtrada em algodão e injetada no *loop* do aparelho com auxílio de uma seringa. A vazão foi de 1 mL min⁻¹ e a rotação de 850 rpm. Foram coletadas 130 frações de 3 mL cada.

Todas as frações foram analisadas por CCD em placas de sílica usando o sistema de solvente Ss 1 e reveladas com solução de anisaldeído/H₂SO₄ e NP/PEG.

As frações 46-52 (9 mg) e as frações 68-75 (23 mg) apresentaram manchas com coloração amarelada e Rf's semelhantes aos do padrão da 6-metoxiapigenina-7-O- β -D-glicopiranosídeo. Nas frações 46-52 foi identificada a substância **EI 1** e nas frações 68-75 a substância **EI 2**.

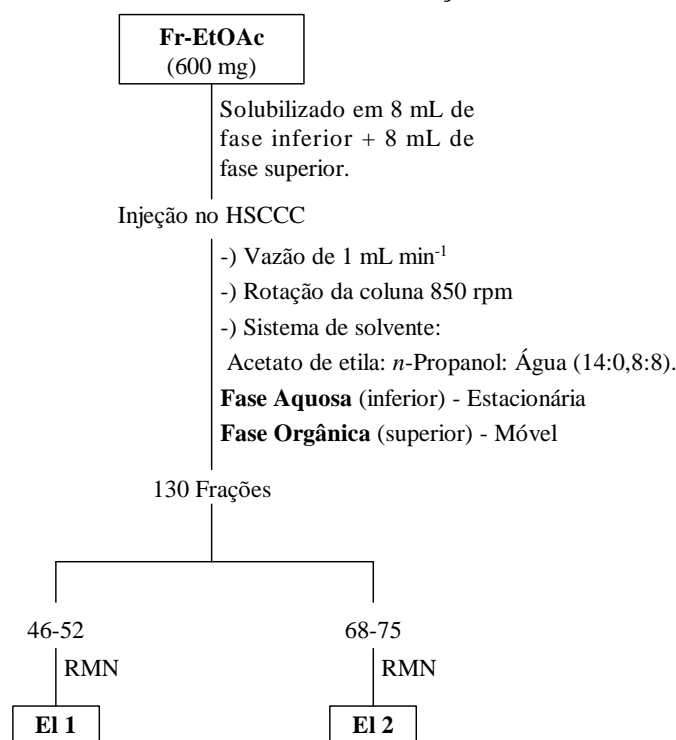


Figura 3.9. Esquema da separação da Fr-EtOAc usando HSCCC.

Purificação da fração butanólica (Fr-BuOH) por HSCCC em fase normal com eluição em modo gradiente (Fig. 3.11)

A Fr-BuOH quando cromatografada em CCD usando como os sistemas de solventes Ss 1 e Ss 2 apresentou uma mistura complexa de flavonóides e naftopiranonas, todas com Rf's próximos ao da rutina. A separação destas substâncias torna muito mais complexa quando se usa apenas uma única fase móvel na eluição do HSCCC. Por isso, investigamos a separação usando sistema de eluição em gradiente, com aumento gradativo da polaridade da fase móvel. A constante de distribuição (K_D) ótima foi obtida com misturas de acetato de etila:n-butanol:água (140:X:80 v/v), onde X variou 2, 4, 6 e 8 (Fig. 3.10).

A fase inferior do sistema de solventes foi usada como fase estacionária e a superior como fase móvel. O sentido do bombeamento das fases foi cauda \rightarrow cabeça da coluna, com vazão de 1 mL min⁻¹ e rotação de 850 rpm. O volume de fase estacionária eluída foi de 40 mL, restando 87 % dentro da coluna. 450 mg da Fr-BuOH foram solubilizados em 16 mL de uma mistura de 1:1 de fase inferior e fase superior do sistema de solvente menos polar, acetato de etila:n-butanol:água (140:2:80 v/v). A mistura foi filtrada em algodão e injetada no *loop* do aparelho com auxílio de uma

seringa. A separação ocorreu com uma vazão de 1 mL min^{-1} e rotação de 850 rpm. Coletaram-se 105 frações de 3 mL cada.

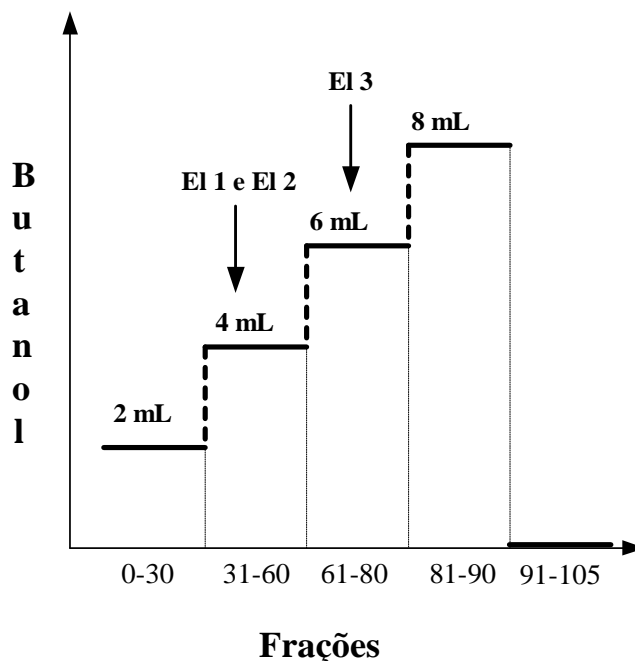


Figura 3.10. Variação do *n*-butanol durante a eluição em modo gradiente.

Todas as frações foram analisadas por CCD em placas de sílica usando os sistemas de solventes Ss 1 e Ss 2 e reveladas com solução de anisaldeído/ H_2SO_4 . As frações 40-49, 54-60 e 67-73 apresentaram coloração amarelada, característica de flavonóides, quando reveladas com uma solução de anisaldeído/ H_2SO_4 e com reagente de NP/PEG. Das frações 40-49 (7 mg) e 54-60 (20 mg) foram re-isoladas as substâncias **El 1** e **El 2**, e das frações 67-73 (14 mg) foi isolada a substância **El 3**.

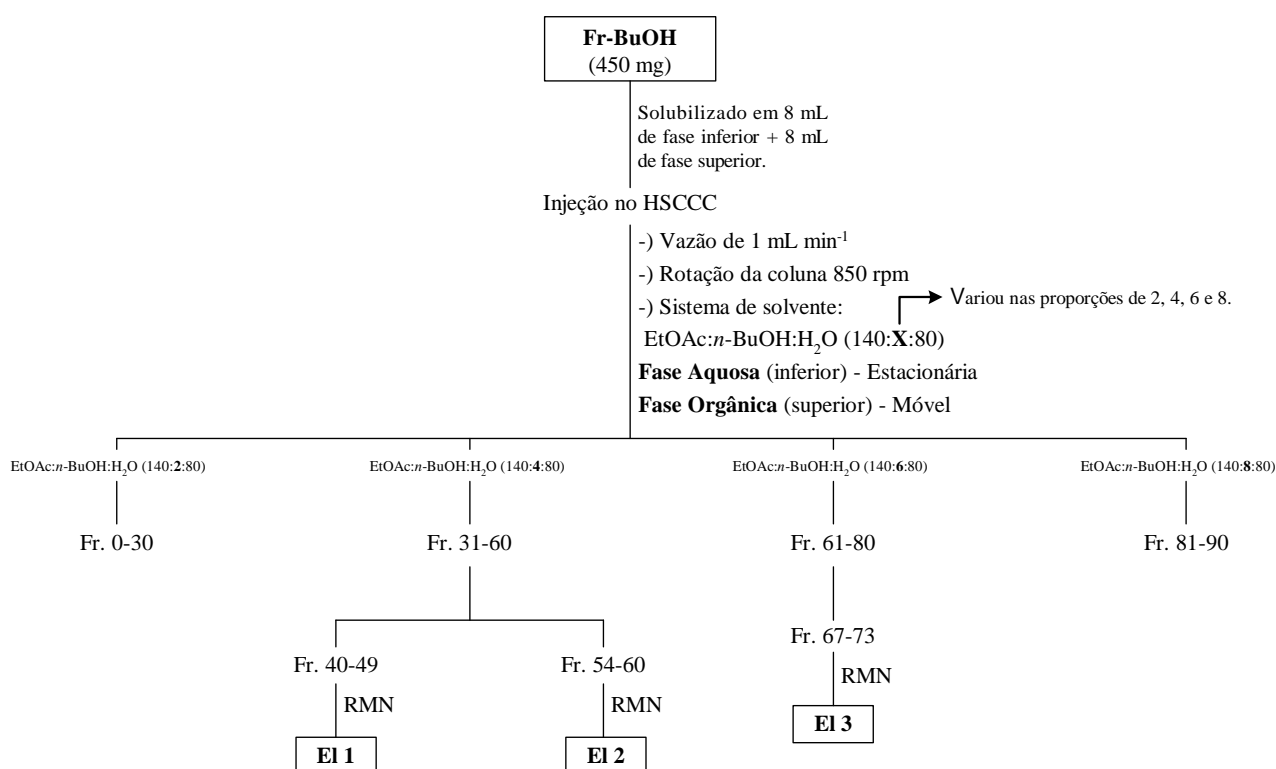


Figura 3.11. Esquema da separação da Fr-BuOH usando HSCCC com eluição em gradiente.

Fracionamento do Ex-MeOH usando cromatografia de permeação em gel de Sephadex LH-20

Dois gramas do Ex-MeOH dos capítulos de *E. ligulatum* foram solubilizados em 6 mL de metanol e centrifugado. O sobrenadante foi filtrado em algodão e aplicado em uma coluna (80 cm de altura x 2 cm de diâmetro interno) tendo como fase estacionária Sephadex LH-20. 160 frações de aproximadamente 10 mL cada foram coletadas com o auxílio de um coletor automático. As frações foram analisadas por CCD utilizando como fase móvel o sistema Ss 1 e padrões de rotina, 6-metoxiapigenina-7-*O*- β -D-glicopiranosídeo, apigenina, quercetina e paepalantina, e reveladas com anisaldeído/H₂SO₄ e NP/PEG. Da fração 154-157 (12 mg) foi identificada por RMN a substância **EI 4**.

Deste fracionamento obtiveram-se ainda três frações contendo grupos de substâncias diferentes. A primeira fração continha um conjunto de flavonóides glicosilados; a segunda apresentou misturas de flavonóides (glicosídeos e agliconas) e naftopiranonas; a terceira fração apresentou mistura de agliconas de flavonóides (Fig. 3.12). As três frações foram enviadas para ensaios de atividade antiúlceras gástricas e mutagênicidade, uma vez que o Ex-MeOH bruto apresentou promissora atividade nesses dois ensaios (Pág. 110).

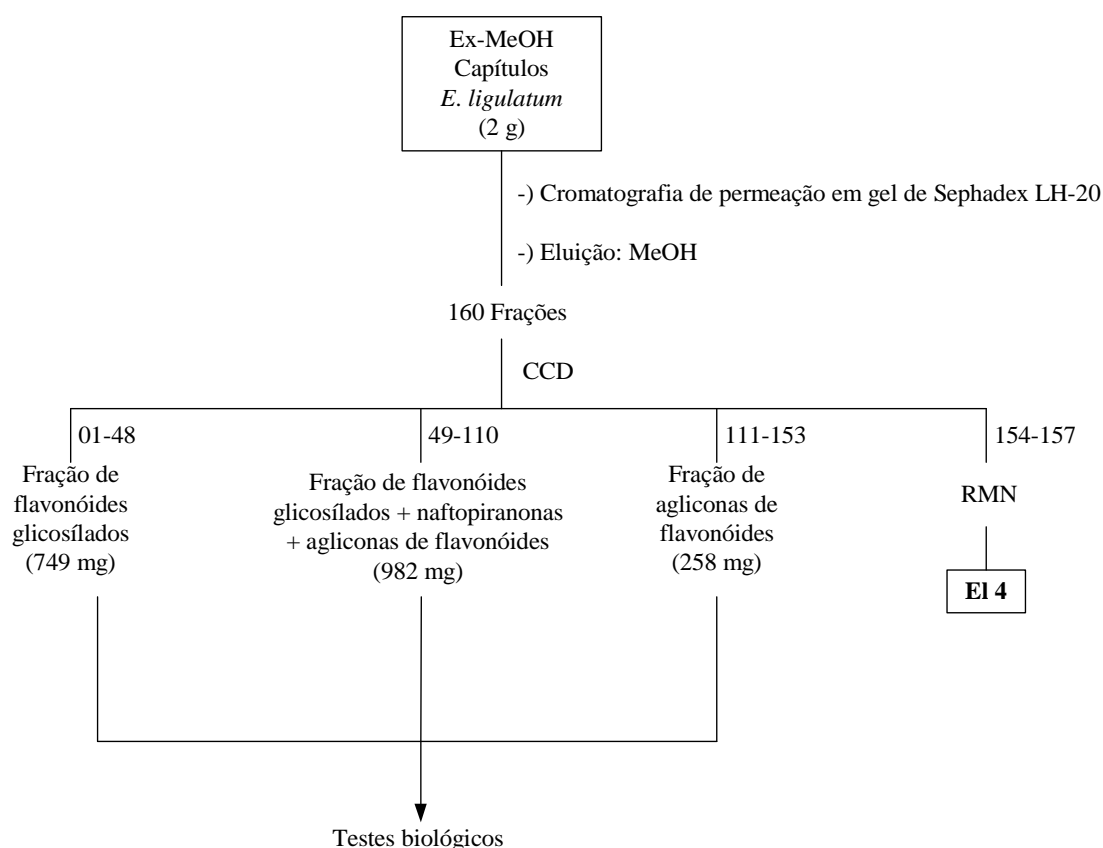


Figura 3.12. Fracionamento do Ex-MeOH dos capítulos de *E. ligulatum*.

Análise do extrato diclorometânico (Ex-DCM)

O Ex-DCM foi inicialmente submetido a análises por CCD em placas de sílica gel eluidas com misturas de hexano e acetato de etila (98:02, 95:05 e 80:20 v/v).

A revelação das cromatoplasas sob luz UV (254 e 366 nm) evidenciou manchas fluorescentes espalhadas ao longo das placas. Quando as mesmas foram reveladas com anisaldeído/H₂SO₄ verificaram-se manchas de cores vermelhas e amareladas.

Em seguida, fracionou-se o Ex-DCM por meio de cromatografia em coluna aberta (12,5 cm de altura da sílica x 3,0 cm de diâmetro interno) contendo 60 g de sílica gel 60 (0,063-0,200 mm, Merck). O empacotamento foi realizado através do preparo de uma suspensão da sílica em hexano. Agitou-se a suspensão para eliminar possíveis bolhas de ar e transferiu-se para a coluna.

Aproximadamente 3 g do Ex-DCM foram pesados e misturados com 1 g da sílica seca empregada na coluna. Em seguida, a mistura foi homogeneizada e vertida no topo da coluna. Os solventes utilizados na eluição cromatográfica constituíram em misturas de hexano:acetato de etila:metanol em gradiente crescente de polaridade (Fig. 3.13).

Foram obtidas 96 frações de aproximadamente 15 mL cada. Após evaporação do solvente, todas as frações foram analisadas por CCD, tendo como fase móvel os sistemas Ss 3 e Ss 4 e como reveladores luz UV (254 e 366 nm) e anisaldeído/H₂SO₄. As frações que apresentaram manchas

com Rf's e colorações semelhantes foram reunidas. As frações 35-42 (8 mg) e 51-55 (20 mg), que apresentaram uma única mancha, foram submetidas a RMN. Dessa foi possível identificar por RMN as substâncias **EI 4** e **EI 5**.

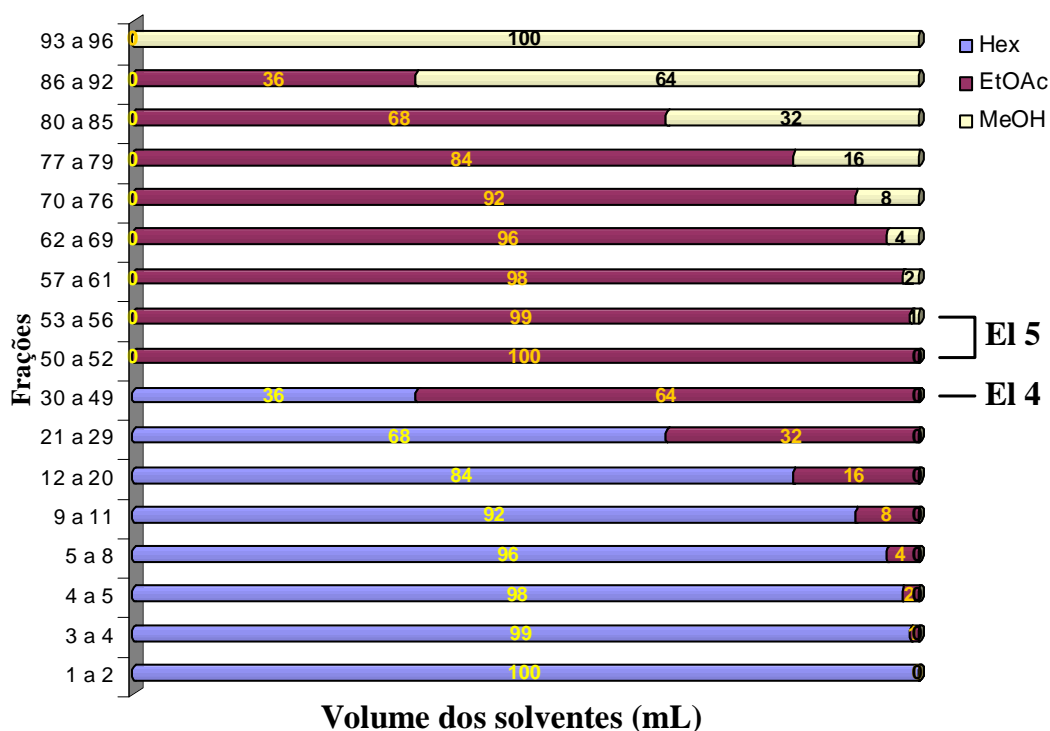


Figura 3.13. Gradiente de polaridade crescente usado no fracionamento do Ex-DCM.

Estudo químico das frações obtidas de *S. suberosus*

O Ex-MeOH foi submetido a um processo de partição líquido-líquido com solventes de polaridade crescente, seguindo a metodologia apresentada na figura 3.6. As três frações foram cromatografadas em placa de sílica gel utilizando o sistema Ss1 como eluente e reveladas com luz UV (254 e 366 nm), anisaldeído/ H₂SO₄ e NP/PEG.

A fração acetato de etila apresentou perfil cromatográfico com grande quantidade de agliconas de flavonóides. A fração butanólica evidenciou maior quantidade de glicosídeos flavonoídicos. Açúcares em abundância foram detectados na fração aquosa.

Foi estabelecido trabalhar com a fração acetato de etila, devido a sua menor complexidade química quando comparada com a fração butanólica.

Purificação da fração acetato de etila (Fr-EtOAc) por HSCCC com eluição isocrática (Fig. 3.14)

O processo de escolha do sistema de solventes para esta análise foi semelhante ao descrito em *E. ligulatum* (Pág. 42).

O melhor sistema encontrado para a separação das substâncias presentes na Fr-EtOAc foi hexano:acetato de etila:etanol:água (04:10:04:10 v/v). A fase inferior foi empregada como fase estacionária e a fase superior como fase móvel. O sentido do bombeamento das fases foi cauda → cabeça da coluna com vazão de 1 mL min⁻¹ e rotação de 850 rpm. O volume de fase estacionária eluída foi de 37 mL, restando 88 % retido. 450 mg da amostra foram dissolvidos em 16 mL da mistura 1:1 das fases superior e inferior. A mistura resultante foi filtrada em algodão e injetada no *loop* do equipamento. A separação ocorreu com uma vazão de 1 mL min⁻¹ e rotação de 850 rpm.

As 94 frações (3 mL cada) foram analisadas por CCD em placas de sílica usando o sistema Ss 1 como eluente e reveladas com solução de anisaldeído/H₂SO₄. As frações 32-45 (10 mg) e as frações 52-61 (14 mg) apresentaram manchas com coloração amarelada e Rf's muito próximos aos dos padrões de apigenina e quercetina. As substâncias **Ss 1** e **Ss 2** foram identificadas por RMN.

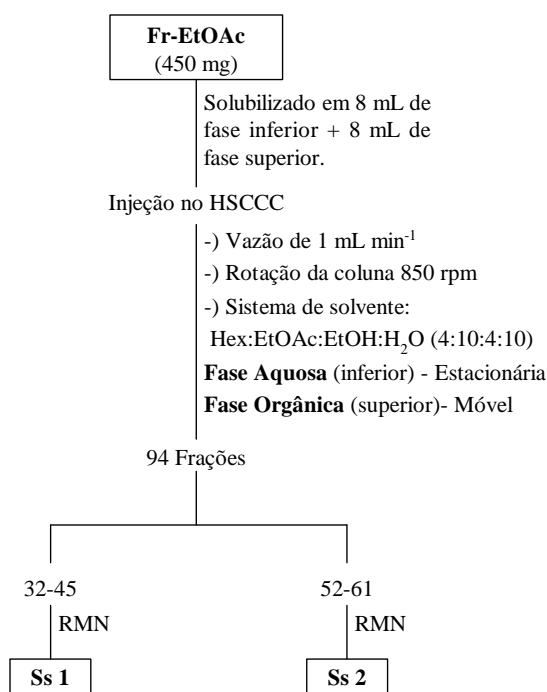


Figura 3.14. Separação da Fr-EtOAc de *S. suberosus* usando HSCCC.

Purificação da fração butanólica (Fr-BuOH) por HSCCC em fase normal com eluição em modo gradiente (Fig. 3.16)

Uma vez que as substâncias presentes na fração mostraram vasta margem de polaridade, optou-se por um gradiente crescente de polaridade da fase móvel. O K_D ótimo para as substâncias foi obtido com as seguintes proporções dos solventes, acetato de etila:*n*-butanol:água (5-X:X:5 v/v), onde X variou 1,0; 1,5 e 1,8 (Fig. 3.15).

O sentido do bombeamento das fases foi da cauda → cabeça da coluna com vazão de 1 mL min⁻¹ e rotação de 850 rpm. O volume de fase estacionária eluída da coluna foi de 43 mL, restando

86 % retida. 436 mg da Fr-BuOH foram solubilizados em 16 mL de uma mistura de 1:1 das fases inferior e superior do sistema de solvente menos polar, acetato de etila:*n*-butanol:água (4:1:5 v/v). A mistura foi filtrada em algodão e injetada no *loop* do aparelho, com auxílio de uma seringa. A fase móvel foi bombeada a uma vazão de 1 mL min⁻¹ e coluna em 850 rpm durante a análise. 106 frações de 3 mL foram coletadas.

Todas as frações foram analisadas por CCD em placas de sílica usando os sistemas Ss 1 e Ss 2 como eluente e reveladas com solução de anisaldeído/H₂SO₄. As frações 34-39 (12 mg), 47-51 (16 mg) e 89-97 (10 mg) apresentaram coloração amarelada, característica de flavonóides (Wagner *et al*, 1984) e foram denominadas de Ss 3, Ss 4 e Ss 5 e identificadas por RMN.

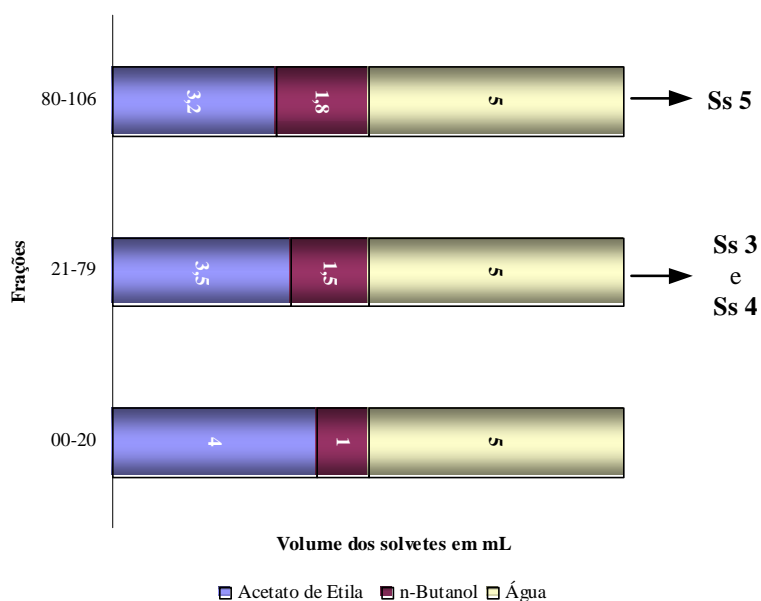


Figura 3.15. Variação do *n*-butanol e do acetato de etila durante a eluição da Fr-BuOH do Ex-MeOH de *S. suberosus* em modo gradiente utilizando HSCCC.

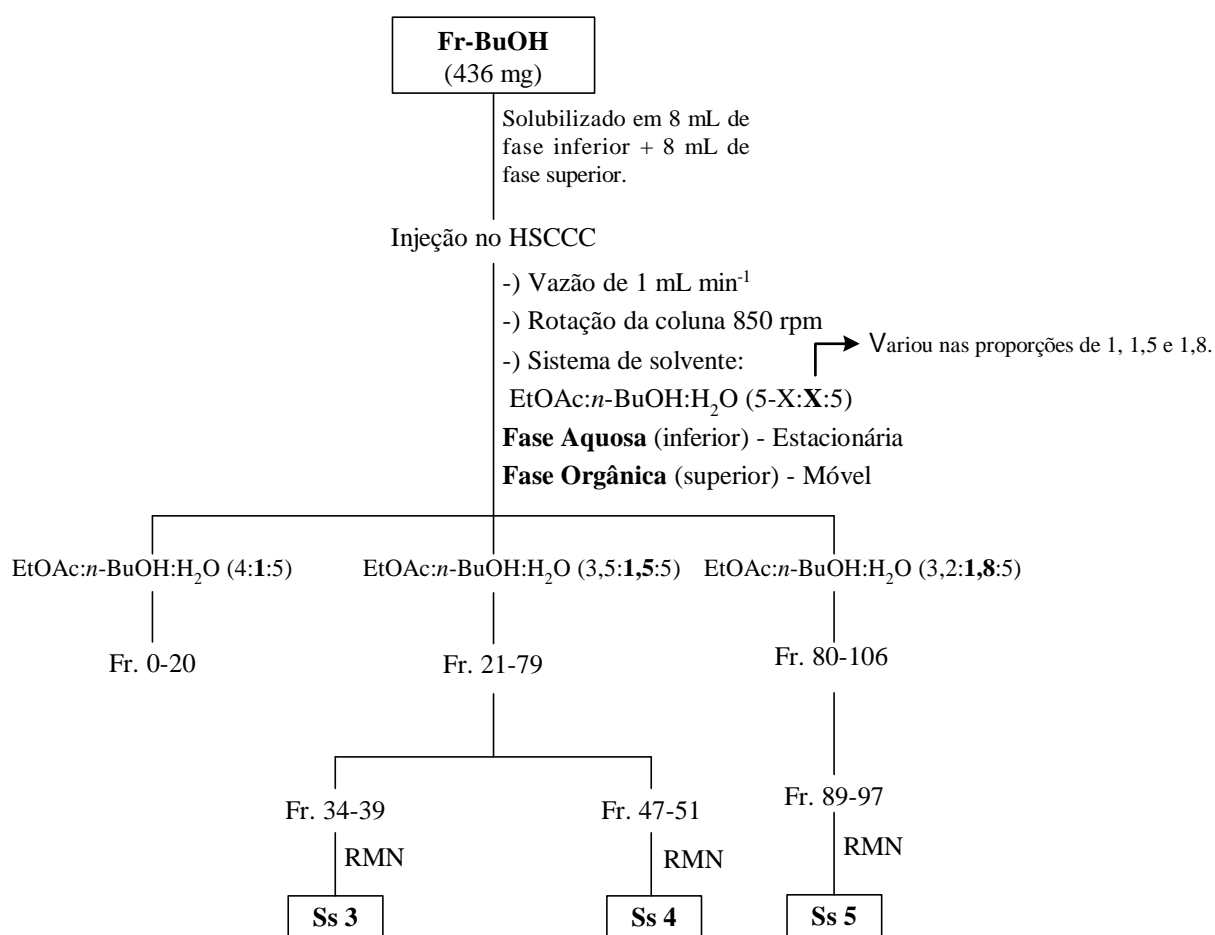


Figura 3.16. Separação da Fr-BuOH de *S. suberosus* usando HSCCC com eluição em gradiente.

A fim de verificar a possível similaridade entre a composição química de *S. suberosus* e *S. dealbatus*, avaliamos seus perfis cromatográficos usando HPLC-UV-PDA.

Perfis dos extratos metanólicos dos capítulos de *Syngonathus* spp

As amostras foram preparadas utilizando 20 mg do extrato MeOH dos capítulos das espécies seguindo a metodologia descrita na pág 148 no item material e métodos. O *clean up* foi realizado em um cartucho de SPE com fase reversa C₁₈. O objetivo do *clean-up* foi o de reter os possíveis interferentes lipofílicos presentes na matriz (Lanças, 2004). A fração coletada foi seca em N₂.

Após vários testes, otimizamos a eluição usando como fase móvel ACN e H₂O, ambas acidificadas com TFA 0,05% (Tab. 3.3).

Tabela 3.3. Gradiente de eluição empregado na separação por HPLC dos metabólitos encontrados no Ex-MeOH de *S. suberosus* e *S. dealbatus*.

Tempo (min)	Água + TFA 0,05% (%)	Acetonitrila + TFA 0,05% (%)
0	65	35
20	65	35
25	45	55
45	45	55
50	0	100

O volume injetado em cada análise foi de 20 μL , vazão de 1 mL min^{-1} , coluna RP₁₈ Phenomenex 250 x 4,6 mm ID, 5 μm . Os picos foram monitorados com detecção UV em 254 nm. O resultado está na figura 3.17.

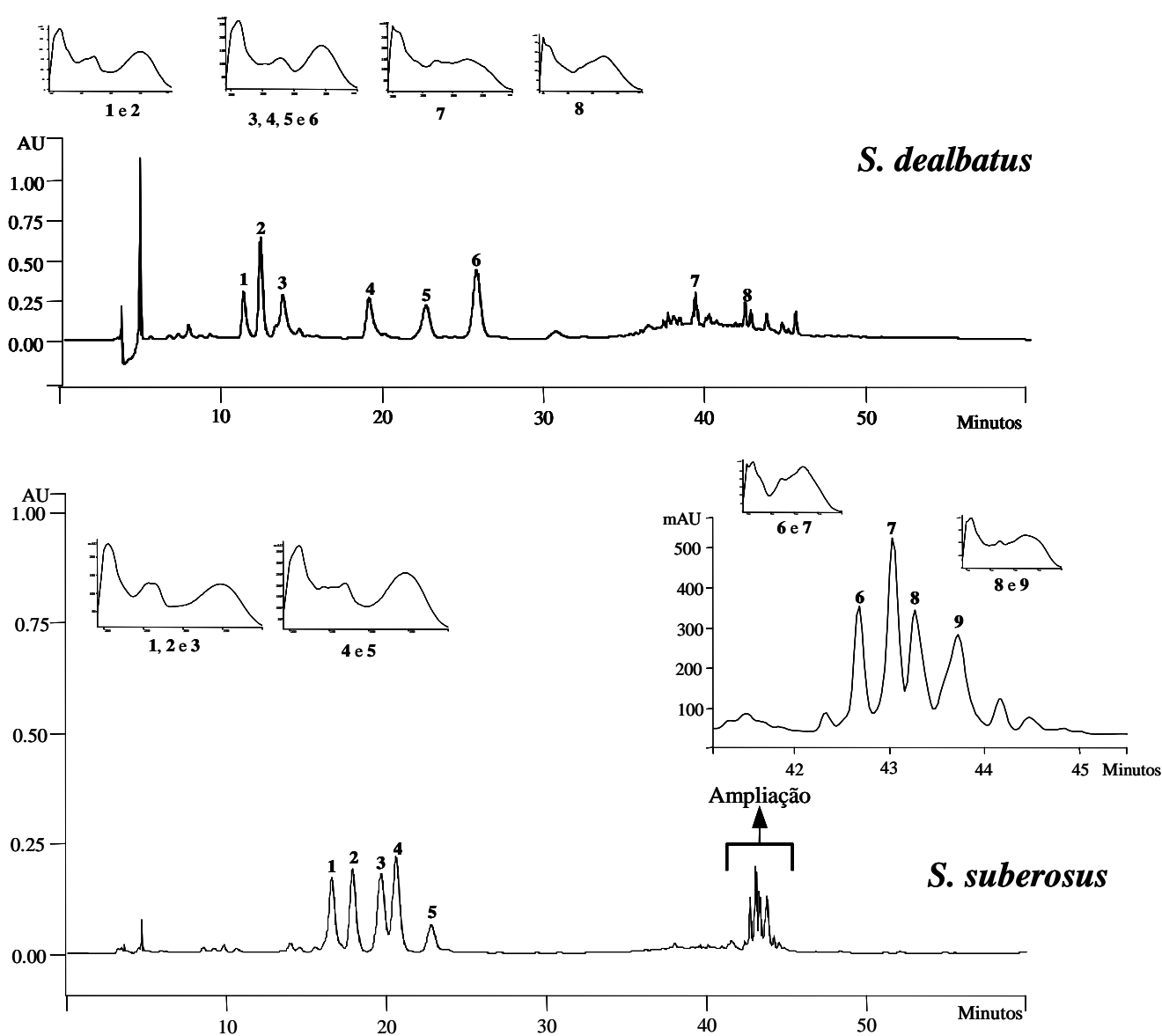


Figura 3.17. Cromatograma dos extratos metanólicos dos capítulos das espécies de *Syngonanthus*. Condições cromatográficas: Coluna RP₁₈ Phenomenex (250 x 4,6 mm d.i.; 5 μm); Gradiente ver tabela 3.3; Volume injetado 20 μL ; Vazão 1 mL min^{-1} .

Como pode-se verificar, existem grandes diferenças entre os perfis cromatográficos das duas espécies: *S. dealbatus* possui metabólitos mais polares (1-3), que eluem com tempo de retenção entre 12-15 min, enquanto que *S. suberosus* apresenta a maior parte dos picos com tempo de retenção entre 17-23 min. Tendo em vista a diferença no perfil cromatográfico das duas espécies (Fig. 3.17), o Ex-MeOH dos capítulos de *S. dealbatus* foi submetido a partição líquido-líquido com solventes de polaridade crescente (Fig. 3.8. Pág. 46). As duas frações foram cromatografadas em placa de sílica gel utilizando como eluente Ss 1 e revelação com luz UV (254 e 366 nm), anisaldeído/ H₂SO₄ e NP/PEG.

A fração acetato de etila apresentou perfil cromatográfico por CCD muito semelhante à fração acetato de etila já estudada de *S. suberosus*, com agliconas de flavonas, principalmente derivados de apigenina e luteolina. Devido a semelhança das frações acetato de etila, optou-se pelo estudo da fração butanólica de *S. dealbatus* sendo esta diferente da fração butanólica da outra espécie.

Purificação da fração butanólica (Fr-BuOH) de *S. dealbatus* por HSCCC (Fig. 3.19)

O sistema de solventes ótimo para a separação consistiu em misturas de hexano:acetato de etila:água (1:4:5 v/v sistema A) e (0:5:5 v/v/ sistema B). A fase inferior foi usada como fase estacionária e a superior como fase móvel.

O sentido do bombeamento das fases foi da cauda → cabeça da coluna com vazão de 1 mL min⁻¹ e rotação de 850 rpm. O volume de fase estacionária eluída da coluna foi de 54 mL, restando 83 % de fase estacionária retida. 850 mg da Fr-BuOH foram solubilizados em 16 mL de uma mistura de 1:1 de fase aquosa e fase orgânica do sistema menos polar hexano:acetato de etila:água (1:4:5 v/v/v). A mistura foi filtrada em algodão e injetada no *loop*, com auxílio de uma seringa. A vazão foi de 1 mL min⁻¹ e rotação de 850 rpm. Coletaram-se 140 frações de 5 mL cada.

Todas as frações foram analisadas por CCD em placas de sílica usando os sistemas Ss 1 e Ss 2 como eluente e reveladas com uma solução de anisaldeído/H₂SO₄. A separação não resultou em substâncias puras. As frações 72-102 (590 mg) foram reunidas e novamente fracionadas por HSCCC com eluição em modo gradiente.

O K_D ótimo para esta nova separação foi estabelecido com a mistura de acetato de etila:*n*-butanol:água (5-X:X:5 v/v), onde X variou 0,9; 1,4 e 1,9 (Fig. 3.18). O preparo do aparelho para a aplicação da amostra seguiu a mesma metodologia descrita anteriormente. O equilíbrio hidrodinâmico foi atingido quando 59 mL de fase estacionária (fase inferior) foi eluída da coluna, restando 81 % da fase estacionária retida. Foram coletadas 103 frações de 3 mL cada. Todas as frações foram analisadas por CCD em placas de sílica usando os sistemas Ss 1 e Ss 2 e reveladas com solução de anisaldeído/H₂SO₄. As frações 21-26 (8 mg), 46-58 (11 mg) e 79-86 (10 mg)

apresentaram coloração amarelada, característica de flavonóides, quando reveladas com uma solução de anisaldeído/H₂SO₄ (Wagner *et al*, 1984). Essas frações foram denominadas de **Sb 1**, **Sb 2** e **Sb 3**. As substâncias foram identificadas por RMN.

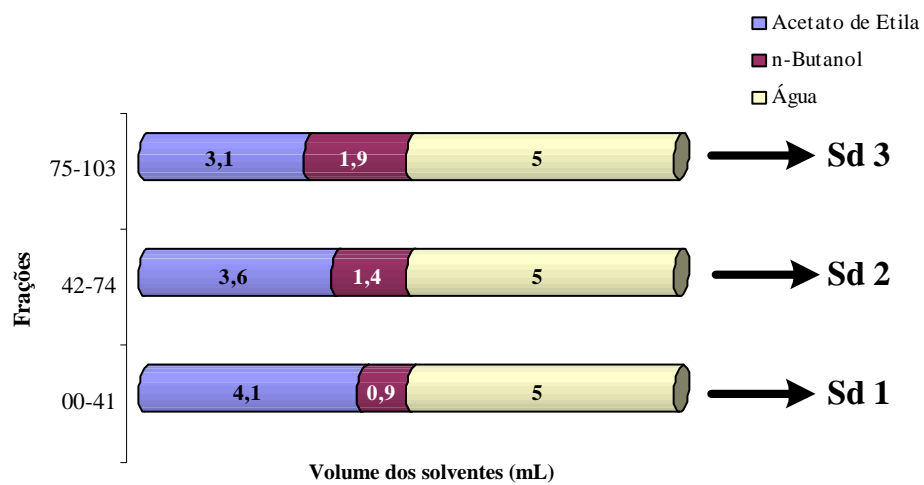


Figura 3.18. Variação do *n*-butanol e do acetato de etila durante a eluição em modo gradiente.

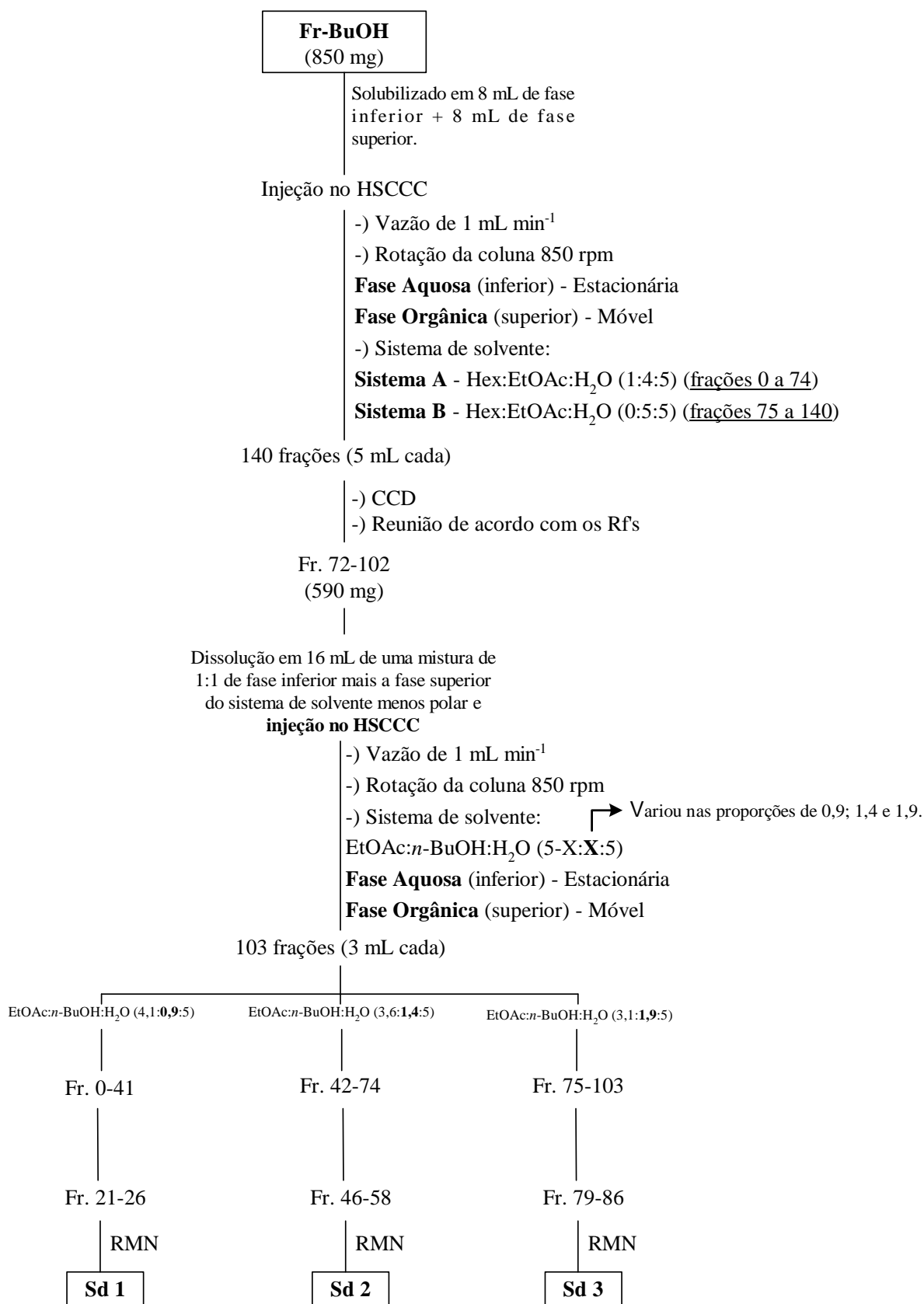


Figura 3.19. Esquema do fracionamento da Fr-BuOH de *S. dealbatus* por HSCCC.

4. Elucidação Estrutural

e

Identificação

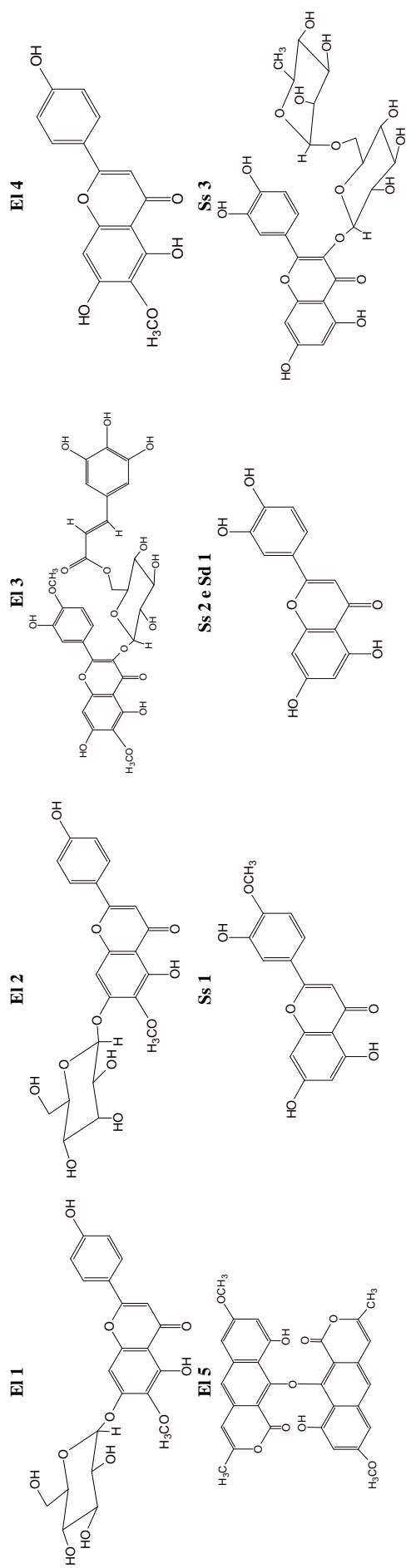


Tabela 4.1. Substâncias isoladas.

Subs.	Nome da molécula
EI 1	6-metoxiapigenina-7-O-β-D-glicopiranosídeo
EI 2	6-metoxiapigenina-7-O-β-D-alopiranosídeo
EI 3	4',6-dimetoxikaempferol-3-O-β-D-6''[(E)-3,4,5-triidroxicinamato]glicopiranosídeo
EI 4	6-metoxiapigenina
EI 5	Eriocaulina
Ss 1	4'-metoxiluteolina
Ss 2	Luteolina
Ss 3	Quercetina-3-O-β-D-glicopiranosídeo (1'''→6'') rhamnopiranosídeo
Ss 4	6-metoxikaempferol-3-O-β-D-galactopiranosídeo (1'''→2'') rhamnopiranosídeo
Ss 5	7-metoxiapigenina-6-C-β-D-glicopiranosídeo
Sd 1	Luteolina
Sd 2	7-metoxiluteolina-6-C-β-D-galactopiranosídeo
Sd 3	Luteolina-6-C-β-D-galactopiranosídeo

Figura 4.1. Moléculas isoladas das espécies de Eriocaulaceae estudadas neste trabalho.

Identificação das substâncias isoladas das espécies de Eriocaulaceae

As tabelas 4.2 a 4.4 apresentam os deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C das substâncias já conhecidas, isoladas das espécies de Eriocaulaceae estudadas neste trabalho.

Tabela 4.2. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C dos flavonóides isolados de *E. ligulatum*.

Posição	^1H	El 1	^{13}C	^1H	El 2	^{13}C	^1H	El 4	^{13}C
2			164,3			164,3			163,7
3	6,82 (s)		102,5	6,81 (s)		102,4	6,76 (s)		102,3
4			182,2			182,2			182,0
5			152,0			152,1			152,3
6			132,5			132,5			131,3
7			156,4			156,7			152,7
8	6,99 (s)		94,3	6,95 (s)		94,1	6,59 (s)		94,1
9			152,4			152,3			157,1
10			105,6			105,6			104,0
1'			120,9			120,7			121,1
2'	7,91 (d) [9,0]		128,5	7,93 (d) [9,0]		128,5	7,91 (d) [9,0]		128,4
3'	6,91 (d) [9,0]		115,9	6,89 (d) [9,0]		116,0	6,91 (d) [9,0]		115,9
4'			161,4			161,6			161,1
5'	6,91 (d) [9,0]		115,9	6,89 (d) [9,0]		116,0	6,91 (d) [9,0]		115,9
6'	7,91 (d) [9,0]		128,5	7,93 (d) [9,0]		128,5	7,91 (d) [9,0]		128,4
Açúcar		Glicose			Alose				
1''	5,08 (d) [7,5]		100,2	5,27 (d) [7,5]		98,7	--		--
2''	3,33 (dd) [9,0; 7,5]		73,1	3,51 (dd) [7,5; 3,0]		70,2	--		--
3''	3,31 (dd) [9,0; 9,0]		76,7	3,94 (dd) [4,5; 3,0]		71,5	--		--
4''	3,19 (dd) [9,0; 9,0]		69,5	3,44 (dd) [9,0; 4,5]		66,9	--		--
5''	3,44 (m)		77,2	3,79 (m)		74,9	--		--
6''	3,46 _a (dd) [10,0; 8,0] 3,54 _b (dd) [10,0; 8,0]		60,6	3,46 _a (dd) [10; 4,0] 3,69 _b (dd) [10; 4,0]		60,8	--		--
6-OCH ₃	3,75 (s)		60,2	3,75 (s)		60,2	3,74 (s)		59,8

Deslocamentos químicos foram comparados com a literatura: Agrawal, 1989 (DMSO-*d*₆, 7,04 T, TMS) e Santos *et al.*, 2005 (DMSO-*d*₆, 11,7 T, TMS). ()

Multiplicidade; [] Constantes de acoplamento em Hz; Espectros obtidos em DMSO-*d*₆, 11,7 T.

Tabela 4.3. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C dos flavonóides isolados de *S.suberosus*.

Posição	^1H	Ss 1	^{13}C	^1H	Ss 2	^{13}C	^1H	Ss 3	^{13}C	^1H	Ss 4	^{13}C	^1H	Ss 5	^{13}C
2		164,7	163,8			157,1			156,1						163,7
3	6,65 (s)	102,8	102,8	6,65 (s)		133,9			132,3				6,82 (s)		103,1
4		181,7	181,5			178,0			177,5						181,8
5		161,3	161,4			161,8			152,3						160,2
6	6,19 (d) [2,0]	98,7	98,8	6,19 (d) [2,5]		99,4	6,18 (d) [2,0]		131,2						109,7
7		164,7	164,1			164,9			151,4						164,9
8	6,44 (d) [2,0]	94,5	93,7	6,44 (d) [2,5]		94,3	6,37 (d) [2,0]		93,8	6,52 (s)			6,81 (s)		90,1
9		157,0	157,2			157,2			157,1						156,7
10		103,9	103,6			104,5			104,2						104,5
1'		119,9	121,4			121,8			120,8						120,9
2'	7,39 (d) [2,0]	113,3	113,3	7,39 (d) [2,0]		116,9	7,52 (d) [2,5]		130,6	7,99 (d) [8,5]			7,94 (d) [8,5]		128,5
3'		145,9	145,7			145,7			115,0	6,85 (d) [8,5]			6,92 (d) [8,5]		115,9
4'		149,7	149,6			149,6			159,8						161,3
5'	6,88 (d) [8,0]	115,9	115,9	6,88 (d) [8,5]		115,9	6,83 (d) [8,5]		115,0	6,85 (d) [8,5]			6,92 (d) [8,5]		115,9
6'	7,41 (dd) [8,0; 2,0]	118,8	118,9	7,40 (dd) [8,5; 2,0]		118,9	7,53 (dd) [8,5; 2,5]		130,6	7,99 (d) [8,5]			7,94 (d) [8,5]		128,5
Açúcar															
1''		--	--			--		Glucose			Galactose			Glucose	
2''		--	--			--	5,32 (d) [7,5]		101,9	5,62 (d) [8,0]			4,56 (d) [10,0]		72,8
3''		--	--			--	3,50 (dd) [9,0; 7,5]		74,7	3,04 (dd) [8,0; 7,0]			3,10 (dd) [10,0; 7,0]		70,8
4''		--	--			--	3,46 (dd) [9,0; 9,0]		77,1	3,06 (dd) [8,0; 8,0]			3,19 (dd) [8,0; 7,0]		79,1
5''		--	--			--	3,28 (dd) [9,0; 9,0]		70,7	3,70 (dd) [8,0; 8,0]			3,98 (dd) [8,0; 7,0]		70,3
6''		--	--			--	3,35 (m)		76,6	3,40 (m)			3,14*		81,6
		--	--			--	3,42 _a (dd) [11,0; 5,0]		67,6	3,25*			3,34 ^{8*}		
		--	--			--	3,85 _b (dd) [11,0; 5,0]						3,68 ^{9*}		617
Açúcar															
1'''		--	--			--		Rhamnose			Rhamnose			--	
2'''		--	--			--	4,38 (d) [1,5]		101,4	5,06 (d) [1,0]				--	
3'''		--	--			--	3,65 (dd) [2,5; 1,5]		71,0	3,42 (dd) [2,0; 1,0]				--	
4'''		--	--			--	3,56 (dd) [8,0; 2,5]		71,2	3,71 (dd) [2,0; 1,0]				--	
5'''		--	--			--	3,31 (m)		72,5	3,07 (m)				--	
6'''		--	--			--	3,44 (m)		68,9	3,10 (m)				--	
4'-OCH ₃	3,89 (s)	55,9				--	0,98 (d) [6,0]		18,3	0,74 (d) [6,0]				--	
6-OCH ₃		--	--			--	--		--	--				--	
7-OCH ₃		--	--			--	--		--	3,73 (s)				--	56,2

* Sinais sobrepostos. Deslocamentos químicos foram comparados com a literatura: Agrawal, 1989 (DMSO-*d*₆, 7,04 T, TMS) e Coelho, 2000 (DMSO-*d*₆, 4,69 T, TMS). () Multiplicidade; [] Constantes de acoplamento em Hz; Espectros obtidos em DMSO-*d*₆, 11,7 T.

Tabela 4.4. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C dos flavonóides isolados de *S. dealbatus*.

Posição	Sd 1		Sd 2		Sd 3	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
2		163,4		164,6		163,9
3	6,58 (s)	102,6	6,65 (s)	101,8	6,65 (s)	102,6
4		182,5		182,1		181,7
5		162,1		155,2		161,8
6	6,25 (d) [2,0]	98,4		105,7		109,8
7		163,9		163,6		163,1
8	6,41 (d) [2,0]	94,2	6,49 (s)	94,8	6,48 (s)	93,5
9		156,9		161,0		156,2
10		103,8		105,1		104,5
1'		121,6		118,7		121,7
2'	7,38 (d) [2,0]	114,3	7,45 (d) [2,0]	113,2	7,39 (d) [2,0]	113,0
3'		145,3		146,0		146,1
4'		148,4		161,7		161,8
5'	6,85 (d) [8,0]	115,8	6,81 (d) [8,0]	115,2	6,88 (d) [2,0]	115,7
6'	7,43 (dd) [8,0; 2,0]	118,6	7,52 (dd) [8,0; 2,0]	119,4	7,40 (dd) [8,0; 2,0]	118,8
Açúcar						
1''	--	--	4,68 (d) [10,0]	72,7	4,58 (d) [10]	72,6
2''	--	--	3,12 (dd) [10,0; 6,0]	78,5	3,09 (dd) [10,0; 6,0]	77,3
3''	--	--	3,16*	72,5	3,10 (dd) [8,0; 6,0]	71,9
4''	--	--	3,62*	69,7	3,53 (dd) [8,0; 6,0]	68,6
5''	--	--	3,46*	80,2	3,46 (m)	81,5
6''	--	--	3,34*	60,5	3,34 (m)	60,1
7-OCH ₃	--	--	3,87	56,0	--	--

* Sinais sobrepostos. Deslocamentos químicos foram comparados com a literatura:

Agrawal, 1989 (DMSO-*d*₆, 7,04 T, TMS) e Coelho, 2000 (DMSO-*d*₆, 4,69 T, TMS).

() Multiplicidade; [] Constantes de acoplamento em Hz; Espectros obtidos em DMSO-*d*₆, 11,7 T.

Determinação estrutural de substâncias isoladas das espécies de Eriocaulaceae

Determinação de EI 3

A substância **EI 3** foi obtida na forma de pó amorfo de cor amarela, que fundiu a 195,0-196,5 °C e apresentou rotação específica $[\alpha]_D = -47,0$ ($c= 0,2$, CH₃OH, 23°C).

O espectro no UV (λ_{\max} , MeOH) de **EI 3** (Fig. 4.4) forneceu bandas em 217 nm, 240 nm, 276 nm e 240 nm, característico de flavonóides (Harborne, 1986). O espectro no IV (KBr) (Fig. 4.4) apresentou absorções em 3.387 cm⁻¹ (ν_{OH}) e 1.637 cm⁻¹ ($\nu_{\text{C=O}}$).

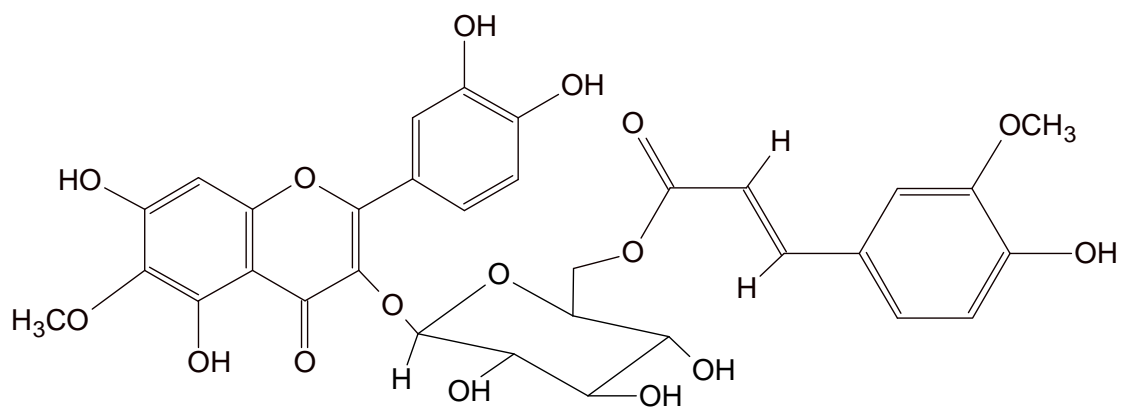
O espectro de RMN ¹H de **EI 3** (Fig. 4.5 e 4.6) apresentou um singlete em δ 12,95 relativo ao quelato formado entre o grupo OH na posição C₅ da aglicona e a carbonila em C₄. Outros dois singletos referentes a duas metoxilas podem ser observados em δ 3,70 e δ 3,88, ligadas aos C₆ e C_{4'}, respectivamente (Tab. 4.5). O singlete em δ 6,49 foi atribuído ao H₈ do anel A de um flavonol tri-substituído. Três sinais em δ 6,85 (d, $J=8$ Hz), δ 7,53 (dd, $J=8,0$ e 2,5 Hz) e δ 7,56 (d, $J=2,5$ Hz) foram respectivamente atribuídos aos hidrogênios H_{5'}, H_{6'} e H_{2'} do anel B respectivamente.

Dois sinais em δ 6,33 (d, $J=16,0$ Hz) e δ 7,49 (d, $J=16,0$ Hz) foram atribuídos respectivamente a H _{α} e H _{β} referentes de uma unidade (*E*)-3,4,5-triidroxicinamato (Santos *et al*, 2002).

O sinal em δ 5,51 (d, $J=7,5$ Hz) foi atribuído ao hidrogênio de um carbono anomérico. Experimento TOCSY-1D (Fig. 4.7) mostrou que se trata de uma unidade de β -glicopiranosídica (Tab. 4.5).

No espectro de RMN ¹³C (Fig. 4.8 e 4.9, Tab. 4.5) observou-se a presença de 32 sinais. Seis deles são atribuídos a uma unidade β -glicopiranosídica; 14 sinais são compatíveis com os do 6-metoxikaempferol e os outros 7 sinais correspondem ao grupo 3,4,5-triidroxicinamato. Os deslocamentos químicos de C₂ (δ 156,5), C₃ (δ 132,6) e C₄ (δ 177,7) demonstraram que a unidade glicopiranosídica está ligada no carbono 3 do anel C do flavonol (Andrade *et al*, 1999). Comprova esses resultados o pico de correlação entre C₃ (δ 132,6) e H_{1''} (5,51) no espectro de gHMBC (Fig. 4.13). O deslocamento químico do C_{6''} da glicose (δ 67,4) indica que esta é a posição onde está ligada a unidade 3,4,5-triidroxicinamato (Agrawal, 1989; Andrade *et al*, 1999; Santos *et al*, 2002).

No espectro de gCOSY (Fig. 4.10) observaram-se os acoplamentos entre os hidrogênios H_{2''}/H₆, H_{5''}/H_{6'} e H_{6''}/H_{5'} do anel B do flavonol e entre os hidrogênios α e β do grupamento (*E*)-3,4,5-triidroxicinamato. A atribuição completa dos sinais de ¹H e de ¹³C foi baseada também nos espectros bidimensionais gHMQC (Fig. 4.11 e 4.12, Tab. 4.5), gHMBC (Fig. 4.13 e 4.14, Tab. 4.5). Portanto, **EI 3** é a 6,4'-dimetoxiquercetina-3-*O*- β -6''[(*E*)-3,4,5-triidroxicinamato]glicopiranosídeo (Fig. 4.3). **EI 3** foi identificada usando como modelo o 6-metoxiquercetina-3-*O*-(6''-(*E*)-feruloil)- β -D-glicopiranosídeo (**33** pág. 32) (Santos *et al*, 2002) (Fig. 4.2).



6-metoxiquercetina-3-*O*-(6''-*E*-feruloil)- β -D-glicopiranosídeo (Santos *et al*, 2002)

Figura 4.2. Modelo usado na elucidação da substância **El 3**.

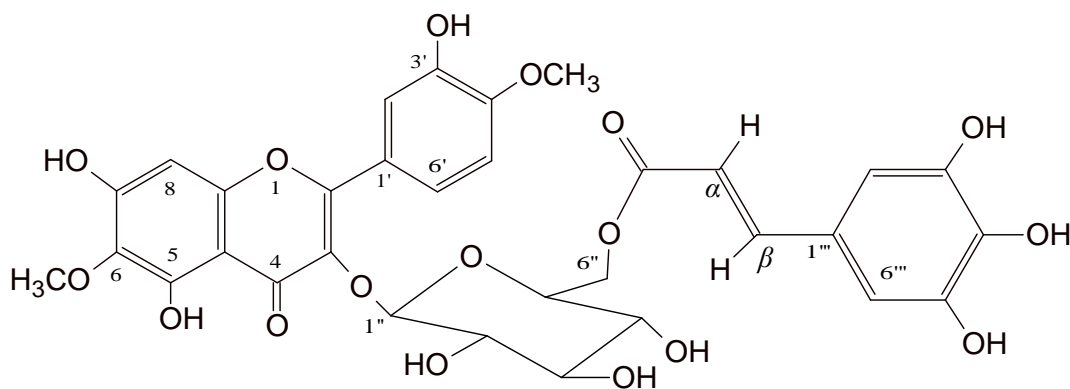


Figura 4.3. Substância **El 3**.

Tabela 4.5. Deslocamentos químicos de RMN 1D e 2D (DMSO-*d*₆, 11,7 T) de **EI 3**.

Posições	¹ H	¹³ C	gCOSY	gHMQC	gHMBC
2		156,5			
3		132,6			
4		177,7			
5		151,4			
6		131,3			
7		157,4			
8	6,49 (s)	94,1		H ₈ /C ₈	H ₈ /C ₆ ; H ₈ /C ₇ ; H ₈ /C ₁₀
9		152,2			
10		104,3			
1'		120,9			
2'	7,56 (d) [2,5]	116,0		H _{2'} /C _{2'}	H _{2'} /C _{6'}
3'		144,7			
4'		148,1			
5'	6,85 (d) [8,0]	115,2	H _{5'} /H _{6'}	H _{5'} /C _{5'}	H _{5'} /C _{1'} ; H _{5'} /C _{3'}
6'	7,53 (dd) [8,0; 2,5]	121,5	H _{6'} /H _{5'}	H _{6'} /C _{6'}	H _{6'} /C ₂ ; H _{6'} /C _{5'} ; H _{6'} /C _{2'}
Glicose					
1''	5,51 (d) [7,5]	100,5		H _{1''} /C _{1''}	H _{1''} /C ₃
2''	3,24 (dd) [9,0; 7,5]	73,7		H _{2''} /C _{2''}	
3''	2,64 (dd) [9,0; 9,0]	76,3		H _{3''} /C _{3''}	
4''	3,19 (dd) [9,0; 9,0]	69,6		H _{4''} /C _{4''}	
5''	2,78 (ddd) [9,0; 5,0; 2,5]	74,2		H _{5''} /C _{5''}	
6''	4,14 _a (dd) [12,0; 5,0] 3,70 _b (dd) [12,0; 2,5]	67,4		H _{6a''} /C _{6''} ; H _{6b''} /C _{6''}	
(E)-3,4,5-triidroxicinamato					
C=O		165,5			
α	6,33 (d) [16]	115,0	H _α /H _β	H _α /C _α	H _α /C _{1'''}
β	7,49 (d) [16]	145,1	H _β /H _α	H _β /C _β	H _β /C=O ; H _β /C _{2'''} ; H _β /C _{6'''}
1'''		124,5			
2'''	7,08 (s)	105,9		H _{2'''} /C _{2'''}	H _{2'''} /C _β ; H _{2'''} /C _{4'''} ; H _{2'''} /C _{6'''}
3'''		148,5			
4'''		138,1			
5'''		148,1			
6'''	7,08 (s)	105,9		H _{6'''} /C _{6'''}	H _{6'''} /C _β ; H _{6'''} /C _{2'''} ; H _{6'''} /C _{4'''}
6-OCH ₃	3,70 (s)	59,9		H _{6-OCH₃} /C _{6-OCH₃}	H _{6-OCH₃} /C ₆
4'-OCH ₃	3,88 (s)	56,1		H _{4'-OCH₃} /C _{4'-OCH₃}	H _{4'-OCH₃} /C _{4'}

() Multiplicidade; [] Constantes de acoplamento em Hz

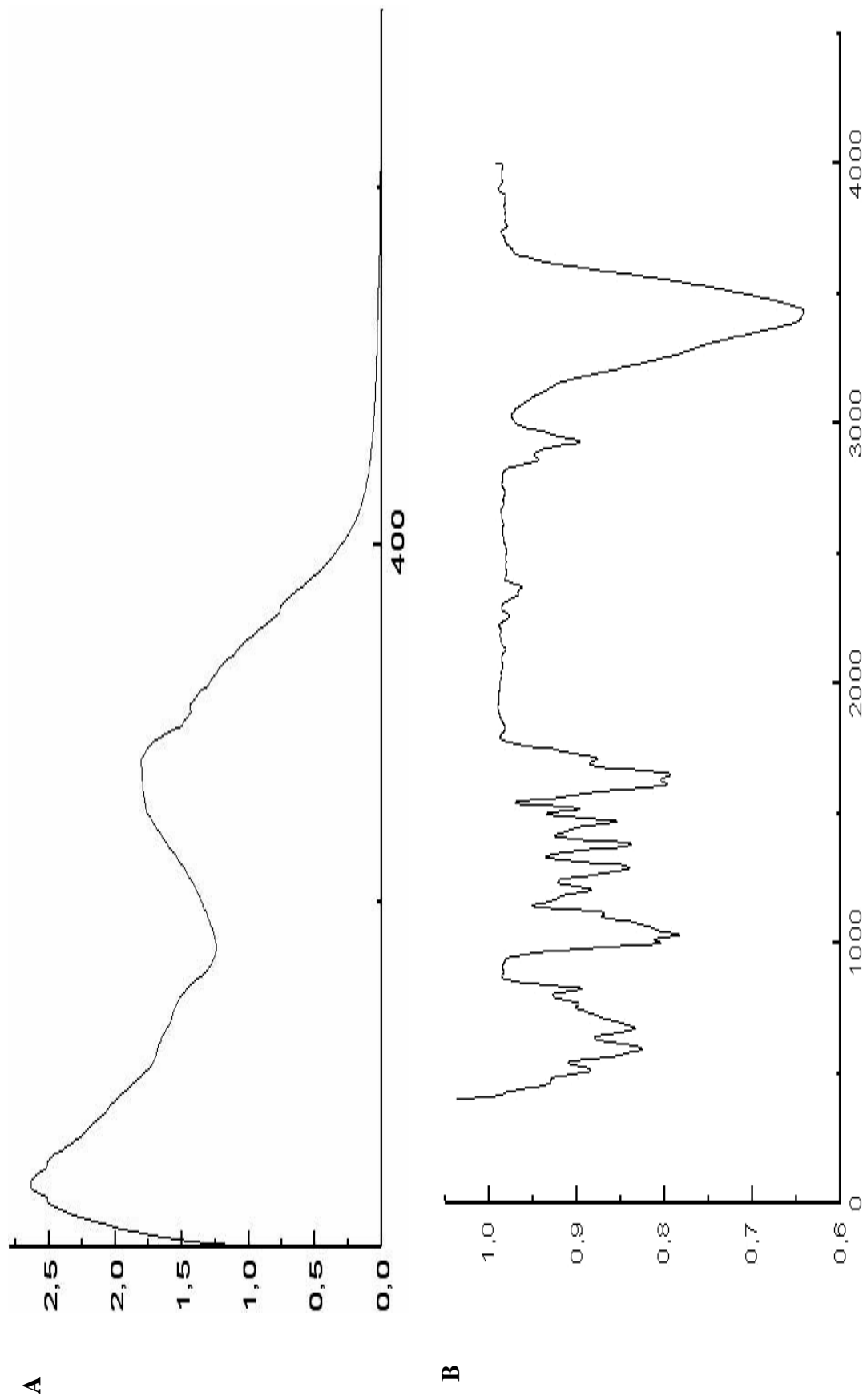


Figura 4.4. Espectro no ultravioleta em metanol (A) e infravermelho em KBr (B) da substância EI 3.

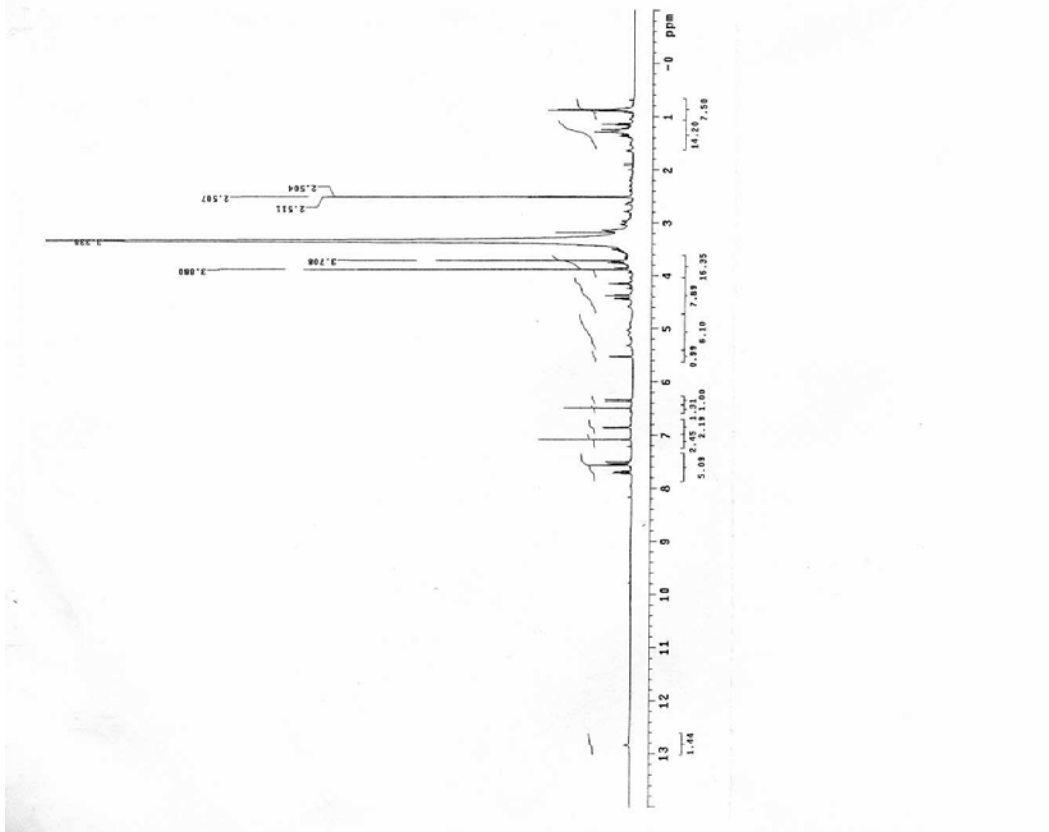
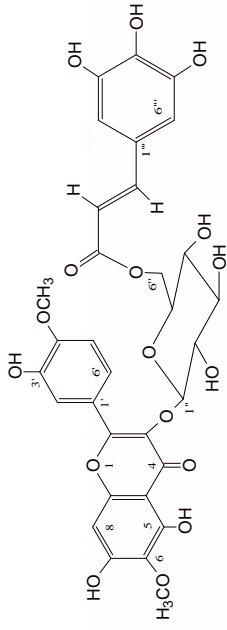


Figura 4.5. Espectros de RMN de ¹H de EI 3, (11,7 T, DMSO-d₆, TMS, δ).

Estudo químico e biológico de plantas da família Eriocaulaceae

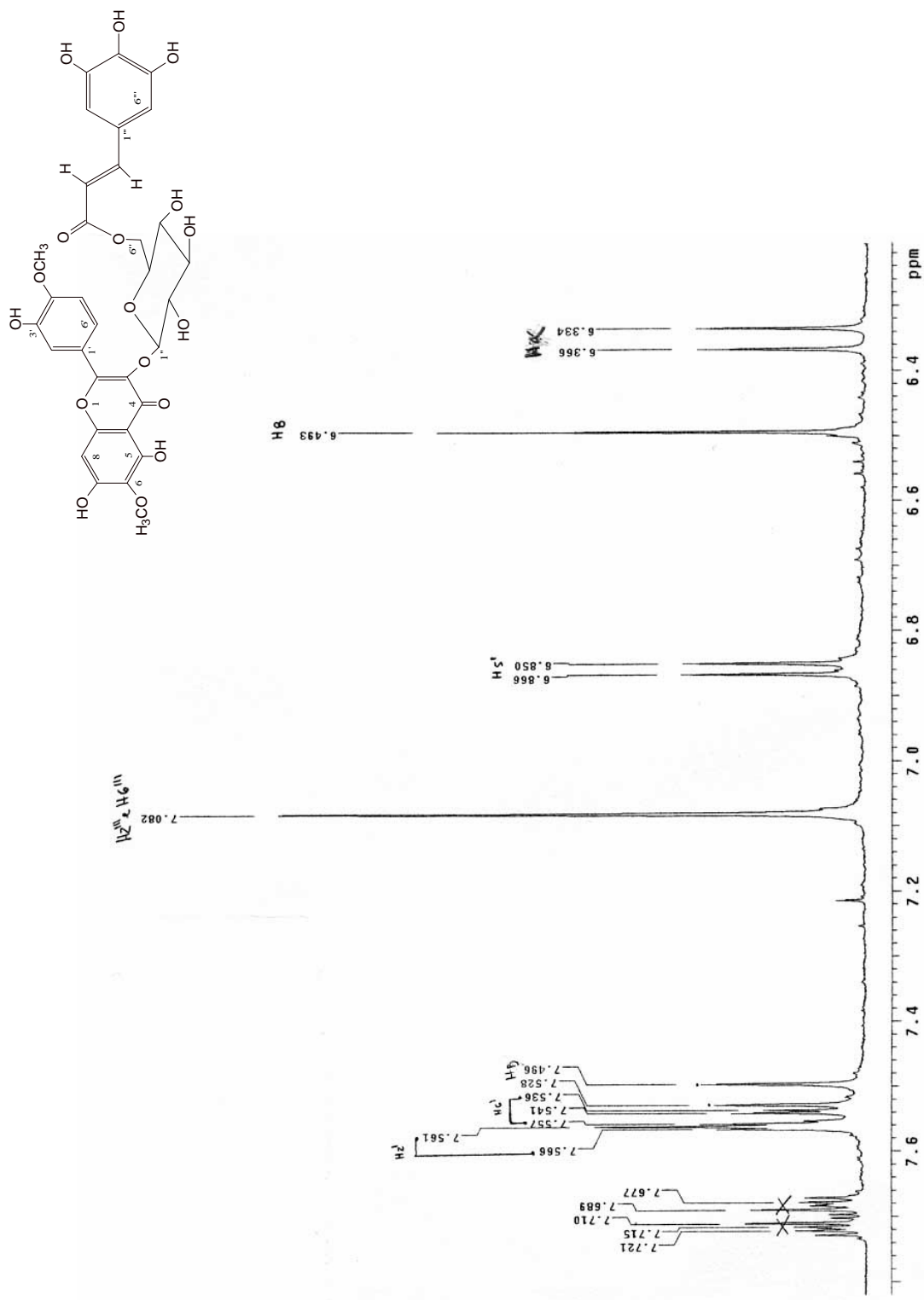


Figura 4.6. Espectros de RMN de ^1H de **El 3**, (11,7 T, DMSO-d_6 , TMS, δ).

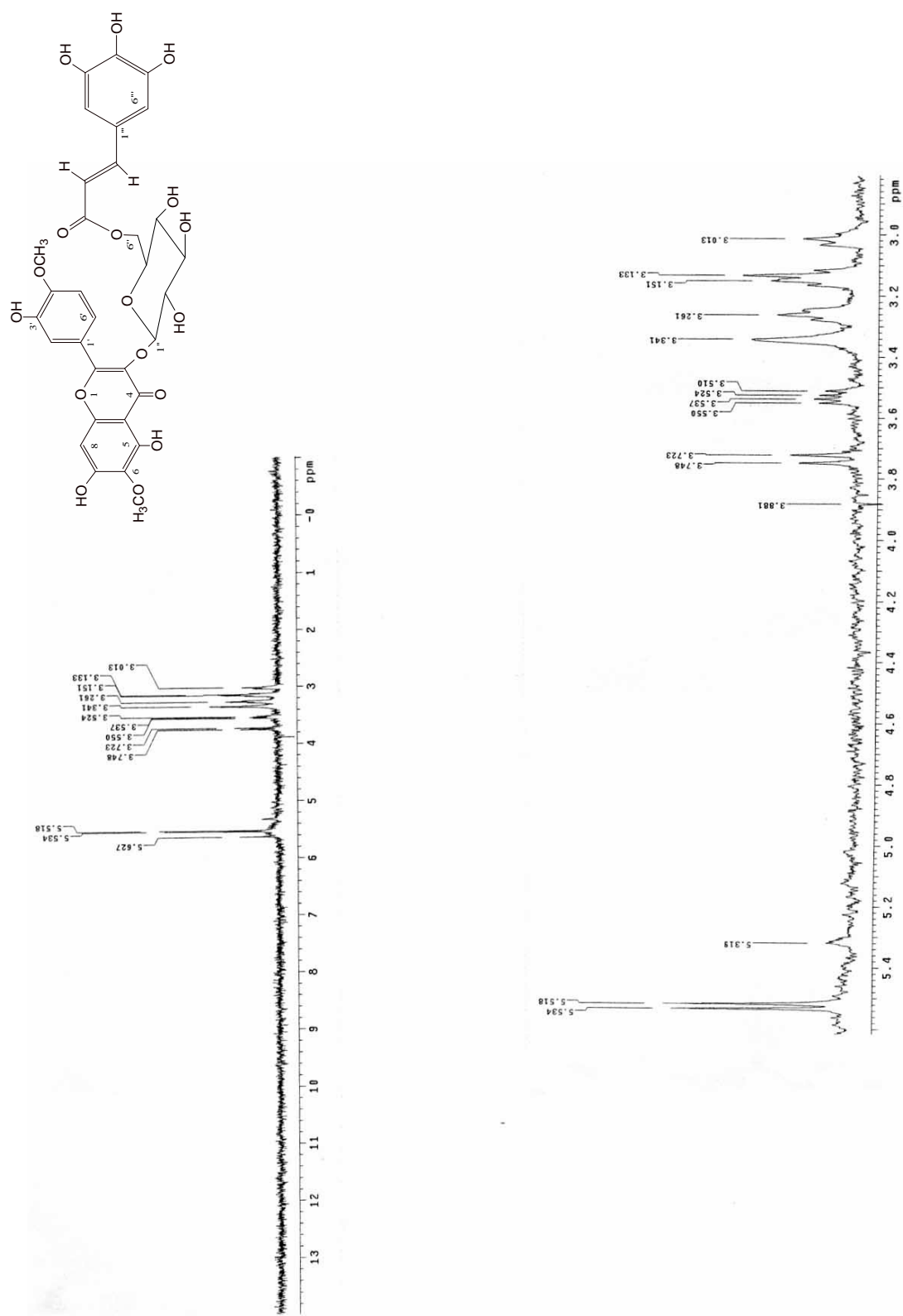


Figura 4.7. Espectros de TOCSY-1D de **El 3**, (11,7 T, DMSO-d₆, TMS, δ).

Estudo químico e biológico de plantas da família Eriocaulaceae

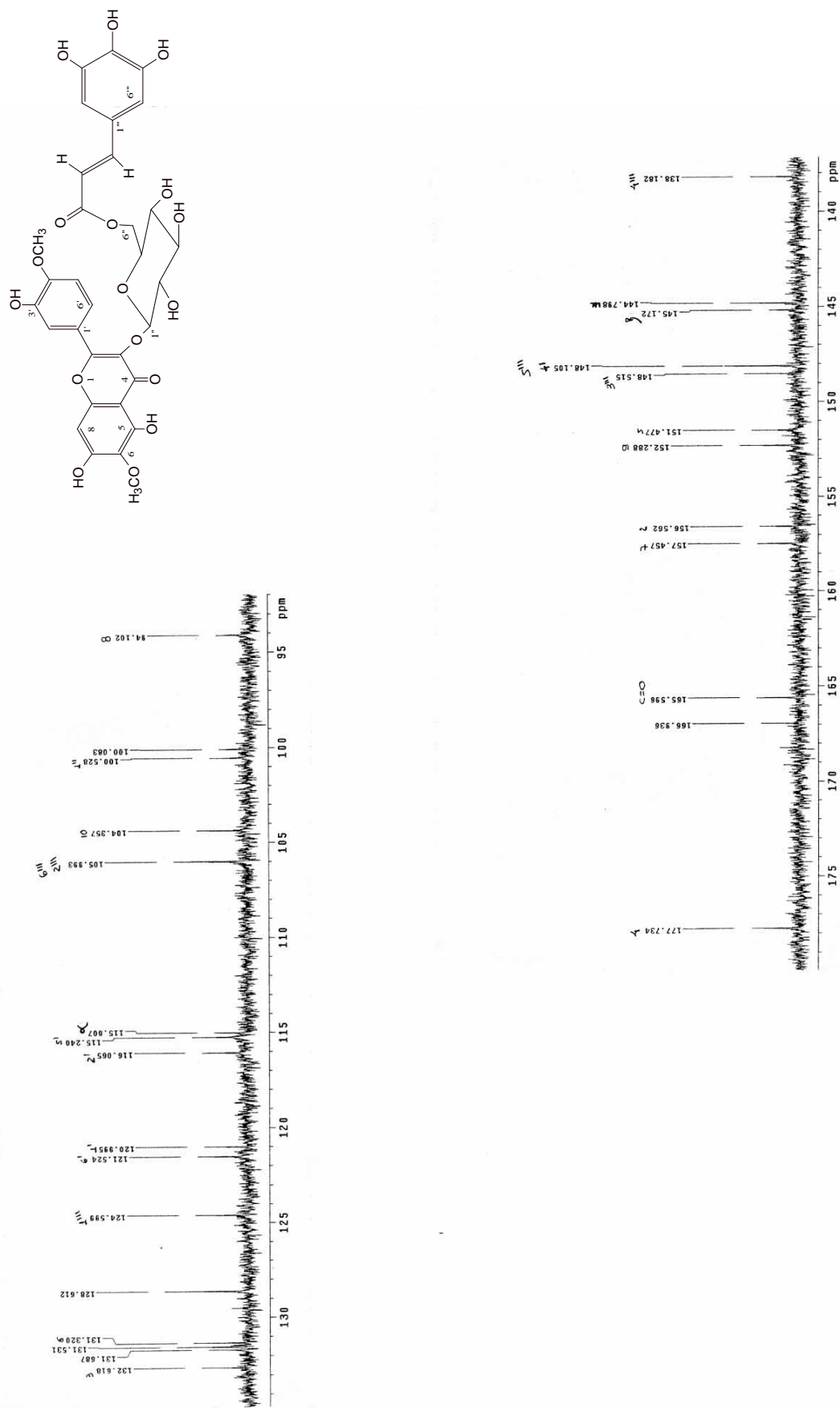


Figura 4.9. Espectros de RMN de ^{13}C de **El 3**, (11,7 T, DMSO- d_6 , TMS, δ).

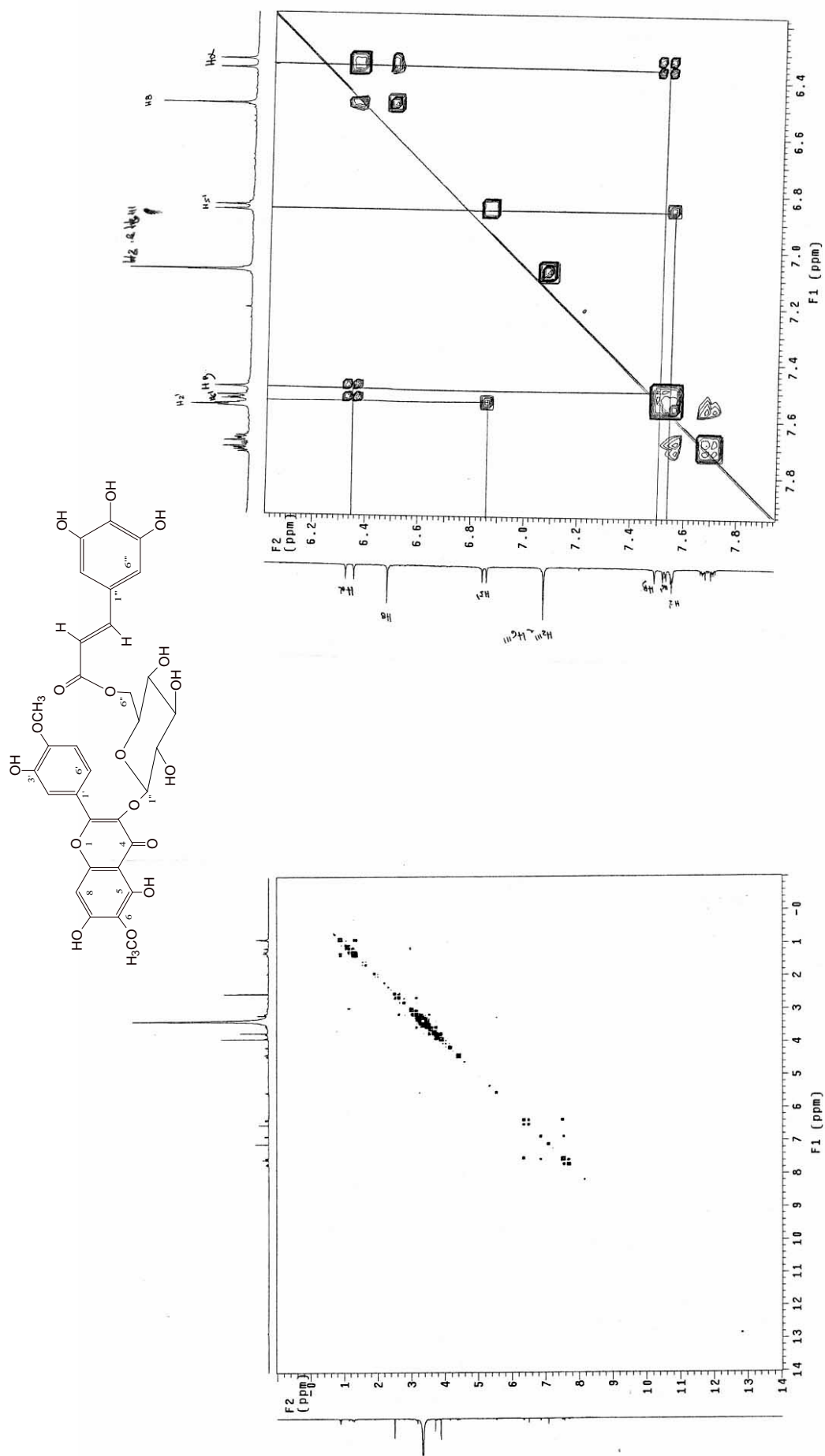


Figura 4.10. Espectros de gCOSY de **El 3**, (11,7 T, DMSO-d₆, TMS, δ).

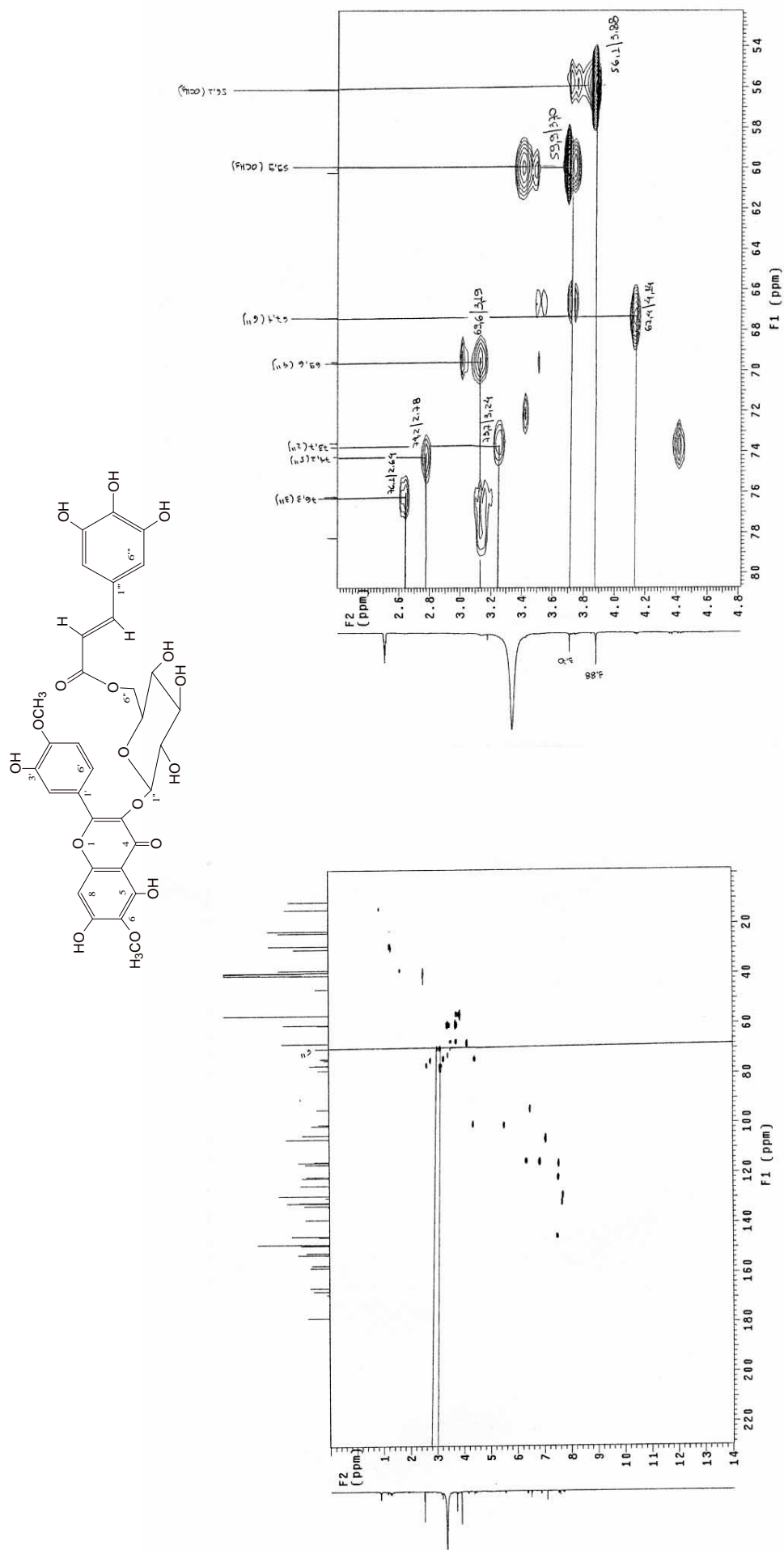


Figura 4.11. Espectros de gHMQC de **El 3**, (11,7 T, DMSO-d₆, TMS, δ).

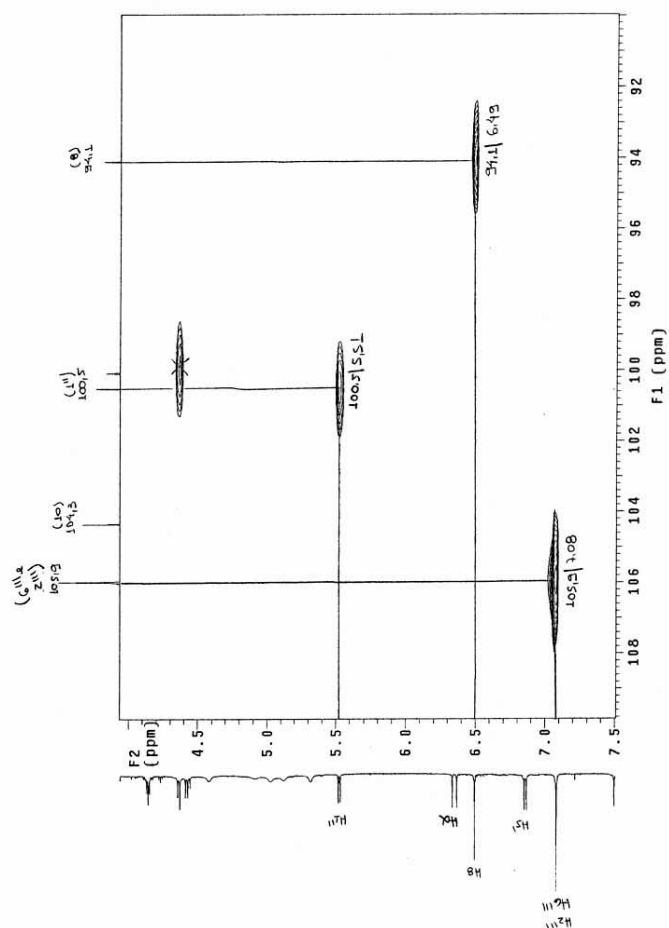
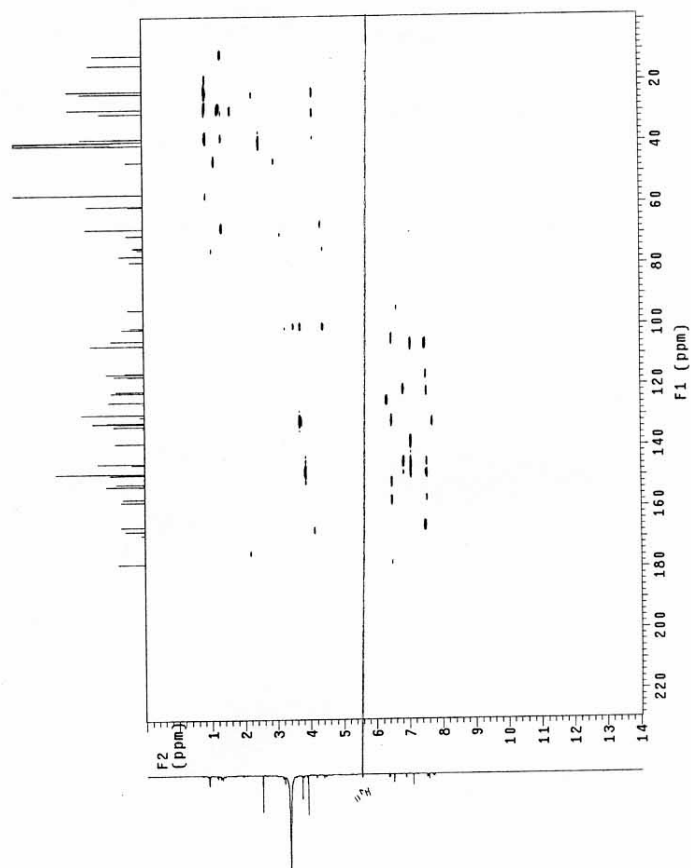
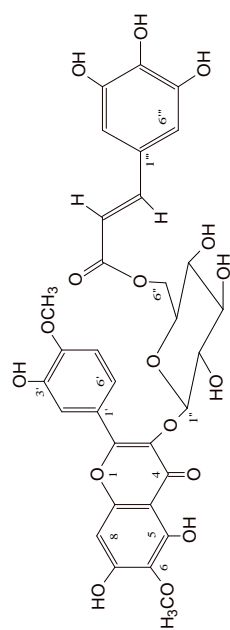


Figura 4.12. Espectros de gHMQC de **El 3**, (11,7 T, DMSO- d_6 , TMS, δ).

Estudo químico e biológico de plantas da família Eriocaulaceae

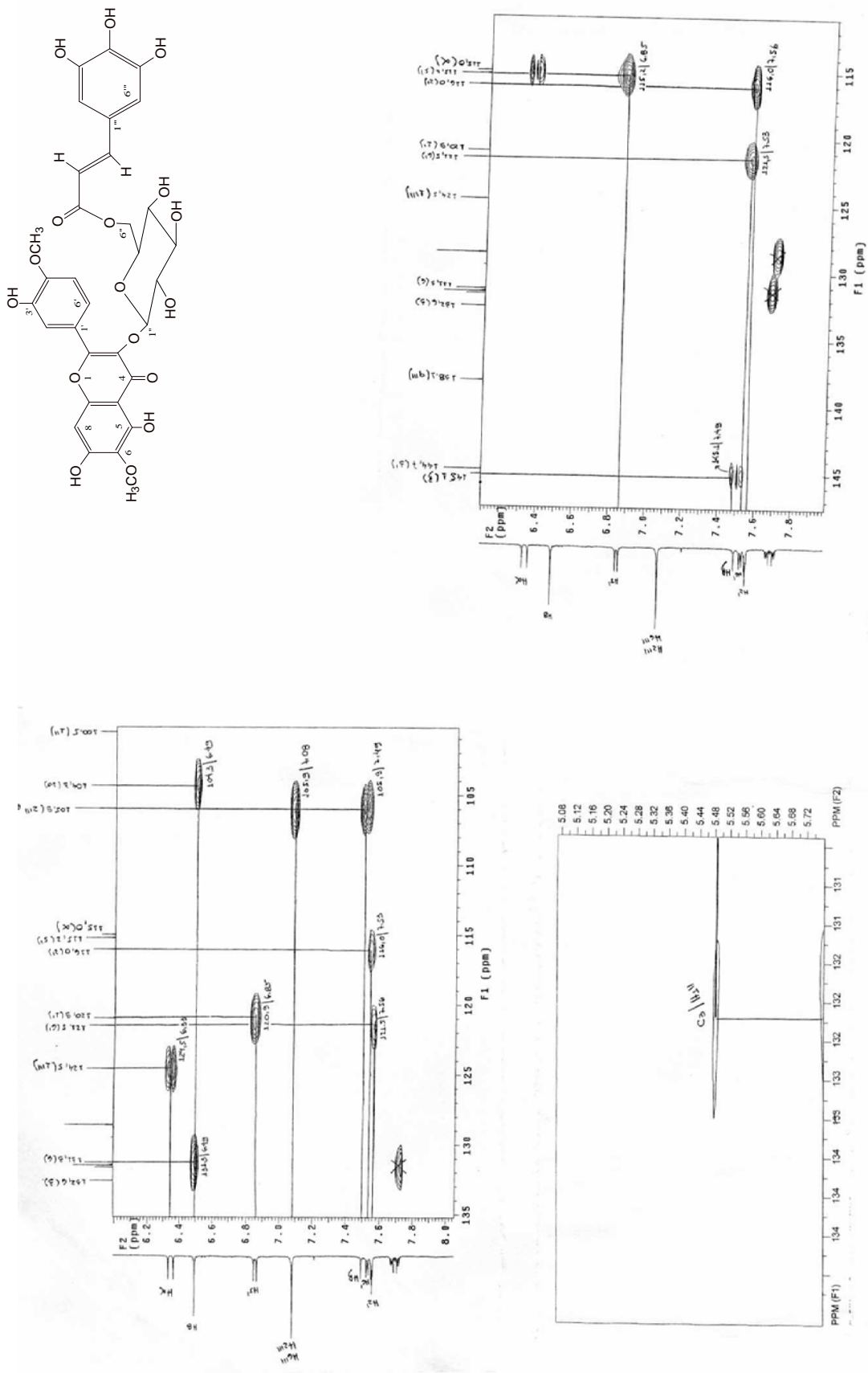


Figura 4.13. Espectros de gHMBC de EI 3, (11,7 T, DMSO-d₆, TMS, δ).

Estudo químico e biológico de plantas da família Eriocaulaceae

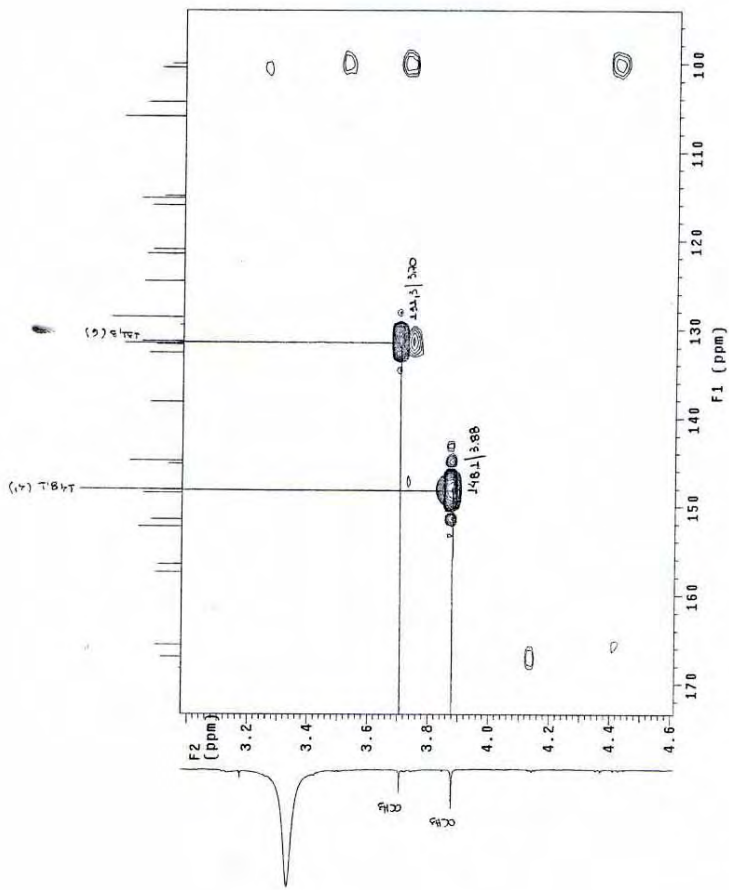
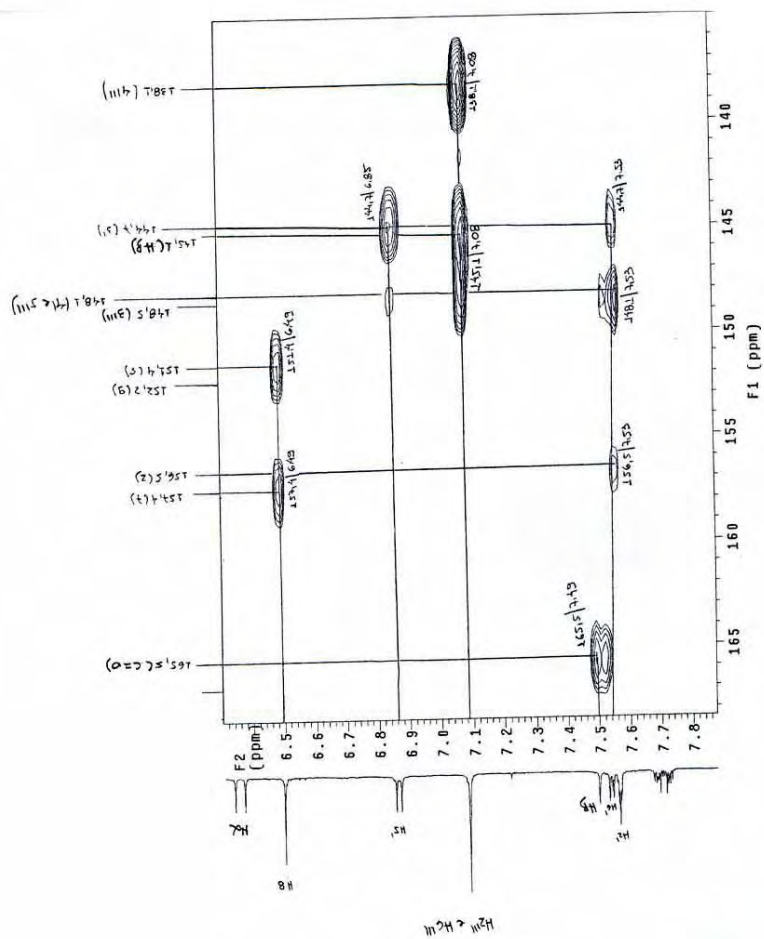
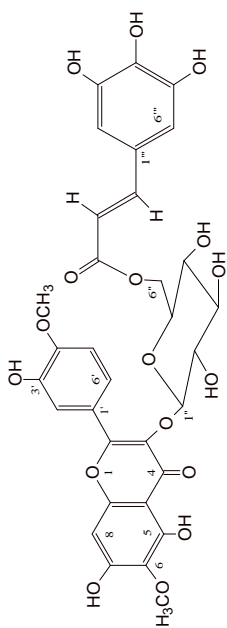


Figura 4.14. Espectros de gHMBC de **El 3**, (11.7 T, DMSO-d₆, TMS, δ).

Estudo químico e biológico de plantas da família Eriocaulaceae

Determinação estrutural de EI 5

A substância **EI 5** foi obtida com um pó amorfo de cor amarela, que fundiu a 152,5-153,7 °C e apresentou rotação específica $[\alpha]_D = -16,5$ ($c=0,2$, CH₃OH, 23°C).

O espectro UV (λ_{\max} , MeOH) da substância **EI 5** (Fig. 4.18) forneceu as bandas em 240 nm, 272,5 nm e 401 nm. A presença de uma banda de absorção em aproximadamente 272 nm (ombro duplo) é característica de naftopiranonas (Santos, 2001). O espectro no IV (KBr) (Fig. 4.18) apresentou absorções em 3.416 cm⁻¹ (ν_{OH}) e 1.638 cm⁻¹ ($\nu_{\text{C=O}}$).

O espectro de RMN de ¹H (Fig. 4.19, Tab. 4.6) mostrou sinais em δ 6,08 (s), δ 6,30 (s), δ 6,48 (d) e δ 6,54 (s), integrando cada um para 1H. O singlete em δ 2,13 (3H) sugere uma metila ligada a carbono sp². Um singlete em δ 3,79 (3H) evidencia a presença de uma metoxila, enquanto que o singlete em δ 14,20 (1H) é relativo a uma hidroxila, provavelmente na posição C₉ de uma naftopiranona (Santos *et al*, 2001b; Coelho *et al*, 2000). O espectro RMN de ¹³C (Fig. 4.20, Tab. 4.6) mostrou 15 sinais, também compatíveis com a estrutura de uma naftopiranona (Santos *et al*, 2001b).

O espectro gHMQC (Fig. 4.21 e 4.22) mostra as correlações diretas entre os carbonos e os hidrogênios de **EI 5** (Tab. 4.6). O espectro gHMBC (Fig. 4.23 e 4.24) exibiu as interações à longa distância entre carbonos e hidrogênios da molécula **EI 5** (Tab. 4.6). A posição da hidroxila em C₉ foi estabelecida pelos sinais de correlação entre o hidrogênio em δ 14,20 e os carbonos δ 97,38 (C₈), δ 162,64 (C₉) e δ 111,28 (C_{9a}), mostrando que esta hidroxila encontra-se livre, enquanto que os hidrogênios da metoxila (δ 3,79) apresentam correlação com o sinal de C₇ (δ 166,21). Os hidrogênios da metila (δ 2,13) correlacionam-se com o sinal de C₄ (δ 18,53). Todos esses dados foram comparados com modelos estruturais da figura 4.15 (Vilegas *et al*, 1998; Santos *et al*, 2001b; Coelho *et al*, 2000).

O espectro de massas de alta resolução (Fig. 4.25) mostrou pico da molécula protonada em m/z 567,3340, correspondente à fórmula molecular [C₃₀H₂₂O₉+K+D]⁺ (calculado m/z 567,2388), o que evidencia a estrutura dimérica de **EI 5**. A molécula encontra-se deuterada, pois o espectro de massas foi obtido após a obtenção dos espectros de RMN 1D e 2D. Apóia essa proposta dois outros sinais, um em m/z 294,0562 {correspondente ao íon [C₁₅H₁₁O₅+Na]⁺ (calculado m/z 294,0504)} e outro em m/z 309,2853 {correspondente ao íon [M-C₁₅H₁₂O₄+K]⁺ (calculado m/z 309,1511)}, que são compatíveis com a fragmentação proposta na Fig. 4.17.

Tendo em vista que a molécula é simétrica e que a hidroxila livre ocorre na posição C₉, fica claro que a ligação entre as duas unidades de paepalantina deve ocorrer nas posições C₁₀ e C_{10'}.

O conjunto destes dados nos levou a propor a estrutura da Eriocaulina (**EI 5**) (Fig. 4.16), um novo dímero de naftopiranona.

Além disso, tendo em vista que **EI 5** possui rotação óptica específica, pode-se concluir que

ela possui atropoisomeria. Contudo, sua configuração absoluta não pôde ser estabelecida. .

Tabela 4.6. Deslocamentos químicos de RMN 1D e 2D (DMSO-*d*₆, 11,7 T) de **El 5**.

Posições	¹ H	¹³ C	gHMQC	gHMBC
1		174,4		
2				
3		151,0		
4	6,30 (s)	105,3	H ₄ /C ₄	H ₄ /C ₃ ; H ₄ /C ₅ ; H ₄ /C _{10a} ; H ₄ /C _{4-CH3}
4a		133,8		
5	6,54 (s)	105,9	H ₅ /C ₅	H ₅ /C ₄ ; H ₅ /C _{5a} ; H ₅ /C ₆ ; H ₅ /C _{9a} ; H ₅ /C _{10a}
5a		141,3		
6	6,48 (d) [2,0]	97,25	H ₆ /C ₆	H ₆ /C ₈ ; H ₆ /C _{9a}
7		166,2		
8	6,08 (s)	97,38	H ₈ /C ₈	
9		162,6		
9a		111,2		
10		162,2		
10a		97,00		
3-CH ₃	2,13 (s)	18,53	H _{4-CH3} /C _{4-CH3}	
7-OCH ₃	3,79 (s)	54,99	H _{7-OCH3} /C _{7-OCH3}	H _{7-OCH3} /C ₇
9-OH	14,2 (s)			H _{9-OH} /C ₉ ; H _{9-OH} /C ₉ ; H _{9-OH} /C _{9a}

() Multiplicidade; [] Constantes de acoplamento em Hz.

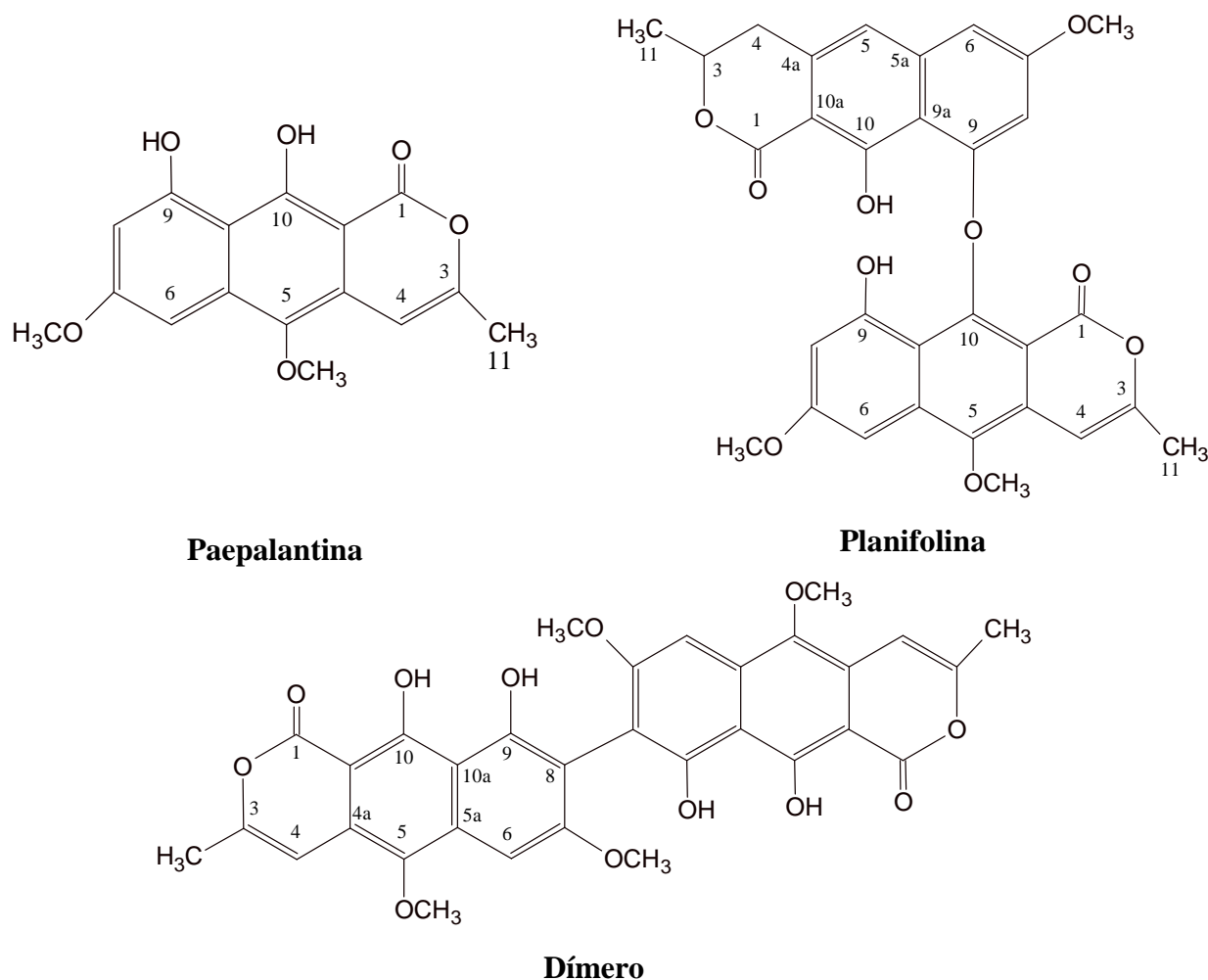


Figura 4.15. Modelos de moléculas usados na elucidação estrutural de **El 5**.

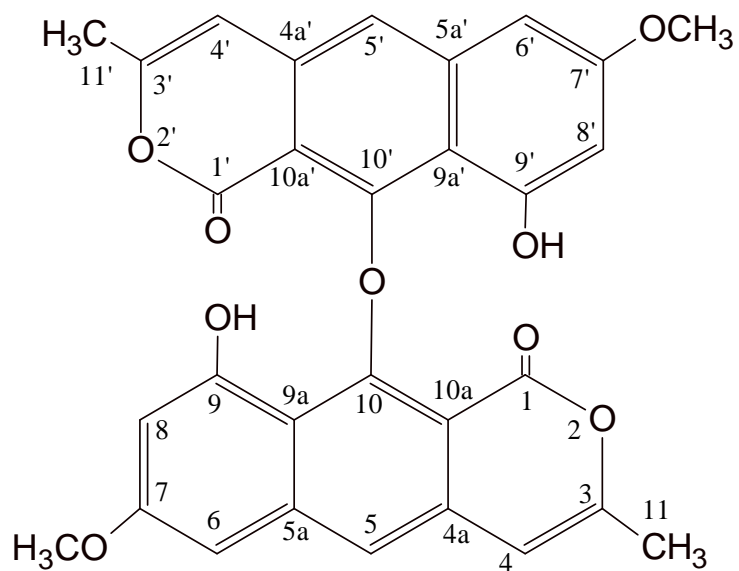


Figura 4.16. Substância EI 5.

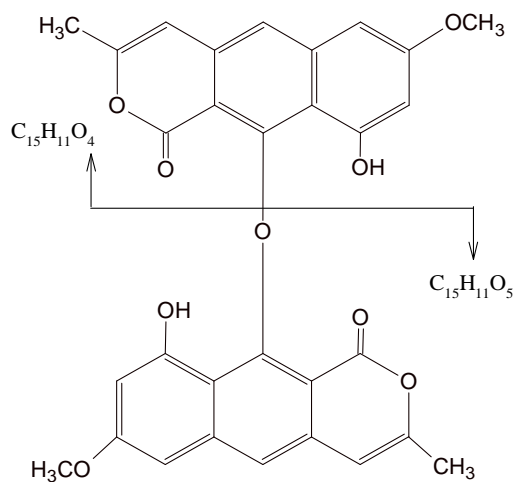


Figura 4.17. Proposta da fragmentação da molécula EI 5.

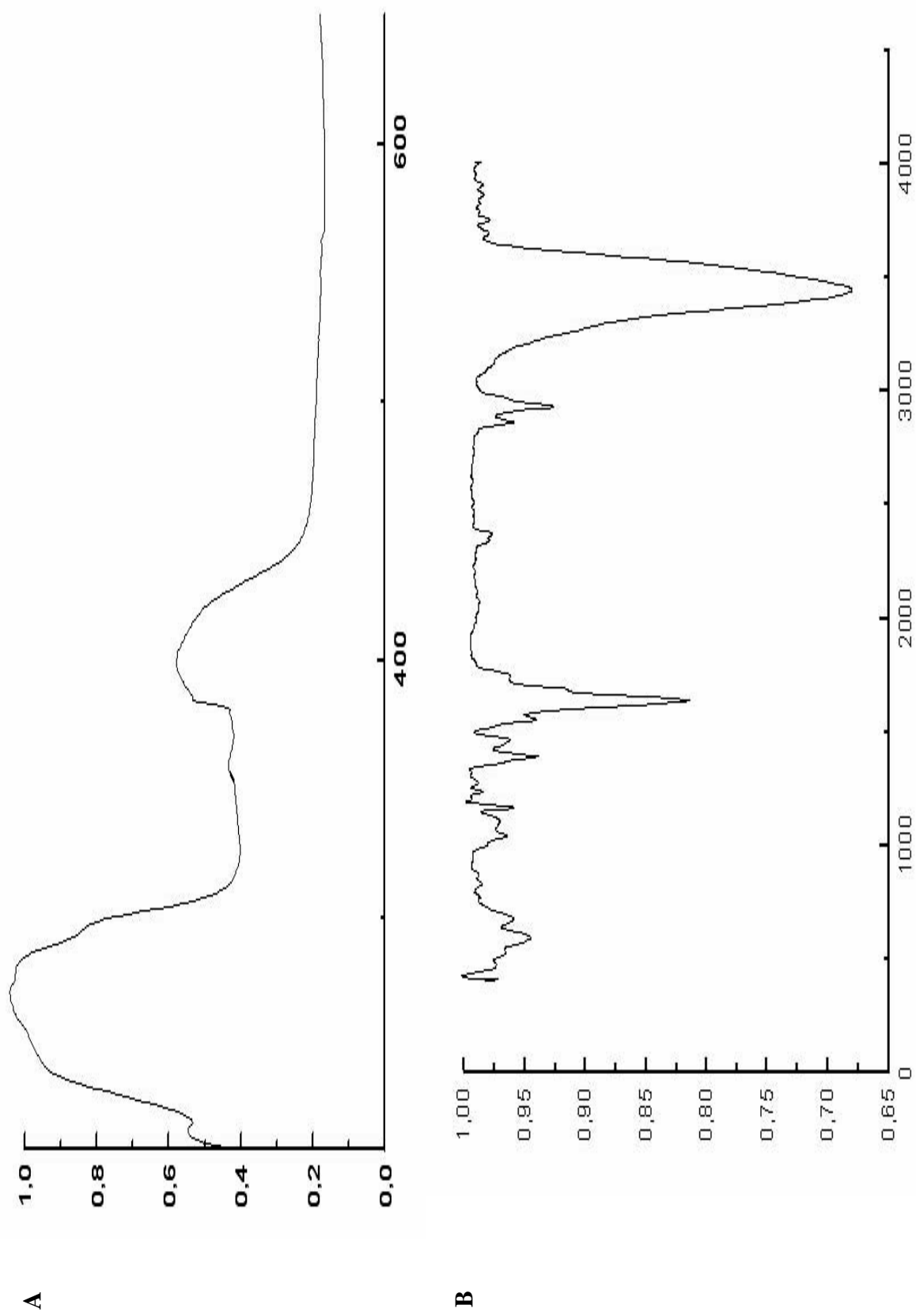


Figura 4.18. Espectro no ultravioleta em metanol (A) e infravermelho em KBr (B) da substância EI 5.

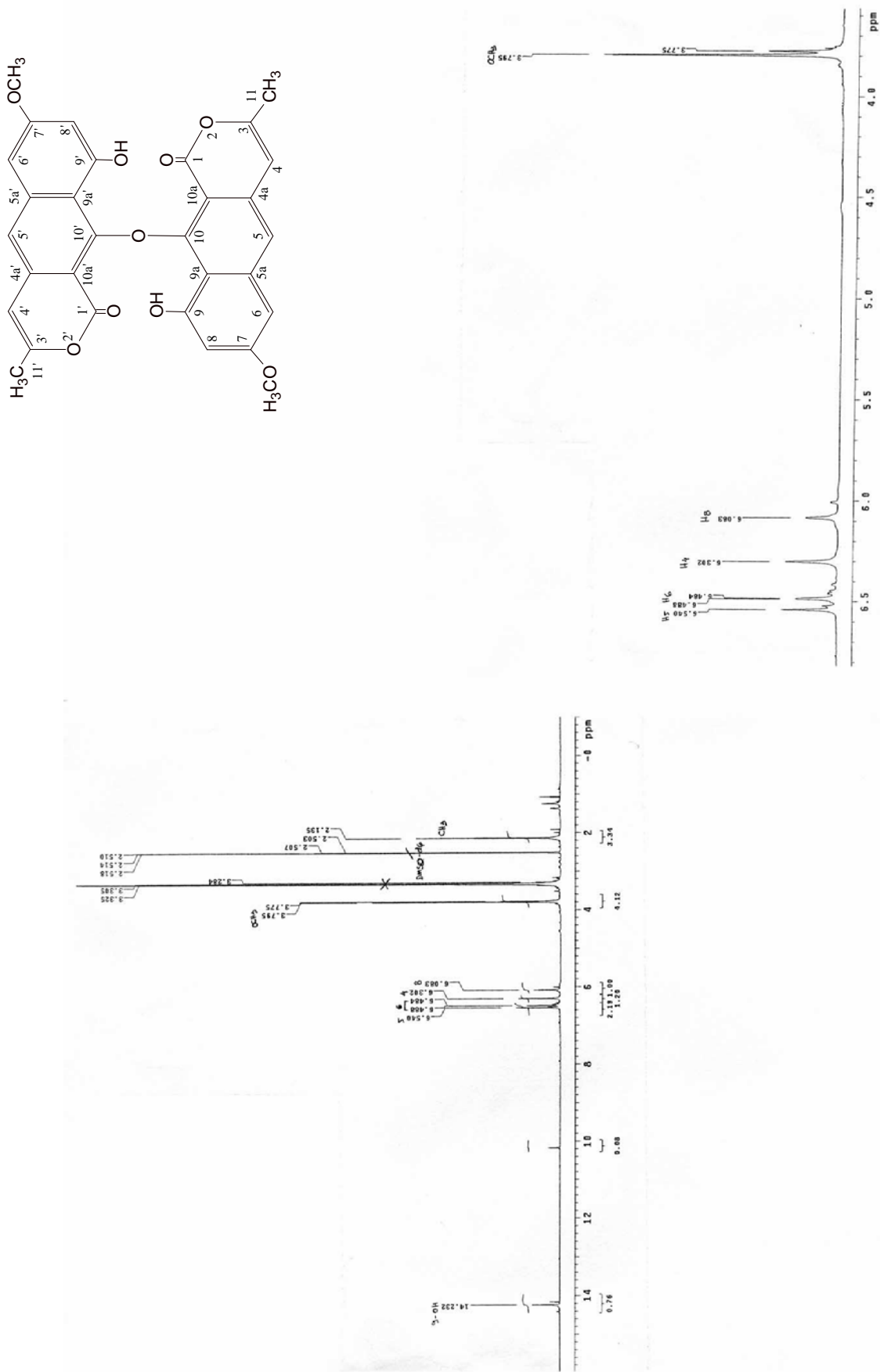


Figura 4.19. Espectros de RMN de ^1H de **El 5**, (11,7 T, DMSO- d_6 , TMS, δ).

Estudo químico e biológico de plantas da família Eriocaulaceae

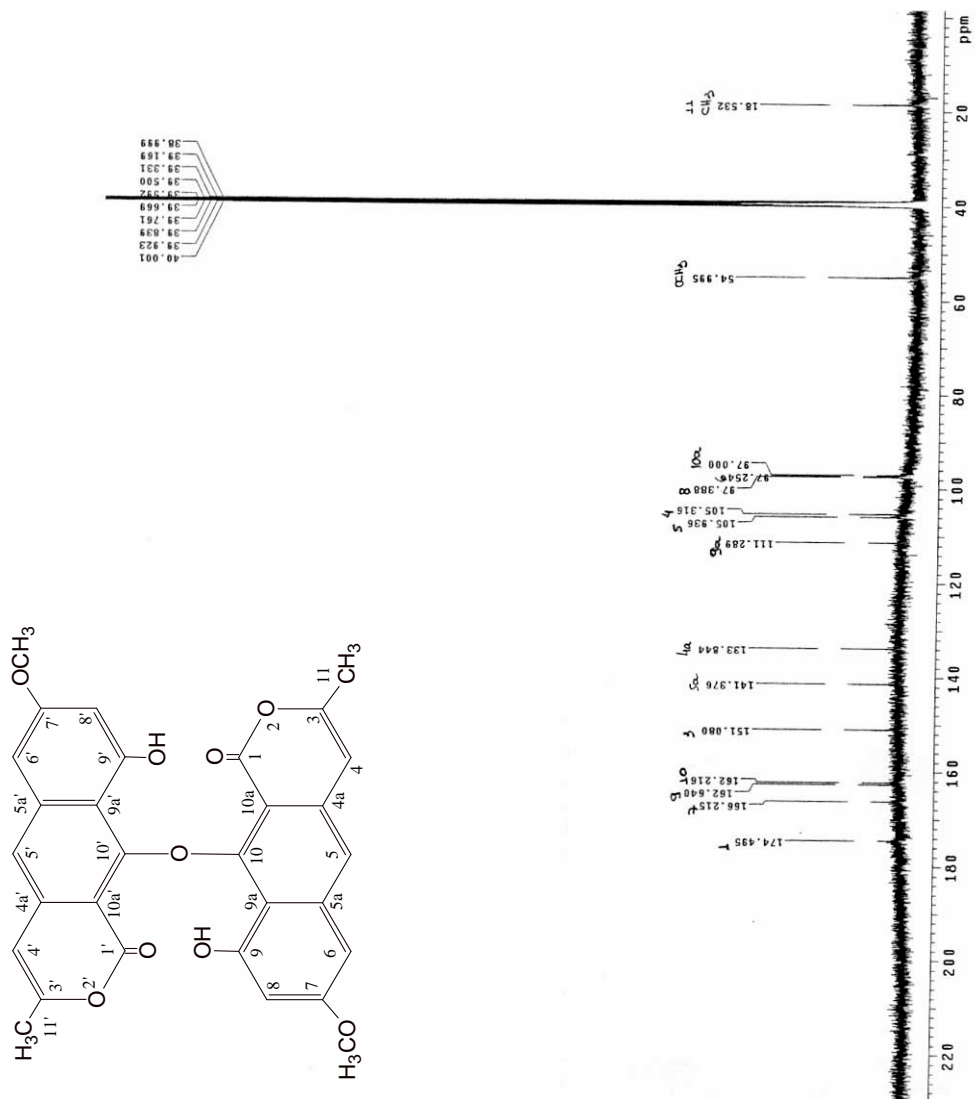


Figura 4.20. Espectro de RMN de ¹³C de **El 5**, (11,7 T, DMSO-d₆, TMS, δ).

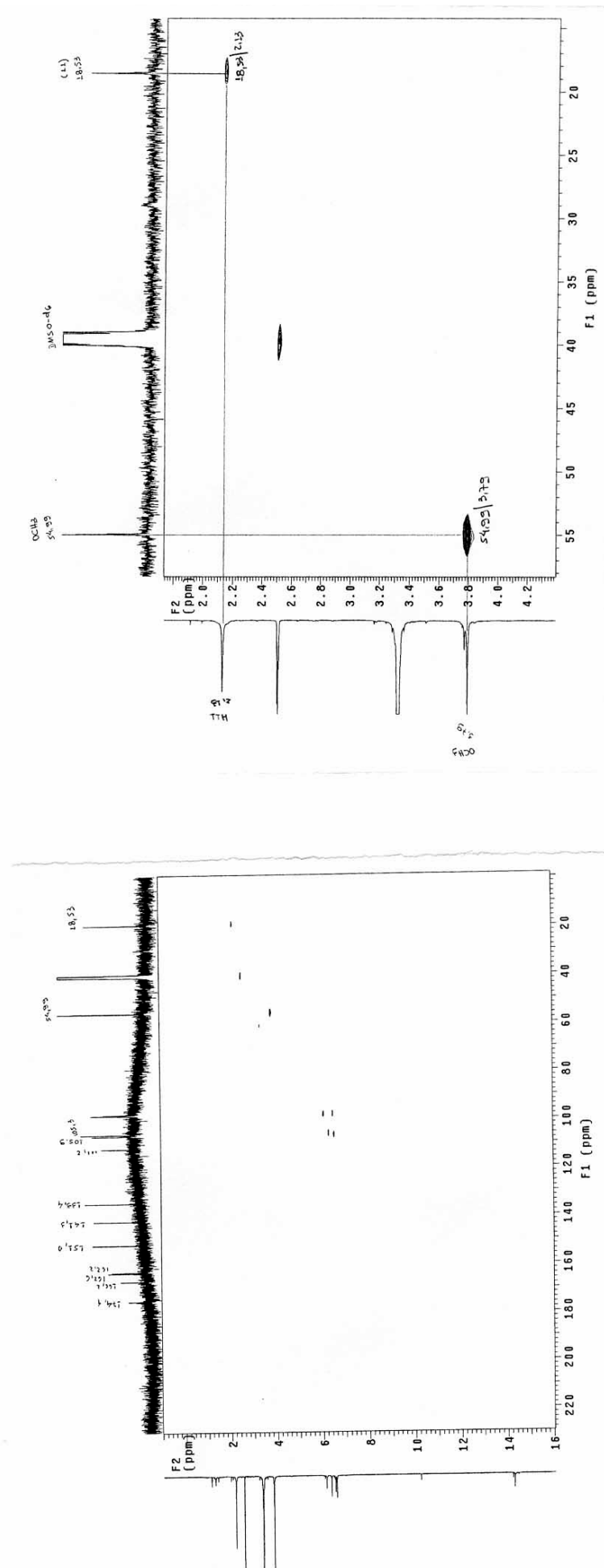
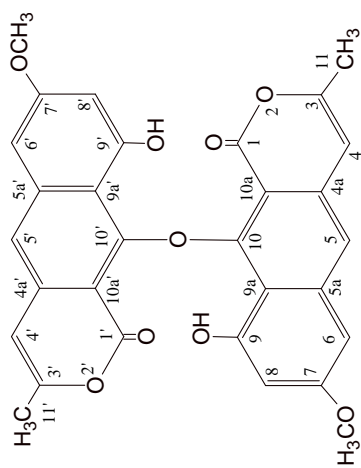


Figura 4.21. Espectros de gHMOC de EI 5, (11,7 T, DMSO-d₆, TMS, δ).

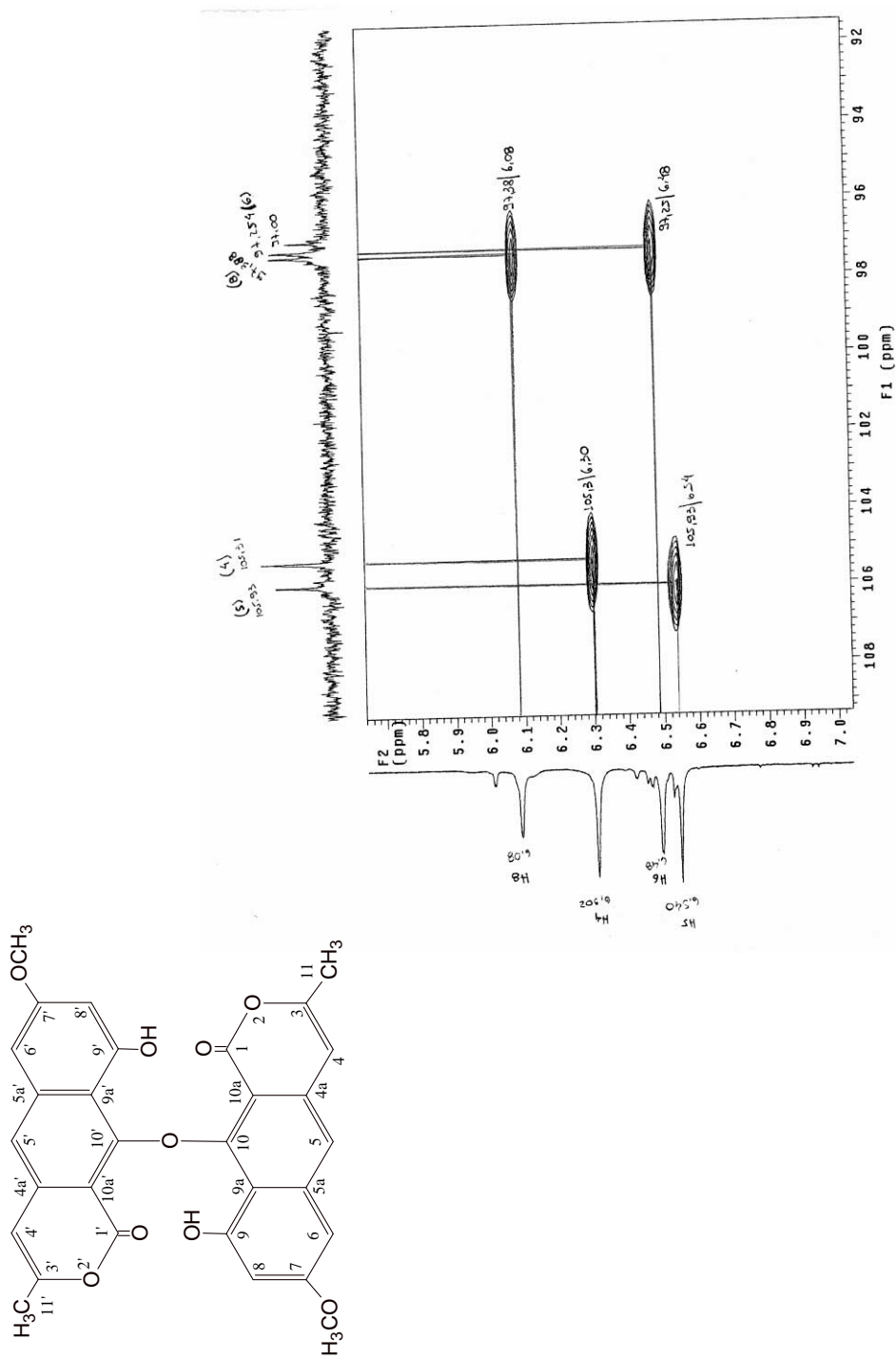


Figura 4.22. Espectros de gHMQC de **El 5**, (11,7 T, DMSO-d_6 , TMS, δ).

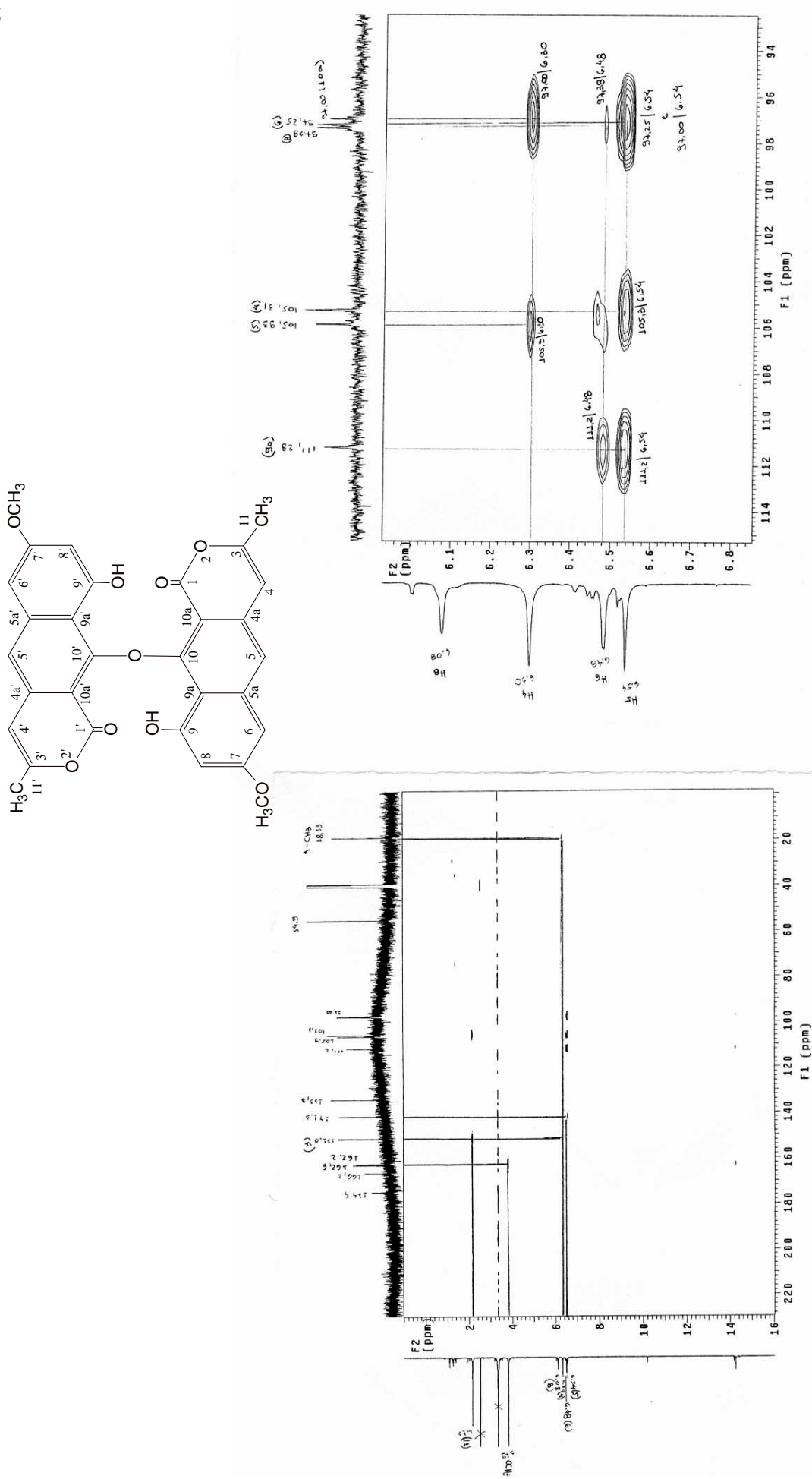


Figura 4.23. Espectros de gHMBC de El 5, (11,7 T, DMSO- d_6 , TMS, δ).

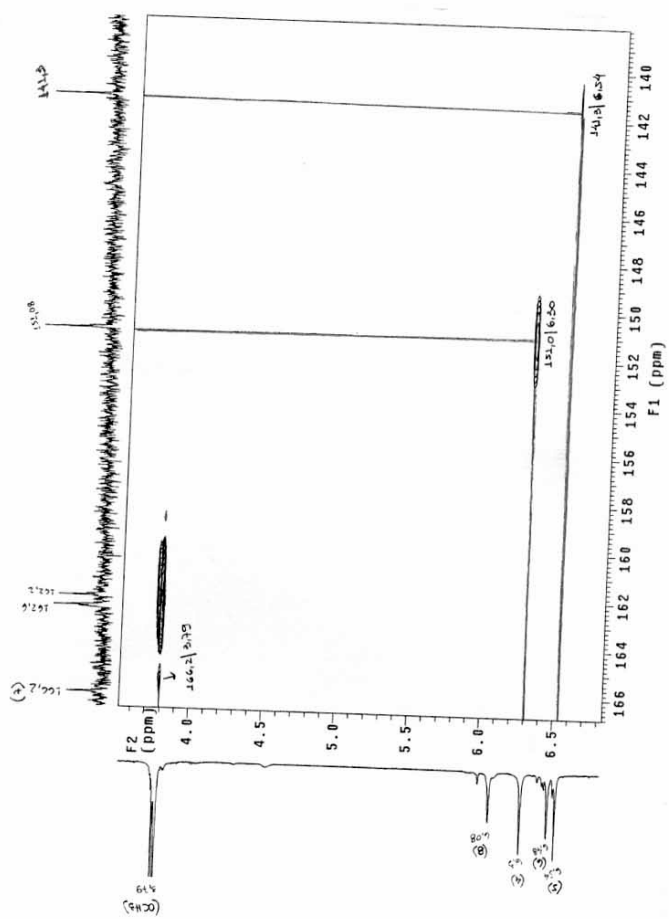
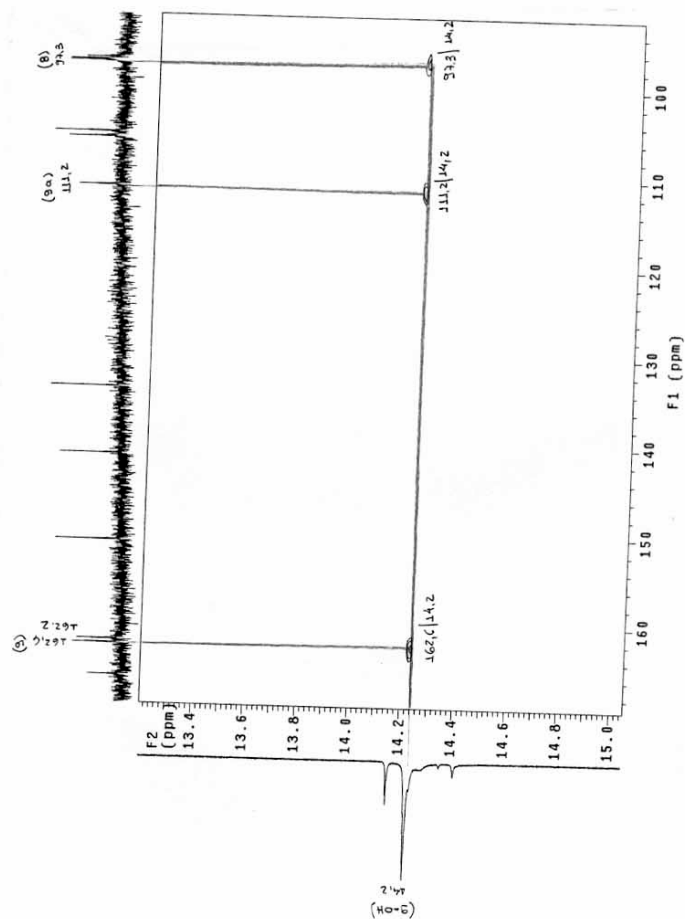
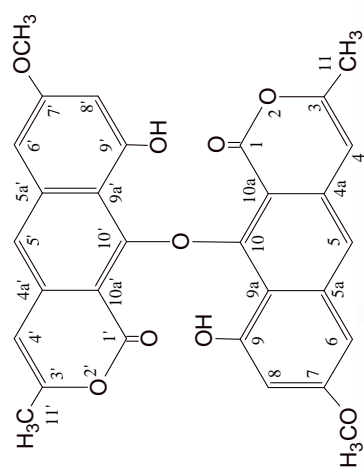


Figura 4.24. Espectros de gHMBC de EI 5, (11,7 T, DMSO-d₆, TMS, δ).

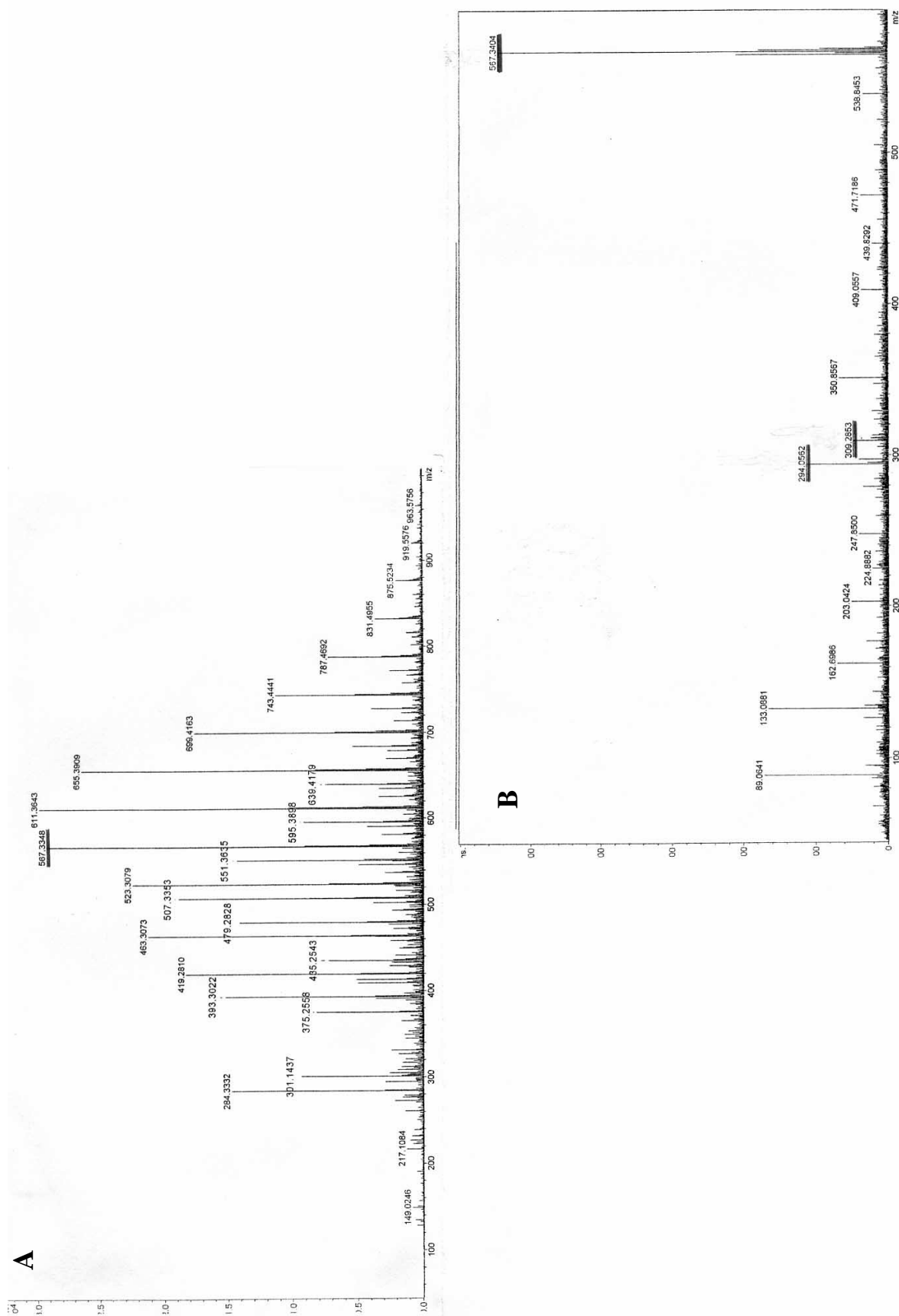


Figura 4.25. (A) Espectro de massas de alta resolução de EI 5. (B) Fragmentação do íon precursor de m/z 567,3348

5. HPLC-MS e FIA-EIS-IT-MS
dos extratos das espécies de Erioculaceae

Estudo do Ex-MeOH dos capítulos de *E. ligulatum* utilizando HPLC-MS

O acoplamento entre cromatógrafo líquido e espectrômetro de massas (HPLC-MS) é muito usado na caracterização dos constituintes químicos dos extratos de plantas. O espectrômetro de massas é considerado um detector universal e, assim, esse acoplamento traz uma economia de tempo na análise de um extrato vegetal, pois evita o isolamento dos constituintes químicos. Além da separação cromatográfica e das informações sobre o peso molecular das substâncias, também se obtém fragmentos das moléculas em análise, que são importantes para a elucidação estrutural de diferentes classes de metabólitos secundários (Benavides *et al*, 2006). Devido à grande sensibilidade, esse sistema muitas vezes consegue detectar compostos minoritários difíceis de serem isolados por técnicas clássicas de fitoquímica (Zhou *et al*, 1996).

A utilização de técnicas hifenadas na detecção de metabólitos secundários em um extrato bruto de planta tem sido aplicada como a “impressão digital” do extrato, ajudando na identificação e autenticidade deste, além de proporcionar a identificação de possíveis adulterantes desses extratos (Hostettmann *et al*, 2003).

Preparo da amostra

Um grama (1 g) do Ex-MeOH dos capítulos de *E. ligulatum* foi dissolvido em 10 mL de metanol. Após a dissolução do extrato a mistura foi centrifugada a 3200 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi filtrado em membrana de PTFE (Disk P-34, 0,45 µm, Supelco, Bellefonte, PA).

Preparo das soluções de padrões

As substâncias 6-metoxiapigenina (**12**), 6-metoxiapigenina-7-*O*-β-D-glicopiranosídeo (**7**), 6-metoxiapigenina-7-*O*-β-D-alopiranosídeo (**8**), 10-hidroxi-7-metoxi-3-(*R*)-metil-1H-nafto[2,3c]piran-1-ona-9-*O*-β-D-alopiranosídeo (1''→6')glicopiranosídeo [paepalantina-9-*O*-β-D-alopiranosídeo (1''→6')glicopiranosídeo] (**9**) e 10-hidroxi-7-metoxi-1H-nafto[2,3c]piran-1-ona-9-*O*-β-D-glicopiranosídeo [paepalantina-9-*O*-β-D-glicopiranosídeo] (**10**) isolados do Ex-MeOH dos capítulos de *E. ligulatum* por Silva *et al* 2007 e Santos *et al* 2005, foram usadas como padrões.

Condições do HPLC e do MS

O cromatógrafo usado nas análises foi SURVEYOR MS micro HPLC (Thermo Finnigan, San José, CA, USA) acoplado ao detector de arranjo de fotodiodos e coluna Hypersil BDS RP18 column (250 x 2.1 mm, 5 µm) (Thermo, Bellefonte, PA, USA) com vazão de 200 µL min⁻¹. A fase móvel foi composta de água (solvente A) e acetonitrila (solvente B), ambos com 0,5 % de ácido acético. O gradiente usado na eluição está descrito na tabela 5.1.

Tabela 5.1. Gradiente de eluição empregado na separação por HPLC dos compostos presentes no Ex-MeOH dos capítulos de *E. ligulatum* na análise por HPLC-MS.

Tempo (min)	Água + Ac. Acético 0,5% (%)	Acetonitrila + Ac. Acético 0,5% (%)
0	95	05
60	40	60
70	05	95
80	05	95

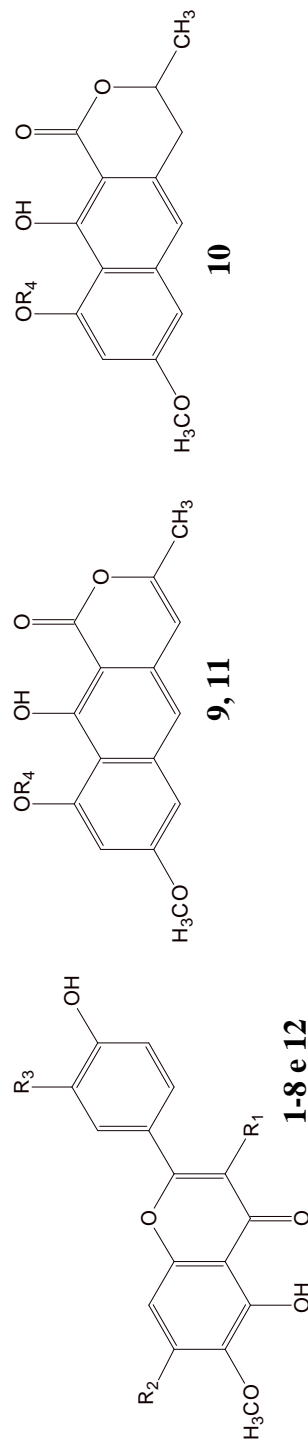
O espectrômetro de massas usado foi o Finnigan LCQ DECA XP Plus Ion Trap Instrument (Thermo Finnigan, San Jose, CA). Para condições experimentais ver materiais e métodos (Pág. 147).

A tabela 5.1 e a figura 5.1 mostra os compostos identificados com o auxílio da técnica de HPLC-ESI-MSⁿ. Destes, três são derivados da apigenina, cinco são derivados da quercetina, um derivado da luteolina e três naftopiranonas.

Tabela 5.2. Dados das substâncias identificadas do Ex-MeOH dos capítulos de *E. ligulatum*.

Substâncias	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Fórmula molecular	Tr (min)	[M-H] ⁻	Fragmentos MS/MS
Flavonóides								
6-metoxiquercetina-di- <i>O</i> -glicopiranosídeo (1)	O-Hex-Hex	OH	OH	---	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₈	24,4	655	331, 315
6-metoxiquercetina-di- <i>O</i> -glicopiranosídeo- vaniloil (2)	O-Hex-Hex-Vaniloil	OH	OH	---	C ₃₆ H ₃₈ O ₂₁	26,7	805	655, 637, 331
6-metoxiluteolina-di- <i>O</i> -glicopiranosídeo (3)	H	O-Hex-Hex	OH	---	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₇	27,1	639	477, 315, 300
4',6-dimetoxiquercetina-di- <i>O</i> -glicopiranosídeo (4)	O-Hex-Hex	OH	OH	---	C ₂₉ H ₃₄ O ₁₈	27,9	669	507, 345, 331
6-metoxiquercetina- <i>O</i> -glicopiranosídeo (5)	O-Hex	OH	OH	---	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₃	28,2	493	331
6-metoxiquercetina-di- <i>O</i> -glicopiranosil-rhamnofuranosídeo (6)	O-Hex-Hex-Rham	OH	OH	---	C ₃₄ H ₄₂ O ₂₂	28,8	801	655, 493, 331, 316
6-metoxiapigenina-7- <i>O</i> -β-D-glicopiranosídeo (7)	H	O-Glic	H	---	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	31,1	461	299, 284
6-metoxiapigenina-7- <i>O</i> -β-D-alopiranosídeo (8)	H	O-Allo	H	---	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	31,1	461	299, 284
6-metoxiapigenina (12)	H	OH	H	---	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	42,1	299	284
Naftopiranos								
10-dihidroxi-7-metoxi-3-(R)-metil-1H-nafto[2,3c]piran-1-ona 9- <i>O</i> -β-D-glicopiranosil-(1'' → 6')-alopiranosídeo (9)				Glic-Allo	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₆	33,8	595	433, 271, 256
3,4-dihidro-10-hidroxi-7-metoxi-3-(R)-metil-1H-nafto[2,3c]piran-1-ona 9- <i>O</i> -β-D-glicopiranosídeo (10)				Glic	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₀	36,6	435	273
10-hidroxi-7-metoxi-1H-nafto[2,3c]piran-1-ona 9- <i>O</i> -β-D-glicopiranosídeo (11)				H	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	38,8	433	271, 256

Legenda: Allo → Alopiranosídeo; Glic → Glicopiranosídeo; Rham → Rhamnofuranosídeo; () Corresponde ao número dos picos identificados nos cromatogramas.

**Figura 5.1.** Substâncias identificadas do Ex-MeOH dos capítulos de *E. ligulatum*

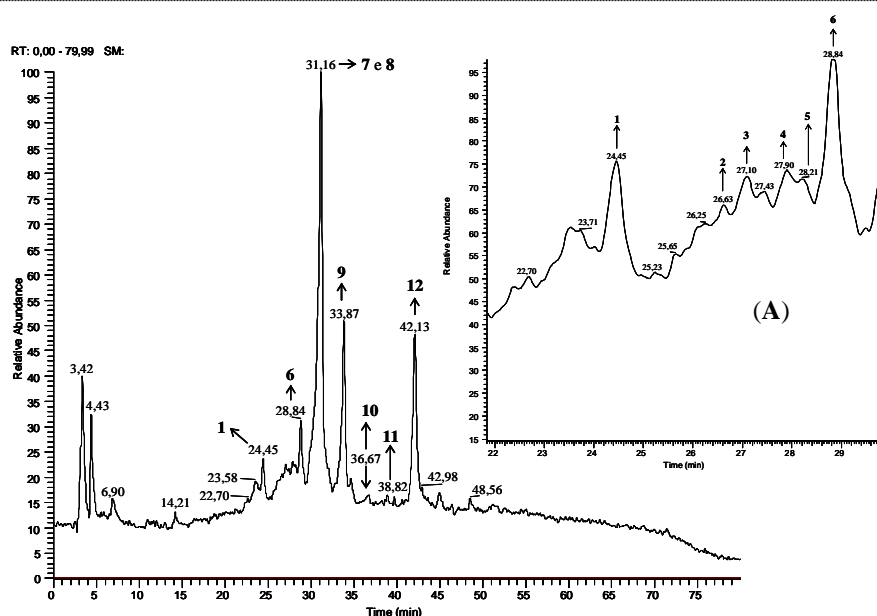


Figura 5.2. Cromatograma da análise por HPLC-ESI-IT-MS do Ex-MeOH dos capítulos de *E. ligulatum*. (A) Expansão do cromatograma de 22,0 a 29,0 min.

O pico **12** (T_R 42,1 min) apresentou sinal da molécula desprotonada $[M-H]^-$ em m/z 299. Fragmentação de segunda-ordem do íon precursor de m/z 299 gerou o íon produto m/z 284 $[M-CH_3-H]^-$ (Fig 5.3, Tab. 5.2). Esses dados, em conjunto à co-injeção do padrão permitiu identificar a 6-metoxiapigenina (**12**).

Os picos **7 e 8** (T_R 31,1 min) (Fig 5.3, Tab. 5.2) exibiram sinais de moléculas desprotonadas $[M-H]^-$ em m/z 461. Fragmentação de segunda-ordem produziu o íon de m/z 299 $[M-162-H]^-$, correspondente à perda de uma unidade de hexose, o que é compatível com 6-metoxiapigenina-7- O - β -D-glicopiranosídeo (**7**) ou 6-metoxiapigenina-7- O - β -D-alopiranosídeo (**8**) isolados de *E. ligulatum* (Silva *et al*, 2007).

O pico **3** (T_R 27,1 min) apresentou sinal da molécula desprotonada $[M-H]^-$ em m/z 639 (Fig 5.4, Tab. 5.2). Fragmentação de segunda-ordem gerou o sinal de m/z 315 $[M-162-162-H]^-$ e de m/z 300 $[M-CH_3-162-162-H]^-$ sugerindo a presença da 6-metoxiluteolina ligada a duas unidades de hexose. Esse resultado é compatível com a proposta da 6-metoxiluteolina-di- O -glicopiranosídeo (**3**).

Os picos **1** (T_R 24,4 min), **2** (T_R 26,7 min), **4** (T_R 27,9 min), **5** (T_R 28,2 min) e **6** (T_R 28,8 min) apresentam sinais das moléculas desprotonadas $[M-H]^-$ em m/z 655, 805, 669, 493 e 801, respectivamente (Fig. 5.5, Tab. 5.2). Quando submetidas à fragmentação de segunda ordem, todas elas produzem o íon de m/z 331, o que sugere a presença de derivados da 6-metoxiquercetina.

O pico **5** (T_R 28,2 min) apresentou sinal da molécula desprotonada $[M-H]^-$ em m/z 493. Fragmentação de segunda-ordem gerou o sinal de m/z 331 $[M-162-H]^-$, sugerindo a presença da 6-metoxiquercetina ligada a uma unidade de hexose (**5**), como por exemplo a 6-metoxiquercetina-3- O - β -D-glicopiranosídeo, isolada dos capítulos de *P. polyanthus*, *P. robustus* e *P. hilairei* (Santos, 2001; Santos *et al*, 2002 e Andade, 1999).

O pico **1** (T_R 24,4 min) apresentou sinal da molécula desprotonada $[M-H]^-$ em m/z 655. Fragmentação de segunda-ordem gerou o sinal de m/z 331 $[M-162-162-H]^-$, sugerindo a presença da 6-metoxiquercetina ligada a duas unidades de hexose (**1**), como a 7-metoxiquercetina-3-*O*- β -D-glicopiranosil (6'' \rightarrow 1''')- β -D-glicopiranosídeo isolada dos capítulos de *P. vellozioides* e *P. latipes* (Dokkedal, 2000).

O pico **4** (T_R 27,9 min) apresentou sinal da molécula desprotonada $[M-H]^-$ em m/z 669. Fragmentação de segunda-ordem gerou o sinal de m/z 507 $[M-162-H]^-$ e de m/z 345 $[M-162-162-H]^-$ e m/z 331 $[M-162-162-CH_3-H]^-$, sugerindo a presença da 6-metoxiquercetina ligada a uma metila adicional e a duas unidades de hexose, como por exemplo, a 4',6-dimetoxiquercetina-3-*O*- β -D-glicopiranosil(1''' \rightarrow 6'')- β -D-glicopiranosídeo (**4**).

O pico **6** (T_R 28,8 min) apresentou sinal da molécula desprotonada $[M-H]^-$ em m/z 801. Fragmentação de segunda-ordem gerou os sinais de m/z 655 $[M-146-H]^-$, m/z 493 $[M-146-162-H]^-$, m/z 331 $[M-146-162-162-H]^-$ e m/z 316 $[M-CH_3-H]^-$, correspondentes às perdas de uma unidade de deoxiexose (Ex.: rhamnose), duas unidades de hexose (Ex.: glicose) e uma metila, sequencialmente, o que sugere a presença de um derivado triglicosilado da 6-metoxiquercetina (**6**).

O pico **2** (T_R 26,7 min) apresentou sinal da molécula desprotonada $[M-H]^-$ em m/z 805. Fragmentação de segunda-ordem gerou os sinais de m/z 655 $[M-150-H]^-$, e m/z 331 $[M-150-162-162-H]^-$, correspondentes às perdas de uma unidade vaniloil e duas unidades de hexose, o que é compatível com um derivado diglicosilado da 6-metoxiquercetina, esterificado por uma unidade de ácido vanílico (**2**).

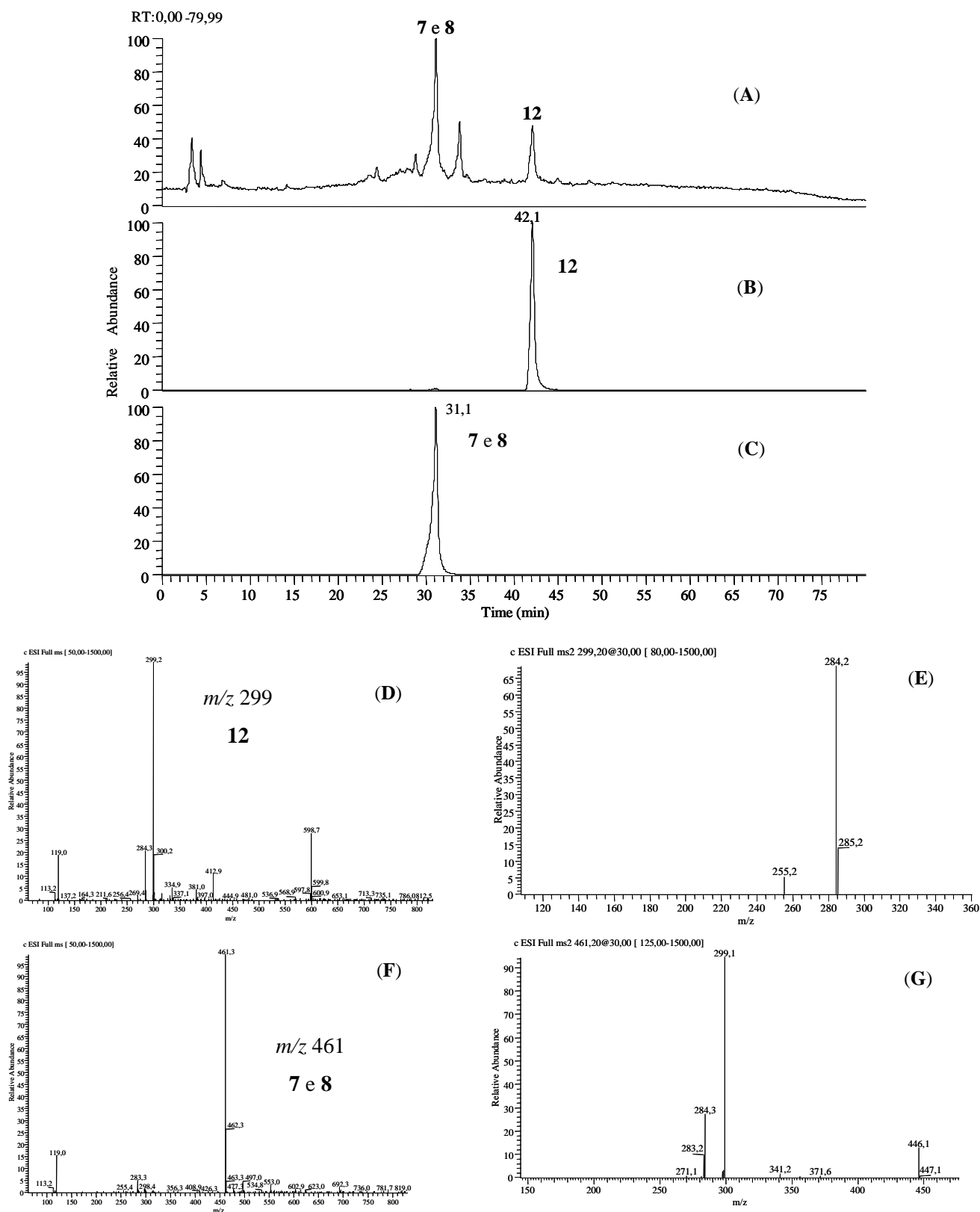


Figura 5.3. (A) Análise por HPLC-ESI-MSⁿ (modo negativo) dos derivados da apigenina presentes no Ex-MeOH dos capítulos de *E. ligulatum*. Cromatograma dos íons extraídos (B) m/z 299 e (C) m/z 461. (D) Espectro de massas do pico 12 (T_R 42,1 min) e (E) fragmentação do íon precursor de m/z 299. (F) Espectro de massas dos picos 7 e 8 (T_R 31,1 min) e (G) fragmentação do íon precursor de m/z 461.

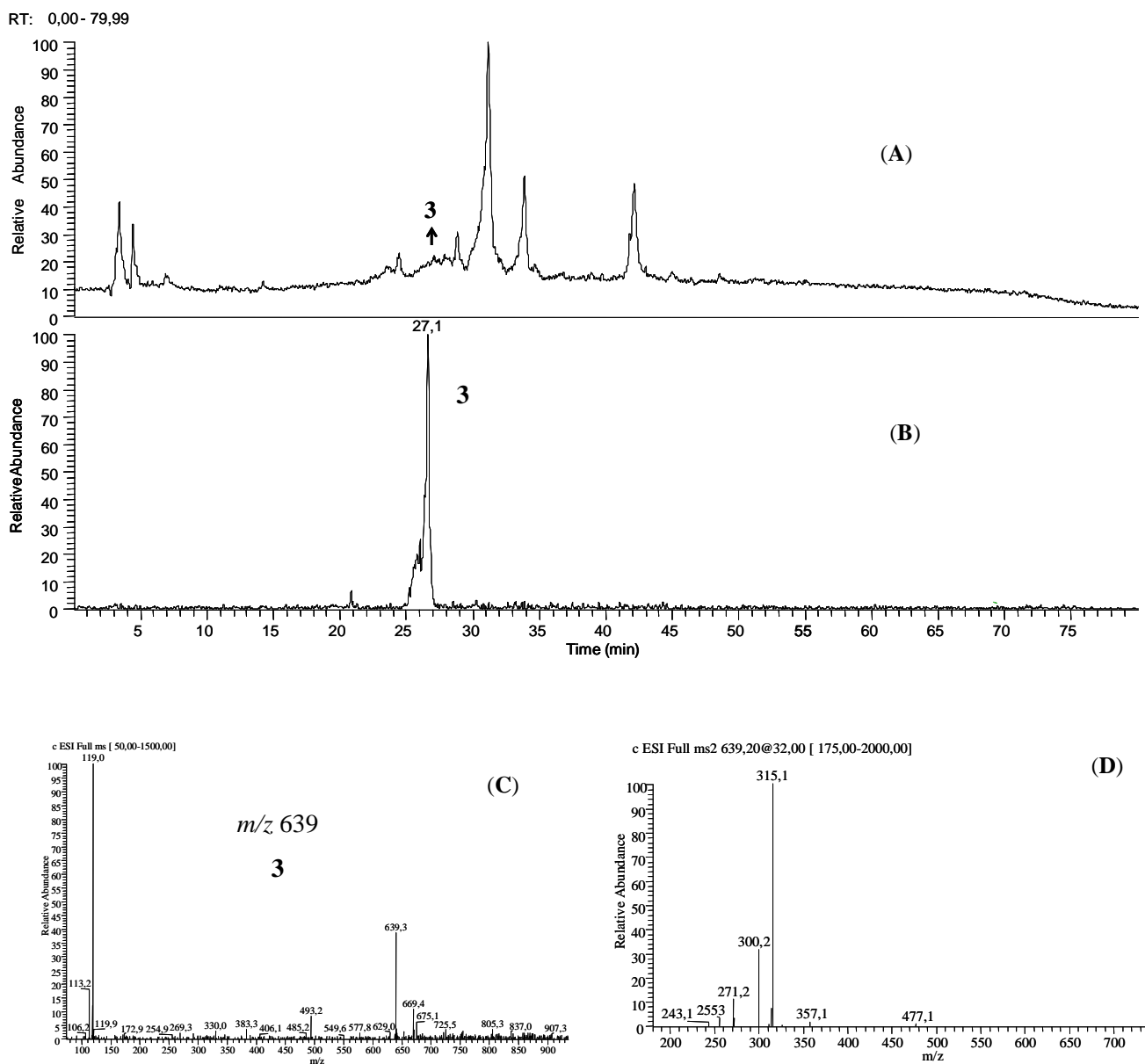
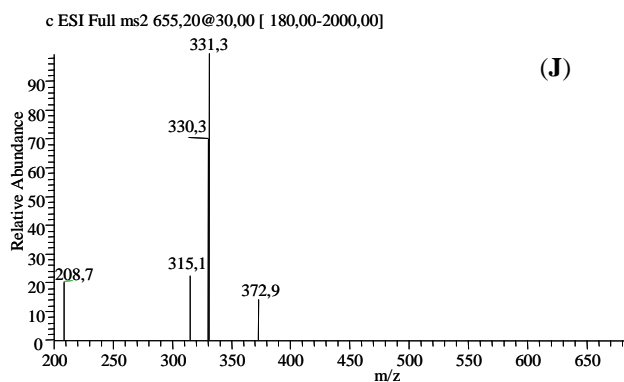
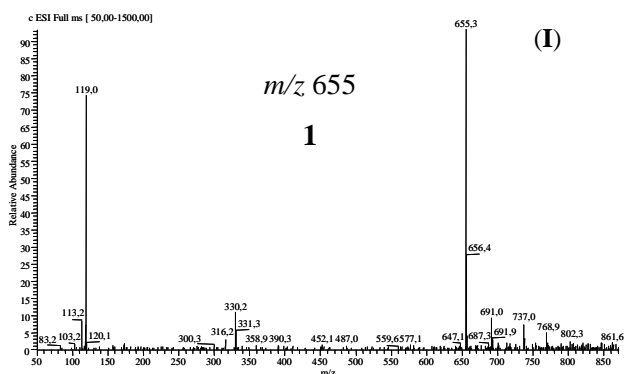
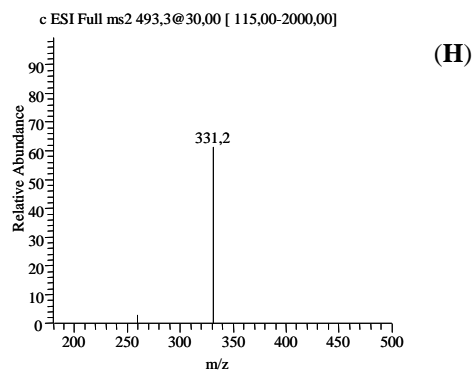
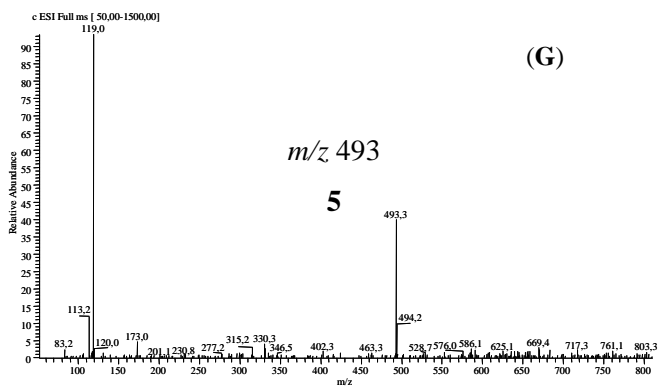
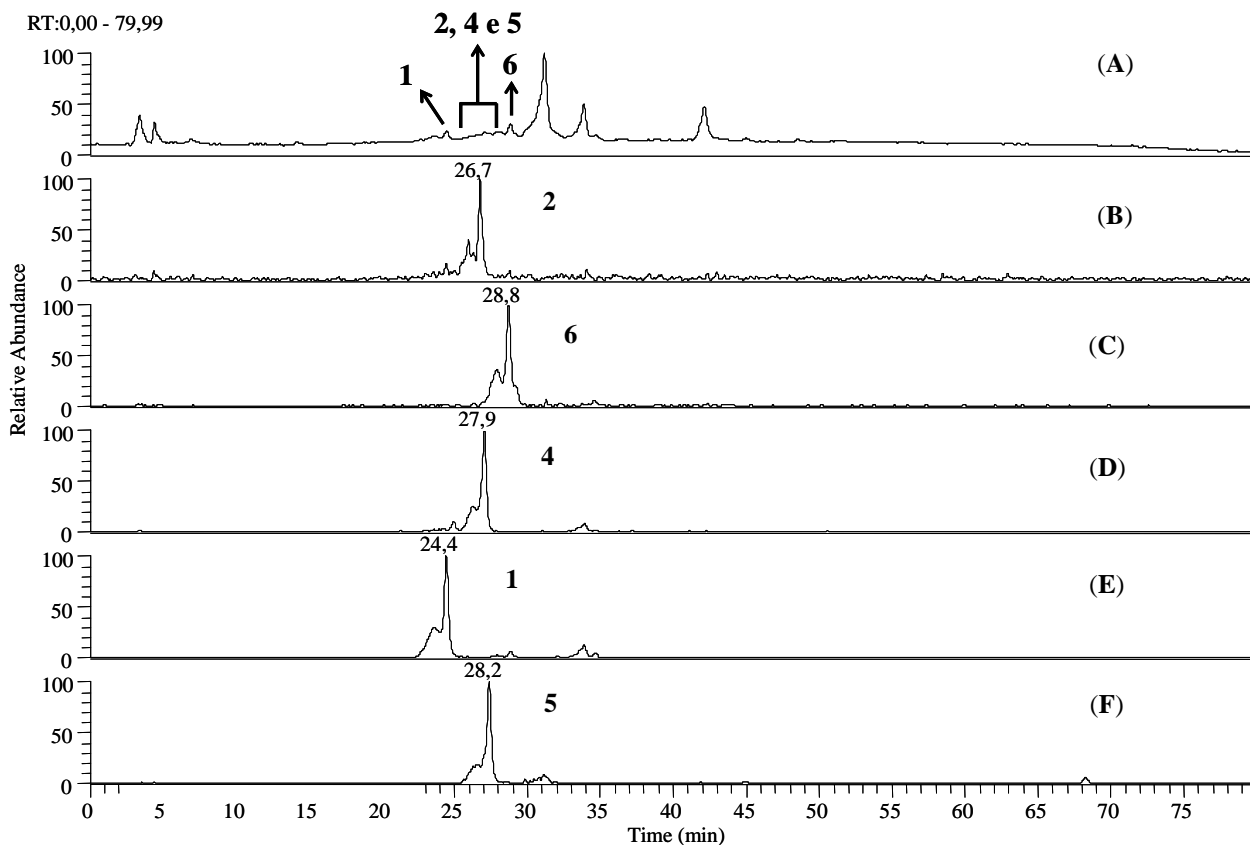


Figura 5.4. (A) Análise por HPLC-ESI-MSⁿ (modo negativo) dos derivados da luteolina presentes no Ex-MeOH dos capítulos de *E. ligulatum*. Cromatograma dos íons extraídos (B) m/z 639. (C) Espectro de massas do pico 3 (T_R 27,1 min) e (D) fragmentação do íon precursor de m/z 639.



Cotinha na próxima página

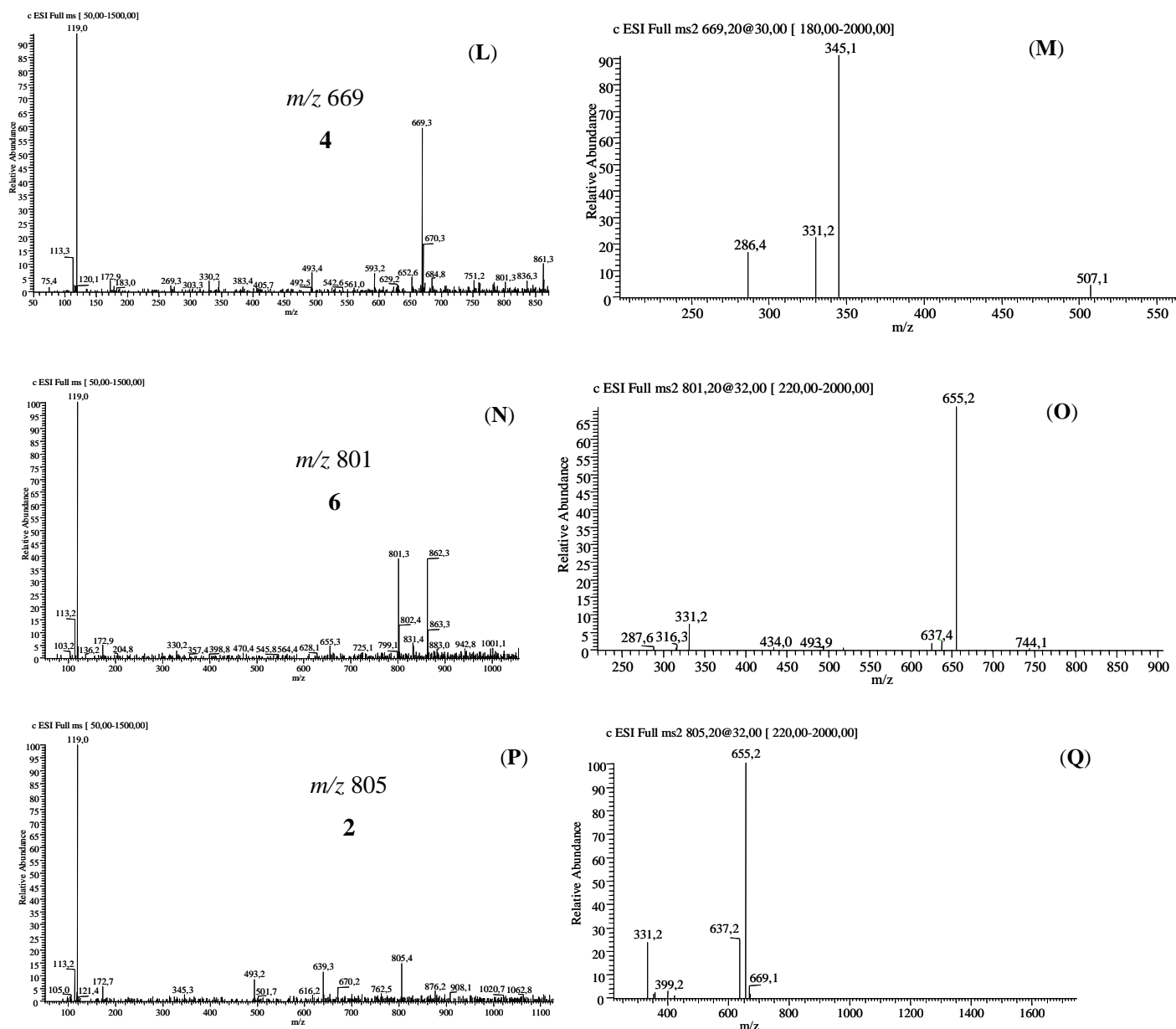


Figura 5.5. (A) Análise por HPLC-ESI-MSⁿ (modo negativo) dos derivados da quercetina presentes no Ex-MeOH dos capítulos de *E. ligulatum*. Cromatograma dos íons extraídos (B) m/z 805, (C) m/z 801, (D) m/z 669, (E) m/z 655 e (F) m/z 493. (G) Espectro de massas do pico 5 (T_R 28,2 min) e (H) fragmentação do íon precursor de m/z 493. (I) Espectro de massas do pico 1 (T_R 24,4 min) e (H) fragmentação do íon precursor de m/z 655. (L) Espectro de massas do pico 4 (T_R 27,9 min) e (M) fragmentação do íon precursor de m/z 669. (N) Espectro de massas do pico 6 (T_R 28,8 min) e (O) fragmentação do íon precursor de m/z 801. (P) Espectro de massas do pico 2 (T_R 26,7 min) e (Q) fragmentação do íon precursor de m/z 805.

Outra classe de substâncias analisadas foi a dos derivados das naftopiranonas, comuns em espécies da família Eriocaulaceae (Vilegas *et al.*, 1999a).

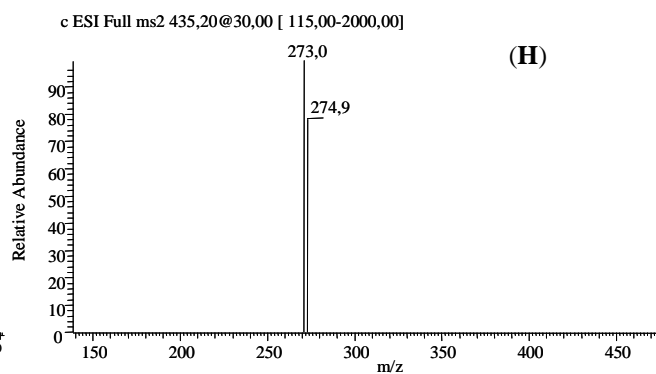
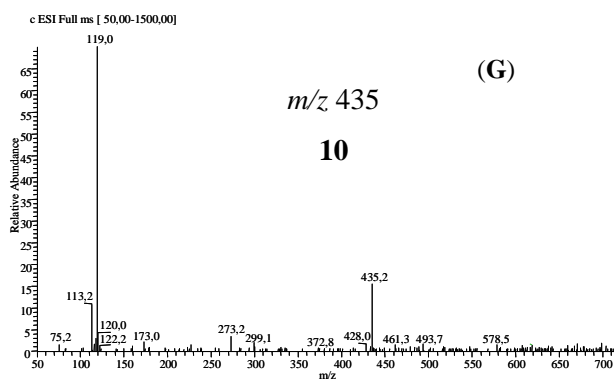
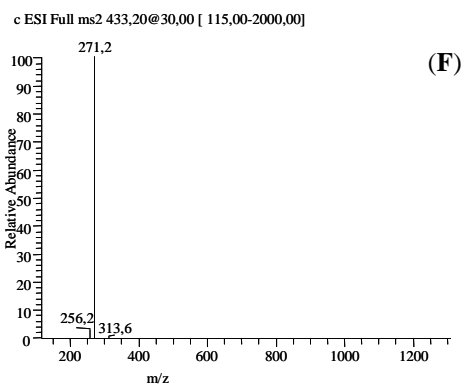
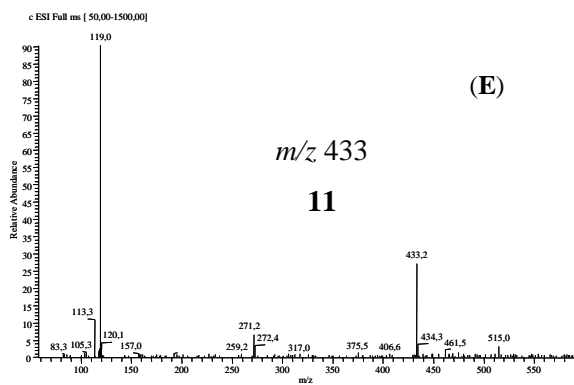
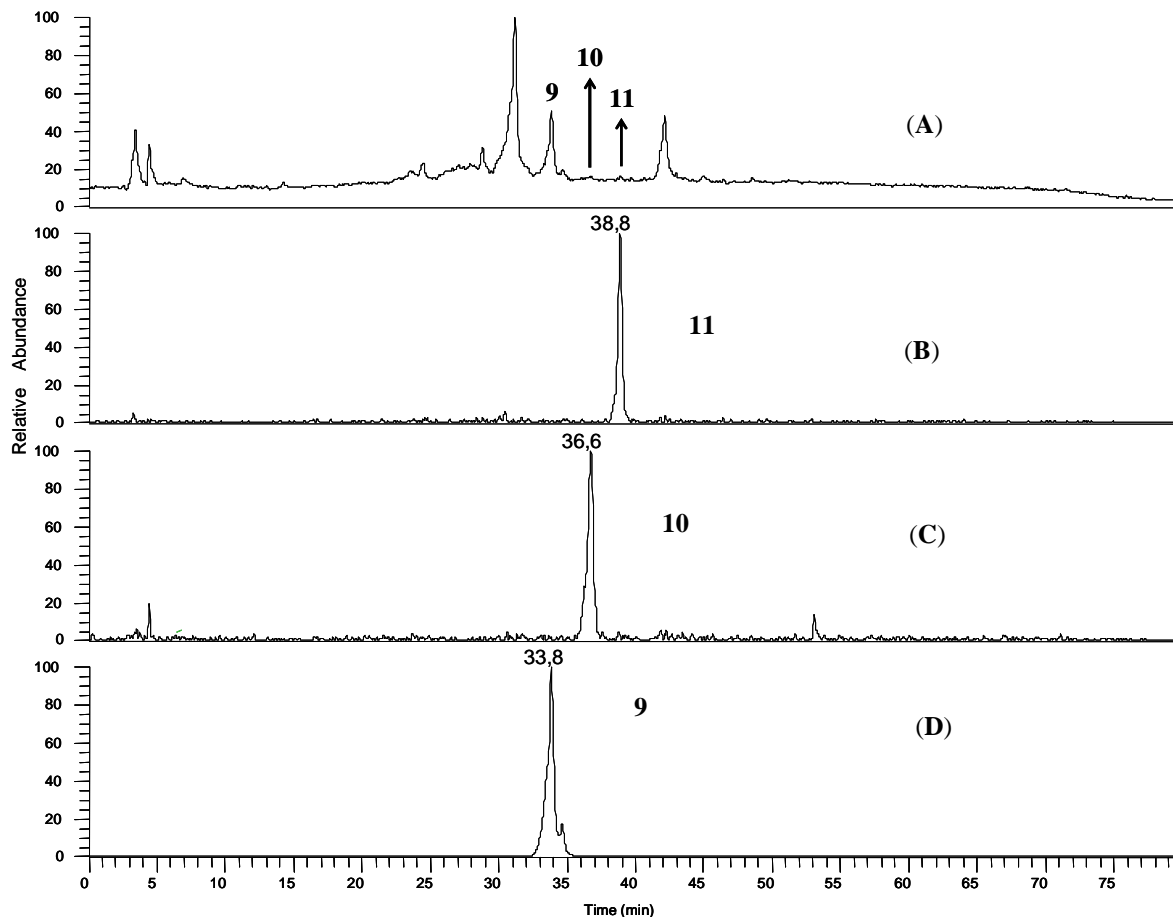
O pico **11** (T_R 38,8 min) apresentou sinal da molécula desprotonada $[M-H]^-$ em m/z 433 (Fig. 5.6, Tab. 5.2). Fragmentação de segunda-ordem gerou os sinais de m/z 271 $[M-162-H]^-$ e m/z 256 $[M-162-CH_3-H]^-$, compatíveis com um derivado da paepalantina ligada a uma unidade de hexose, similar à 10-hidroxi-7-metoxi-1H-nafto[2,3c]piran-1-ona-9-*O*- β -D-glicopiranosídeo (**11**), isolada de *P. speciosus* (Garcia, 1997).

O pico **10** (T_R 36,6 min) apresentou sinal da molécula desprotonada $[M-H]^-$ em m/z 435. Fragmentação de segunda-ordem gerou o sinal de m/z 273 $[M-162-H]^-$, compatível com uma unidade de semi-vioxantina ligada a uma unidade de hexose, similar à 3,4-diidro-10-hidroxi-7-metoxi-3-(*R*)-metil-1H-3,4-diidronafto-[2,3c]-piran-1-ona-9-*O*- β -D-glicopiranosídeo (**10**), isolada de *P. latipes* (Vilegas *et al.*, 1999a).

O pico **9** (T_R 33,8 min) apresentou sinal da molécula desprotonada $[M-H]^-$ em m/z 595. Fragmentação de segunda-ordem gerou os sinais de m/z 433 $[M-162-H]^-$ e m/z 271 $[M-162-162-H]^-$, compatíveis com um derivado da paepalantina ligada a duas unidades de hexose, similar à 10-hidroxi-7-metoxi-3-(*R*)-metil-1H-nafto[2,3c]piran-1-ona-9-*O*- β -D-glicopiranosil(1'' \rightarrow 6')- β -D-alopiranosídeo (**9**), isolada de *P. chlorocephalus* e *P. macrocephalus* (Dokkedal, 2000).

Assim, os resultados obtidos permitiram identificar doze substâncias no extrato metanólico de *E. ligulatum*. Destas, as substâncias **7**, **8** e **12** já tinham sido isoladas do extrato usando técnicas cromatográficas clássicas (Silva *et al.*, 2007). Os outros flavonóides identificados por HPLC-MS não foram isolados dos extratos da espécie. Quantos às naftopiranonas, Santos *et al.* (2005), isolou paepalantina-9-*O*- β -D-glicopiranosídeo (**11**) e a paepalantina-9-*O*- β -D-glicopiranosil(1'' \rightarrow 6')- β -D-alopiranosídeo (**9**) do extrato metanólico dos capítulos de *E. ligulatum*. Com a utilização do HPLC-MS foi possível identificar derivados da paepalantina sem a presença da metoxila na posição 5 (**9** e **11**) e um derivado da semi-vioxantina (**10**). Esta naftopiranonona (**10**), identificadas por HPLC-MS não foi, até o momento, isolada do extrato metanólico dos capítulos de *E. ligulatum*.

RT :0,00 - 79,99



Continua na próxima página

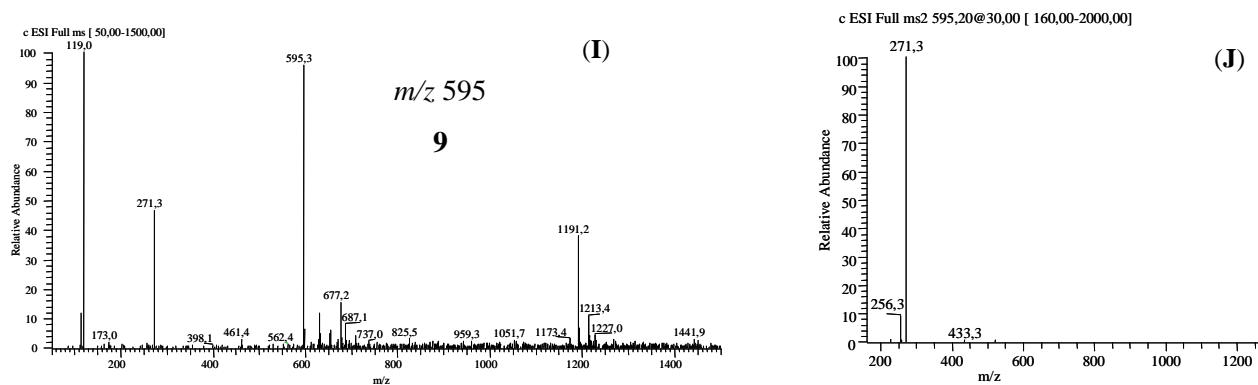


Figura 5.6. (A) Análise por HPLC-ESI-MSⁿ (modo negativo) dos derivados de naftopiranonas presentes no Ex-MeOH dos capítulos de *E. ligulatum*. Cromatograma dos íons extraídos (B) m/z 433, (C) m/z 435 e (D) m/z 595. (E) Espectro de massas do pico 11 (T_R 38,8 min) e (F) fragmentação do íon precursor de m/z 433. (G) Espectro de massas do pico 10 (T_R 36,6 min) e (H) fragmentação do íon precursor de m/z 435. (I) Espectro de massas do pico 9 (T_R 33,8 min) e (J) fragmentação do íon precursor de m/z 595.

Análises por FIA-ESI-IT-MS dos extratos metanólicos de *Syngonanthus* spp

Realizou-se a caracterização química dos metabólitos do Ex-MeOH dos capítulos de *Syngonanthus suberosus* e *Syngonanthus dealbatus* utilizando a técnica de ESI-IT-MS/MS empregando o modo de inserção direta.

O preparo da amostra consistiu na solubilização do extrato metanólico em metanol. A quantidade de extrato utilizada foi o suficiente para obter uma solução de concentração de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$. Esta solução foi filtrada em uma membrana de PTFE com poros de $0,45 \mu\text{m}$. A solução obtida foi introduzida diretamente na fonte de ESI por meio de uma seringa de vidro impulsionada por um sistema de bombeamento em fluxo de $5 \mu\text{L min}^{-1}$.

Fragmentação de segunda ordem (MS/MS) para cada um dos íons mais representativos levou à identificação de metabólitos, observando a presença de flavonóides C-glicosilados. Estes são comuns no gênero *Syngonanthus* (Ricci *et al*, 1996; Bonfim, 1993; Coelho, 2000).

Em flavonóides C-glicosilados, o açúcar é ligado diretamente no núcleo do flavonóide por uma ligação C–C, dificilmente clivada, sendo que a sua principal característica química é a resistência à hidrólise ácida. Em flavonóides O-glicosilados a ligação O–C é mais susceptível à clivagem. Análises por ESI-MS/MS fornecem subsídios que permitem a caracterização de O- e C-glicosídeos em ambos os modos de ionização (negativo e positivo). Para flavonóides C-glicosilados, a via de fragmentação preferencial é aquela que se baseia na clivagem interna da unidade sacarídica (Fig. 5.7). Os flavonóides O-glicosilados, a eliminação intacta da unidade sacarídica é favorecida, conforme demonstrado na Fig. 5.8 (Cuyckens & Claeys, 2004).

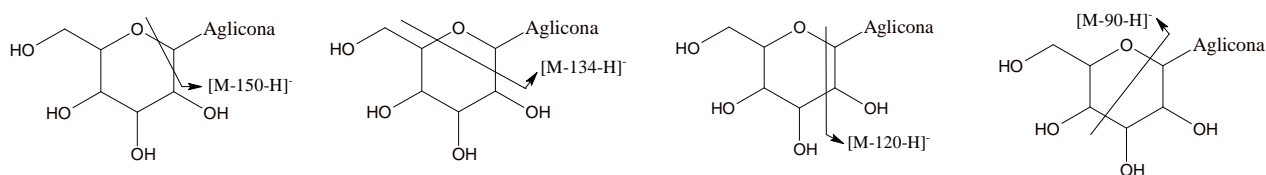


Figura 5.7. Íons produtos característicos formados pela clivagem de uma C-glicosídeo (baseado em Cuyckens & Claeys, 2004).

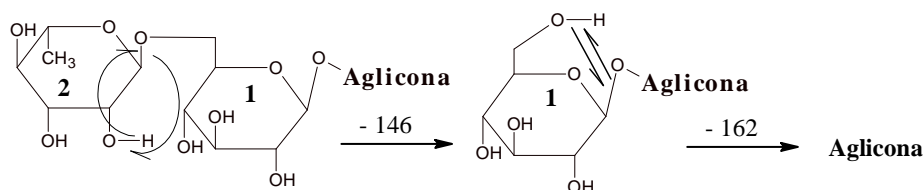


Figura 5.8. Formação dos íons originados da clivagem de uma O-glicosídeo. O hidrogênio da hidroxila do açúcar participa do rearranjo no momento da clivagem da unidade sacarídica (baseado em Cuyckens & Claeys, 2004).

Nos flavonóides *O*-glicosilados a quebra da ligação O–C pode sofrer um rearranjo com o hidrogênio da hidroxila da unidade sacarídica acarretando sua eliminação, isto é, perdas de 162 u (hexose), 146 u (deoxiexose) e 132 u (pentose) (Fig. 5.8). Estas informações possibilitam a determinação da seqüência das unidades de açúcares presentes nas agliconas.

Os *C*-glicosídeos podem também perder moléculas de água devido à interação por ligação de hidrogênio das hidroxilas das unidades sacarídicas com as hidroxilas presentes na aglicona (Cuyckens & Claeys, 2004). Isto acontece quando a unidade sacarídica estiver ligada na posição 6 do anel A do flavonóide, conforme demonstra o esquema representado pela figura 5.9.

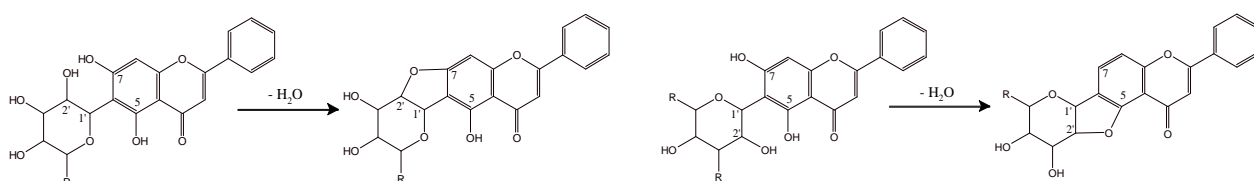


Figura 5.9. Perda de moléculas de água observadas em flavonóides *C*-glicosídeos (baseado em Cuyckens & Claeys, 2004).

A tabela 5.3 mostra os principais fragmentos das substâncias encontradas nos extratos metanólico dos capítulos de *S. suberosus* e *S. dalbatus*. A fragmentação encontrada está de acordo com a proposta de moléculas *C*-glicosiladas, onde foram observadas as fragmentações internas das unidades sacarídicas. Além da presença majoritária de *C*-glicosídeos, detectamos também flavonóides *O*- e *C*-glicosilados, evidenciados pela perda intacta da unidade sacarídica, conforme indicada na figura 5.8.

Conforme apresentado na tabela 5.3, as propostas de estruturas para as substâncias 3, 4, 6, 7, 8 e 12 apresentam-se como *O*-glicosídeo e ligação C–O entre as unidades sacarídicas, devido à perda de unidades 146 u, 162 u e 132 u (Cuyckens & Claeys, 2004).

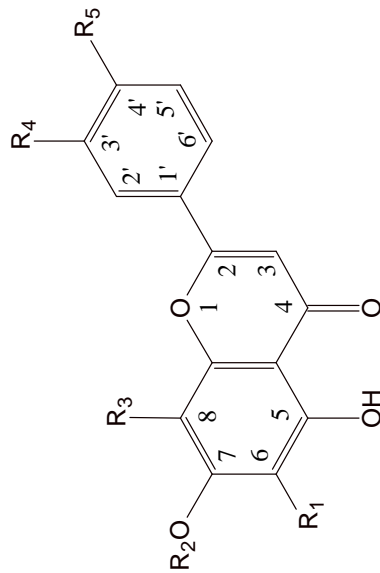
A proposta da presença de flavonóides *C*-glicosilados foi baseada considerando-se os fragmentos internos (perdas de 150 u, 134 u, 120 u e 90 u) para as substâncias 2-7 e a 9-12 (Cuyckens & Claeys, 2004).

Segundo Iwashina (2000), nos gêneros *Prunus* (Rosaceae), *Primula* (Primulaceae), *Pityrogramma* (Pteridophytes), *Cheilanthes* (Pteridophytes), *Notholeana* (Pteridophytes), *Alnus* (Betulaceae), *Betula* (Betulaceae), *Nitella* (Characeae) e *Ostrya* (Betulaceae) é comum a presença de flavonas substituídos por *C*- e *O*-glicosídeos ligados na mesma aglicona. A presença desses metabólitos também foi constatada em *Takakia lepidozoides* e *Takakia ceratophylla*, pertencente às briófitas (Markham & Potter, 1979).

Em Eriocaulaceae, flavonas do tipo C– e O–glicosídeos ligados na mesma agliconas foram isoladas e identificadas da espécie de *Syngonanthus bisulcatus* (Coelho, 2000), como por exemplo as moléculas **9**, **10**, **11**, **12** e **13** (referente a Tab. 1.3, pág. 32). Dentre os gêneros estudados, somente *Syngonanthus* apresentou este tipo de flavonas. Essa informação é relevante, pois até o momento a presença de flavonas C– e O–glicosiladas se mostra predominante no gênero *Syngonanthus*. Estes dados podem vir a ser úteis nos estudos quimiotaxonômicos dos gêneros à Eriocaulaceae.

Tabela 5.3. Substâncias identificadas e os principais fragmentos do Ex-MeOH dos capítulos de *S. suberosus* e *S. dealbatus* obtidos por FIA-ESI-IT-MS. [] molécula da figura 5.10.

Substância	Fórmula molecular (Peso molecular)	[M-H] ⁻	Principais fragmentos MS/MS (m/z)
<i>Syngonanthus suberosus</i>			
Apigenina (1)	C ₁₅ H ₁₀ O ₆ (286)	285	267 = [M-18-H] ⁻ , 257 = [M-28-H] ⁻ , 243 = [M-42-H] ⁻
7-metoxiapigenina-6-C-hexose (2)	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀ (446)	445	427 = [M-18-H] ⁻ , 355 = [M-90-H] ⁻ , 325 = [M-120-H] ⁻ , 297 = [M-120-28-H] ⁻ , 282 = [M-134-28-H] ⁻
4'-metoxiapigenina-6-C-hexose, 7-O-pentose (3)	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄ (578)	577	457 = [M-120-H] ⁻ , 445 = [M-132-H] ⁻ , 427 = [M-150-H] ⁻ , 307 = [M-150-120-H] ⁻ , 293 = [M-150-134-H] ⁻
4'-metoxiapigenina-6-C-hexose(1''' → 6'')-O-desoxihexose (4)	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₄ (592)	591	471 = [M-120-H] ⁻ , 445 = [M-146-H] ⁻ , 427 = [M-146-18-H] ⁻ , 397 = [M-146-18-30-H] ⁻ , 325 = [M-146-120-H] ⁻ , 307 = [M-146-18-120-H] ⁻
4'-metoxiapigenina-6-C-hexose, 8-C-hexose (5)	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅ (608)	607	592 = [M-15-H] ⁻ , 487 = [M-120-H] ⁻ , 475 = [M-120-H] ⁻ , 457 = [M-C ₉ H ₈ O-H] ⁻ , 457 = [M-150-H] ⁻ , 442 = [M-150-15-H] ⁻ , 427 = [M-150-30-H] ⁻ , 355 = [M-134-28-90-H] ⁻ , 337 = [M-150-120-H] ⁻ , 323 = [M-150-134-H] ⁻ , 307 = [M-150-150-H] ⁻
Apigenina-6-C-hexose(1''' → 6'')-O-desoxihexose, 8-C-desoxihexose (6)	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₈ (724)	723	577 = [M-146-H] ⁻ , 573 = [M-150-H] ⁻ , 559 = [M-146-18-H] ⁻ , 427 = [M-150-146-H] ⁻ , 293 = [M-150-146-134-H] ⁻
4'-metoxiapigenina-6-C-hexose(1''' → 6'')-O-desoxihexose, 8-C-hexose (7)	C ₃₄ H ₄₂ O ₁₉ (754)	753	735 = [M-18-H] ⁻ , 603 = [M-150-H] ⁻ , 573 = [M-150-30-H] ⁻ , 457 = [M-150-146-H] ⁻ , 323 = [M-150-146-134-H] ⁻
<i>Syngonanthus dealbatus</i>			
Apigenina-7-O-desoxihexose (8)	C ₂₁ H ₂₀ O ₉ (416)	415	397 = [M-18-H] ⁻ , 269 = [M-146-H] ⁻
Luteolina-6-C-hexose (9)	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁ (448)	447	429 = [M-18-H] ⁻ , 357 = [M-90-H] ⁻ , 327 = [M-120-H] ⁻ , 285 = [M-134-28-H] ⁻
7-metoxiluteolina-6-C-hexose (10)	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁ (462)	461	443 = [M-18-H] ⁻ , 371 = [M-90-H] ⁻ , 341 = [M-120-H] ⁻ , 313 = [M-120-28-H] ⁻ , 298 = [M-120-28-15-H] ⁻
Apigenina-6-C-hexose, 8-C-hexose (11)	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅ (594)	593	575 = [M-18-H] ⁻ , 503 = [M-90-H] ⁻ , 473 = [M-120-H] ⁻ , 383 = [M-120-90-H] ⁻ , 485 = [M-90-18-H] ⁻
4'-metoxiapigenina-6-C-hexose(1''' → 6'')-O-hexose (12)	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅ (608)	607	531 = [M-28-18-30-H] ⁻ , 513 = [M-28-18-30-18-H] ⁻ , 445 = [M-162-H] ⁻ , 355 = [M-162-90-H] ⁻ , 295 = [M-162-150-H] ⁻



Substância	N°	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Apigenina	(1)	H	H	H	H	OH
7-metoxiapigenina-6-C-glicopiranosídeo	(2)	-Glic	CH ₃	H	H	OH
4'-metoxiapigenina-6-C-glicopiranosídeo, 7-O-xilofuranosídeo	(3)	-Glic	Xil	H	H	OCH ₃
4'-metoxiapigenina-6-C-glicopiranosil(1''' → 6'')-O-rhamnofuranosídeo	(4)	-Glic-O-Rham	H	H	H	OCH ₃
4'-metoxiapigenina-6-C-glicopiranosídeo, 8-C-glicopiranosídeo	(5)	-Glic	H	-Glic	H	OCH ₃
Apigenina-6-C-glicopiranosil(1''' → 6'')-O-rhamnofuranosídeo, 8-C-rhamnofuranosídeo	(6)	-Glic-O-Rham	H	-Rham	H	OH
4'-metoxiapigenina-6-C-glicopiranosil(6''' → 1''')-O-rhamnofuranosídeo, 8-C-glicopiranosídeo	(7)	-Glic-O-Rham	H	-Glic	H	OCH ₃
Apigenina-7-O-glicopiranosídeo	(8)	H	-Glic	H	H	OH
Luteolina-6-C-glicopiranosídeo	(9)	-Glic	H		OH	OH
7-metoxiluteolina-6-C-glicopiranosídeo	(10)	-Glic	H	H	OH	OCH ₃
Apigenina-6-C-glicopiranosídeo, 8-C-glicopiranosídeo	(11)	-Glic	H	-Glic	H	OH
4'-metoxiapigenina-6-C-glicopiranosil(1''' → 6'')-O-glicopiranosídeo	(12)	-Glic-O-Glic	H	H	H	OCH ₃

Legenda: Glic → Glicopiranosídeo; Rham → Rhamnofuranosídeo; Xil → xilofuranosídeo.

Figura 5.10. Moléculas propostas no estudo do extrato metanólico dos capítulos de *S. suberosus* e *S. dealbatus* por FIA-ESI-IT-MS.

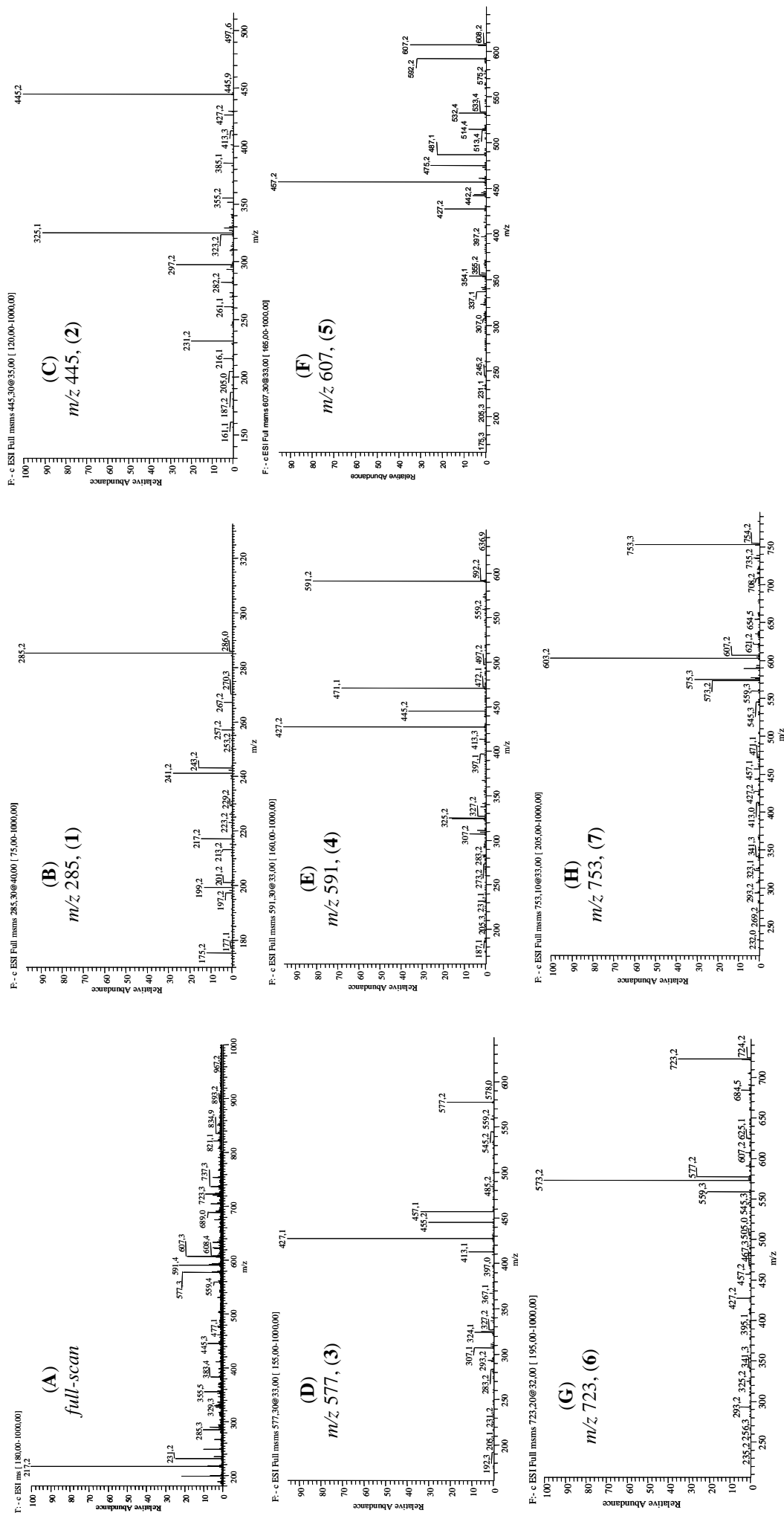


Figura 5.11. (A) Espectros de massas de primeira-ordem, em modo *full-scan*, do Ex-MeOH dos capítulos de *S. suberosus* avaliado em modo negativo. Espectros de massas de segunda-ordem dos íons precursores (B) m/z 285, (C) m/z 445, (D) m/z 577, (E) m/z 591, (F) m/z 607, (G) m/z 723 e (H) m/z 753, obtidos em modo negativo. Para condições experimentais veja: Anexo parte experimental. Legenda: () número da molécula proposta descrita na figura 5.10.

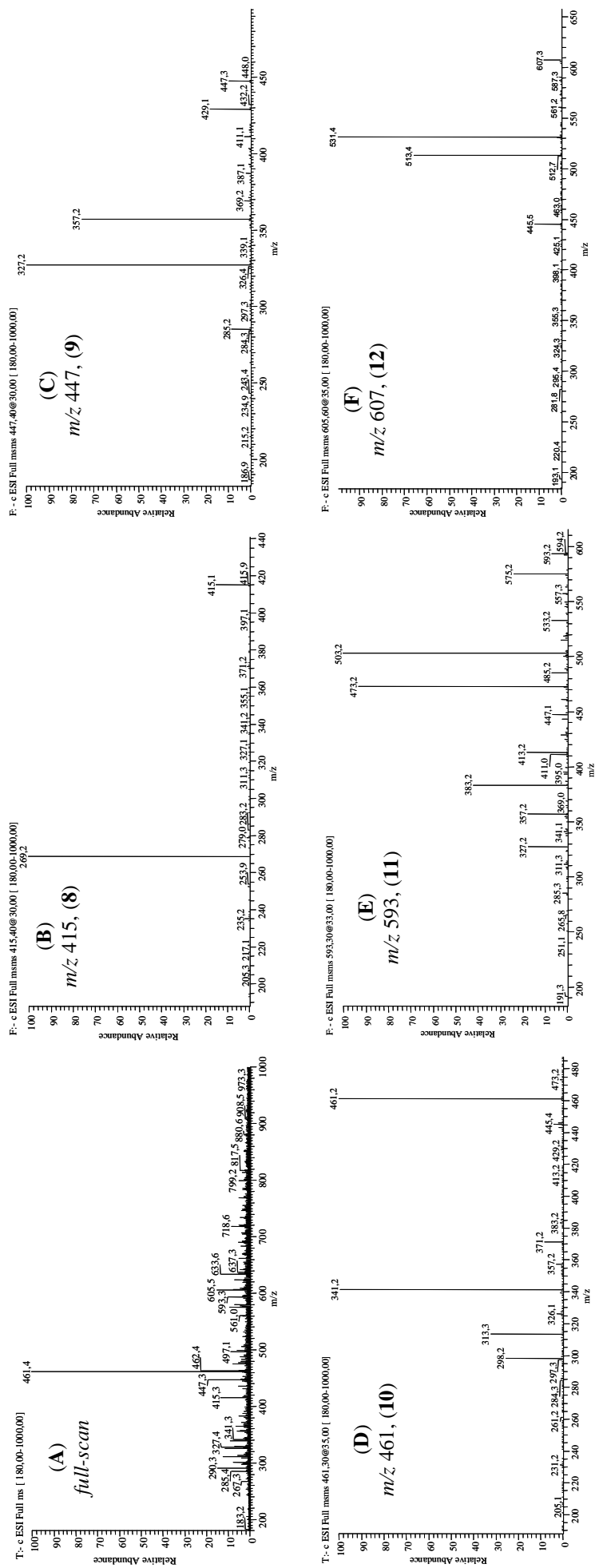


Figura 5.12. (A) Espectros de massas de primeira-ordem, em modo *full-scan*, do Ex-MeOH dos capítulos de *S.dealbatuss* avaliado em modo negativo. Espectros de massas de segunda-ordem dos íons precursores (B) m/z 415, (C) m/z 447, (D) m/z 461, (E) m/z 593 e (F) m/z 607, obtidos em modo negativo. Para condições experimentais veja: Anexo parte experimental. Legenda: () número da molécula proposta descrita na figura 5.10.

6. Ensaaios Químicos e Biológicos

Ensaio biológicos

O ensaio da atividade mutagênica foi realizado no Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas Araraquara – Unesp, sob a orientação da Prof^a Dr^a Eliana Aparecida Varanda.

Os ensaios biológicos de toxicidade aguda e “screening” hipocrático, atividade antiúlcera e motilidade intestinal foram realizados no Laboratório de Farmacologia do Instituto de Biociências de Botucatu – Unesp, sob a orientação da Prof^a Dr^a Clélia Akiko Hiruma-Lima. Todos os experimentos obedeceram a protocolos experimentais (nº 017, 018, 019, 020, 021 e 022/04-CEEA; nº 018 e 019/05-CEEA) aprovados, previamente, pela Comissão de Ética na Experimentação Animal do Instituto de Biociências da Unesp – Botucatu.

Teste da toxicidade aguda e “screening” hipocrático

Este estudo tem como objetivo efetuar uma avaliação preliminar e uma estimativa das propriedades tóxicas de substâncias. No caso do extrato bruto de *E. ligulatum*, visa fornecer informações acerca dos riscos para a saúde, resultante de uma exposição de curta duração, administrado pela via oral.

Os camundongos *Swiss* foram divididos em dois grupos de animais adultos e sadios (10 machos e 10 fêmeas nulíparas e não grávidas). Os animais foram tratados com uma dose única de 5000 mg/Kg por animal e o grupo controle tratado com salina (10 mL/Kg) por via oral. Logo em seguida à administração, os animais foram observados durante 30, 60, 120, 240 e 360 minutos seguindo parâmetros comportamentais descritos por Souza Brito, 1994. Após essas observações preliminares, os animais foram acompanhados por um período de 15 dias; nesse período, diariamente foi avaliada a ocorrência de morte, alterações no peso corporal, no pêlo e nas mucosas, assim como a presença de diarréias, estereotipia, convulsões ou estado de depressão ou estimulação central. Ao final do ensaio os animais foram sacrificados e alguns órgãos foram biopsiados. Fígado, pulmão, coração, baço e rins foram removidos, analisados macroscopicamente quanto à forma e a uma possível coloração diferente dos órgãos dos animais controles. Os órgãos foram também pesados para avaliar possíveis alterações em relação ao grupo controle. A metodologia utilizada foi descrita por Souza Brito, 1994.

Tabela 6.1. Avaliação do efeito tóxico agudo do Ex-MeOH dos capítulos de *E. ligulatum*.

Tratamento ⁺	n	Fígado*	Coração*	Pulmões*	Rins*	Baço*
Fêmeas						
Salina	10	12,78 ± 0,13	3,98 ± 0,07	4,70 ± 0,09	5,65 ± 0,05	3,53 ± 0,09
Ex-MeOH	10	12,00 ± 0,35	4,13 ± 0,10	4,57 ± 0,10	5,41 ± 0,10	3,72 ± 0,13
Machos						
Salina	10	12,62 ± 0,35	3,87 ± 0,05	4,39 ± 0,06	6,35 ± 0,11	3,27 ± 0,12
Ex-MeOH	10	12,44 ± 0,30	3,85 ± 0,04	4,15 ± 0,05	6,44 ± 0,15	3,39 ± 0,12

+ O tratamento dos animais foi de 5000 mg/Kg por via oral em dose única. * Dados da razão do peso dos órgãos dividido pelo peso corpóreo. Valores expressos em média (g) ± desvio padrão. Análise estatística entre os grupos: teste “t” de Student.

Após o teste “t” de Student, verificou-se a não existência de diferença significativa ($p > 0.05$) entre os grupos de animais tratados com salina e aqueles tratados com o Ex-MeOH dos capítulos de *E. ligulatum* (Tab. 6.1). A sobrevivência de todos os animais e a ausência de quaisquer alterações morfológicas nos órgãos indica que o Ex-MeOH bruto não apresentou sinal de toxicidade em camundongos machos e fêmeas quando administrados em uma única dose de 5000 mg/Kg, por via oral.

O monitoramento diário dos pesos dos animais não indicou variação em relação ao controle negativo (Fig. 6.1).

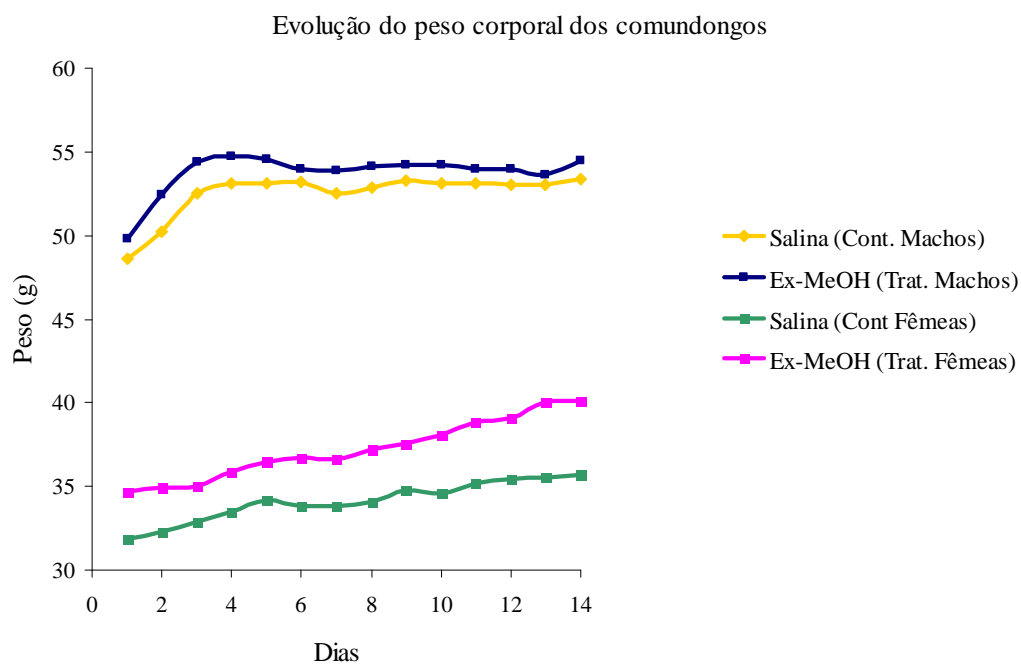


Figura 6.1. Evolução do peso corporal de camundongos machos e fêmeas tratados com Ex-MeOH dos capítulos de *E. ligulatum* (5000 mg/Kg) e salina, submetidos ao modelo de toxicidade aguda.

O estudo da toxicidade pré-clínica deve indicar qual o grau de confiança a ser depositado em um preparado farmacêutico a ser administrado à espécie humana.

De acordo com Souza-Brito (1994), em experimentos de validação dos efeitos antiulcerogênicos com plantas medicinais, pressupõe-se que para a dose de 1000 mg/Kg do extrato bruto exista uma correspondência de 10 % de concentração de substâncias ativas como cimetidina (100 mg/Kg), de 2% para similares ao omeprazol (20 mg/Kg) e de 0.1% para aquelas semelhantes ao misoprostol (1 mg/Kg). A partir desses dados, pode-se concluir que em 5000 mg/Kg haveria um aumento de 5 vezes da concentração desses compostos ativos teóricos presentes no extrato. Contudo, o extrato dos capítulos de *E. ligulatum* não apresentou efeito tóxico agudo aparente, com a administração de uma dose única de 5000 mg/Kg.

Para uma avaliação mais segura da toxicidade deste extrato, seria necessário verificar a sua ação frente à carcinogenicidade, mutagenicidade, embriofetotoxicidade e a sua toxicidade frente à fertilidade. Estes testes teriam que ser realizados com uma dose única (teste agudo) e com doses repetidas durante um determinado tempo (toxicidade crônica). Devemos ressaltar que estes ensaios são, primeiramente, feitos em animais de laboratório. Na ausência total de toxicidade aguda e crônica, passaria para testes de toxicidade a serem realizados em seres humanos. Depois de concluídos todos os testes referentes a avaliação da capacidade toxicológica do extrato, poderíamos concluir com segurança o poder toxicológico do extrato.

Motilidade intestinal

A motilidade intestinal é causada pelos movimentos peristálticos dos músculos lisos dos intestinos. Este ensaio visa obter informações se o material vegetal em estudo possui efeito em diminuir ou aumentar esses movimentos no intestino de camundongos.

A alteração da motilidade pode afetar pessoas que utilizam preparados de plantas medicinais em conjunto com medicamentos, geralmente de uso contínuo. Esta associação pode aumentar ou diminuir a biodisponibilidade dos mesmos, o que levar a uma alteração na farmacocinética da substância ativa no organismo. Este tipo de interação é muito comum, pois ainda se tem a convicção de que preparados oriundos de plantas não causam danos à saúde.

O método empregou camundongos *Swiss* com 25 dias de idade pesando entre 20 e 30 mg, em jejum por 24 horas e recebendo água *ad libitum*. O protocolo experimental seguido foi desenvolvido por Wong *et al* (1981). Os animais foram separados em grupos controles e grupos experimentais (10 animais cada). Os grupos experimentais foram tratados com o Ex-MeOH dos capítulos de *E. ligulatum* nas doses de 250, 500 e 1000 mg/Kg. O grupo do controle negativo foi tratado com solução fisiológica (10 mL/Kg) e o grupo do controle positivo foi tratado com uma solução de atropina (30 mg/Kg). Após 90 minutos da administração das doses do Ex-MeOH e dos controles positivo e negativo, cada animal recebeu 0,3 mL de suspensão de carvão ativo 10% em água. Passados 45 minutos da administração do carvão ativo, todos animais foram sacrificados fazendo-se a extirpação imediata do intestino desde o piloro até o início do ceco. Mediu-se o comprimento total do intestino e a distância percorrida pela suspensão de carvão (Tab. 6.2). O controle negativo apresentou a média da relação, distância percorrida pelo carvão ativo (marcador) dividido pelo tamanho total do intestino que foi de $0,71 \pm 0,17$, enquanto que no grupo tratado com a atropina esta média foi de $0,39 \pm 0,18$. Quando estes dados foram correlacionados estatisticamente com os resultados obtidos nas doses administradas, não mostraram diferenças estatísticas (Tab. 6.2), evidenciando que o Ex-MeOH de *E. ligulatum* não alterou a motilidade intestinal.

Tabela 6.2. Resultados do motilidade intestinal do Ex-MeOH dos capítulos de *E. ligulatum*.

Tratamento	Dose (mg/Kg)	n	P/T** (média ± DP)
Salina	---	09	$0,71 \pm 0,17$
Atropina	30	09	$0,39 \pm 0,18^*$
Ex-MeOH	250	10	$0,72 \pm 0,08$
Ex-MeOH	500	10	$0,76 \pm 0,13$
Ex-MeOH	1000	10	$0,83 \pm 0,09$

ANOVA $F_{(4,43)} = 16,22$ $p < 0,001$. Teste de Dunnett $*p < 0,05$.

**P/T = medida percorrida pelo carvão ativo (marcador) pela medida total do intestino dividido.

Avaliação da atividade gastroprotetora

Lesões Ulcerosas

Nos testes de atividade antiulcerogênica, os extratos brutos e/ou frações enriquecidas, fármaco padrão (cimetidina, lansoprazol ou carbenoxolona, os quais foram utilizados como controles positivos indicados em cada modelo de lesão gástrica) foram sempre administrados pela via mais adequada para cada modelo em concentrações estabelecidas em cada experimento. Foi utilizado ainda um grupo controle (negativo) que recebeu um volume equivalente de uma solução de salina 0,9 %. As amostras e os fármacos padrões utilizados nos testes foram dissolvidos em uma solução de salina 0,9 % (Hiruma-Lima, 1998).

Animais e leitura das lesões

Camundongos *Swiss* e ratos *Wistar*, mantidos em gaiola especial, sem maravalha, e submetidos a jejum de no mínimo 12 horas com água *ad libitum*, serão utilizados dependendo do modelo. Em todos os experimentos de indução de úlcera, após a morte, retirada do estômago e abertura pela curvatura maior, os mesmos foram prensados entre placas de vidro transparente e escaneados para posterior medição das áreas ulceradas com a utilização do programa AvSoft Bio View – Espectra.

Indução de úlcera por etanol absoluto

Baseado no modelo descrito por Morimoto *et al* (1991), ratos machos foram separados em grupos de 5 animais, para os seus respectivos tratamentos (salina, carbenoxolona 100 mg/Kg e Ex-MeOH dos capítulos e dos escapos na dose de 500 mg/Kg, além de doses variadas de frações enriquecidas obtidas do Ex-MeOH dos capítulos da espécie). Os tratamentos foram administrados por via oral, num volume de 10 mL/Kg. Decorridos 60 minutos do pré-tratamento, 1 mL do agente lesivo (etanol 99,5 %) foi aplicado (via oral) em todos os animais, que depois de 1 hora, foram sacrificados para a realização dos procedimentos de medição das áreas ulceradas.

Modelo de indução de úlcera por HCl/Etanol

Este método foi baseado no modelo descrito por Mizui & Doteuchi (1983) com modificações. Após 24 horas de jejum, com água *ad libitum*, os grupos experimentais, compostos por camundongos *Swiss* machos, receberam os respectivos tratamentos 50 minutos antes da indução da lesão gástrica por HCl/etanol. Os tratamentos foram: carbenoxolona 100 mg/Kg (controle positivo), salina 0,9 % (controle negativo) e o Ex-MeOH dos capítulos nas doses 250, 500 e 1000 mg/Kg; todos administrados por via oral, em dose volume final de 10 mL/Kg. Os agentes lesivos

foram administrados (v.o.) em volume de 0,2 mL de uma solução de 0,3 M HCl em etanol 60 %. Os animais foram sacrificados 1 hora após a administração do agente lesivo para a realização dos procedimentos de medição das áreas ulceradas.

Indução de úlcera por droga antiinflamatória não esteroidal (DAINE)

O experimento foi realizado segundo a metodologia descrita por Rainsford (1987) modificado. Foram utilizados camundongos *Swiss* machos, submetidos a jejum por um período de 36 horas com água *ad libitum*. As lesões gástricas foram induzidas pela administração de piroxicam na dose de 30 mg/Kg, por via subcutânea. Os tratamentos (v.o.) com o Ex-MeOH dos capítulos nas doses de 250, 500 e 1000 mg/Kg, cimetidina 30 mg/Kg (controle positivo) e salina 0,9 % (controle negativo) foram realizados 30 minutos antes da administração do agente indutor. Os animais foram sacrificados 4 horas após o estímulo lesivo. A medição das áreas ulceradas se deu conforme procedimento já descrito anteriormente.

Avaliação do envolvimento do óxido nítrico nas lesões gástricas

O método utilizado foi o descrito por Arrieta *et al* (2003). Foram utilizados ratos *Wistar* machos, estes submetidos a jejum por 24 horas com água *ad libitum*. Os animais foram divididos em 6 grupos, cada um contendo 5 animais. Os ratos foram pré-tratados, intraperitonealmente com L-NAME (N-nitro-L-arginine metil ester, inibe a enzima NO-sintase) 70 mg/kg ou com salina 0,9 %. Trinta minutos depois, receberam por via oral, salina (10 mL/Kg), controle positivo (carbenoxolona, 100 mg/Kg) ou Ex-MeOH dos capítulos (500 mg/Kg). Depois de 60 minutos todos os animais foram tratados com 1 mL de etanol absoluto (v.o.), para a indução de úlceras gástricas. Uma hora após a administração do etanol, os animais foram sacrificados e seus estômagos retirados para a realização dos procedimentos de medição das áreas ulceradas.

Avaliação da participação do grupamento sulfidril

Neste ensaio foi utilizada a metodologia descrita por Matsuda *et al* (1999). Ratos *Wistar* machos foram divididos em 6 grupos, cada um contendo 5 animais. Após jejum de 24 horas com água *ad libitum*, os grupos foram pré-tratados com salina ou com a droga NEM (N-etilmaleimida), 10 mg/Kg. A NEM apresenta a propriedade de quelar as pontes de dissulfetos, responsáveis pela manutenção da conformação da barreira mucosa, via intraperitoneal. Trinta minutos depois, receberam os tratamentos (v.o.): veículo (salina 0,9 %), carbenoxolona (100 mg/Kg) e Ex-MeOH dos capítulos (500 mg/Kg). Uma hora após a administração, os grupos foram tratados oralmente com 1 mL de etanol absoluto, para indução de úlceras gástricas. Após 1 hora os animais foram

sacrificados, os estômagos retirados para a realização dos procedimentos de medição das áreas ulceradas.

Modelo de indução de úlcera por ligadura do piloro

Este método foi baseado nos procedimentos descrito por Shay (1945). Foram utilizados camundongos *Swiss* machos, submetidos a jejum por um período de 24 horas com água *ad libitum*. Os camundongos foram separados em 5 animais para cada grupo. Estes foram anestesiados por intermédio da inalação de éter etílico. Com os animais anestesiados, realizou-se a ligadura do piloro através de uma incisão longitudinal logo abaixo da apófise xifóide, para a amarração do piloro e a administração dos tratamentos (salina 0,9 %, cimetidina 100 mg/Kg e Ex-MeOH dos capítulos na dose de 500 mg/Kg), todos em dose volume final de 10 mL/Kg, por via intraduodenal. Logo após os tratamentos, as incisões dos camundongos foram suturadas. Quatro horas após a cirurgia os animais foram sacrificados, e a incisão re-aberta e, após a ligadura da cárdia (para preservação do conteúdo estomacal), os estômagos foram retirado. O conteúdo estomacal foi coletado e, em seguida, foram determinados volume, pH e concentração de íons hidrogênios na secreção gástrica. Para a determinação dos íons hidrogênios, adicionou-se água até completar 10 mL e esta solução foi centrifugada por 10 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi titulado com NaOH 0,01 N, utilizando-se fenolftaleína como indicador. A concentração total de ácido em mg/mL foi calculada utilizando a equação:

$$[\text{ácida total}] = \frac{\text{fator } 1,825 \times \text{Vol. NaOH (mL)}}{\text{Vol. gástrico (mL)}}$$

Análise estatística

Os resultados foram expressos na forma de média \pm erro padrão da média. Os valores obtidos foram submetidos à análise de variância de uma via (one-way ANOVA) seguida do teste de Dunnett quando o número de grupos era maior que 2. No caso da análise entre dois grupos, recorreu-se ao teste “t” de Student não pareado (unpaired t test). A significância mínima considerada foi de $p < 0,05$.

As tabelas abaixo arrolam os resultados dos testes antiúlcera nos modelos descritos acima.

Tabela 6.3. Efeito do Ex-MeOH dos capítulos e dos escapos de *E. ligulatum* no modelo de EtOH absoluto.

Tratamento	Dose (mg/Kg)	n	Área total das lesões (mm ²)	% de proteção ¹	% de proteção comparada com o controle positivo (%) ²
Salina	---	05	166,20 ± 13,48	----	----
Carbenoxolona	100	05	39,00 ± 9,40**	76,54	----
Ex-MeOH escapos	500	05	79,60 ± 16,50**	52,11	68,08
Ex-MeOH capítulos	500	05	30,00 ± 12,30**	81,99	107,12

ANOVA $F_{(3,16)} = 2,59$ $p < 0,001$. Teste de Dunnett * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

¹Os valores em % representam a atividade protetora em relação ao grupo controle negativo

²Os valores em % representam a atividade protetora em relação ao grupo controle positivo

Tabela 6.4. Efeito do Ex-MeOH dos capítulos de *E. ligulatum* no modelo de HCl/EtOH.

Tratamento	Dose (mg/Kg)	n	Área total das lesões (mm ²)	% de proteção ¹	% de proteção comparada com o controle positivo (%) ²
Salina	---	07	51,94 ± 9,10	----	----
Carbenoxolona	100	08	10,55 ± 3,15**	79,69	----
Ex-MeOH	250	07	32,51 ± 9,60	37,41	46,94
Ex-MeOH	500	08	23,78 ± 6,41*	54,22	68,03
Ex-MeOH	1000	08	18,62 ± 6,51*	64,15	80,50

ANOVA $F_{(4,33)} = 5,24$ $p < 0,001$. Teste de Dunnett * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

¹Os valores em % representam a atividade protetora em relação ao grupo controle negativo

²Os valores em % representam a atividade protetora em relação ao grupo controle positivo

Tabela 6.5. Efeito do Ex-MeOH dos capítulos de *E. ligulatum* no modelo de DAINÉ.

Tratamento	Dose (mg/Kg)	n	Área total das lesões (mm ²)	% de proteção ¹	% de proteção comparada com o controle positivo (%) ²
Salina	---	09	20,55 ± 4,99	-----	----
Cimetidina	30	07	7,85 ± 2,09*	61,85	----
Ex-MeOH	250	07	10,00 ± 1,69	51,34	83,01
Ex-MeOH	500	08	6,62 ± 1,82*	67,79	109,60
Ex-MeOH	1000	08	4,50 ± 0,80**	78,10	126,27

ANOVA $F_{(4,34)} = 3,87$ $p < 0,001$. Teste de Dunnett * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

¹Os valores em % representam a atividade protetora em relação ao grupo controle negativo

²Os valores em % representam a atividade protetora em relação ao grupo controle positivo

Tabela 6.6. Efeito do Ex-MeOH dos capítulos de *E. ligulatum* no modelo de NO.

Tratamento	Dose (mg/Kg)	n	Área total das lesões (mm ²)	% de proteção ¹	% de proteção comparada com o controle positivo (%) ²
Salina	---	05	99,00 ± 19,66	----	----
Carbenoxolona	100	05	37,41 ± 8,29**	62,21	----
Ex-MeOH	500	05	33,40 ± 6,90**	66,27	106,53

ANOVA $F_{(2,12)} = 4,37$ $p < 0,001$. Teste de Dunnett ** $p < 0,01$.¹Os valores em % representam a atividade protetora em relação ao grupo controle negativo²Os valores em % representam a atividade protetora em relação ao grupo controle positivo**Tabela 6.7.** Efeito do Ex-MeOH dos capítulos de *E. ligulatum* no modelo de grupamento sulfidril não protéico.

Tratamento	Dose (mg/Kg)	n	Área total das lesões (mm ²)	% de proteção ¹	% de proteção comparada com o controle positivo (%) ²
Salina	---	05	306,00 ± 46,52	----	----
Carbenoxolona	100	05	90,25 ± 8,29**	70,51	----
Ex-MeOH	500	05	62,20 ± 14,57*	79,67	112,99

ANOVA $F_{(2,12)} = 9,35$ $p < 0,001$. Teste de Dunnett * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.¹Os valores em % representam a atividade protetora em relação ao grupo controle negativo²Os valores em % representam a atividade protetora em relação ao grupo controle positivo**Tabela 6.8** Efeito do Ex-MeOH dos capítulos de *E. ligulatum* no modelo de ligadura do piloro duodenal e oral.

Tratamento	Dose (mg/Kg)	n	pH	[H ⁺] (mEq [H ⁺] / mL / 4h)	Volume do conteúdo gástrico (mL)
Piloro duodenal					
Salina	---	09	3,37 ± 0,26	4,93 ± 0,32	0,85 ± 0,09
Cimetidina	100	08	5,00 ± 0,61*	3,21 ± 0,31*	0,87 ± 0,11
Ex-MeOH	500	09	3,00 ± 0,32	5,67 ± 0,57	0,79 ± 0,07
Piloro oral					
Salina	---	09	3,22 ± 0,40	8,19 ± 2,14	0,82 ± 0,10
Cimetidina	100	08	4,00 ± 0,59	5,30 ± 2,11	1,10 ± 0,17
Ex-MeOH	500	09	3,00 ± 0,32	9,76 ± 2,86	0,71 ± 0,15

ANOVA $F_{(2,23)} = 7,29$ $p < 0,001$. Teste de Dunnett * $p < 0,05$.

Tabela 6.9. Efeito das frações obtidas do Ex-MeOH dos capítulos de *E. ligulatum* no modelo de EtOH absoluto.

Tratamento	Dose (mg/Kg)	n	Área total das lesões (mm ²)	% de proteção ¹	% de proteção comparada com o controle positivo (%) ²
Salina	---	05	126,12 ± 35,73	----	----
Carbenoxolona	100	05	17,79 ± 6,69**	85,89	----
F.Fl. Aglic. ⁺	32,25	05	51,81 ± 8,12	58,92	68,60
F.Fl. Aglic. ⁺	64,50	05	69,32 ± 21,58	45,04	52,44
F.Fl. Aglic. ⁺	129,00	05	47,00 ± 31,82*	62,73	73,03
F.Fl. Glic. ⁺⁺	93,62	05	86,54 ± 18,76	31,38	36,54
F.Fl. Glic. ⁺⁺	187,25	05	53,36 ± 9,92	57,69	67,17
F.Fl. Glic. ⁺⁺	374,50	05	44,73 ± 12,19*	64,53	75,13
F.Fl. Glic. + F.Fl. Aglic. + F. Naf. ⁺⁺⁺	122,75	05	80,70 ± 7,98	36,01	41,93
F.Fl. Glic. + F.Fl. Aglic. + F. Naf. ⁺⁺⁺	245,50	05	51,02 ± 10,87*	59,55	69,33
F.Fl. Glic. + F.Fl. Aglic. + F. Naf. ⁺⁺⁺	491,00	05	35,85 ± 5,22*	71,57	83,33

ANOVA $F_{(10,45)} = 7,59$ $p < 0,001$. Teste de Dunnett * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

¹Os valores em % representam a atividade protetora em relação ao grupo controle negativo

²Os valores em % representam a atividade protetora em relação ao grupo controle positivo

⁺F.Fl. Aglic. – Fração de agliconas de flavonóides;

⁺⁺F.Fl. Glic. – Fração de flavonóides glicosilados;

⁺⁺⁺F.Fl. Glic. + F.Fl. Aglic. + F. Naf – Fração de flavonóides glicosilados + agliconas + naftopirranonas.

Os experimentos realizados para a avaliação dos efeitos gastroprotetores foram selecionados por envolverem diferentes agentes e mecanismos, conhecidos na indução de lesões gástricas. A formação de lesões úlceraivas em modelos experimentais, assim como as decorrentes em humanos envolvem a explicação clássica, de que elas são provocadas por um desequilíbrio entre os fatores protetores e lesivos da mucosa gástrica. Esse desequilíbrio pode ser induzido de diversas maneiras, seja por mecanismos de atuação nervosas, substâncias químicas ou pela realização de procedimentos cirúrgicos.

Os resultados obtidos (Tab. 6.3) mostram que a dose de 500 mg/kg de Ex-MeOH dos capítulos apresentou melhor efeito, com promoção de 81,99 % de proteção em relação ao grupo tratado com Ex-MeOH dos escapos que exerceu 52,11 % de proteção frente às lesões induzidas por etanol. Na triagem química dos dois extratos realizado no trabalho de Santos *et al* (2005), o extrato oriundo dos capítulos mostrou-se mais rico em metabólitos quando comparado com o extrato dos

escapos. Diante destes resultados biológico e químico, deu-se preferência para o estudo do extrato metanólico dos capítulos de *E. ligulatum*.

O Ex-MeOH dos capítulos apresentou efeito significativo nas doses 500 e 1000 mg/Kg, quando avaliado no modelo de indução de úlcera causado por HCl/EtOH. Obteve-se proteção de 54,22 % e 64,15 % (Tab. 6.4) em relação aos animais do controle negativo. A menor dose do extrato (250 mg/Kg) apresentou redução das lesões gástricas frente ao controle positivo, porém não expressou efeito de importância estatística. Observa-se que a redução da área total de lesão foi dose dependente.

Os modelos de indução de úlceras por HCl/EtOH e etanol absoluto provocam as lesões de maneira multifatorial e formam lesões necróticas na mucosa, pois estes dois agentes causadores de úlceras, são extremamente lesivos para com a mucosa gástrica. A solução de HCl/EtOH tem como um dos prováveis fatores de formação das lesões, a peroxidação lipídica das células epiteliais de maneira a provocar a sua necrose (Toma *et al*, 2004). No modelo de etanol absoluto, ocorre peroxidação lipídica, formação de radicais livres, estresse oxidativo intracelular, alterações na permeabilidade e despolarização da membrana mitocondrial que precedem à morte celular (Hirokawa, 1998; Bagchi *et al*, 1998; Repetto & Llesuy, 2002). O etanol é capaz de chegar à mucosa através do rompimento da barreira mucosa e suas ações celulares refletem em ruptura da parede dos vasos sanguíneos, sendo a causa das lesões hemorrágicas observadas nestes modelos (Mincis *et al*, 1995).

No modelo de úlcera induzido por antiinflamatório não esteroideal (Tab. 6.5), o Ex-MeOH dos capítulos apresentou efeito diferente do controle negativo em termos estatísticos na dose 500 mg/Kg (67,79 % de proteção) e na dose de 1000 mg/Kg (78,10 % de proteção). Na menor dose, 250 mg/Kg, pode-se observar uma tendência de redução da quantidade das lesões, embora não tenha tido diferença estatística. Novamente a proteção gástrica se mostrou dose dependente.

As úlceras causadas por drogas antiinflamatórias envolvem mecanismos de inibição das ciclooxigenases I e II (COX-1 e COX-2), de maneira a promover redução da produção de prostaglandinas. As prostaglandinas possuem efeitos na síntese de muco e bicarbonato, na regulação da secreção ácida e do fluxo sanguíneo da mucosa gástrica (Fig. 6.2) (Curtis *et al*, 1995; Halter *et al*, 2001). A redução dos níveis de prostaglandinas compromete a barreira mucosa que é composta de muco e bicarbonato e facilita a formação de lesões causadas pelas secreções gástricas (ácido clorídrico e enzimas).

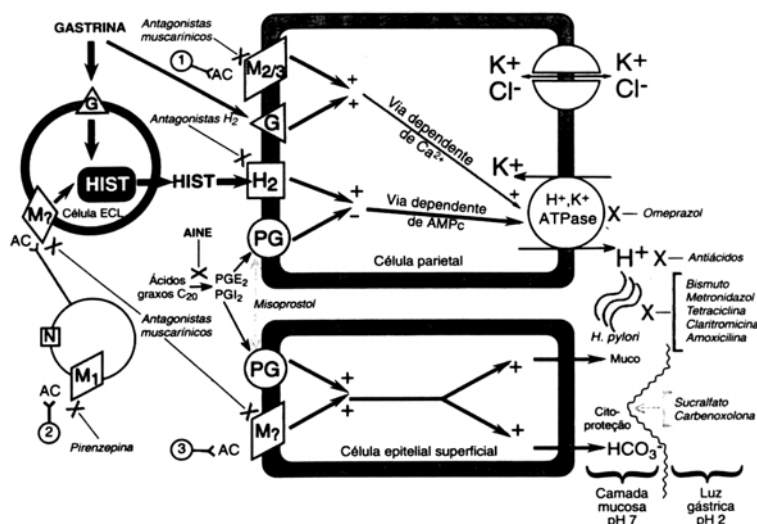


Figura 6.2. Regulação fisiológica e farmacológica da secreção gástrica (Goodman, 1996).

Estudos indicam que o NO (óxido nítrico) está envolvido na preservação da mucosa em modelos experimentais de úlcera por promover vasodilatação, redução da peroxidação lipídica e também por uma ação antiinflamatória nos tecidos (Cho, 2001; Kwiecien *et al*, 2002; Ancha *et al*, 2003). Sendo assim, testou-se o extrato metanólico em modelo de inibição da síntese de óxido nítrico.

O tratamento com Ex-MeOH dos capítulos apresentou uma proteção significativa, ao promover 66,27 % de redução da área das lesões nos animais pré-tratados com L-NAME (inibe a óxido nítrico sintase, inibindo a produção de óxido nítrico) (Tab. 6.6).

No estudo da influência dos grupamentos sulfidril não protéico na proteção gástrica, novamente o Ex-MeOH dos capítulos de *E. ligulatum* apresentou uma atividade de proteção gástrica, sendo está proteção maior do que o controle positivo (Tab. 6.7). Este resultado mostra o possível envolvimento dos metabólitos presente no extrato no auxílio da captura dos radicais livres. Sabe-se que os compostos sulfidrilas participam da proteção da mucosa pela ligação aos radicais livres (exercem um efeito antioxidante) e por formar pontes de dissulfeto entre as subunidades do muco de maneira a impedir a sua dissociação (Avila *et al*, 1996).

Espécies reativas de oxigênio (EROS) são apontadas como um dos fatores mais importantes envolvidos no desenvolvimento da úlcera gástrica. As EROS são induzidas por diversos fatores, como: etanol, drogas antiinflamatórios não esteroidais e estresse (De La Lastra *et al*, 1997; Hassan *et al*, 1983; Kwiecien *et al*, 2002; El-Abhar *et al*, 2003).

O modelo de ligadura do piloro (duodenal e oral) foi desenvolvido para a avaliação da capacidade de proteção do extrato de *E. ligulatum*. Nos dois modelos não houve uma redução significativa da concentração do H^+ (Tab. 6.8). Quando feita a análise do volume do conteúdo

gástrico, observou-se uma diminuição do volume, nos dois modelos, no tratamento com uma dose de 500 mg/Kg do Ex-MeOH. O pH do suco gástrico dos animais tratados com o Ex-MeOH teve uma redução quando comparado com o grupo controle negativo (Tab. 6.8).

As frações obtidas do Ex-MeOH dos capítulos de *E. ligulatum* foram avaliadas frente ao modelo de indução de úlcera por etanol absoluto (Tab. 6.9). A maior proteção foi verificada para a fração contendo uma mistura de flavonóides agliconas + glicosídeos + naftopiranonas, a qual induziu 71,57 % de proteção gástrica. A fração de flavonóides glicosilados apresentou proteção de 64,53 %. A menor proteção se deu para a fração de agliconas de flavonóides, com 62,73 % de proteção.

Sabe-se que a atividade antioxidante está diretamente relacionada com a proteção gástrica. A geração de radicais livres é uma das principais causas no desenvolvimento de úlcera gástrica. Para verificar a capacidade antioxidante dos extratos e das frações obtidas de *E. ligulatum*, foi feito o teste de atividade antioxidante usando o reagente de DPPH. Com este experimento procurou-se evidenciar qual é o possível mecanismo de ação envolvido na proteção gástrica exercida pelo extrato e frações da espécie em estudo.

Ensaio antioxidante com DPPH

Um ensaio que pode ser usado para investigar a propriedade antioxidante de substâncias envolve o uso de radical livre DPPH.

O DPPH apresenta coloração violeta, tendo absorção em 517 nm. Quando reduzido torna-se amarelo (Fig. 6.3). Esta redução ocorre quando existem substâncias capazes de doar hidrogênios radicalares ao DPPH dando origem a outro radical estável, o que esta associado à propriedade antioxidante (Hostettmann *et al*, 2003).

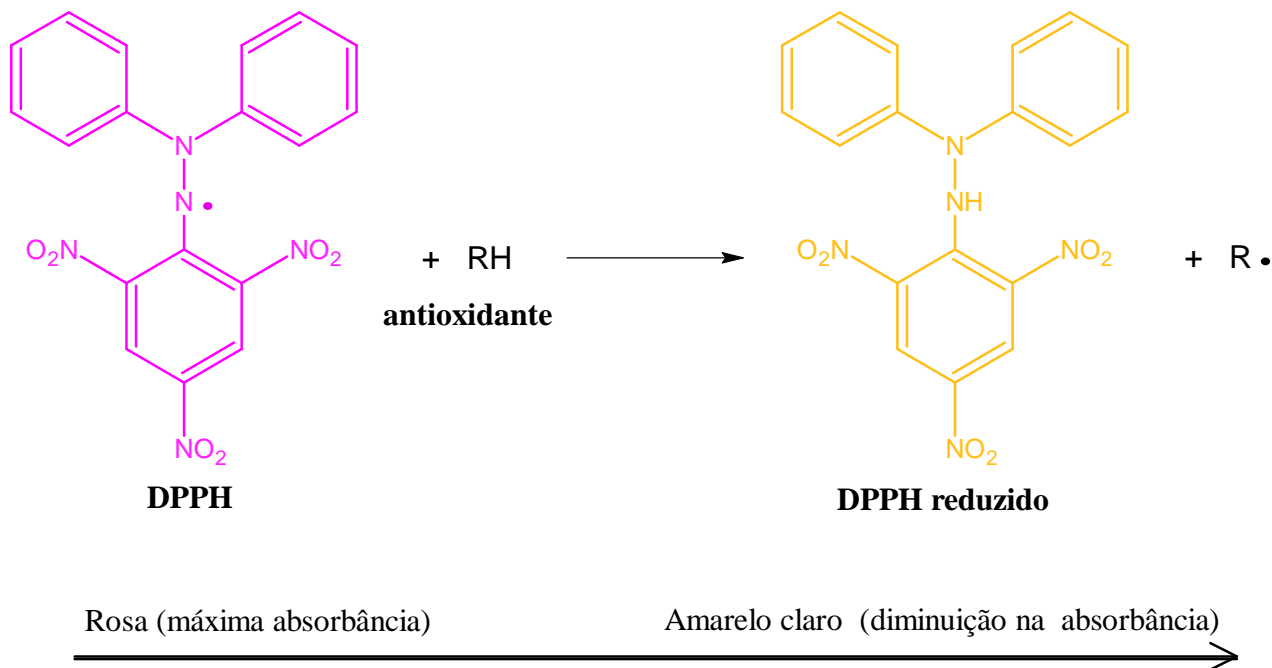


Figura 6.3. Representação da reação de doação de hidrogênios para uma substância sequestradora de radicais livres, no caso DPPH.

O potencial antioxidante é avaliado por meio de um ensaio espectrofotométrico utilizando-se uma solução de DPPH 0,004 % em metanol, o qual é misturado a solução da amostra em análise. Soluções estoque são preparadas a partir de 1 mg da amostra teste em 10 mL de metanol. Em seguida são feitas diluições até as concentrações de 5, 10, 20, 40, 80 e 160 $\mu\text{g/mL}$. A cada 1 mL da amostra é adicionado 2 mL da solução de DPPH. Após 30 minutos de reação, as absorvâncias das soluções são medidas a 517 nm (Fig. 6.4). A solução referência é constituída de 2 mL da solução de DPPH acrescido de 1 mL de metanol. Utilizamos padrões de apigenina e ácido gálico os quais foram submetidos ao mesmo procedimento experimental. Os valores medidos das absorvâncias foram plotados em um gráfico de variação da absorvância ($\% \Delta$) versus concentração da amostra, de acordo com a expressão da figura 6.5.

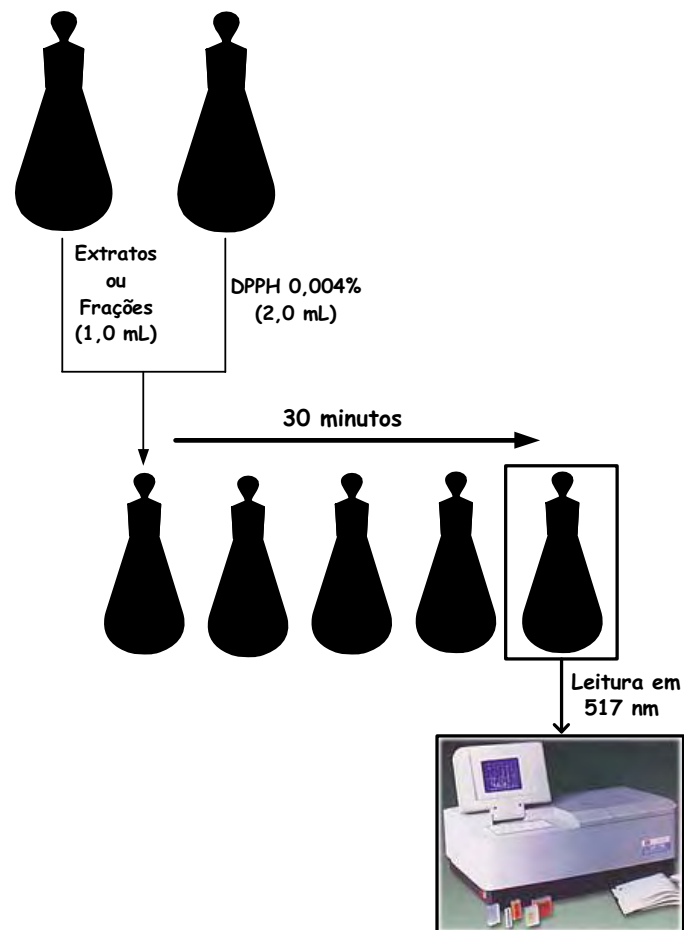
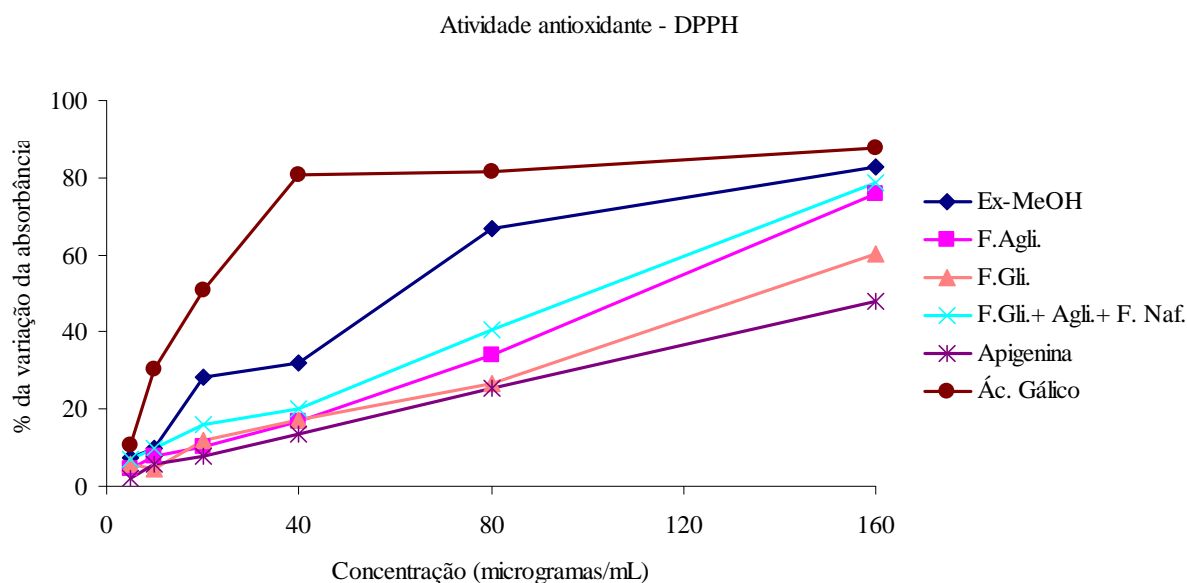


Figura 6.4. Esquema do método usado na determinação da atividade antioxidante usando o reagente de DPPH.

$$\% \Delta_o = \frac{A_o - A}{A_o} \times 100$$

Figura 6.5. Equação utilizada para verificação da variação da absorvância (% Δ), onde A_o é a absorvância do DPPH em metanol e A , corresponde a absorvância verificada após 30 minutos de reação.



Legenda: Ex-MeOH – Extrato metanólico de *E. ligulatum*; F.Agli. – Fração de flavonóides agliconas; F.Gli. – Fração de flavonóides glicosilados; F.Gli. + F.Agli. + F. Naf. – Fração de flavonóides glicosilados + agliconas + naftopirranonas.

Figura 6.6. Capacidade seqüestradora de radicais livres dos extratos e das frações obtidas das espécies de Eriocaulaceae, sobre o DPPH. Absorbância em 517 nm após 30 minutos de reação.

A figura 6.6 mostra que a maior atividade antioxidante foi observada para o Ex-MeOH. Quando compara com as frações, percebe-se que a mistura de flavonóides agliconas + glicosídeos + naftopirranonas apresentou a melhor atividade antioxidante, seguida da fração de flavonóides agliconas. A fração de flavonóides glicosilados apresentou a menor capacidade antioxidante. As frações isoladas apresentaram atividades menores, quando comparadas com a atividade do extrato bruto da espécie. Os resultados são importantes, pois a atividade antioxidante esta diretamente relacionada à proteção gástrica. Os antioxidantes funcionam como seqüestradores de radicais livres e algumas vezes, como quelantes de metais, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (Soares, 2002). Dentre os compostos antioxidantes presente nos extratos de plantas, tem-se destacado os derivados fenólicos.

As propriedades anti-radicaís livres dos flavonóides se dirigem fundamentalmente para o radical hidroxila e superóxido, espécies altamente reativas implicadas no início da cadeia de peroxidação lipídica (Jovanovic *et al*, 1998). Há também evidencias da sua capacidade de modificar a síntese de eicosanóides (com resposta anti-prostanóide e antiinflamatória), de prevenir a agregação plaquetária (efeito antitrombócito) e também de proteger as proteínas de baixa densidade de oxidação (prevenção de ateroma) (Pace-Asciak *et al*, 1995; Yang, 2000; Geleijnse, 2002).

Quantificação de fenóis totais

As patologias causadas pela ação dos radicais livres são bastante maléficas para o organismo. Assim, é de suma importância a busca por substâncias antioxidantes, sendo que dentre estas se encontram os derivados fenólicos. Por isso, a quantificação de fenóis totais se faz necessária, como forma de buscar subsídios para o esclarecimento da atividade antioxidante, que por sua vez está diretamente ligada com a proteção gástrica e de outras patologias maléficas para os seres humanos (Jovanovic *et al.*, 1998).

A quantificação de fenóis totais presentes nos extratos foi realizada através do método colorimétrico de Folin-Ciocalteu. O método baseia-se na produção de complexos de coloração azul, que podem ser medidos em espectrofotômetro a 760 nm.

A curva de calibração (Fig. 6.7) foi obtida utilizando 5 diluições das soluções de ácido gálico (Merck), substância utilizada como padrão de fenol. As soluções de padrão foram submetidas ao mesmo procedimento abaixo descrito. As leituras foram determinadas em triplicata através de absorbância registrada a 760 nm em função da concentração do padrão fenólico.

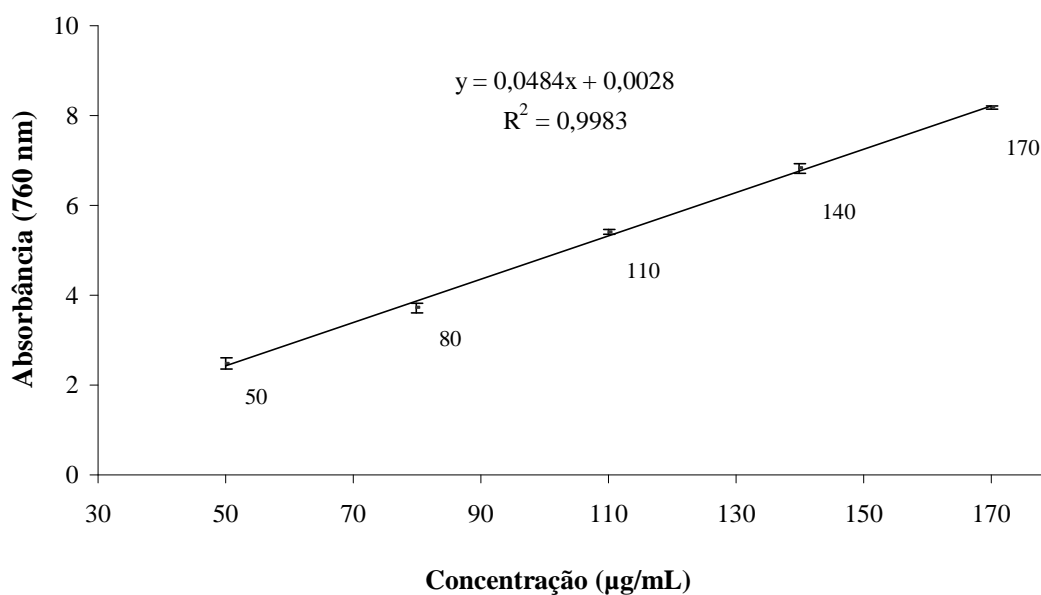


Figura 6.7. Curva de calibração de ácido gálico obtida pelo método de Folin-Ciocalteu.

R^2 = correlação linear.

Pesou-se 6,25 mg do extrato e/ou frações, solubilizando-os em água para obtenção de soluções estoque de 250 µg/mL as quais foram diluídas até as concentrações de 150, 100, 50 e 25 µg/mL em água destilada. Em seguida adicionou-se a cada 0,25 mL de solução de extrato e/ou frações mais 0,25 mL de Folin-Ciocalteu, (1:1, v/v.), 2,0 mL de água destilada e 0,25 mL de uma solução saturada (200 g/L) de Na_2CO_3 . Após 30 min à temperatura ambiente, mediu-se a absorbância a 760 nm (Fig. 6.8).

As soluções resultantes foram lidas em triplicata, e as concentrações de fenóis totais foram determinadas através da extrapolação da absorbância lida, na curva de calibração do padrão de fenol (Zieliski & Kozowska, 2000; Genovese *et al*, 2003).

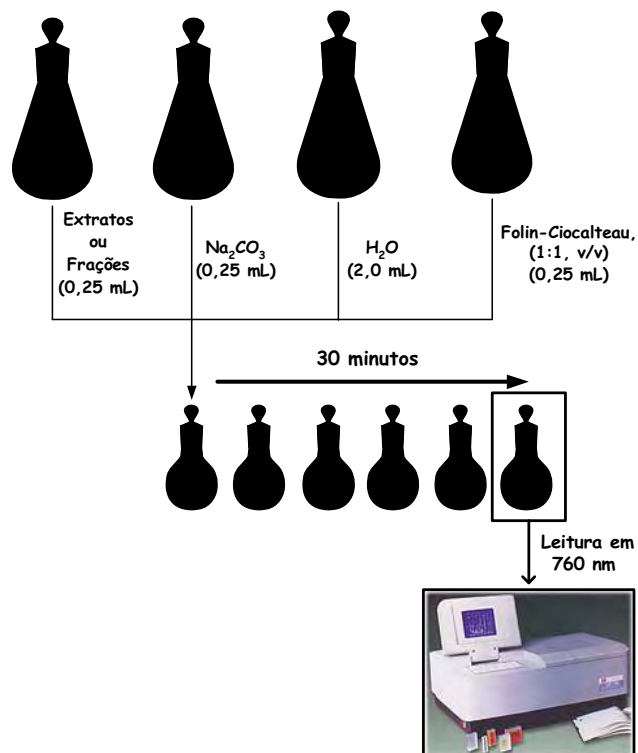
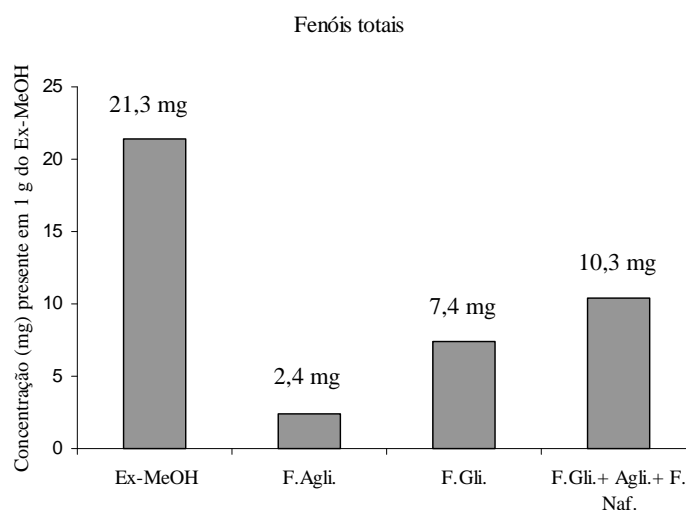


Figura 6.8. Esquema do método usado na quantificação de fenóis totais.



Legenda: Ex-MeOH – Extrato metanólico de *E. ligulatum*; F.Agli. – Fração de flavonóides agliconas; F.Gli. – Fração de flavonóides glicosilados; F.Gli. + F.Agli. + F. Naf. – Fração de flavonóides glicosilados + agliconas + naftopiranas.

Figura 6.9. Concentração de fenóis totais do Ex-MeOH e das frações obtidas de *E. ligulatum*.

Com esses resultados (Fig. 6.9) verificamos que o Ex-MeOH dos capítulos de *E. ligulatum* apresentou maior teor de compostos fenólicos. Entre as frações obtidas do extrato, a mistura de flavonóides glicosilados + flavonóides agliconas + naftopiranas foi a que apresentou a maior quantidade de compostos fenólicos. Esses dados corroboram com a atividade antioxidante, cujo maior valor foi verificado para o Ex-MeOH, seguido pelas frações de flavonóides glicosilados + flavonóides agliconas + naftopiranas. A fração de flavonóides agliconas apresenta atividade intermediária, enquanto que a fração de flavonóides glicosilados demonstrou a menor atividade.

O melhor resultado obtido com o Ex-MeOH foi verificado no modelo de úlcera induzido pelo etanol absoluto. Esse modelo tem como característica principal induzir uma rápida e forte vasoconstrição. Os radicais de oxigênio gerados durante os episódios de isquemia, provocam severas mudanças celulares, levando em alguns casos até à morte celular, devido ao ataque a constituintes essenciais da célula, como ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos; também induz à peroxidação lipídica da membrana, levando à formação de compostos tóxicos, como aldeídos e novos radicais livres (Miranda, 2006).

Verificamos que no modelo de úlcera induzida por EtOH absoluto a atividade antiúlcera decresce na mesma seqüência da atividade antioxidante (Tab. 6.9, pág. 120) o que evidencia que esse é um dos prováveis mecanismos da inibição das úlceras gástricas.

Avaliação da mutagenicidade

Ensaio de mutação gênica reversa

O ensaio de mutação gênica reversa utilizado nesse trabalho foi o Teste de Ames que baseia-se na utilização de linhagens de *Salmonella typhimurium* auxotróficas para o aminoácido histidina, as quais reverterem à prototrofia pelo tratamento com agentes mutagênicos (Maron & Ames, 1983). Para informações adicionais das cepas usadas neste estudo, consultar Maron & Ames (1983) e Ribeiro *et al* (2003).

Manutenção e estoque das cepas de *Salmonella typhimurium*

As cepas de *S. typhimurium* são estocadas em tubos para congelamento (1,5 mL) à – 70°C para que se mantenham inalteradas todas as suas características genéticas. Para cada 0,9 mL de cultura foi adicionado 0,1 mL de DMSO e substância crioprotetora.

Verificação das características genéticas das cepas de *S. typhimurium*

As características genéticas das cepas de *S. typhimurium* são coferidas rotineiramente, antes do preparo dos estoques para congelamento. A dependência da histidina, presença de mutação *rfa*, presença de deleção *uvrB*, presença de plasmídios de resistência e taxa de reversão espontânea foram verificadas de acordo com Maron e Ames (1983).

Preparo dos inóculos de *S. typhimurium* utilizados no ensaio

Com auxílio da alça de inoculação, pequena quantidade da cultura estoque congelada foi semeada em 30 mL de caldo nutriente (Oxoid nº 2), incubada a 37 °C, por 14 horas, em banho-maria (37 °C) com agitação (160 rpm), de modo a obter uma densidade de $1-2 \times 10^9$ bactérias/mL.

Meios de cultura

Os meios de cultura e soluções necessários para os ensaios de mutação reversa foram preparados de acordo com as especificações de Maron & Ames (1983) e Ribeiro *et al* (2003).

Os meios de cultura foram preparados e esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 minutos.

Controles

O controle negativo foi feito com DMSO, o solvente no qual os extratos vegetais foram obtidos. O ensaio foi realizado incluindo controles positivos para confirmar as propriedades de reversão e especificidade de cada cepa. Foram utilizados como controle positivo em ensaios sem ativação metabólica (-S9) o 4-nitrofenilenodiamino (NPD) para as linhagens TA98 e TA97a, azida

sódica para a linhagem TA100 e mitomicina C para a linhagem TA102 e para os ensaios com ativação metabólica (+S9) foram usados o 2-antramino (TA98, TA100 e TA97a) e o 2-aminofluoreno (TA102).

Preparo da mistura S9

Foi utilizada a fração microsossomal S9 homogeneizada de fígado de rato (fração pós-mitocondrial), suplementada com um co-fator, preparada a partir de fígado de roedores tratados com agentes indutores de enzimas (Aroclor 1254). A fração S9 revela se a substância ou amostra é mutagênica em sua forma original ou necessita ser metabolizada ou ativada para se tornar mutagênica. Essa fração foi obtida da MOLTOX (Molecular Toxicology, Inc. USA). Para o preparo da mistura S9, todas as soluções (cloreto de magnésio 0,4 M; cloreto de potássio 0,4 M; glicose-6-fosfato 1 M; β -nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato 0,1 M; tampão fosfato 0,2 M pH 7,4 e água destilada) inclusive a fração S9 hidratada, foram mantidas em banho de gelo durante todo o ensaio e, preparadas sempre a fresco e utilizadas por um período de no máximo 3 horas.

Realização dos ensaios

Foi usada a metodologia de pré-incubação desenvolvida por Maron e Ames (1983). Em tubos de ensaios foram colocados 0,1 mL de cultura de bactérias ($1-2 \times 10^9$ bactérias/mL), a concentração adequada do extrato e 0,5 mL de tampão fosfato pH 7,4 ou 0,5 mL de S9 (4%) nos ensaios com ativação metabólica. Os tubos assim compostos foram incubados a 37 °C durante 20 minutos. Após esse período foram adicionados 2 mL de ágar de superfície (top-agar) acrescido de uma solução de histidina/biotina 0,05 mM na proporção de 1:10 mL. Em seguida, os tubos foram agitados e vertidos em placas de Petri, que já continham o meio mínimo glicosado. Essas placas foram incubadas por 48 horas a 37 °C. Transcorrido esse tempo, foi efetuada a contagem das colônias revertentes (Fig. 6.10). Todas as concentrações testadas, controles positivos e negativos foram realizados em triplicata.

Análise dos resultados

Os dados de mutagenicidade foram analisados utilizando o programa estatístico Salanal elaborado e cedido pelo Dr. L. Myers do Research Triangle Institute, RTP, Carolina do Norte, USA, por intermédio da Dr^a. Maria Inês Sato (CETESB). Esse programa permite avaliar o efeito dose resposta através do cálculo da análise de variância (ANOVA – teste F) entre as médias do número de revertentes nas diferentes doses testadas e o controle negativo, seguido de uma regressão linear. O modelo do programa escolhido para a análise dos dados foi o modelo Bernstein (Bernstein *et al*, 1982). A partir dos resultados obtidos, foi calculada a razão de mutagenicidade

(RM) para cada dose estudada. A RM consiste na média do número de revertentes na placa teste (espontâneos + induzidos) dividida pela média do número de revertentes por placa do controle negativo. A amostra foi considerada positiva quando a razão de mutagenicidade (RM) foi maior ou igual a 2 em pelo menos uma das doses testadas, e quando houve uma relação dose resposta entre as concentrações testadas e o número de revertentes induzidos. Por sua vez, a amostra foi considerada negativa para o Teste de Ames quando a mesma não induziu aumento significativo no número de revertentes e seus RM forem todos menores que 2. Quando apenas um dos parâmetros foi atendido, considerou-se a amostra com indícios de mutagenicidade.

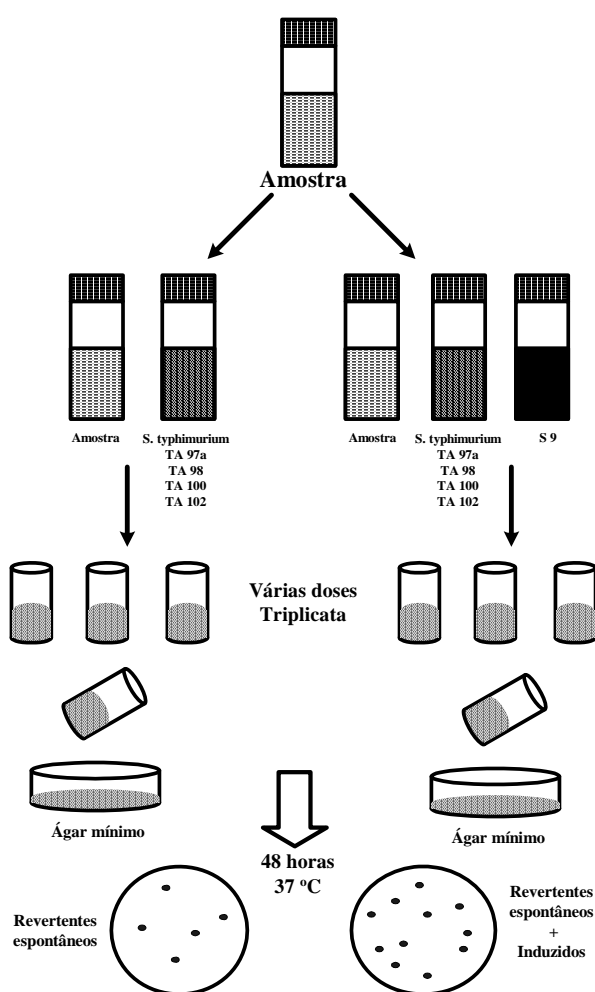


Figura 6.10. Esquema do procedimento experimental utilizado para verificar a mutagenicidade dos extratos e das frações de *E. ligulatum* (Ribeiro *et al*, 2003).

As tabelas 6.10 a 6.12 mostram os resultados dos ensaios de mutagenicidade realizados para os extratos e frações obtidos dos capítulos de *E. ligulatum*.

Tabela 6.10. Atividade mutagênica dos extratos metanólicos (Ex-MeOH) e diclorometânico (Ex-DCM) dos capítulos de *E. ligulatum* em linhagens de *S. typhimurium* em ausência de metabolização (-S9) e na presença de metabolização (+S9).

Tratamento mg/placa	Número médio de revertentes / Placa e (RM)							
	TA 100		TA 98		TA 97a		TA 102	
Ex-MeOH	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9
DMSO	221 ± 5	92 ± 8	19 ± 5	24 + 4	133 ± 19	159 + 10	293 ± 17	335 + 20
0,6	289 ± 7 (1,3)	154 + 18 (1,7)*	29 ± 1 (1,5)	34 + 7 (1,4)	1052 ± 97 (7,9)**	836 + 124 (5,2)**	328 ± 14 (1,1)	746 + 86 (2,2)**
1,2	334 ± 15 (1,5)	157 + 20 (1,7)*	31 ± 0 (1,6)	28 + 5 (1,2)	1209 ± 142 (9,0)**	844 + 18 (5,3)**	295 ± 18 (1,0)	681 + 71 (2,0)**
2,3	331 ± 16 (1,5)	195 + 51 (2,1)*	26 ± 4 (1,4)	34 + 3 (1,4)	1113 ± 103 (8,4)**	747 + 78 (4,7)**	311 ± 8 (1,1)	1093 + 270 (3,3)*
4,6	235 ± 15 (1,1)	171 + 23 (1,85)*	34 ± 4 (1,8)	31 + 2 (1,3)	952 ± 65 (7,15)**	541 + 50 (3,4)**	287 ± 18 (1,0)	568 + 86 (1,7)*
6,9	148 ± 3 (0,7)	116 + 17 (1,3)	32 ± 10 (1,7)	30 + 5 (1,25)	619 ± 56 (4,65)**	759 + 227 (4,8)*	296 + 16 (1,0)	730 + 184 (2,2)
Controle +	965 ± 83 ^a	2174 + 348 ^d	726 ± 99 ^b	480 + 43 ^d	1026 ± 129 ^b	2189 + 171 ^d	1650 ± 25 ^c	3364 + 437 ^e
Ex-DCM	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9
DMSO	173 ± 29	92 + 8	19 ± 5	24 + 4	159 ± 24	159 + 10	252 ± 12	335 + 20
0,7	177 ± 12 (1,0)	111 + 9 (1,2)	28 ± 2 (1,5)	29 + 3 (1,2)	162 ± 9 (1,0)	190 + 22 (1,2)	231 ± 15 (0,9)	395 + 45 (1,2)
1,4	178 ± 13 (1,0)	111 + 14 (1,2)	26 ± 6 (1,4)	24 + 7 (1,0)	135 ± 30 (0,85)	186 + 32 (1,2)	221 ± 25 (0,9)	395 + 9 (1,2)
2,9	190 ± 12 (1,1)	145 + 21 (1,6)*	32 ± 4 (1,7)	19 + 3 (0,8)	147 ± 9 (0,9)	143 + 3 (0,9)	211 ± 12 (0,8)	343 + 14 (1,0)
5,8	179 ± 21 (1,0)	114 + 8 (1,2)	46 ± 6 (2,4)*	22 + 6 (0,9)	153 ± 12 (1,0)	166 + 27 (1,0)	246 ± 10 (1,0)	365 + 5 (1,1)
8,7	120 ± 15 (0,7)	120 + 20 (1,3)	46 ± 14 (2,4)*	17 + 2 (0,7)	156 ± 13 (1,0)	143 + 13 (0,9)	272 ± 16 (1,1)	333 + 13 (1,0)
Controle+	955 ± 92 ^a	2174 + 348 ^d	726 ± 99 ^b	480 + 43 ^d	975 ± 46 ^b	2189 + 171 ^d	1650 ± 25 ^c	3364 + 437 ^e

DMSO: 75 µL por placa (controle negativo); Controles +: ^a Azida sódica (2,5 µg /placa); ^b NPD (4-nitro-*o*-fenilenediamina – 10 µg/placa); ^c Mitomicina (0,5 µg /placa); ^d 2-Antramina (1,25 µg /placa); ^e Aminofluorena (10 µg /placa). * p < 0,05 e ** p < 0,01.

Tabela 6.11. Atividade mutagênica das frações enriquecidas obtidas do extrato metanólico dos capítulos de *E. ligulatum* em linhagens de *S. typhimurium* em ausência (-S9) em presença de metabolização (+S9).

		Número médio de revertentes / Placa e (RM)							
Tratamento mg/placa		TA 100		TA 98		TA 97a		TA 102	
F. Fl. Glic. ++		- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9
DMSO		179 ± 17	166 ± 18	23 ± 5	36 ± 7	180 ± 17	143 ± 17	428 ± 26	313 ± 15
0,4		192 ± 18 (1,07)	158 ± 16 (0,95)	29 ± 1 (1,26)	29 ± 8 (0,8)	192 ± 29 (1,07)	157 ± 16 (1,1)	388 ± 9 (0,9)	334 ± 18 (1,07)
0,8		174 ± 10 (0,97)	185 ± 13 (1,11)	26 ± 4 (1,13)	36 ± 9 (1,0)	166 ± 14 (0,92)	133 ± 40 (0,93)	330 ± 37 (0,77)	356 ± 43 (1,14)
1,5		207 ± 20 (1,16)	190 ± 12 (1,14)	28 ± 4 (1,21)	33 ± 7 (0,92)	163 ± 17 (0,9)	165 ± 14 (1,15)	347 ± 23 (0,81)	317 ± 8 (1,01)
3,0		197 ± 9 (1,1)	174 ± 18 (1,04)	30 ± 4 (1,3)	32 ± 4 (0,88)	136 ± 25 (0,75)	149 ± 31 (1,04)	308 ± 24 (0,71)	320 ± 29 (1,02)
4,6		211 ± 3 (1,18)	189 ± 19 (1,13)	26 ± 5 (1,13)	32 ± 4 (0,88)	147 ± 5 (0,82)	128 ± 11 (0,9)	298 ± 2 (0,69)	335 ± 33 (1,07)
Controle +		3089 ± 140 ^a	3453 ± 65 ^d	2866 ± 822 ^b	1763 ± 67 ^d	1430 ± 123 ^b	2271 ± 90 ^d	2401 ± 324 ^c	2335 ± 312 ^e
F.Fl. Glic. + F.Fl. Aglic. + F. Naf. +++		- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9
DMSO		238 ± 31	166 ± 18	23 ± 5	36 ± 7	180 ± 17	143 ± 17	348 ± 33	313 ± 15
0,6		298 ± 16 (1,25)	216 ± 16 (1,3)	23 ± 5 (1,0)	34 ± 1 (0,94)	275 ± 15 (1,53)**	261 ± 43 (1,83)*	427 ± 5 (1,23)	491 ± 55 (1,57)*
1,1		209 ± 53 (0,9)	263 ± 42 (1,58)	26 ± 2 (1,13)	34 ± 9 (0,94)	363 ± 59 (2,02)*	297 ± 30 (2,08)**	413 ± 9 (1,19)	522 ± 49 (1,67)**
2,2		323 ± 20 (1,82)*	309 ± 48 (1,86)*	27 ± 5 (1,17)	34 ± 3 (0,94)	437 ± 23 (2,43)**	276 ± 36 (1,93)*	473 ± 20 (1,36)	547 ± 61 (1,75)*
4,5		280 ± 52 (1,2)	266 ± 37 (1,6)*	30 ± 6 (1,3)	24 ± 4 (0,66)	392 ± 81 (2,17)*	295 ± 22 (2,06)**	453 ± 26 (1,3)	758 ± 2 (2,42)**
6,7		298 ± 39 (1,25)	262 ± 15 (1,58)**	30 ± 5 (1,3)	39 ± 8 (1,08)	427 ± 53 (2,37)**	262 ± 60 (1,83)	428 ± 41 (1,33)	695 ± 51 (2,22)**
Controle+		2592 ± 233 ^a	3453 ± 65 ^d	2866 ± 822 ^b	1763 ± 67 ^d	1430 ± 123 ^b	2271 ± 90 ^d	2401 ± 324 ^c	2335 ± 312 ^e

DMSO: 75 µL por placa (controle negativo); Controles +: ^a Azida sódica (2,5 µg /placa); ^b NPD (4-nitro-*o*-fenilenediamina – 10 µg/placa); ^c Mitomicina (0,5 µg /placa); ^d 2-Antramina (1,25 µg /placa); ^e Aminofluoreno (10 µg /placa). *p < 0,05 e ** p < 0,01. F.Fl. Aglic. - Fração de agliconas de flavonóides; ⁺F.Fl. Glic. - Fração de flavonóides glicosilados; ⁺⁺F.Fl. Glic. + F.Fl. Aglic. + F. Naf. - Fração de flavonóides glicosilados + agliconas + naftopiranas.

Tabela 6.12. Atividade mutagênica das frações enriquecidas obtidas do extrato metanólico dos capítulos de *E. ligulatum* em linhagens de *S. typhimurium* em ausência (-S9) e em presença de metabolização (+S9).

Tratamento mg/placa	Número médio de revertentes / Placa e (RM)							
	TA 100		TA 98		TA 97a		TA 102	
F. Fl. Aglic. ⁺	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9
DMSO	179 ± 17	166 ± 18	23 ± 5	33 ± 4	180 ± 17	143 ± 17	348 ± 33	313 ± 15
0,1	198 ± 9 (1,1)	197 ± 26 (1,19)	28 ± 6 (1,21)	39 ± 5 (1,18)	203 ± 11 (1,13)	200 ± 33 (1,4)	436 ± 22 (1,25)	469 ± 45 (1,5)*
0,2	195 ± 16 (1,1)	192 ± 22 (1,16)	26 ± 2 (1,13)	42 ± 8 (1,27)	198 ± 11 (1,05)	189 ± 48 (1,32)	329 ± 24 (0,95)	567 ± 39 (1,81)**
0,4	182 ± 13 (1,02)	215 ± 6 (1,3)*	28 ± 3 (1,21)	38 ± 6 (1,15)	254 ± 14 (1,41)	215 ± 9 (1,5)*	211 ± 13 (0,6)	545 ± 54 (1,74)**
0,8	155 ± 15 (0,86)	242 ± 10 (1,46)*	25 ± 2 (1,08)	37 ± 6 (1,12)	178 ± 28 (0,98)	212 ± 11 (1,48)*	188 ± 13 (0,54)	602 ± 58 (1,92)**
1,2	----	222 ± 13 (1,34)*	24 ± 4 (1,04)	28 ± 3 (0,85)	171 ± 8 (0,95)	186 ± 12 (1,3)	208 ± 14 (0,59)	649 ± 4 (2,07)**
Controle +	3089 ± 140 ^a	3453 ± 65 ^d	2866 ± 822 ^b	2003 ± 254 ^d	1430 ± 123 ^b	2271 ± 90 ^d	2401 ± 324 ^c	2335 ± 312 ^e

DMSO: 75 µL por placa (controle negativo); Controles +: ^a Azida sódica (2,5 µg /placa); ^b NPD (4-nitro-*o*-fenilenediamina – 10 µg/placa); ^c Mitomicina (0,5 µg /placa);

^d 2-Antramina 1,25 µg /placa); ^e Aminofluoreno (10 µg /placa). * p < 0,05 e ** p < 0,01. .⁺F.Fl. Aglic. - Fração de agliconas de flavonóides; ⁺⁺F.Fl. Glic. - Fração de flavonóides glicosilados; ⁺⁺⁺F.Fl. Glic. + F.Fl. Aglic. + F. Naf. - Fração de flavonóides glicosilados + agliconas + naftopirranonas.

De acordo com a tabela 6.10, em ausência de metabolização (-S9) podemos observar que para a linhagem TA97a o extrato metanólico dos capítulos de *E. ligulatum* (Ex-MeOH), apresentou mutagenicidade positiva para todas as concentrações testadas (0,6; 1,2; 2,3; 4,6 e 6,9 mg/placa), pois o RM (razão de mutagenicidade) foi maior que 2 para todas as concentrações e houve um aumento significativo na relação dose-resposta. Para as outras linhagens (TA100, TA98 e TA102) foi considerado com atividade mutagênica negativa. O extrato diclorometânico (Ex-DCM) apresentou mutagenicidade positiva para a linhagem TA98, nas concentrações de 5,8 e 8,7 mg/placa. Para as outras linhagens (TA100, TA97a, TA102) a mutagenicidade foi considerada negativa, por não atender a nenhum dos parâmetros descritos.

Nos ensaios em presença de metabolização (+S9), o Ex-MeOH de *E. ligulatum* apresentou mutagenicidade positiva para a linhagem TA100 na concentração de 2,3 mg/placa, para a linhagem TA97a em todas as concentrações testadas e para a linhagem TA102 também em todas as concentrações testadas, exceto na concentração de 4,6 mg/placa. O Ex-DCM apresentou mutagenicidade positiva somente para a linhagem TA 98, pois o RM foi maior que 2 nas duas últimas concentrações testadas (5,8 e 8,7 mg/placa) e houve uma relação dose resposta ($p < 0,05$). Para as demais linhagens testadas a mutagenicidade foi considerada negativa.

Na tabela 6.11 são apresentados os resultados referentes às frações F.Fl. Glic. (fração de flavonóides glicosilados) e F.Fl. Glic. + F.Fl. Aglic. + F. Naf. (fração de flavonóides glicosilados + agliconas + naftopiranonas). Em ausência de metabolização (-S9), na fração de flavonóides glicosilados a mutagenicidade foi considerada negativa para todas as concentrações testadas (0,4; 0,8; 1,5; 3,0 e 4,6 mg/placa), em todas as linhagens (TA100, TA98, TA97a e TA102). Para a linhagem TA97a a fração de flavonóides glicosilados + agliconas + naftopiranonas, apresentou mutagenicidade positiva para todas as concentrações testadas (0,6; 1,1; 2,2; 4,5 e 6,7 mg/placa), pois a RM foi maior que 2 para as quatro últimas concentrações e houve um aumento significativo na relação dose resposta ($p < 0,05$ e $p < 0,01$). Ainda para esta mesma fração, na linhagem TA100 verificaram-se indícios de mutagenicidade positiva, pois a RM não foi maior que 2 em nenhuma das concentrações testadas, mas houve uma relação dose resposta (para a linhagem TA100, na concentração de 2,2 mg/placa; $p < 0,05$).

Em presença de metabolização (+S9), na fração de flavonóides glicosilados a mutagenicidade também foi considerada negativa em todas as concentrações testadas (0,4; 0,8; 1,5; 3,0 e 4,6 mg/placa), em todas as linhagens (T100, TA98, TA97a e TA102). A fração de flavonóides glicosilados + agliconas + naftopiranonas foi verificada mutagenicidade positiva para a linhagem TA97a em todas as concentrações testadas (0,6; 1,1; 2,2; 4,5 e 6,7 mg/placa), exceto na última. Para a linhagem TA102, a RM foi maior que 2 nas concentrações de 4,5 e 6,7 mg/placa. Considerando ainda esta mesma fração, para a linhagem TA100, verificou-se indícios de mutagenicidade positiva,

pois a RM não foi maior que 2 em nenhuma das concentrações testadas, mas houve uma relação dose–resposta (nas concentrações de 2,2 e 6,7 mg/placa; $p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente).

Na tabela 6.12 estão os resultados referentes à fração de aglicona de flavonóides (F. Fl. Aglic.) do extrato metanólico de *E. ligulatum*. Verificou-se que, em ausência de metabolização (-S9), a mutagenicidade foi considerada negativa para todas as concentrações testadas em todas as linhagens. Em presença de metabolização (+S9), verificou-se mutagenicidade positiva para a linhagem TA102, em todas as concentrações testadas (0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,2 mg/placa) da fração sendo que a RM foi maior que 2 para a última concentração e houve um aumento significativo na relação dose–resposta ($p < 0,05$ e $p < 0,01$). Ainda na mesma fração, para as linhagens TA100 e TA97a, verificou-se indícios de mutagenicidade positiva.

No extrato metanólico de *E. ligulatum* foram encontrados flavonóides e naftopirranonas, bem como seus respectivos glicosídeos (Santos *et al*, 2005, Silva *et al*, 2007).

A toxicidade genética de alguns flavonóides tem sido avaliada em diversas plantas medicinais. Certos flavonóides são genotóxicos enquanto outros inibem a mutagenicidade e carcinogenicidade de mutágenos (Kandaswami *et al*, 1991; Kandaswami *et al*, 1992; Chaumontet *et al*, 1994; Hirano *et al*, 1995; Kawaii *et al*, 1999).

Além de um crescente interesse na avaliação da mutagenicidade, alguns pesquisadores identificaram a relação estrutura atividade de certos flavonóides responsável pela atividade mutagenicidade positiva no teste de reversão com *S. typhimurium* (Nagao *et al*, 1981; Czczot *et al*, 1990; Sandnes *et al*, 1992; Edenharder *et al*, 1993). Comparação feita com as estrutura dos flavonóides e a atividade mutagênica, indica que a mutagenicidade dos flavonóides é dependente da presença de grupos hidroxila nas posições 3' e 4' no anel B; a presença de uma hidroxila ou um grupo metoxila na posição 7 no anel A também contribui com o aparecimento de atividade mutagênica no Teste de Ames (Czczot *et al*, 1990). Sugere-se também, neste mesmo trabalho, que a presença de metoxilas no anel B da molécula de flavonóide, reduz drasticamente a atividade mutagênica do composto.

Para Nagao *et al* (1981) um flavonóide exerce atividade mutagênica quando possui uma dupla ligação entre os carbonos 2 e 3 do anel C e um grupo hidroxila na posição 3 do mesmo anel. Todos os flavonóides encontrados no Ex-MeOH dos capítulos de *E. ligulatum* apresentam a dupla ligação entre as posições 2 e 3 do anel C e uma ou duas hidroxilas no anel B da aglicona.

Sandnes *et al* 1992 avaliaram a mutagenicidade de alguns flavonóides glicosilados do extrato de *Senna* sp. Verificaram que esses foram inativos em todas as linhagens testadas (TA100, TA98, TA97a e TA102), mas quando esses flavonóides foram expostos à hidrólise enzimática com a hesperidina, a atividade mutagênica teve um aumento significativo. Este aumento da atividade

está relacionado com a formação das agliconas dos flavonóis, principalmente quercetina e kaempferol.

Nagao *et al* (1981) verificaram que 6 flavonóis glicosilados (três derivados da quercetinas e três derivados do kaempferol) foram mutagênicos após pré-incubação com hesperidinase, e que dentre as 61 agliconas estudadas, a quercetina foi a substância mutagênica mais potente.

A análise da mutagenicidade das frações do extrato metanólico de *E. ligulatum* indicou que as substâncias responsáveis pela atividade mutagênica mais significativa estão presentes na fração contendo a mistura de flavonóides glicosilados + agliconas + naftopiranonas.

As naftopiranonas compreendem uma classe de produtos naturais polifenólicos presentes numa variedade de espécies de plantas (Hill, 1986), apresentando muitas atividades farmacológicas, incluindo ação antitumoral (Canedo *et al*, 1997; Devienne *et al*, 2002; Di Stasi *et al*, 2004; Kostova, 2005; Devienne *et al*, 2005; Okamoto *et al*, 2005). As naftopiranonas possuem grupamentos OH, OCH₃, COOH e açúcares ligados à estrutura básica, os quais podem interferir diretamente na atividade biológica das naftopiranonas.

A paepalantina e seus derivados glicosilados, isolados do extrato polar de *Paepalanthus bromelioides*, apresentaram atividade antimicrobiana, mutagênica e citotóxica (Varanda *et al*, 1997; Varanda *et al*, 2004). Verificou-se que a paepalantina-9-*O*- β -D-glucopiranosil(1'' \rightarrow 6')-*O*- β -D-alopiranosideo (diglicosilada) (**37**, pág. 32) apresentou indícios de mutagenicidade na linhagem TA102 e TA97a. A paepalantina-9-*O*- β -D-glucopiranosideo (monoglicosilada) (**36**, pág. 32) apresentou uma significativa atividade mutagênica na linhagem TA97a, enquanto que a paepalantina (aglicona) (**35**, pág. 32) apresentou uma alta atividade mutagênica dose dependente nas linhagens TA102, TA100 e TA98.

Os dados citados corroboram com os resultados obtidos neste estudo, pois a fração de flavonóides glicosilados + agliconas + naftopiranonas foi a que apresentou maior atividade mutagênica para as linhagens TA97a e TA102. Santos *et al* (2005) realizou a análise cromatográfica do Ex-MeOH de *E. ligulatum* - que deu origem às frações enriquecidas – e verificou que o mesmo possui derivados mono e diglicosilados da paepalantina, sendo que a paepalantina-9-*O*- β -D-glucopiranosil(1'' \rightarrow 6')-*O*- β -D-alopiranosideo (**37**, pág. 32) é a naftopiranona majoritária.

Varanda *et al* (2004) sugeriram que a capacidade de os átomos de oxigênio e hidroxilas presentes nas posições 1, 9 e 10 da paepalantina (**35**, pág. 32) formarem pontes de hidrogênio com o nitrogênio das bases do DNA pode explicar a atividade mutagênica dessa naftopiranonas. Baseado no trabalho de Dewick (1997) (Fig. 6.11), uma outra proposta sugerida para explicar a atividade mutagênica da paepalantina é a reação de cicloadição que pode ocorrer entre a molécula e a timina do DNA (Fig. 6.12). Esta reação causaria a formação de um aduto entre o DNA e a paepalantina, provocando problemas na leitura da enzima RNA sintase dependente de DNA. Este erro na leitura

pode levar a mutações nas células e conseqüentemente problemas diversificados, entre eles, a morte celular.

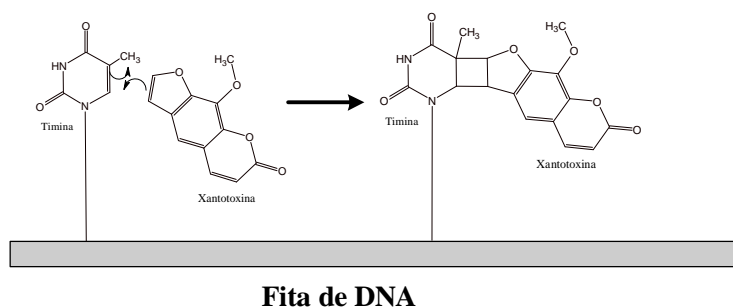


Figura 6.11. Dewick (1997) demonstra a reação de ciclo adição ocorrida na timina do DNA celular.

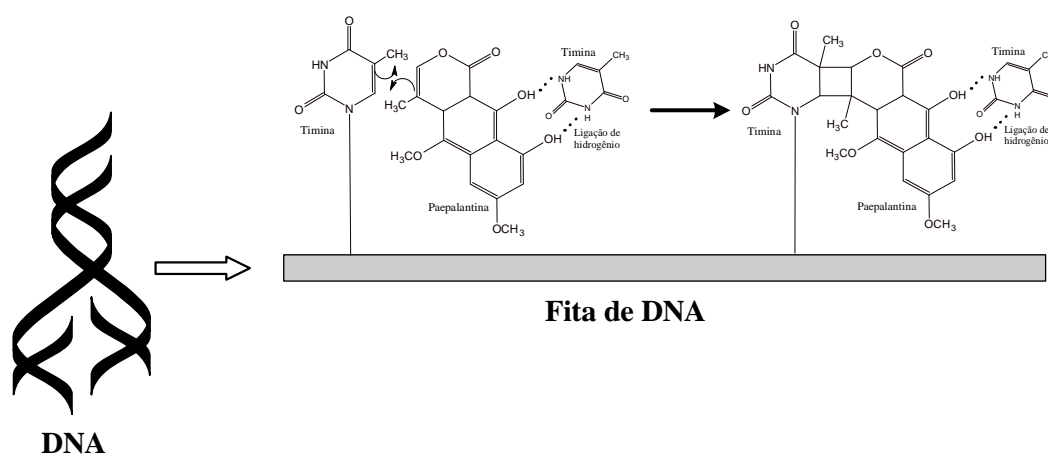


Figura 6.12. Propostas das prováveis interações e reação de ciclo adição ocorrida entre a paepalantina (aglicona) e a timina do DNA celular.

7. Considerações Finais

Considerações finais

Com os estudos realizados pudemos avaliar os constituintes químicos dos extratos polares e de média polaridade de espécies pertencentes à família Eriocaulaceae. Foram isoladas, identificadas e determinadas, flavonas, flavonas C- e O-glicosiladas, flavonóis, flavonóis acilados e uma naftopiranona dimérica.

Os flavonóides de média e alta polaridade foram isolados usando a técnica de cromatografia em contracorrente de alta velocidade (HSCCC), que levou ao isolamento de várias substâncias em graus de pureza adequados às análises espectrométricas. O fracionamento dos extratos por HSCCC no modo isocrático (Fr-EtOAc) e gradiente (Fr-BuOH) permitiu o isolamento de agliconas e glicosídeos, mesmo em misturas complexas contendo diferentes classes de metabólitos secundários como flavonóides e naftopiranonas.

No estudo químico de *E. ligulatum* optou-se pelo estudo dos capítulos da espécie, pois quando comparados com os escapos, os capítulos se mostraram mais promissores, uma vez que análise por CCD demonstrou maior quantidade de substâncias (Santos *et al*, 2005). Desta espécie isolou-se do Ex-MeOH flavonas (**EI 1**, **EI 2** e **EI 4**) e um novo flavonol acilado (**EI 3**) e do Ex-DCM uma nova naftopiranona dimérica (**EI 5**).

Do Ex-MeOH dos capítulos das espécies de *Syngonanthus* foram isolados flavonas (**Ss 1**, **Ss 2** e **Sd 1**), flavonóis (**Ss 3** e **Ss 4**) e flavonas C-glicosiladas (**Ss 5**, **Sd 2** e **Sd 3**).

A utilização da técnica HPLC/ESI-IT-MSⁿ possibilitou avaliar de maneira rápida a composição química do Ex-MeOH dos capítulos de *E. ligulatum*. Desse extrato foi possível identificar 12 compostos oriundos do metabolismo secundário da espécie. Análise do Ex-MeOH das espécies de *Syngonanthus* por FIA-ESI-IT-MS viabilizou a identificação de 7 substâncias de *S. suberosus* e 5 substâncias de *S. dealbatus*. As substâncias identificadas das espécies pertencem à classe das flavonas C- e O-glicosiladas. Este tipo de abordagem é importante para se obter o perfil das substâncias presentes no extrato das espécies.

A partir desse conjunto de resultados e aqueles descritos na literatura é possível incrementar a discussão quimiotaxonômica dos gêneros pertencentes à família Eriocaulaceae. Salatino *et al* (2000) relataram a importância dos metabólitos secundários na classificação das angiospermas. Tratando-se de Eriocaulaceae, três classes extremamente importantes para estes estudos são os flavonóides, xantonas e naftopiranonas.

Salatino *et al* (1990) compararam vários gêneros e espécies de Eriocaulaceae tomando como base a concentração de fenóis totais. As diferenças das quantidades de fenóis entre as próprias espécies de *Paepalanthus* enfatizam a evidencia parafilética do gênero. Naftopiranonas, flavonóis, flavonóis glicosilados e flavonóis acilados evidenciam a aproximação do gênero *Eriocaulon* com

Paepalanthus. Este tipo de abordagem contribui para ratificar que o gênero *Paepalanthus* é parafilético.

Podemos observar que o caminho evolutivo parece ter levado à perda das substâncias pertencentes à classe das naftopirranonas. Enquanto em *P.* subg *Actinocephalus* são comuns, mas não como constituintes majoritários, em *P.* subg *Xeractis* são de pouca ocorrência. No gênero *Eriocaulon*, também são comuns, mas não constituem as substâncias majoritárias. Já em *Leiothrix* e *Syngonanthus* estão ausentes (Dokkedal *et al*, 2008).

A presença de flavonas e xantonas é uma característica marcante, utilizada para definir o clado *Leiothrix-Syngonanthus*. Nas espécies do gênero *Leiothrix*, a presença de xantonas diferencia este gênero do de *Syngonanthus*, onde as xantonas estão ausentes. No gênero *Syngonanthus*, a presença de flavonas como constituintes majoritários é uma característica quimiotaxonômica deste gênero (Dokkedal *et al*, 2008). A presença de flavonas como substâncias majoritárias nas espécies de *Syngonanthus* estudadas neste trabalho aprofunda o conhecimento sobre a composição química da família, auxiliando na análise cladística, e, assim, a resolver as relações entre o clado *Leiothrix-Syngonanthus*.

O Ex-MeOH de *E. ligulatum* e as frações enriquecidas dele oriundas foram submetidas a testes biológicos para averiguar a sua toxicidade aguda, atividade gastroprotetora, motilidade intestinal e mutagenicidade. Além desses testes biológicos, foram realizados também ensaios para avaliar a atividade antioxidante do extrato e das frações e a quantificação de fenóis totais. Esses ensaios visaram colaborar no esclarecimento do possível mecanismo de ação do extrato e das frações obtidos da espécie.

No ensaio de toxicidade aguda, o extrato dos capítulos de *E. ligulatum* não apresentou efeito tóxico aparente, com a administração de 5000 mg/kg (via oral). Não houve também alteração do peso dos animais tratados com o extrato.

A maior proteção gástrica foi evidenciada no modelo de úlcera induzida por droga antiinflamatória não esteroide. O Ex-MeOH (1000 mg/Kg), a porcentagem de proteção foi de 78,1 %. Outro resultado bastante significativo foi obtido no modelo de grupamentos sulfidril não protéicos: o Ex-MeOH (500 mg/Kg) demonstrou proteção de 79,7 %. A atividade das frações foi sempre menor quando comparada com a do extrato bruto.

Percebe-se, com os resultados, que a atividade antioxidante pode estar envolvida no mecanismo de ação das substâncias frente à ação gastroprotetora, já que o Ex-MeOH apresentou a maior atividade antioxidante e maior teor de fenóis totais quando comparado com as frações.

O Ex-MeOH, nas doses de 250, 500 e 1000 mg/Kg, não causou alteração nos movimentos peristálticos dos intestinos dos camundongos quando submetidos à avaliação da motilidade

intestinal, o que é importante no estudo biológico de preparados de plantas em conjunto com medicamentos de uso contínuo.

O Ex-MeOH apresentou atividade mutagênica no ensaio de mutação gênica reversa nas linhagens TA 97a, TA 100 e TA 102. O Ex-DCM demonstrou atividade mutagênica na linhagem TA 98. Nas frações enriquecidas oriundas do Ex-MeOH, a fração de flavonóides glicosilados não demonstrou atividade mutagênica em nenhuma das linhagens. A fração de flavonóides glicosilados + agliconas de flavonóides + naftopirranonas apresentou mutagenicidade na linhagem TA 97a e TA 102. A fração de agliconas de flavonóides demonstrou atividade na linhagem TA 102, cujo mecanismo de mutagenicidade está associado a substituição de pares de bases. Esses resultados levam a postular que as naftopirranonas são as responsáveis pela mutagenicidade na linhagem TA 97a, que está envolvida no deslocamento do quadro de leitura. Contudo, não se pode esquecer que é possível haver sinergismos positivos e negativos, o que implica na necessidade de outros experimentos confirmatórios.

Os resultados apresentados neste trabalho são de grande importância, pois as espécies de Eriocaulaceae vêm sendo extintas das suas áreas endêmicas a cada ano, principalmente pela exploração comercial não sustentável.

A abordagem interdisciplinar possibilitou uma visão mais ampla e verdadeira do estudo de plantas, tanto para o conhecimento acadêmico quanto para a obtenção de resultados sobre as atividades biológicas exercidas pelas suas substâncias químicas presentes nos extratos vegetais.

8. Materiais e Métodos

-) Reagentes e reveladores

Solventes PA: acetato de etila, *n*-butanol, etanol, clorofórmio, hexano, metanol, *n*-propanol (Synthlab).

Solventes grau HPLC: Acetonitrila, ácido acético e metanol (Merck e Mallinckrodt) e água purificada em sistema Milli-Q.

Solventes deuterados: DMSO-*d*₆ e CDCl₃ (Aldrich).

Reagente 1,1-difenil-1-picril-hidrazila da marca Merck (DPPH).

Reagente de Folin-Ciocalteu da marca Merck.

Padrões: Apigenina, luteolina, quercetina, rutina e ácido gálico (Sigma Aldrich).

Reveladores para cromatografia em camada delgada comparativa

Luz UV 254-366 nm (Chromatovue)

Anisaldeído / H₂SO₄ (Wagner *et al*, 1984)

NP/PEG (Wagner *et al*, 1984)

-) Equipamentos e Procedimentos

Cromatografia em camada delgada - CCD

Na análise por cromatografia em camada delgada comparativa as placas usadas foram preparadas aplicando-se uma suspensão de sílica gel 60 G (Merck) em água destilada, na proporção de 1:2 (m/v), sobre placas de vidro 5x10 ou 20x20 cm. Após a preparação as placas foram deixadas em repouso por cerca de 8 horas à temperatura ambiente, e depois colocadas em estufa a 120°C por cerca de 30 minutos. Foram utilizadas também placas prontas de sílica gel 60 (Merck) de diversos tamanhos.

Cromatografia em coluna aberta - CC

Foi utilizada sílica gel 60 (0,063-0,200 mm, Merck). A quantidade de sílica empregada foi de 20 vezes a quantidade de amostra. As aplicações foram realizadas pela impregnação do extrato em uma pequena quantidade de sílica posteriormente aplicada no topo da coluna. As eluições foram realizadas com o aumento da força de eluição da fase móvel, utilizando misturas de solventes (hexano, acetato de etila e metanol). As frações foram coletadas pela observação das manchas eluídas e/ou por frações de 10 mL.

Cromatografia de permeação em gel

O fracionamento por cromatografia por exclusão molecular foi realizado em colunas de vidro com 80 cm de altura por 2 cm de d.i., empacotada com Sephadex[®] LH-20 (Pharmacia). O solvente foi bombeado para a coluna com o auxílio de uma bomba peristáltica (Pharmacia) com fluxo de 0,5 mL/min. As frações com aproximadamente 10 ml cada foram coletadas em um coletor automático Redifrac (Pharmacia).

Cromatografia líquida de alta eficiência

HPLC-DAD-prep: Sistema Binário Varian Pro Star Bombas: modelo 210. PDA Detector Varian Pro Star modelo 330. Coluna Phenomenex 250 cm x 10 mm 5 µm RP₁₈. Fluxo: 2,0 mL/min Solventes: MeOH:H₂O, modo gradiente.

HPLC-DAD analítico: Sistema Binário Varian Pro Star Bombas: modelo 210. PDA Detector Varian Pro Star modelo 330. Coluna Phenomenex 25 cm x 4,6 mm 100 Å RP₁₈.

Espectrofotômetro

Espectrofotômetro marca Hach, modelo DR/4000 U para obtenção dos espectros na região do ultravioleta-visível.

Espectrometria de massas de alta resolução

Espectrômetro de massas ultrOTOFG-ESI-TOF Mass Spectrometer Bruker Daltonics (Billerica, MA - USA). As condições utilizadas foram: ionização por Eletrospray (modo positivo), temperatura da fonte 100 °C, voltagem capilar 3.0 kV e cone de voltagem 40 V. As amostras foram introduzidas na fonte de eletrospray usando uma seringa e fluxo de 8 mL/min. A pressão de He foi mantida constante.

Espectro de massas – Injeção direta

Espectrômetro de massas acoplado a um trapeador de íons, Ion-Trap (IT), LCQ Deca (ESI-IT-MS/MS, Thermo Finnigan). Os espectros foram obtidos pela técnica de análise por injeção em fluxo (FIA). Modo negativo para os espectros de primeira ordem (MS), bem como para os demais experimentos em múltiplos estágios (MSⁿ). Condições: voltagem do capilar – 4 V, voltagem do spray –5 kV, temperatura do capilar 280 °C, gás de arraste (N₂) fluxo 60 (unidades arbitárias). A faixa de aquisição foi *m/z* 50-2000, com dois ou mais eventos de varredura realizados simultaneamente no espectrômetro de massas LCQ. O primeiro evento foi uma varredura completa *full-scan* dos espectros de massas para a adquirir os dados dos íons na faixa *m/z* estabelecida. Os demais eventos foram experimentos MSⁿ realizados a partir dos dados da primeira varredura para

íons precursores pré-selecionados com energia de colisão entre 25 e 30 % da energia total do instrumento.

As análises de FIA-ESI-IT-MS/MS foram realizadas junto aos grupos do Prof. Dr. Cosimo Pizza e Sonia Piacente da Università degli Studi di Salerno e da Prof^a. Dr^a. Virginia Carbone do Istituto di Scienze dell Centro di Spettrometria di Massa Proteomica e Biomolecolare – Itália

Infravermelho

Espectrômetro marca Jasco®, modelo FT/IR – 4100 para obtenção de espectro na região do IV.

HPLC/MS

Cromatógrafo SURVEYOR MS micro HPLC (Thermo Finnigan, San José, CA, USA). Coluna Hypersil BDS RP18 column (250 x 2.1 mm, 5 µm) (Thermo, Bellefonte, PA, USA), com uma vazão de 200 µL min⁻¹. A fase móvel usada nas análises, foi composta dos seguintes solventes: Água (solvente A) e acetonitrila (solvente B), ambos com 0,5 % de ácido acético.

O espectrômetro de massas usado foi o Finnigan LCQ DECA XP Plus Ion Trap Instrument (Thermo Finnigan, San Jose, CA) equipado com Xcalibur software versão 1.3 (Thermo Finnigan) para tratamento dos dados. O ESI-MS operou nas seguintes condições: Modo negativo; Voltagem do capilar -4 V, voltagem do “spray” -4,5 kV, temperatura do capilar 275 °C, gás de arraste N₂ com uma vazão de 60 (unidades arbitrárias). A faixa de aquisição foi *m/z* 50-1500, com dois ou mais eventos de varredura realizados simultaneamente no espectrômetro de massas. O primeiro evento foi uma varredura completa (*full-scan*) do espectro de massas para adquirir os dados dos íons na faixa estabelecida. Os demais eventos foram experimentos MSⁿ realizados a partir dos dados da primeira varredura para íons precursores pré-selecionados, com energia de colisão entre 25-32 % da energia total do instrumento.

As análises de HPLC/MS foram realizadas junto aos grupos do Prof. Dr. Cosimo Pizza e Dr^a. Sonia Piacente da Università degli Studi di Salerno e da Prof^a. Dr^a. Virginia Carbone do Istituto di Scienze dell Centro di Spettrometria di Massa Proteomica e Biomolecolare – Itália

High Speed Counter-current Chromatography - HSCCC

High Speed Counter-current Chromatography P.C. Ind. Equipado com coluna de politetrafluoroetileno (PTFE) de 130 m x 1,6 mm de d.i.. O valor de β (estabelece o equilíbrio hidrodinâmico), varia de 0,5 na parte interna da coluna a 0,85 na parte externa da coluna. Volume total da coluna 325 mL. A rotação teve uma rotação de 850 rpm. Sample Injector P.C. Ind. Com loop de 16 mL. Bomba FMI Q2 da Waters.

Ponto de fusão

Aparelho digital MQ APF-301 (Microquímica, Brasil).

Procedimento cromatográfico para o *clean-up*

O *clean-up* dos extratos foi realizado em cartucho se SPE de C₁₈. 1 mg da amostra para cada 10 mg de C₁₈. O cartucho foi previamente ativado com MeOH (4 mL) e depois ambientado com H₂O (5 mL). O material a ser aplicado no suporte de SPE foi previamente solubilizado em aproximadamente 0,5 mL de MeOH com auxílio de ultra-som, sendo posteriormente adicionados 2 mL de H₂O. A eluição no suporte de C₁₈ obedeceu à seguinte ordem de eluição (MeOH/H₂O 2:8, v/v, MeOH/H₂O 1:1, v/v e MeOH). Alíquotas de 5 mL foram coletadas para cada composição do eluente empregado na dessorção dos analitos (Lanças, 2004). A fração MeOH/H₂O 1:1, v/v foi analisada por HPLC.

Ressonância magnética nuclear - RMN

Espectrômetro Varian INOVA 500, operando a 500 MHz (11,7 Tesla) utilizando probe inversa. Experimentos 1D e 2 D: NOESY-1D, TOCSY-1D, gCOSY, gHMBC e gHMQC.

9. Referências Bibliográficas

Referências

- AGRAWAL, P. K. **Carbon 13 NMR of Flavonoids**. Amsterdam: Elsevier, 1989. v. 39.
- ANCHA, H.; OJEAS, H.; TEDESCO, D.; WARD, A.; HARTY, R. F. Somatostatin-induced gastric against ethanol: involvement of nitric oxide and effects on gastric mucosal blood flow. **Regulatory Peptides**, v. 110, p. 107-113, 2003.
- ANDRADE, F. D. P. **Estudo químico de planta com atividade biológica**. 1996. 62 f. Monografia (Bacharelado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1996.
- 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.
- ARRIETA, J.; BENITEZ, J.; FLRES, E.; CASTILHO, C.; NAVARRETE, A. Purification of gastroprotective triterpenoids from stem bark of *Amphipterygium adstringens*; roles of prostaglandins, sulphidryls, nitric oxide and capsaicin neurons. **Planta Medica**, v. 69, p. 905-909, 2003.
- AVILA, J. R.; LASTRA, A. D. L.; MARTIN, M. J.; MOTILVA, V.; LUQUE, I.; DELGADO, D.; ESTEBAN, J.; HERRERIAS, J. Role of endogenous sulphidryls and neutrophil infiltration in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by piroxicam in rats. **Inflammation Research**, v. 45, p. 83-88, 1996.
- BENAVIDES, A.; MONTORO, P.; BASSARELLO, C.; PIACENTE, S.; PIZZA, C. Catechin derivatives in *Jatropha macrantha* stems: characterisation and LC/ESI/MS/MS quali-quantitative analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 40, p. 639-647, 2006.
- BAGCHI, D.; CARRYL, O. R.; TRAN, M. X.; KROHN, R. L.; BAGCHI, D. J.; GARG, A.; BAGCHI, M.; MITRA, S.; STOHS, S. J. Stress, diet and alcohol-induced oxidative gastrointestinal mucosal injury in rats and protection by bismuth subsalicylate. **Journal of Applied Toxicology**, v. 18, p. 3-13, 1998.
- 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.
- BERNSTEIN, L.; KALDOR, J.; McCANN, J.; PIKE, M. C. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the *Salmonella* test. **Mutation Research**, v. 97, p. 267-281, 1982.
- 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.
- BONGARD, M. Essai monographique sur les espèces d' *Eriocaulon* do Brésil. **Académie Imprimé St. Pétersbourg**, v. 6, p. 601-655, 1831.
- CALIXTO, J.; YUNES, R. A. (Org.). **Plantas medicinais sob a ótica da medicina moderna**. Chapecó: Argos, 2001.
- CANEDO, L. M.; PUENTS, J. L. F.; BAZ, J. P. A new isocoumarin antitumor agent produced by a marine bacterium. **Journal of Antibiotics**, v. 50, p. 175-176, 1997.

- CHAUMONTET, C.; BEX, V.; GAILLARD-SANCHEZ, I.; SEILLAN-HEBERDEN, C.; SUSCHETET, M.; MARTEL, P. Apigenin and tangeritin enhance gap junction intercellular communication in rat liver epithelial cells. **Carcinogenesis**, v. 15, p. 2325-2330, 1994.
- CHO, C. H. Current role of nitric oxide in gastrointestinal disorders. **Journal of Physiology Paris**, v. 95, p. 253-256, 2001.
- 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.
- COELHO, R. G.; VILEGAS, W.; DEVIENNE, K. F.; RADDI, M. S. G. A new cytotoxic naphthopyrone dimer from *Paepalanthus bromelioides*. **Fitoterapia**, v. 71, p. 497-500, 2000.
- CONWAY, W. D. **Countercurrent chromatography, apparatus theory & applications**. New York: VCH Publishers, 1989.
- CURTIS, G. H.; MacNAUGHTON, W. K.; GALL, D. G.; WALLACE, J. L. Intraluminal pH modulates gastric prostaglandin synthesis. **Canadian Journal of Physiology Pharmacology**, v. 73, p. 130-134, 1995.
- CUYCKENS, F.; CLAEYS, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 39, p. 1-5, 2004.
- CZECZOT, H.; TUDEK, B.; KUSZTELAK, J.; SZYMCZYK, T.; DOBROWOLSKA, B.; GLINKOWSKA, G.; MALINOWSKI, J.; STRZELECKA, H. Isolation and studies of the mutagenic activity in the Ames test of flavonoids naturally occurring in medical herbs. **Mutation Research**, v. 240, p. 209-216, 1990.
- DE LA LASTRA, C. A.; CABEZA, J.; MOTILVA, V.; MARTIN, M. J. Melatonin protects against gastric ischemia reperfusion injury in rats. **Journal of Pineal Research**, v. 23, n. 2, p. 47-52, 1997.
- DEVIENNE, K. F. **Avaliação da atividade biológica *in vitro* de isocumarinas naturais e semi-sintéticas obtidas de *Paepalanthus bromelioides***. 2000. 105 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2000.
- DEVIENNE, K. F.; RADDI, M. S. G.; VARANDA, E. A.; VILEGAS, W. *In vitro* cytotoxicity of some natural and semi synthetic isocoumarins from *Paepalanthus bromelioides*. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 57c, p. 85-88, 2002.
- DEVIENNE, K. F.; RADDI, M. S. G.; COELHO, R. G.; VILEGAS, W. Structure antimicrobial activity of some natural isocoumarins and their analogues. **Phytomedicine**, v. 12, p. 378–381, 2005.
- DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. London: John Wiley & Sons, 1997.
- DI STASI, L. C.; CAMUESCO, D.; NIETO, A.; VILEGAS, W.; ZARZUELO, A.; GALVEZ, J. Intestinal anti-inflammatory activity of paepalantine, an isocoumarin isolated from the capitula of *Paepalanthus bromelioides* in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. **Planta Medica**, v. 70, p. 315-320, 2004.
- 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 *Leiothrix* Ruhl. (Eriocaulaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 20, p. 31-32, 1992.
- DOKKEDAL, A. L.; SANTOS, L. C.; SANO, P. T.; VILEGAS, W. Chemistry Eriocaulaceae. **Zeitschrift für Naturforschung C**, 2008. In press.

- EDENHARDER, R.; VON PETERSDORFF, I.; RAUSCHER, R. Antimutagenic effects of flavonoids, chalcones and structurally related compounds on the activity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) and other heterocyclic amine mutagens from cooked food. **Mutation Research**, v. 287, p. 261-274, 1993.
- EL-ABHAR, H. S.; ABDALLAH, D. M.; SALEH, S. Gastroprotective activity of *Nigella sativa* oil and its constituent, thymoquinone, against gastric mucosal injury induced by ischaemia reperfusion in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 84, p. 251-258, 2003.
- FANG, J. J.; YE, G.; CHEN, L. W.; ZHAO, M. W. Antibacterial phenolic components from *Eriocaulon buergerianum*. **Phytochemistry**, v. 69, p. 1279-1286, 2008.
- FOUCAULT, A. P.; CHEVOLOT, L. Counter-current chromatography: instrumentation, solvent selection and some recent applications to natural product purification. **Journal of Chromatography A**, v. 808, p. 3-22, 1998.
- GARCIA, A. C. L. **Aplicações de técnicas analíticas na determinação dos constituintes químicos de “Sempre Vivas”**. 1997. 73 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1997.
- GELEJINSE, J. M.; LAUNER, L. J.; VANDERKUIP, D. A.; HOFMAN, A.; WITTEMAN, J. C. Inverse association of tea and flavonoids intakes with incident myocardial infarction: the Rotterdam study. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 75, p. 880-886, 2002.
- GENOVESE, M. I.; SANTOS, R. J.; HASSIMOTTO, N. M. A.; LAJOLO, F. M. Determinação do conteúdo de fenólicos totais em frutas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, p. 167-169, 2003.
- 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, 1978a.
- GIULIETTI, A. M. *Blastocaulon scirpeum* (Mart.) Giul. Uma nova combinação para *Paepalanthus scirpeum* Mart. **Boletim de Botânica Universidade de São Paulo**, v. 6. p. 61-66, 1978b.
- 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 Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 1997.
- GIULIETTI, A. M.; WANDERLEY, M. G. L.; WAGNER, H. M. L.; PIRANI, J. R.; PARRA, L. R. Estudos em “Sempre-Vivas”: taxonomia com ênfase nas espécies de Minas Gerais, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, v. 10, p. 329-353, 1996.
- GIULIETTI, A. M.; SCATENA, V. L.; SANO, P. T.; PARRA, L. R.; QUEIROZ, L. P.; HARLEY, R. M.; MENEZES, N. L.; YSEPPON, 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 on neotropical Eriocaulaceae, Monocots: systematics and evolutions**. Collingwood: CSIRO Publishing, 2000. p. 580-588.
- GOODMAN, A. G. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.
- HALTER, F.; TARNAWSKI, A. S.; SCHMASSMANN, A.; PESKAR, B. M. Cyclooxygenase 2-implications on maintenance of gastric mucosal integrity and ulcer healing: controversial issues and perspectives. **Gastroenterology**, v. 49, p. 443-453, 2001.

- HARBORNE, J. B. **The Flavonoids: advances in research since 1986.** London: Chapman and Hall, 1986. 676 p.
- HASSAN, M.; KASHIMURA, H.; MATSUMARU, K.; NAKAHARA, A.; IWATA, R.; HAYASHI, T. Gastric mucosal injury induced by local ischemia reperfusion in rats. Role of endogenous endothelin-1 and free radical. **Digestive Disease and Sciences**, v. 42, p. 1375-1380, 1983.
- HENSOLD, N.; GIULIETTI, A. M. Revision and redefinition of the genus *Rondonanthus* Herzog (Eriocauloaceae). **Annals Missouri Botanical Garden**, v. 78, p. 441-459, 1991.
- HILL, R. A. Naturally occurring isocoumarins. **Fortschritte der Chemie Organischer**, v. 49, p. 1-78, 1986.
- HIRANO, T.; ABE, T.; GOTOH, M.; OKA, K. Citrus flavone tangeretin inhibits leukaemic HL-60 cell growth partially through induction of apoptosis with less cytotoxicity on normal lymphocytes. **British Journal of Cancer**, v. 72, p. 1380-1388, 1995.
- HIROKAWA, M.; MIURA, S.; YOSHIDA, H.; KUROSE, I.; SHIGEMATSU, T.; HOKARI, R.; HIGUCHI, H.; WATANABE, N.; YOKOYAMA, Y.; KIMURA, H.; KATO, S.; ISHII, H. Oxidative stress and mitochondrial damage precedes gastric mucosal cell death induced by ethanol administration. **Alcoholic Clinical Experiment Research**, v. 22, p. 111-114, 1998.
- HIRUMA-LIMA, C. A. **Atividade antiulcerogênica da desidrocrotonina e do óleo essencial obtido a partir das cascas de *Croton cajucara*, uma planta da família Euphorbiaceae.** 1998. 102 f. Tese (Doutorado Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.
- HO, J. C.; CHEN, C. M. Flavonoids from the aquatic plant *Eriocaulon buergerianum*. **Phytochemistry**, v. 61, p. 405-408, 2002.
- HOSTETTMANN, K.; HOSTETTMANN, M.; MARSTON, A. **Técnicas de cromatografia preparativa.** Barcelona: Springer-Verlag Ibérica, 2001.
- HOSTETTMANN, K.; QUEIROS, F. E.; VIEIRA, C. P. **Princípios ativos de plantas superiores.** São Carlos: Ed. UFSCar, 2003.
- HOSTETTMANN, K.; APPOLONIA, C.; HOSTETTMANN, M. Droplet countercurrent chromatography – new applications in natural products chemistry. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 7, p. 231-238, 1984.
- ITO, Y. Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1065, p. 145-168, 2005.
- IWASHINA, T. The structure and distribution of the flavonoids in plants. **Journal of Plant Research**, v. 113, p. 287-299, 2000.
- JOVANONIC, S. V.; STEENKEN, S.; SIMIC, M. G.; HARA, Y. Antioxidant properties of flavonoids: reduction potentials and electron transfer reactions of flavonoids radicals. In: RICE-EVANS, C. T.; PACKER, L. (Ed.). **Flavonoids in health and disease.** San Diego: Marcel Dekker, 1998. p. 137-161.
- KANDASWAMI, C.; PERKINS, E.; SOLONIUK, D. S.; DRZEWIECKI, G.; MIDDLETON, E. Jr. Antiproliferative effect of citrus flavonoids on a human squamous cell carcinoma *in vitro*. **Cancer Letters**, v. 56, p. 147-152, 1991.
- KANDASWAMI, C.; PERKINS, E.; DRZEWIECKI, G.; SOLONIUK, D. S.; MIDDLETON, E. Jr. Differential inhibition of proliferation of human squamous cell carcinoma, glisarcoma, and embryonic fibroblast-like lung cells in culture by plant flavonoids. **Anticancer Drugs**, v. 3, p. 525-530, 1992.

- KAWAII, S.; TOMONO, Y.; KATASE, E.; OGAWA, K.; YANO, M. Effect of citrus flavonoids on HL-60 differentiation. **Anticancer Research**, v. 440, p. 1261-1269, 1999.
- KOSTOVA, I. Synthetic and natural coumarins as cytotoxic agents. **Current Medicinal Chemistry**, v. 5, p. 29-46, 2005.
- KWIECIEN, S.; BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, S. J. Effects of reactive oxygen species action on gastric mucosa in various models of mucosal injury. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 53, n. 1, p. 39-50, 2002.
- LANÇAS, F. M. **Extração em fase sólida (SPE)**. São Carlos: RiMa, 2004.
- LEITÃO, G. G. Uso da cromatografia contracorrente na obtenção de padrões de origem vegetal. **Revista Fito**, v. 1, p. 48-52, 2005.
- MANDAVA, N. B.; ITO, Y. **Countercurrent chromatography, theory and practice**. New York: Marcel Dekker, 1988.
- MATSUDA, H.; LI, Y.; YOSHIKAWA, M. Roles of capsaicin sensitive sensory nerves, endogenous nitric oxide, sulphhydryl and prostaglandins in gastoprotection by mormodic and oleanolic acid oligoglycoside, on ethanol-induced gastric mucosal lesion in rats. **Life Sciences**, v. 65, p. 27-32, 1999.
- MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutation Research**, v. 113, p.173-215, 1983.
- MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. Modern separation methods. **Natural Product Reports**, p. 391-413, 1991.
- MARSTON, A.; SLACANIN, I.; HOSTETTMANN, K. Centrifugal partition chromatography in the separation of natural products. **Phytochemical Analysis**, v. 1, p. 3-17, 1990.
- MARKHAM, K. R.; POTER, L. J. Flavonoids of the primitive liverwort *Takakia* and their taxonomic and phylogenetic significance. **Phytochemistry**, v. 18, p. 417-419, 1979.
- MAYWORM, M. A. S.; SALATINO, A. Flavonoides de quatro espécies de *Paepalanthus* Ruhl. (Eriocaulaceae). **Acta Botânica Brasileira**, v. 7, p. 129-133, 1993.
- MENEZES, N. L.; GIULIETTI, A. M. Campos Rupestres, paraíso botânico na Serra do Cipó. **Ciência Hoje**, v. 5, p. 38-44, 1986.
- MINCIS, M.; CHEBLI, J. M. F.; KHOURI, S. T.; MINCIS, R. Etanol e o trato gastrointestinal. **Arquivo de Gastroenterologia**, v. 32, p. 131-139, 1995.
- MIRANDA, M. C. **Atividade antiulcerogênica de plantas nativas do cerrado do Estado de São Paulo – pertencentes ao gênero *Indigofera***. 2006. 148 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.
- MIZUI, T.; DOUTEUCHI, M. Effect of polyamines on acidified ethanol-induced gastric lesions in rats. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 33, p. 934-945, 1983.
- MOLDENKE, N. H. **A fifth summary of the Verbenaceae, Avicenniaceae, Stilbeaceae, Iscrastylidaceae, Symphoremaceae, Nyctanthaceae and Eriocaulaceae of the world as to valid taxa, geographic distribution and synonymy**. Ann Arbor: Braun-Brunfield, 1971. 2 v.
- MONTEIRO, W. R.; MAZZONI, S. C. Aspectos morfológicos em ápice de inflorescências de Eriocaulaceae. **Boletim de Botânica Universidade de São Paulo**, v. 4, p. 23-29, 1976.

- MORIMOTO, Y.; SHIMOHARA, K.; OSHIMA, S.; SUKAMOTO, K. Effects of the new antiulcer agent kb-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of terpenone and cimetidine. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 57, p. 495-505, 1991.
- NAGAO, M.; MORITA, N.; YAHAGI, T.; SHIMIZU, M.; KUROYANAGI, M.; FUKUOKA, M.; YOSHIHARA, K.; NATORI, S.; FUJINO, T.; SUGIMURA, T. Mutagenicities of 61 flavonoids and 11 related compounds. **Environmental Mutagenesis**, v. 3, p. 401-419, 1981.
- 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.
- OKA, H.; HARADA, K.; ITO, Y.; ITO, Y. Separation of antibiotics by counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 812, p. 35-52, 1998.
- OKAMOTO, T.; KOBAYASHI, T.; YOSHIDA, S. Chemical aspects of coumarin compounds for the prevention of hepatocellular carcinomas. **Current Medicinal Chemistry**, v. 5, p. 47-51, 2005.
- PACE-ASCIAC, C. R.; HAHN, S.; DIAMANDS, E. P.; SOLEAS, G.; GOLDBERG, D. The red wine phenolics trans resveratrol and quercetin block human platelet aggregation in eicosanoid synthesis: implication for protection in against coronary heart disease. **Clinica Chimica Acta**, v. 219, p. 207-219, 1995.
- PARRA, L. R. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: *Syngonanthus* Ruhland (Eriocaulaceae). **Boletim de Botânica Universidade de São Paulo**, v. 17, p. 219-254, 1998.
- 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.
- RAINSFORD, K. D. Gastric ulcerogenicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs in mice with mucosa sensitized by cholinomimetic treatment. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 39, p. 669-672, 1987.
- RAVEN, H. P.; EVERT, F. R.; EICHHORN, E. S. **Biologia vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 478-485.
- REPETTO, M. G.; LLESUY, S. L. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. **Brazilian Journal of Medical Biological Research**, v. 35, p. 523-534, 2002.
- RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F. S.; MARQUES, E. K (Org.). **Mutagênese ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003.
- RICCI, C. V. **Perfil flavonóico de espécies das seções *Carpocephalus* Koern. e *Dimorphocaulon* Ruhl. de *Syngonanthus* Ruhl. (Eriocaulaceae)**. 1993. 157 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1993.
- 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. Eriocalaceae. In: ENGLER, A. **Das Pflanzenreich**. Leipzig: Engelmann, 1903. v. 13.
- 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.
- SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F.; SANTOS D. Y. A. C. Distribution and evolution of secondary metabolites in Eriocaulaceae, Lythraceae and Velloziaceae from “Campos Rupestres”. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, p. 931-940, 2000.

- SANDNES, D.; JOHANSEN, T.; TEIEN, G.; ULSAKER, G. Mutagenicity of crude senna and senna glycosides in *Salmonella typhimurium*. **Pharmacological Toxicology**, v. 71, p. 165-72, 1992.
- SANO, P. T. Revisão de Actinocephalus (Koern.) Sano – Eriocaulaceae. 1999. 241 f. Tese (Doutorado em Botânica) – Instituto de Biociência, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.
- SANTOS, L. C. **Estudo químico de *Paepalanthus hilairei* Koern. Eriocaulaceae**. 1997. 117 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1997.
- SANTOS, L. C. **Investigação química de plantas da família Eriocaulaceae**. 2001. 188 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2001.
- SANTOS, L. C.; PIACENTE, S.; RICCARDIS, F. D.; ELETTO, A. M.; PIZZA, C.; VILEGAS, W. Xanthonas 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.; 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.; MONTORO, P.; PIZZA, C.; VILEGAS, W. Atividade antioxidante de xantonas isoladas de espécies de *Leiothrix* (Eriocaulaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 67-74, 2003.
- SANTOS, L. C.; RODRIGUES, C. M.; SILVA, M. A.; COELHO, R. G.; SANNOMIYA, M.; VILEGAS, W. Chemical profile of *Eriocaulon ligulatum* (Vell.) LB Smith (Eriocaulaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 33, p. 1159-1166, 2005.
- SCATENA, V. L.; MENEZES, N. L. Anatomia de escapos e folhas de *Syngonanthus* Ruhl. (Eriocaulaceae) de Campos Rupestres. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 56, p. 317-332, 1996.
- SCHMIDT, I. B. **Etnobotânica e ecologia populacional de *Syngonanthus nitens*: “Sempre-Viva” utilizada para artesanato no Jalapão, Tocantins**. 2005. 91 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2005.
- SHAY, H.; KOMAROV, S. A.; FELS, S. S.; MERANZE, D.; GRUENSTEIN, M.; SIPLET, H. A simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rat. **Gastroenterology**, v. 5, p. 43-61, 1945.
- SHINOMIYA, K.; YOZO, K.; ITO, Y. Protein separation by cross-axis coil planet centrifuge with spiral column assemblies. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 25, p. 2665-2678, 2002.
- 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.
- SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.
- THOMAS, P. A.; ROBERT, K. Solvent selection guide for counter-current chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 538, p. 109-118, 1991.
- SOUZA-BRITO, A. R. **Manual de ensaios toxicológicos in vivo**. Campinas: Ed. UNICAMP, 1994.

TOMA, W.; TRIGO, J. R.; BENSUASKI, P. A. C.; SOUZA-BRITO, A. R. M. Modulation of gastrin and epidermal growth factor by pyrrolizidine alkaloids obtained from *Senecio brasiliensis* in acute and chronic induced gastric ulcer. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 82, p. 319-25, 2004.

VARANDA, E. A.; RADDI, M. S. G.; DIAS, F. L. P.; ARAUJO, M. C. S.; GIBRAN, S. C. A.; TAKAHASHI, C. S.; VILEGAS, W. Evaluation of the genotoxic potential of the isocoumarin paepalantine *in vivo* and *in vitro* mammalian systems. **Teratogenesis Carcinogenesis and Mutagenesis**, v. 17, p. 85-95, 1997.

VARANDA, E. A.; DEVIENNE, K. F.; RADDI, M. S. G.; FURUYA, E. M.; VILEGAS, W. Mutagenicity of paepalantine dimer and glycoside derivatives from *Paepalanthus bromelioides*. **Toxicology in Vitro**, p. 109-114, 2004.

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.; 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.

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. Quercetagenin 7-methyl ether glycosides from *Paepalanthus vellozioides* and *Paepalanthus latipes*. **Phytochemistry**, v. 51, p. 403-409, 1999b.

WAGNER, H. M.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E. M. **Plant drug analysis**. Berlin: Springer, 1984.

WONG, C. L.; WAY, M. K. Effects of aspirin and paracetamol on naloxone reversal of morphine-induced inhibition of gastrointestinal propulsion in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 73, p. 11-19, 1981.

YANG, K.; LAMPRECHT, S. A.; LIU, Y. Chemoprevention studies of the flavonoids quercetin and rutin in normal and azoxymethane treated mouse colon. **Carcinogenesis**, v. 21, p. 1655-1660, 2000.

ZHANG, T.; CAO, X.; HAN, X. Preparation of national certified reference materials of active compounds from natural products by CCC. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 26, p. 1986-1995, 2003.

ZIELISKI, H.; KOZOWSKA, H. Antioxidant activity and total phenolics in selected cereal rains and their different morphological fractions. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 48, p. 2008-2016, 2000.

ZHOU, S.; HAMBURGER, M. Application of liquid chromatography-atmospheric pressure ionization mass spectrometry in natural products analysis. Evaluation and optimization of electrospray and heated nebulizer interfaces. **Journal of Chromatography A**, v. 755, p. 189-204, 1996.