

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**CAMPUS DE ARARAQUARA**

**FELIPE HILÁRIO**

**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E  
ANTIMICROBIANA DOS ESCAPOS DE *Syngonanthus nitens* (BONG.)  
RUHLAND. (ERIOCAULACEAE)**

**ARARAQUARA - SP**

**2012**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
CAMPUS DE ARARAQUARA**

**FELIPE HILÁRIO**

**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E  
ANTIMICROBIANA DOS ESCAPOS DE *Syngonanthus nitens*  
(BONG.) RUHLAND. (ERIOCAULACEAE)**

**Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Graduação  
em Farmácia-Bioquímica da Faculdade  
de Ciências Farmacêuticas de  
Araraquara, da Universidade Estadual  
Paulista para obtenção do grau de  
Farmacêutico-Bioquímico.**



**Orientadora: Profa. Dra. Lourdes Campaner dos Santos**

**ARARAQUARA - SP**

**2012**

*Dedico este trabalho aos meus queridos pais, Eduardo e Maria Anália, aos meus irmãos, Eduardo e Fernando e à minha família.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à Profa. Dra. Lourdes Campaner dos Santos, minha orientadora, pela oportunidade, apoio, confiança e colaboração para o desenvolvimento deste projeto.

Ao Prof. Dr. Wagner Vilegas que com muito trabalho e dedicação liderou sabiamente o nosso grupo.

Ao Prof. Dr. Marcelo Aparecido de Souza pelos primeiros passos.

À Mestranda Mariana Pacífico pela amizade e parceria no desenvolvimento do projeto.

À Mestranda Fabiana pelo carisma e incentivo.

Aos meus amigos de laboratório Adriana, Aninha, Carol Benfatti, Carol Gomes, Carlos, Claudinha, Daniel, Michelle, Guilherme, Rodrigo, Leonardo, Ju Severi, Juliana Moreno, Mayara, Tiago Nakamura, Júlia, Raissa, Fabiano, Viviane, Clenilson, Portes, Marcelo, Claudia, Maria do Socorro e Lima Neto.

Ao Nivaldo pelas análises de RMN.

A todos os funcionários do IQ que contribuíram para a realização desse trabalho.

À Profa. Dra Taís Bauab e o Doutorando Marcelo Araújo pelos ensaios antimicrobianos.

À Profa. Dra. Clelia Akiko Hiruma pelo ensaio antiúlcera.

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

À FAPESP pelo suporte financeiro.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	15
1.1 Família Eriocaulaceae .....	15
1.2 O Gênero <i>Syngonanthus</i> .....	16
1.3 <i>Syngonanthus nitens</i> (Bong.) Ruhland.....	16
1.4 Estudos Químicos e Biológicos .....	20
2. OBJETIVOS .....	25
2.1 Objetivos gerais .....	25
2.2 Objetivos específicos.....	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1 MATERIAIS .....	27
3.1.1 Solventes e reagentes .....	27
3.1.2 Procedimentos cromatográficos .....	27
3.1.3 Equipamentos.....	27
3.2 MÉTODOS USADOS NO ESTUDO QUÍMICO.....	29
3.2.1 Coleta e identificação do material vegetal .....	29
3.2.2 Obtenção dos extratos de <i>S.nitens</i> .....	29
3.2.3 Perfil cromatográfico de <i>S. nitens</i> .....	30
3.2.4 Fracionamento em colunas de permeação em gel .....	30
3.2.5 HSCCC .....	32
3.2.6 HPLC – RI .....	32
3.2.7 HPLC – PDA.....	33
3.3 MÉTODOS USADOS NOS ENSAIOS BIOLÓGICOS .....	33
3.3.1 Avaliação da atividade antioxidante.....	33
3.3.2 Avaliação da atividade antimicrobiana.....	34
3.3.3 Avaliação da atividade antiúlcera .....	36
3.3.4 Etanol absoluto .....	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4.1 Perfil cromatográfico dos espectros no UV dos escapos de <i>S. nitens</i> .....	38
4.2 Fracionamento do EMeOH dos escapos de <i>S. nitens</i> .....	39
4.2.1 HSCCC .....	39
4.2.2 HPLC – RI .....	39

4.2.3 HPLC – PDA.....	40
4.3 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL.....	42
4.3.1 Elucidação estrutural de Sn1 .....	42
4.3.2 Elucidação estrutural de Sn2 .....	46
4.3.3 Elucidação estrutural de Sn3 .....	48
4.3.4 Elucidação estrutural de Sn4 .....	53
4.3.5 Elucidação estrutural de Sn5 .....	55
4.3.6 Elucidação estrutural de Sn6 .....	56
4.3.7 Elucidação estrutural de Sn7 .....	61
4.3.8 Elucidação estrutural de Sn8 .....	63
4.4 ATIVIDADE BIOLÓGICA .....	70
4.4.1 Atividade antioxidante.....	70
4.4.2 Atividade antimicrobiana.....	73
4.4.3 Atividade antiulcerogênica.....	77
4.4.4 Etanol absoluto .....	77
5. CONCLUSÕES .....	82
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	85
7. ANEXOS .....	98

## RESUMO

Neste trabalho é apresentado o estudo químico dos escapos de *Syngonanthus nitens* (Bong.) Ruhland, pertencente à família Eriocaulaceae. O extrato metanólico foi preparado por percolação, concentrado e fracionado em coluna de permeação em gel. As frações obtidas foram analisadas por CCDC e purificadas por HSCCC, HPLC-RI e HPLC-PDA. As estruturas foram determinadas usando ultravioleta, técnicas mono e bidimensionais de RMN e espectrometria de massas com fonte electrospray e analisador *íon trap* (modo de inserção direta). O perfil cromatográfico de HPLC-PDA mostrou que as flavonas derivadas da luteolina são os seus principais constituintes químicos. Foram isoladas as substâncias: 7-metoxiluteolina-8-C- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (**SN1**), 7-metoxiluteolina-6-C- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (**SN2**), 3',7-dimetoxiluteolina-6-C- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (**SN3**), luteolina (**SN4**), 6-hidroxiluteolina (**SN5**), luteolina-6-C- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (**Sn6**), 6-hidroxiluteolina-7-O- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (**Sn7**) e 7-metoxiluteolina-6-C- $\beta$ -D-glicopiranosídeo-(3'-O-3'')-7'-metoxiluteolina-8'-C- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (**Sn8**). Foram avaliadas as atividades antioxidantes do extrato metanólico dos escapos de *S. nitens* e do biflavonóide identificado, os quais apresentaram atividade significativa quando comparada com os padrões do ácido gálico, rutina e quercetina. A atividade antimicrobiana do extrato metanólico dos escapos e das substâncias identificadas derivadas da luteolina foram também avaliadas. O extrato metanólico dos escapos apresentou melhor atividade antimicrobiana, quando comparada com os demais flavonoides isolados e identificados do mesmo extrato. Finalmente, foi avaliada a atividade antiulcerogênica do extrato metanólico dos escapos, utilizando-se o modelo de lesão ulcerativa induzida por etanol absoluto.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema de capítulos, escapos e folhas (Parra, 1998) .....	15
<b>Figura 2.</b> Campos úmidos, local de ocorrência de <i>Syngonanthus nitens</i> , e moradores locais realizando a colheita (Fonte: disponível em <a href="http://www.ispn.org.br">www.ispn.org.br</a> , acesso em maio de 2010) .....	17
<b>Figura 3.</b> <i>Syngonanthus nitens</i> (Fonte: disponível em <a href="http://www.pequi.org.br">www.pequi.org.br</a> e <a href="http://www.ispn.org.br">www.ispn.org.br</a> , acesso em maio de 2010).....	17
<b>Figura 4.</b> Artesanato realizado com capim dourado. (Fonte: disponível em <a href="http://www.ispn.org.br">www.ispn.org.br</a> , acesso em maio de 2010).....	18
<b>Figura 5.</b> Localização da área do Jalapão, no Tocantins (Fonte: disponível em <a href="http://www.revistabrasileiros.com.br">www.revistabrasileiros.com.br</a> , acesso em maio de 2010).....	19
<b>Figura 6.</b> CCDC das reuniões obtidas do Sephadex LH-20 .....	31
<b>Figura 7.</b> Equação utilizada para verificação da variação da absorbância (% $\Delta$ ), onde $A_0$ é a absorbância do DPPH em metanol e $A$ corresponde à absorbância verificada após 30 minutos de reação .....	34
<b>Figura 8.</b> Cromatograma representando o perfil do extrato metanólico dos escapos de <i>S. nitens</i> (RP-18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 $\mu$ m; Solvente A: H <sub>2</sub> O + 0,05% TFA; Solvente B: ACN + 0,05% TFA. Gradiente de 10-50% de B em A em 40 min; fluxo de 1,0 mL min <sup>-1</sup> , $\lambda$ = 240 nm) e espectros da absorção na região do UV dos picos destacados.....	38
<b>Figura 9.</b> Espectro de massas de primeira ordem (modo <i>full-scan</i> ) de <b>Sn1</b> , avaliado em modo negativo.....	42
<b>Figura 10.</b> Representação de íons produtos característicos formados pela clivagem de uma C-hexose (A) e de uma O-hexose (B). O sinal $\pm$ indica os modos de ionização, positivo ou negativo.....	43



<b>Figura 11.</b> Espectro de massas de segunda ordem de <b>Sn1</b> , avaliado em modo negativo.....	43
<b>Figura 12.</b> Espectro da absorção na região no UV de <b>Sn1</b> .....	44
<b>Figura 13.</b> Estrutura de <b>Sn1</b> .....	45
<b>Figura 14.</b> Espectro de massas de primeira ordem (modo <i>full-scan</i> ) da fração <b>Sn2</b> , avaliado em modo negativo.....	46
<b>Figura 15.</b> Espectro de absorção na região no UV de <b>Sn2</b> .....	47
<b>Figura 16.</b> Estrutura de <b>Sn2</b> .....	48
<b>Figura 17.</b> Espectro de massas de primeira ordem (modo <i>full-scan</i> ) de <b>Sn3</b> , avaliado em modo negativo.....	49
<b>Figura 18.</b> Espectro de massas de segunda ordem (modo <i>full-scan</i> ) de <b>Sn3</b> , avaliado em modo negativo.....	49
<b>Figura 19.</b> Espectro de massas de terceira ordem (modo <i>full-scan</i> ) de <b>Sn3</b> , avaliado em modo negativo.....	50
<b>Figura 20.</b> Estrutura de <b>Sn3</b> .....	51
<b>Figura 21.</b> Espectro de massas de primeira ordem (modo <i>full-scan</i> ) de <b>Sn4</b> , avaliado em modo negativo.....	53
<b>Figura 22.</b> Espectro da absorção na região no UV de <b>Sn4</b> .....	53
<b>Figura 23.</b> Estrutura de <b>Sn4</b> .....	54
<b>Figura 24.</b> Estrutura de <b>Sn5</b> .....	55
<b>Figura 25.</b> Espectro de massas de primeira ordem (modo <i>full-scan</i> ) de <b>Sn-6</b> , analisado em modo negativo.....	56
<b>Figura 26.</b> Representação de íons produtos característicos formados pela clivagem de uma C-hexose (A) e de uma O-hexose (B). O sinal $\pm$ indica os modos de ionização, positivo ou negativo (Cuyckens e Claeys, 2004).....	57

<b>Figura 27.</b> Espectro de massas de segunda ordem de $m/z$ 447 de <b>Sn6</b> .....	57
<b>Figura 28.</b> Proposta de fragmentação para <b>Sn6</b> baseada em CUYCKENS E CLAEYS, (2004). Onde: $0,2X = [M - H - 120]^-$ ; $0,3X = [M - H - 90]^-$ .....	58
<b>Figura 29.</b> Estrutura de <b>Sn6</b> .....	59
<b>Figura 30.</b> Espectro de massas de segunda ordem de $m/z$ 463 de <b>Sn7</b> analisado em modo negativo.....	61
<b>Figura 31.</b> Estrutura de <b>Sn7</b> .....	62
<b>Figura 32.</b> Espectro da absorção na região no UV de <b>Sn8</b> .....	63
<b>Figura 33.</b> Espectro de massas de primeira ordem (modo <i>full-scan</i> ) de <b>Sn8</b> , analisado em modo negativo.....	64
<b>Figura 34.</b> Espectro de massas de segunda ordem de $m/z$ 463 de <b>Sn8</b> analisado em modo negativo.....	64
<b>Figura 35.</b> Estrutura de <b>Sn8</b> .....	67
<b>Figura 36.</b> Capacidade seqüestradora de radicais livres dos extratos MeOH (capítulos e escapos) de <i>S. nitens</i> sobre o DPPH. Absorbância em 517 nm após 30 min de reação.....	70
<b>Figura 37.</b> Reação de estabilização do radical livre DPPH por doação de átomos de hidrogênios de uma substância antioxidante .....	71
<b>Figura 38.</b> Efeito do extrato metanólico de capítulos e escapos de <i>S. nitens</i> no modelo de lesão ulcerativa induzida por etanol absoluto. Resultados expressos na forma de média $\pm$ E.P.M. (n: 5) da área de lesão e na forma de porcentagem de proteção. Anova – Dunnett ** $p < 0,01$ .....	79

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Massa das frações obtidas da reunião das Sephadex e respectivos métodos de fracionamento .....	31
<b>Tabela 2.</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de <b>Sn1-3</b> (11,7 T, DMSO- <i>d</i> 6) .....	52
<b>Tabela 3.</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de <b>Sn4-6</b> (11,7 T, DMSO- <i>d</i> 6) .....	60
<b>Tabela 4.</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de <b>Sn7-8</b> (11,7 T, DMSO- <i>d</i> 6).....	68
<b>Tabela 5.</b> Atividade antifúngica dos extratos metanólicos de capítulos, escapos e flavonóides identificados nos escapos de <i>S. nitens</i> .....	73
<b>Tabela 6.</b> Atividade antibacteriana dos extratos metanólicos de escapos e capítulos de <i>S. nitens</i> .....	74
<b>Tabela 7.</b> Concentração bactericida mínima (CBM) e concentração fungicida mínima (CFM) dos extratos metanólicos de escapos e capítulos de <i>S. nitens</i> .....	74
<b>Tabela 8.</b> Concentração bactericida mínima (CBM) de flavonoides identificados em <i>S.nitens</i> .....	75
<b>Tabela 9.</b> Concentração fungicida mínima (CFM) de flavonoides identificados em <i>S.nitens</i> .....	75

## LISTA DE ESPECTROS

<b>Espectro 1.</b> de RMN H <sup>1</sup> (DMSO-d <sub>6</sub> , 11,4 t) de <b>Sn1</b> .....	98
<b>Espectro 2.</b> gHSQC (DMSO-d <sub>6</sub> , 11,4 t) de <b>Sn1</b> .....	99
<b>Espectro 3.</b> gHMBC (DMSO-d <sub>6</sub> , 11,4 t) de <b>Sn1</b> .....	99
<b>Espectro 4.</b> gCOSY (DMSO-d <sub>6</sub> , 11,4 t) de <b>Sn1</b> .....	100
<b>Espectro 5.</b> TOCSY 1D (DMSO -d <sub>6</sub> , 11,4 t) de <b>Sn1</b> .....	100
<b>Espectro 6.</b> de RMN H <sup>1</sup> ( DMSO -d <sub>6</sub> , 11,4 t) de <b>Sn2</b> .....	101
<b>Espectro 7.</b> gHSQC (DMSO-d <sub>6</sub> , 11,4 t) de <b>Sn2</b> .....	101
<b>Espectro 8.</b> gHMBC (DMSO-d <sub>6</sub> , 11,4 t) de <b>Sn2</b> .....	102
<b>Espectro 9.</b> TOCSY-1D(DMSO-d <sub>6</sub> , 11,4 t) de <b>Sn2</b> .....	102
<b>Espectro 10.</b> RMN de <sup>1</sup> H (DMSO -d <sub>6</sub> , 11,4 t) de <b>Sn3</b> .....	103
<b>Espectro 11.</b> gCOSY (DMSO -d <sub>6</sub> , 11,4 t) de <b>Sn3</b> .....	103
<b>Espectro 12.</b> gHSQC (DMSO -d <sub>6</sub> , 11,4 t de <b>Sn3</b> .....	104
<b>Espectro 13.</b> gHSBC (DMSO -d <sub>6</sub> , 11,4 t de <b>Sn3</b> .....	104
<b>Espectro 16.</b> gCOSY (DMSO -d <sub>6</sub> , 11,4 t)de <b>Sn4</b> .....	106
<b>Espectro 17.</b> gHMBC (DMSO -d <sub>6</sub> , 11,4 t de <b>Sn4</b> .....	106
<b>Espectro 18.</b> gHMBC (DMSO -d <sub>6</sub> , 11,4 t) de <b>Sn4</b> .....	107
<b>Espectro 19.</b> de RMN H <sup>1</sup> (DMSO -d <sub>6</sub> , 11,4 t) de <b>Sn5</b> .....	107
<b>Espectro 20.</b> gCOSY (DMSO -d <sub>6</sub> , 11,4 t) de <b>Sn5</b> .....	108
<b>Espectro 21.</b> gHMQC (DMSO d <sub>6</sub> , 11,4 t) de <b>Sn5</b> .....	108
<b>Espectro 22.</b> gHMBC (DMSO -d <sub>6</sub> , 11,4 t) de <b>Sn5</b> .....	109
<b>Espectro 23.</b> de RMN H <sup>1</sup> (DMSO -d <sub>6</sub> , 11,4 t) de <b>Sn-6 e Sn-7</b> .....	110
<b>Espectro 23a.</b> de RMN H <sup>1</sup> (DMSO -d <sub>6</sub> , 11,4 t) de <b>Sn-6 e Sn-7</b> (expansão δ 4,5 a 7,5) .....	110

<b>Espectro 24.</b> gHSQC (11,4 t, DMSO -d <sub>6</sub> ) de <b>Sn-6 e Sn-7</b> ( expansão de $\delta$ 65 a 83 a $\delta$ 90 a 120) .....	111
<b>Espectro 25.</b> gHMBC(11,4 t, DMSO -d <sub>6</sub> ) de <b>Sn-6 e Sn-7</b> .....	112
<b>Espectro 26.</b> TOCSY 1D (DMSO -d <sub>6</sub> , 11,4 t) de <b>Sn-6 e Sn-7</b> .....	112
<b>Espectro 27.</b> de RMN <sup>1</sup> H (DMSO -d <sub>6</sub> , 11,4 t) de <b>Sn8</b> .....	113
<b>Espectro 27a.</b> de RMN <sup>1</sup> H (DMSO -d <sub>6</sub> , 11,4 t) de <b>Sn8</b> (expansão $\delta$ 3,7 a 5,0) .....	113
<b>Espectro 28.</b> gHSQC (DMSO -d <sub>6</sub> , 11,4 t) de <b>Sn8</b> .....	114
<b>Espectro 29.</b> gHMBC (DMSO -d <sub>6</sub> , 11,4 t) de <b>Sn8</b> .....	114
<b>Espectro 30.</b> TOCSY 1D (DMSO -d <sub>6</sub> , 11,4 t) de <b>Sn8</b> .....	115
<b>Espectro 31.</b> gCOSY (DMSO-d <sub>6</sub> , 11,4 t) de <b>Sn8</b> .....	115

## LISTA DE ABREVIATURAS

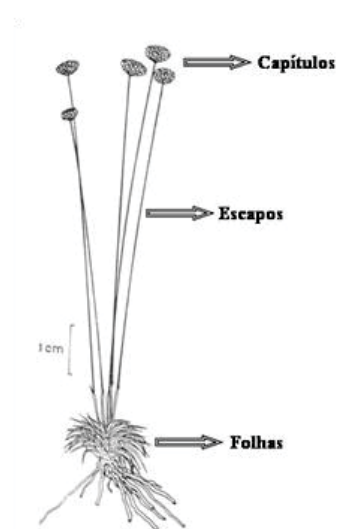
CCDC	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
<i>d</i>	Dubleto
DCM	Diclorometano
<i>dd</i>	Duplo dubleto
d.i.	Diâmetro interno
DMSO- $d_6$	Dimetilsulfóxido deuterado
<i>DPPH</i>	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
<i>ESI-IT-MS</i>	Eletrospray ion trap mass spectrometry
EM	Espectrometria de massas
EMeOH	Extrato metanólico
$\delta$	Deslocamento químico
<i>gHMBC</i>	Gradient Heteronuclear Multiple Bond Correlations
<i>gHMQC</i>	Gradient Heteronuclear Multiple Quantun Coherence
<i>gCOSY</i>	Gradient Correlated Spectroscopy
HPLC-PDA	High Performance Liquid Chromatography-Photodiode Array
HPLC-RI	High Performance Liquid Chromatography (Refractive index)
HSCCC	High Speed Countercurrent Chromatography
Hz	Hertz
<i>J</i>	Constante de acoplamento
$K_d$	<i>Coeficiente de distribuição</i>
<i>m</i>	Multiplete
<i>m/z</i>	Relação massa carga
MeOH	Metanol
MS	Mass spectrometry
<i>n</i> -PrOH	<i>n</i> -propanol
<i>n</i> -BuOH	<i>n</i> -butanol
$R_f$	Retention factor (Fator de retenção)
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
<i>s</i>	Singleto
<i>Sn</i>	<i>Syngonanthus nitens</i>
<i>s/</i>	Singleto largo
Spdx	Sephadex <sup>®</sup>
TFA	Ácido trifluoroacético
TMS	Tetrametilsilano
$t_r$	Tempo de retenção
TOCSY	Totally correlated spectroscopy
UV	Ultravioleta
<i>v</i>	Volume

## **INTRODUÇÃO**

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Família Eriocaulaceae

A família Eriocaulaceae possui 11 gêneros e aproximadamente 1200 espécies (Andrade *et al.*, 2010). É caracterizada por possuir inflorescências do tipo capítulos, que são envolvidos por brácteas, e folhas em forma de roseta, de onde surgem os escapos, e destes, surgem os capítulos (Fig. 1) (Giulietti, 1996; Ricci *et al.*, 1996).



**Figura 1.** Esquema de capítulos, escapos e folhas (Parra, 1998)

Essas plantas podem ocorrer em diversos habitats, que variam desde pântanos e ambientes aquáticos e solos arenosos ou pedregosos, onde crescem principalmente. (Giulietti *et al.*, 1996; Ricci *et al.*, 1996; Scatena *et al.*, 1996).

As Eriocaulaceae são popularmente conhecidas como “Sempre-vivas”, esse nome é dado no Brasil a partes de plantas, geralmente, escapos e inflorescências, que conservam a aparência de estruturas vivas mesmo depois de destacadas e



secas e que são comercializadas e exportadas para decorações interiores (Giulietti *et al.*, 1997; Ramos *et al.*, 2005).

As espécies de “sempre-vivas” são oriundas dos cerrados do Centro-Oeste e Sudeste do Brasil e dos campos rupestres de Minas Gerais, Bahia e Goiás.

## **1.2 O Gênero *Syngonanthus***

A maioria das espécies da família Eriocaulaceae que são comercializadas como “sempre vivas” pertencem ao gênero *Syngonanthus* (Lazzari, 2000; Ramos *et al.*, 2005).

Este gênero possui aproximadamente 200 espécies, com distribuição nas Américas e na África, sendo a maior parte encontrada na América do Sul, nos Estados de Minas Gerais e Bahia, no Brasil, onde podem ser encontradas cerca de 180 espécies (Giulietti, 1997).

Essas plantas são abundantes principalmente na região da Cadeia do Espinhaço e são importante fonte de renda para as famílias que habitam esse local, onde há risco de extinção devido ao intenso extrativismo (Lazzari, 2000).

## **1.3 *Syngonanthus nitens* (Bong.) Ruhland**

A espécie *S. nitens* (Bong.) Ruhland é amplamente distribuída pelo Brasil Central, encontrada em campos úmidos adjacentes a veredas e matas de galeria inundáveis (Fig. 2) (Schmidt *et al.*, 2007). Ocorrem também, no Paraguai, Bolívia, Venezuela e Peru (Parra, 1998).



**Figura 2.** Campos úmidos, local de ocorrência de *Syngonanthus nitens*, e moradores locais realizando a colheita (Fonte: disponível em [www.ispn.org.br](http://www.ispn.org.br), acesso em maio de 2010)

Os escapos de *S. nitens* são utilizados para confecção de artesanato em regiões do Cerrado, principalmente na Cadeia do Espinhaço, nos Estados de Minas Gerais e Bahia (Schmidt *et al.*, 2007). No Estado de Minas Gerais, essa planta é conhecida como “sedinha” (Giulietti *et al.*, 1996). É encontrada em regiões de Goiás e na Serra do Jalapão no Tocantins, onde é conhecida como “capim dourado” (Schmidt *et al.*, 2007).



**Figura 3.** *Syngonanthus nitens* (Fonte: disponível em [www.pequi.org.br](http://www.pequi.org.br) e [www.ispn.org.br](http://www.ispn.org.br), acesso em maio de 2010)

O capim dourado (Fig. 3) é amplamente utilizado para confecção de artesanato (Fig. 4), consistindo em uma espécie de grande importância econômica para a população da região do Jalapão (Schmidt, 2005).



**Figura 4.** Artesanato realizado com capim dourado. (Fonte: disponível em [www.ispn.org.br](http://www.ispn.org.br), acesso em maio de 2010)

Ao contrário do que ocorre com outras “sempre-vivas”, que são exploradas e comercializadas por causa das flores, o capim dourado na região do Jalapão é valorizado pelos seus escapos. Assim, pode-se esperar a produção de sementes para se realizar a colheita, o que pode ser uma forma de manejo simples e efetiva para garantir a sustentabilidade da atividade extrativista na região do Jalapão (Schmidt e Figueiredo, 2007)

A região do Jalapão está localizada a leste do Tocantins e faz divisa com Bahia, Piauí e Maranhão; está inserida no bioma Cerrado e seus principais municípios são mateiros, Ponte Alta do Tocantins e São Félix do Tocantins (Figueiredo, 2007). Nessa região está localizada uma grande área do Cerrado conservado, e existem áreas em unidades de conservação de proteção integral (Silva e Bates, 2002). Existem três unidades, a Estação Ecológica Serra Geral do Tocantins, Parque Estadual do Jalapão e Parque Nacional Nascentes do Paraíba ( Fig. 5) (Silva e Bates, 2002; Figueiredo, 2007).



**Figura 5.** Localização da área do Jalapão, no Tocantins (Fonte: disponível em [www.revistabrasileiros.com.br](http://www.revistabrasileiros.com.br), acesso em maio de 2010)

O artesanato no Jalapão se caracteriza pela técnica de costurar conjuntos de escapos de capim dourado em feixes concêntricos, com seda de buriti (*Mauritia flexuosa* Mart., Arecaceae). A seda utilizada é fibra de folhas novas de buriti (Figueiredo, 2007).

Essa técnica tem origem indígena e teve início na região há aproximadamente 80 anos (Schmidt, 2005). Porém foi na década de 1990 que houve maior divulgação e expansão das vendas do artesanato de peças feitas com capim dourado, com consequente aumento do número de artesãos interessados na confecção artesanal (Schmidt, 2005).

Este crescente interesse pode ocasionar aumento da coleta da planta, gerando extrativismo desordenado, o que comprometeria a reprodução da espécie, causando declínio populacional (Schmidt, 2005).

Essa atividade, porém, está sendo regulamentada e a população conscientizada dos cuidados na colheita, para que a espécie não entre em extinção, o que garante a sustentabilidade do artesanato (Figueiredo, 2007).

Em 2000, o Instituto Brasileiro de Meio Ambientes e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), juntamente com outras instituições, iniciou estudos para a sustentabilidade da atividade artesanal do capim dourado (Schmidt *et al.*, 2006).

Por isso, o artesanato do capim dourado é uma atividade viável, e o seu fortalecimento pode gerar renda, conservar áreas do Cerrado, evitando que estas sejam convertidas em áreas de plantio de espécies agrícolas, o que geraria perda da biodiversidade e processos erosivos no solo (Schmidt, 2005).

Diante da escassez de informações na literatura sobre a química de *S. nitens*, faz-se necessário a investigação dessa espécie, com o objetivo de adquirir maiores informações sobre a sua composição química. Também, pretende-se fornecer subsídios, para que estas informações, aliadas ao conhecimento tradicional existente, indique formas sustentáveis para a atividade extrativista na região do Jalapão.

#### **1.4 Estudos Químicos e Biológicos**

Os primeiros estudos químicos de plantas da família Eriocaulaceae relataram a presença de flavonoides em espécies dos gêneros *Eriocaulon*, *Paepalanthus*, *Leiothrix*, e *Syngonanthus*, bem como a relação da distribuição destas substâncias nesses gêneros e sua evolução (Bate Smith e Harborne, 1969; Dokkedal e Salatino, 1992; Mayworm e Salatino, 1993, Ricci *et al.*, 1996). Foi descrito que em espécies de *Eriocaulon* e *Paepalanthus*, há a predominância de compostos fenólicos e flavonóis, como a quercetagetina e patuletina, enquanto que em *Leiothrix* e

*Syngonanthus*, há a predominância de flavonas, principalmente C-glicosiladas (Salatino *et al.*, 2000, Dokkedal *et al.*, 2004).

Foram isolados de capítulos de *Eriocaulon ligulatum*, um flavonóide acilado (6,4-dimetoxiquercetina-3-O- $\beta$ -D-6'' [3,4,5-triidroxi (E)-cinamoil] glicopiranosídeo), um dímero de naftopiranona, denominado eriocaulina e flavonoides (6-metoxiapigenina-7-O- $\beta$ -D-glicopiranosídeo e 6-metoxiapigenina-7-O- $\beta$ -D alopiranosídeo).

O extrato e algumas frações enriquecidas de *E. ligulatum* apresentaram atividade mutagênica para algumas linhagens de *Salmonella* (Silva *et al.*, 2007). Estudos com espécies de *Paepalanthus* identificaram a presença da paepalantina, uma isocumarina, dos capítulos de *P. bromelioides* (Vilegas *et al.*, 1990), um metabólito não usual em plantas, e frequente em microorganismos dos gêneros *Penicillium spp* e *Fusarium spp* (Hill, 1986). Ensaio biológico *in vitro* indicaram intensa atividade antibiótica contra *Bacillus cereus* (7,5  $\mu$ g/ml), *Staphylococcus aureus* (7,5  $\mu$ g/ml), *S.epidermidis* (15  $\mu$ g/ml) e *Escherichia coli* (250 7,5  $\mu$ g/ml) (Varanda *et al.*, 1997; Tavares *et al.*, 1999).

Houve isolamento do dímero da paepalantina, também de *P. bromelioides*, testado biologicamente e com grande potencial citotóxico. Esse composto foi isolado por Coelho *et al.*, (2000).

Estudos avaliaram a toxicidade, mutagenicidade e a atividade antimicrobiana da paepalantina e seus derivados (Devienne *et al.*, 2005; Varanda *et al.*, 2004), em que se compara também a relação estrutura-atividade da paepalantina e seus derivados, demonstrando que a substituição das hidroxilas livres nas posições 9 e ou 10 da paepalantina resulta em compostos significativamente menos tóxicos e com menor atividade antimicrobiana para alguns microorganismos. Concluiu também que



a ausência de mutagenicidade pode estar relacionada com a configuração espacial da molécula, que proporciona impedimento estérico para sua interação com o DNA.

Foi isolado um composto das folhas de *Paepalanthus argenteus*, caracterizado como xeractinol, um diidroflavonol C-glicosilado, que pode ser utilizado como marcador taxonômico, por não ter sido encontrado em nenhum outro táxon de Eriocaulaceae (Dokkedal *et al.*, 2007). De *Paepalanthus polyanthus*, foram isolados vários flavonóides 6-metoxilados-glicosilados derivados da quercetina e 6-metoxiquercetina-3-O-(6"-E-feruloil)- $\beta$ -D-glucopiranosideo (Santos *et al.*, 2002).

Das folhas de *Paepalanthus planifolius*, foi isolada a planifolina, além de outros flavonóides derivados da quercetina (Santos *et al.*, 2003). A planifolina apresentou atividade citotóxica in vitro em linhagens celulares tumorais de mama e de pulmão (Santos *et al.*, 2005).

Ricci *et al.*, (1996) descreveu a presença de flavonas C- glicosiladas e O-glicosiladas, derivadas da luteolina em espécies do gênero *Syngonanthus*. Os autores concluíram que, devido a presença das flavonas os gêneros *Syngonanthus* e *Leiothrix* são próximos.

Estudos químicos realizados por Dokkedal (2000) e Santos *et al.*, (2001) descrevem o isolamento e a identificação de flavonas e xantonas dos capítulos de *Leiothrix flavescens* (Bong.) Ruhland, sendo que as xantonas isoladas do gênero *Leiothrix* apresentaram atividade antioxidante (Santos *et al.*, 2003).

Quanto ao gênero *Syngonanthus*, extratos de espécies de *Syngonanthus* apresentaram atividade antiulcerogênica (Moraes *et al.*, 2010). Extratos contendo flavonoides, de *Syngonanthus bisulcatus* (Coelho *et al.*, 2006) e de *Syngonanthus arthrotrichus* (Batista *et al.*, 2004) apresentaram atividade antiulcerogênica no modelo de úlcera induzida por etanol/ácido clorídrico. Pacifico *et al.*, (2011)

identificaram 17 compostos, entre flavonas e xantonas, incluindo 6 novas moléculas, em extratos de *Syngonanthus nitens*.

Portanto, diante das informações relevantes já existentes na literatura sobre a química e do potencial biológico apresentando até então de moléculas isoladas de Eriocaulaceae, neste trabalho estudamos a química do extrato metanólico de escapos de *Syngonanthus nitens*, e suas atividades antioxidante, antimicrobianas e antiúlceras.



## **OBJETIVOS**

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos gerais

Realizar o estudo fitoquímico do extrato metanólico dos escapos de *Syngonanthus nitens* e avaliar as atividades antioxidantes, antimicrobianas e antiulcerogênicas.

### 2.2 Objetivos específicos

- Traçar o perfil cromatográfico HPLC-PDA do extrato metanólico dos escapos de *S.nitens*;
- Isolar e purificar os constituintes químicos usando métodos cromatográficos;
- Identificar e/ou elucidar as substâncias isoladas por técnicas espectroscópicas e espectrométricas;
- Avaliar a atividade antioxidante por DPPH do extrato metanólico e/ou frações enriquecidas e/ou substâncias puras obtidas de *S.nitens*;
- Avaliar a atividade antimicrobiana do extrato metanólico e/ou frações enriquecidas e/ou substâncias puras obtidas de *S.nitens*;
- Avaliar a atividade antiúlcera do extrato metanólico dos escapos de *S.nitens*.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAIS

##### 3.1.1 Solventes e reagentes

Solventes PA: acetato de etila, ácido acético, clorofórmio, metanol, *n*-butanol, *n*-propanol (Synthlab<sup>®</sup>).

Solventes grau HPLC: metanol (Baker<sup>®</sup>), acetonitrila (Mallinckrodt<sup>®</sup>), água purificada em sistema Milli Q (Millipore<sup>®</sup>) e ácido trifluoroacético (TFA) (Mallinckrodt<sup>®</sup>).

Solvente deuterado: DMSO-d<sub>6</sub> (Sigma Aldrich<sup>®</sup>).

Reagentes para reveladores e triagem preliminar: anisaldeído/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e NP/PEG (WAGNER *et al.*, 1984).

##### 3.1.2 Procedimentos cromatográficos

Nas análises por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) foram utilizadas placas preparadas de sílica gel 60 (Merck<sup>®</sup>) (20 x 20 cm x 0,2 mm).

Para o fracionamento por cromatografia em permeação em gel foram utilizadas colunas de vidro preenchidas com Sephadex LH-20 (57 cm x 3,0 cm d.i.), acopladas a uma bomba peristáltica modelo P1 18-1110-91 (Pharmacia<sup>®</sup>) e a um coletor automático Redifrac (Pharmacia<sup>®</sup>).

##### 3.1.3 Equipamentos

As balanças utilizadas foram: balança analítica (Marte<sup>®</sup>, AL 200) com capacidade para 200g e precisão de 0,001g para pesagem das frações e balança

(Quimis<sup>®</sup>, BG 4000) com capacidade para 4.040g e precisão de 0,01g para pesagem dos extratos.

A concentração do extrato e das amostras foi efetuada em evaporador rotativo (Heidolph<sup>®</sup>, Laborota 4001 – efficient) equipado com bomba à vácuo (Heidolph<sup>®</sup>, Rotavac valve control).

Utilizou-se centrífuga da marca CELM, modelo COMBATE, a 2500 rpm na preparação das amostras para os fracionamentos.

A purificação das substâncias foi realizada em cromatógrafos: HPLC - (Knauer<sup>®</sup>), acoplado a um detector de índice de refração, Smartline IR Detector 2300/2400 (Knauer<sup>®</sup>) com coluna de fase reversa C18 (Phenomenex<sup>®</sup>) (250 x 10 mm d.i.) com partícula de tamanho médio de 10mm; HPLC - modelo PU-2089 (Jasco<sup>®</sup>), acoplado a um detector de arranjo de foto diodos, modelo MD-2010 (Jasco<sup>®</sup>) e a um injetor automático modelo AS-2055 (Jasco<sup>®</sup>).

Os dados espectroscópicos e espectrométricos para determinação estrutural das substâncias foram obtidos dos equipamentos: Espectrômetro de RMN de 11,7 T (Varian<sup>®</sup> INOVA), operando a 500 MHz para <sup>1</sup>H e 125 MHz para <sup>13</sup>C. Espectrofotômetro de UV/Visível Biotek<sup>®</sup>, modelo Epoch; Os espectros de massas foram obtidos em um espectrômetro de massas LCQ Fleet da Thermo Analítica, equipado com um dispositivo de inserção direta da amostra via análise por injeção em fluxo contínuo (FIA). A amostra foi analisada no modo de ionização por electrospray (ESI) e as fragmentações em múltiplos estágios (MS<sup>2</sup>, MS<sup>3</sup>) realizadas em uma interface do tipo *ion-trap* (IT). O modo negativo foi escolhido para a geração e análise dos espectros de massas em primeira-ordem (MS), bem como para os demais experimentos em múltiplos estágios (MS<sup>n</sup>), sob as seguintes condições: voltagem do capilar -4 V, voltagem do spray -5 kV, temperatura do capilar 280 °C,

gás de arraste (N<sub>2</sub>) fluxo 60 (unidades arbitrárias). A faixa de aquisição foi  $m/z$  50-1000, com dois ou mais eventos de varredura realizados simultaneamente no espectrômetro de massas LCQ. O primeiro evento foi uma varredura completa (*full-scan*) do espectro de massas para adquirir os dados dos íons na faixa  $m/z$  estabelecida. Os demais eventos foram experimentos MS<sup>n</sup> 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. O software Xcalibur versão 1.0 (Thermo Finigan®) foi utilizado durante a aquisição e processamento dos dados espectrométricos.

## **3.2 MÉTODOS USADOS NO ESTUDO QUÍMICO**

### **3.2.1 Coleta e identificação do material vegetal**

As partes aéreas *S. nitens* (escapos e capítulos) foram coletadas na Serra do Jalapão no estado do Tocantins por Crysthiano Borges Pereira em dezembro de 2008 e a identificação foi feita pelo Prof. Paulo Takeo Sano (USP/SP). Uma exsicata está depositada no IB-USP São Paulo sob número SPF 189975.

### **3.2.2 Obtenção dos extratos de *S. nitens***

O material vegetal (capítulos e escapos) foi seco em estufa a 40 ° C durante 48 horas. Depois, capítulos foram separados de escapos e foram triturados, separadamente, em moinho de facas, resultando um pó. O pó foi submetido à extração por maceração, com hexano, 2 vezes, por 72 horas cada. O mesmo procedimento foi realizado com DCM e em seguida, foi realizada extração por percolação com MeOH. Foram utilizados 410 g de pó de escapos.

Após cada extração, o extrato obtido foi filtrado em papel filtro, concentrado em evaporador rotativo sob pressão reduzida (em temperatura inferior a 40°C). Os extratos foram transferidos para vidros tarados e deixados na capela até completa eliminação dos solventes fornecendo 1,96 g (0,47%) do extrato hexânico, 2,25g (0,55%) do extrato diclorometânico e 16,06 g (3,92%) do extrato metanólico de escapos.

### **3.2.3 Perfil cromatográfico de *S. nitens***

Para a caracterização química, o extrato metanólico dos escapos foi submetido a um *clean-up* por SPE-RP18. Foi pesado 10,0 mg de cada extrato e solubilizado em 1,0 mL de metanol e aplicado no cartucho. As amostras foram secas, ressuspendidas em uma solução MeOH/H<sub>2</sub>O, 5:95 v/v e filtradas em filtro 0,45 µm. Após etapas de *clean-up*, as frações (H<sub>2</sub>O:MeOH, 8:2, v/v; MeOH:H<sub>2</sub>O, 1:1, v/v e 100% MeOH), foram analisadas por HPLC-UV-DAD e monitoramento em 254 nm.

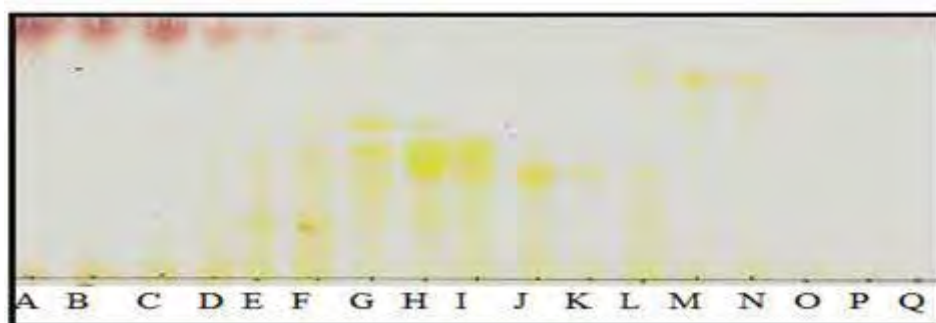
### **3.2.4 Fracionamento em colunas de permeação em gel**

O extrato metanólico dos escapos foi fracionado em coluna de Sephadex LH-20 (57 cm x 3,0 cm d.i.), eluída com metanol. Foram feitos 3 fracionamentos, em cada um deles 3,5 g de extrato foram solubilizados em 20 mL de metanol e centrifugados por 2 vezes, 8 minutos cada. O sobrenadante foi aplicado na coluna. As frações foram analisadas por CCDC, em placas de sílica gel, eluídas com CHCl<sub>3</sub>/MeOH/n-prOH/H<sub>2</sub>O (5:6:1:4, v/v) e reveladas com solução de anisalaldeído/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, (Fig. 6).

As frações dessa Sephadex foram reunidas e denominadas por letras de A a Q, as massas em mg de cada uma dessas reuniões e os métodos usados no fracionamento estão representados na tabela 1.

**Tabela 1.** Massa das frações obtidas da reunião das Sephadex e respectivos métodos de fracionamento

Reunião	Massa (mg)	Método	Reunião	Massa (mg)	Método
A	516,0	-	J (56-59)	270,6	HPLC-RI
B	433,0	-	K (62-65)	93,0	HPLC- RI
C	327,3	-	L (66-68)	175,0/120,0	HPLC-PDA
D	262,4	-	M (69-86)	106,9	HSCCC
E	352,3	-	N	306,0	-
F	368,9	-	O (131-153)	229,0	HPLC- RI
G	303,1	-	P	325,0	-
H	318,8	-	Q	142,0	-
I	225,5	-			-



**Figura 6.** CCDC das reuniões obtidas do Sephadex LH-20.  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/n\text{-prOH}/\text{H}_2\text{O}$  (5:6:1:4, v/v) e reveladas com solução de anisaldeído/ $\text{H}_2\text{SO}_4$



### 3.2.5 HSCCC

A reunião **M** do Sephadex-LH 20 foi fracionada por cromatografia em contracorrente de alta velocidade. Foram testadas várias proporções da mistura de acetato de etila:*n*-butanol:H<sub>2</sub>O, obtendo-se resultados satisfatórios com a mistura de acetato de etila:*n*-butanol:H<sub>2</sub>O (3,5:1,5:5,0 v/v). Esta fase mostrou  $K_D$  próximo 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 de solventes foi usada como fase estacionária e a superior como fase móvel. O sentido do bombeamento das fases foi cauda → cabeça da coluna, com vazão de 1 mL min<sup>-1</sup> e rotação de 870 rpm.

O volume de fase estacionária eluída foi de 55 mL. Os 106,9 mg da fração foram solubilizados em 16 mL de uma mistura de 1:1 de fase inferior e fase superior do sistema de solvente. A amostra foi centrifugada e o sobrenadante foi injetado no *loop* do aparelho com auxílio de uma seringa. Coletaram-se 84 frações de 3 mL cada.

### 3.2.6 HPLC – RI

A reunião **J** foi purificada por HPLC-RI no modo semipreparativo. A amostra foi solubilizada em 1,0 mL de uma solução MeOH/H<sub>2</sub>O (45:55 v/v) e filtrada em Millex de 0,45 µm. (RP18; 2,5 mL min<sup>-1</sup>). Foram realizadas 15 injeções de 80 µL cada, e 13 frações coletadas.

A reunião **K** foi purificada, por HPLC-RI no modo semipreparativo. A amostra foi solubilizada em 1,0 mL de uma solução MeOH/H<sub>2</sub>O 45:55 v/v e filtrada em Millex

de 0,45  $\mu\text{m}$ . (RP18; 2,5 mL  $\text{min}^{-1}$ ). Foram realizadas 15 injeções de 80  $\mu\text{L}$  cada, e 13 frações coletadas.

A reunião **O** obtida da segunda coluna de Sephadex LH-20 foi fracionada por HPLC-RI no modo semipreparativo. A amostra foi solubilizada em 2,5 mL de MeOH/H<sub>2</sub>O 75:25 v/v, filtrada em Millex de 0,45  $\mu\text{m}$ , obtendo-se uma solução de 100 mg mL<sup>-1</sup> (RP18; 2,0 mL  $\text{min}^{-1}$

### **3.2.7 HPLC – PDA**

A reunião **L** foi purificada por HPLC-PDA, no modo semipreparativo. Foi solubilizada em 1,0 mL de MeOH/H<sub>2</sub>O (9:1 v/v), filtrada em Millex de 0,45  $\mu\text{m}$ , obtendo-se uma solução de 100 mg mL<sup>-1</sup>. A fase móvel empregada foi: A = H<sub>2</sub>O +TFA 0,05% e B = MeOH + TFA 0,1%, em fluxo de 2,5 mL  $\text{min}^{-1}$ . A rampa de eluição usada para a fração **L** foi: 0-30 min, 25-70% B, 30-35 min 70-100%B.).

## **3.3 MÉTODOS USADOS NOS ENSAIOS BIOLÓGICOS**

### **3.3.1 Avaliação da atividade antioxidante**

O potencial antioxidante foi avaliado por meio de um ensaio espectrofotométrico utilizando-se uma solução de DPPH (0,004%) em metanol, a qual é misturada a solução da amostra em análise. A solução estoque foi preparada a partir de 2,5 mg da amostra teste em 10 mL de metanol. Em seguida foram feitas diluições até as concentrações de 6,25; 12,5; 25; 50; 100 e 200  $\mu\text{g/mL}$ .

A cada 1 mL da amostra é adicionado 2 mL da solução de DPPH. Após 30 minutos de reação, as absorbâncias das soluções são medidas a 517 nm. O branco, solução referência, é constituída de 2 mL da solução de DPPH acrescido de 1 mL de metanol. Utilizamos padrões de quercetina 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 seguinte equação ( Fig. 07):

Na qual, % $\Delta$  é a medida da variação de absorvância,  $A_0$  é a absorvância da solução de referência e A, corresponde à absorvância verificada após 30 minutos de reação. Equação utilizada para verificação da variação da absorvância (% $\Delta$ ) ( Fig. 7), onde  $A_0$  é a absorvância do DPPH em metanol e A corresponde à absorvância verificada após 30 minutos de reação.

$$\% \Delta_0 = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100$$

**Figura 7.** Equação utilizada para verificação da variação da absorvância (% $\Delta$ ), onde  $A_0$  é a absorvância do DPPH em metanol e A corresponde à absorvância verificada após 30 minutos de reação

### 3.3.2 Avaliação da atividade antimicrobiana

Os ensaios da atividade antimicrobiana foram realizados em colaboração com o grupo de pesquisa coordenado pela Profa. Dra. Thais Bauab, pesquisadora da FCFAr - UNESP de Araraquara.

A atividade antibacteriana foi avaliada pela técnica de diluição em microplacas utilizando extratos metanólicos de escapos, capítulos e os flavonóides identificados nos escapos de *S. nitens* (luteolina-6-C- $\beta$ -D-glucopiranosídeo, 7-metoxiluteolina-6-C- $\beta$ -D-glucopiranosídeo, 7-metoxiluteolina-8-C- $\beta$ -D-glucopiranosídeo, isolados deste extrato, com determinação da concentração

inibitória mínima (CIM) seguindo as recomendações do Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI, 2006).

As culturas de padrões bactericidas Gram-positivo e Gram-negativos utilizados foram: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 19659, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Salmonella Setubal* ATCC 19196.

As amostras foram primeiramente dissolvidas em 25% de metanol em água para dar uma concentração final de 1000 µg/ml. Este foi serialmente diluído em duas partes para obter concentrações de (3,90-500 µg/ml). 100 µL de cada concentração foi adicionado em microplacas de 96 poços, contendo solução de 80 µL de Muller-Hinton (MHB) e 20 µL de padrão inoculum a  $1.0 \times 10^7$  CFU/ml por ajuste da densidade óptica de 0,1 a 620 nm (espectrômetro da Pharmacia LKB – Ultrospec III). Ciprofloxacina (Bayer HealthCare) foi usada como controle positivo. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. O ensaio foi feito em triplicata. A CIM das amostras foram detectados pela adição de (50 µL) de 0.2 mg/ml de resazurina e incubados a 37 °C por 30 min. A morte das bactérias viáveis é percebida pela mudança da cor azul para pink. A CIM foi definida como a menor concentração da amostra que preveniu esta troca e exibiu a inibição do crescimento das bactérias.

Para a determinação da Concentração mínima bactericida, a porção de cada poços que mostrou atividade antibactericida foi plotada em Agar Muller-Hinton (MHA) e incubada a 37 °C por 24 h. A menor concentração que forneceu o não crescimento após sub-cultura foi considerada Concentração mínima bactericida (Kueete *et al.*, 2008).

### 3.3.3 Avaliação da atividade antiúlcera

Os ensaios da atividade antiúlcera foram realizados em colaboração com o grupo de pesquisa coordenado pela Profa. Dra. Clelia Akiko Hiruma Lima, pesquisadora do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu.

Nesses ensaios foram utilizados camundongos *Swiss* albinos, machos e fêmeas (25-40 g) e ratos *Wistar* machos (150 a 200 g) provenientes do Biotério Central da UNESP-Botucatu, aclimatados às condições do biotério setorial por pelo menos sete dias antes da manipulação experimental, sob temperatura ( $23 \pm 2^\circ \text{C}$ ) e ciclo claro-escuro de 12 horas. Os animais foram alimentados com ração comercial e água *ad libitum*.

Todos os experimentos obedeceram a protocolos experimentais aprovados previamente pela Comissão de Ética na Experimentação Animal, do Instituto de Biociências da UNESP - Botucatu. O número de animais por grupo experimental variou de 5 a 10. Os resultados foram expressos na forma de média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) dos parâmetros obtidos. Os valores médios obtidos foram submetidos à análise de variância - ANOVA, seguido pelo teste à posteriori de *Dunnett* em experimentos com mais de dois grupos de tratamento. O teste t de Student foi utilizado para a análise estatística de diferenças existentes entre dois grupos de tratamento. Foi considerado como nível de significância mínima  $p < 0,01$ .

### 3.3.4 Etanol absoluto

Este modelo consiste na destruição da barreira mucoprotetora e redução do fluxo sanguíneo da mucosa gástrica. Foram utilizados ratos submetidos a jejum prévio de 24 horas.

Os animais foram tratados oralmente por gavagem com carbenoxolona 100 mg kg<sup>-1</sup> (controle positivo), solução salina 0,9% ou Tween 80 a 8% no volume de 10 mL kg<sup>-1</sup> (controle negativo) e com os extratos metanólicos de capítulos e escapos em diversas doses (125, 250 e 500 mg kg<sup>-1</sup>), (MORIMOTO et al., 1991).

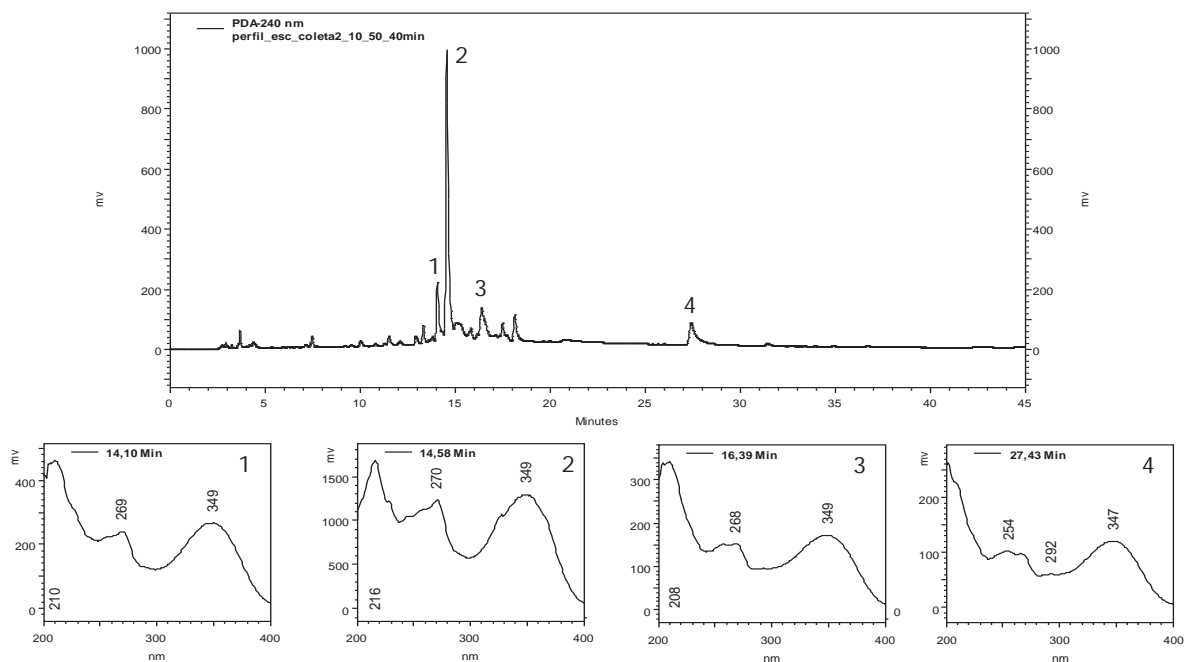
Decorridos 60 minutos dos tratamentos, os animais receberam, também por via oral, 1 mL de etanol absoluto (agente indutor das lesões). Após 60 minutos do agente indutor de lesão gástrica, os animais foram mortos e seus estômagos retirados para mensuração das lesões.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Perfil cromatográfico dos espectros no UV dos escapos de *S. nitens*

A figura 8 apresenta o cromatograma HPLC-PDA apresentando o perfil do extrato metanólico dos escapos de *Syngonanthus nitens* e o perfil de alguns espectros de absorção na região do UV, evidenciando a presença de flavonóides. Esta classe de substâncias é comum em *Syngonanthus*, sendo que várias flavonas já foram isoladas e identificadas em outras espécies do gênero *Syngonanthus* (Coelho *et al.*, 2006; Ricci *et al.*, 1996).



**Figura 8.** Cromatograma representando o perfil do extrato metanólico dos escapos de *Syngonanthus nitens* (RP-18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5  $\mu\text{m}$ ; Solvente A:  $\text{H}_2\text{O}$  + 0,05% TFA; Solvente B: ACN + 0,05% TFA. Gradiente de 10-50% de B em A em 40 min; fluxo de 1,0  $\text{mL min}^{-1}$ ,  $\lambda = 240 \text{ nm}$ ) e espectros de absorção na região do UV dos picos destacados.



A natureza do flavonóide e seu padrão de oxigenação podem ser definidos pela posição e intensidades relativas dos máximos de absorção. O espectro no UV de um flavonóide possui dois máximos de absorção: a banda II, que se encontra em um intervalo de comprimento de onda de 240-285 nm e a banda I entre 300-550 nm.

Quando existem modificações no anel A, a banda II se altera e quando há modificações nos anéis B e C, a banda I se altera. As bandas características de flavonas estão entre 250-280 nm (banda II) e 310-350 nm (banda I) (Mabry *et al.*, 1970).

Percebe-se, portanto, que no perfil dos espectros no UV do extrato metanólico dos escapos de *S. nitens*, a predominância de flavonas.

## 4.2 Fracionamento do EMeOH dos escapos de *S. nitens*

### 4.2.1 HSCCC

A reunião **M** foi fracionada no HSCCC, e foram coletadas 84 frações de 3,0 mL cada uma. As frações foram analisadas por CCDC, eluídas com CHCl<sub>3</sub>/MeOH/n-prOH/H<sub>2</sub>O (5:6:1:4, v/v) e reveladas com solução de anisaldeído/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Foram isoladas as substâncias **Sn1** (8,0 mg) e **Sn2** (7,0 mg), que foram analisadas por UV, RMN e EM.

### 4.2.2 HPLC – IR

As reuniões **K**, **O** e **J** da Sephadex foram fracionadas por HPLC-RI no modo semi-preparativo. Da reunião **K** foram realizadas 15 injeções de 80 µL cada, e 13 frações coletadas. Foi isolada a substância **Sn3** (5,0 mg). Da reunião **O** foram realizadas 18 injeções de 80 µL cada, e 12 frações coletadas, resultando no isolamento das substâncias **Sn4** (10,0 mg) e **Sn5** (11,0 mg). Da reunião **J** foram

realizadas 20 injeções de 80 µL cada, e 20 frações foram coletadas, apresentou a mistura de substâncias **Sn6** e **Sn7** (4,8 mg). Todas as substâncias foram analisadas por UV, RMN e EM.

#### 4.2.3 HPLC – PDA

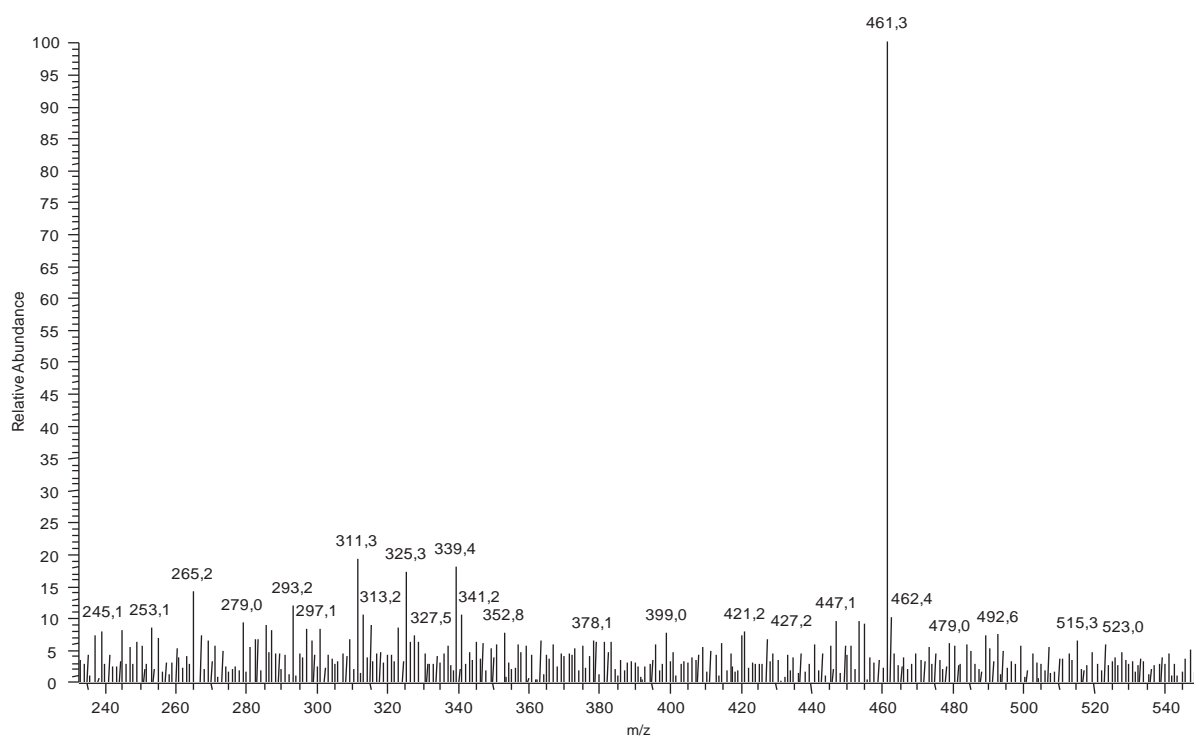
A reunião **L** foi purificada em HPLC-PDA no modo semi-preparativo. Foram realizadas 17 injeções de 80 µL cada, e 15 frações foram coletadas. As frações foram analisadas por CCDC, eluídas com CHCl<sub>3</sub>/MeOH/n-prOH/H<sub>2</sub>O (5:6:1:4, v/v) e reveladas com solução de anisaldeído/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Foi isolada a substância **Sn8** (4,8 mg), que foi analisada por RMN e EM.

**ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL**

### 4.3 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL

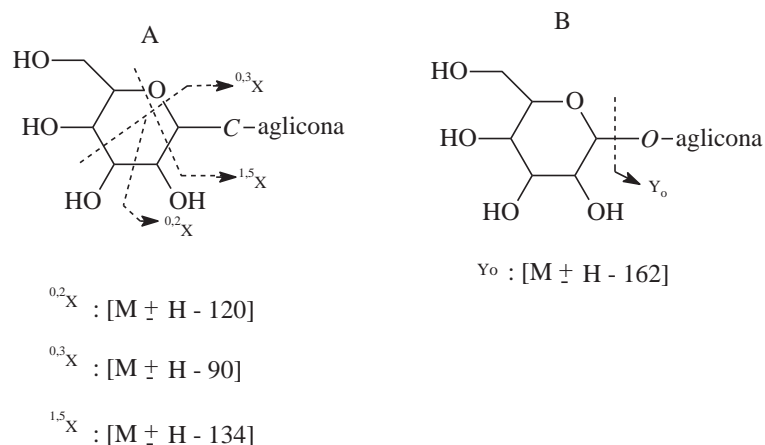
#### 4.3.1 Elucidação estrutural de Sn1

O espectro de massas das substâncias **Sn1** (Fig. 9) exibiu pico a  $m/z$  461 [M-H]<sup>-</sup> referente à molécula desprotonada e fragmentos significativos no espectro de MS<sup>2</sup> (Fig. 13) em  $m/z$  371, referente a [M-90-H]<sup>-</sup> e em  $m/z$  341 [M-120-H]<sup>-</sup>. Em flavonóides C-glicosilados, o açúcar é ligado diretamente ao núcleo do flavonóide por uma ligação C-C, dificilmente clivada; já em flavonóides O-glicosilados, a ligação O-C é mais susceptível a clivagem. Por isso, é possível diferenciá-los através da análise do espectro de massas. Em flavonóides C-glicosilados a via de fragmentação preferencial é aquela que se baseia na clivagem interna da unidade sacarídica, e em flavonóides O-glicosilados é favorecida a eliminação intacta do açúcar.

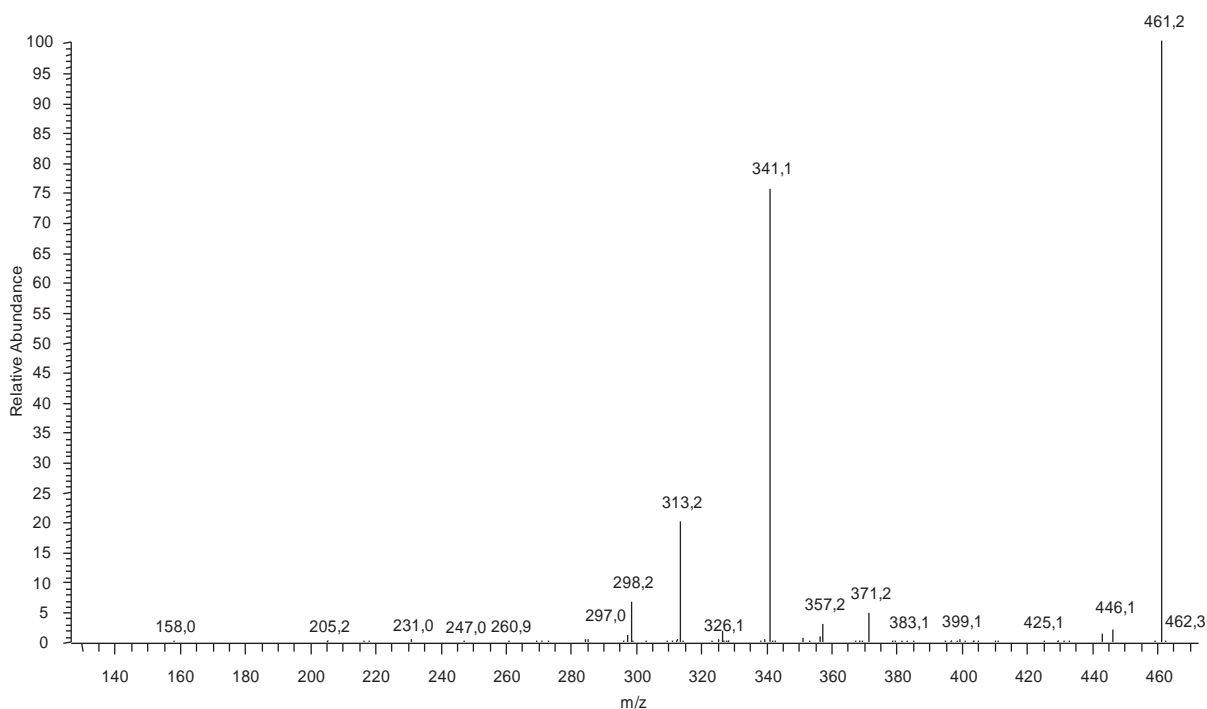


**Figura 9.** Espectro de massas de primeira ordem (modo *full-scan*) de **Sn1**, avaliado em modo negativo

A eliminação de água a partir da desidratação da unidade sacarídica seria uma fragmentação específica de C-6-glicosídeos (Cuyckens e Claeys, 2004), (Fig. 10).

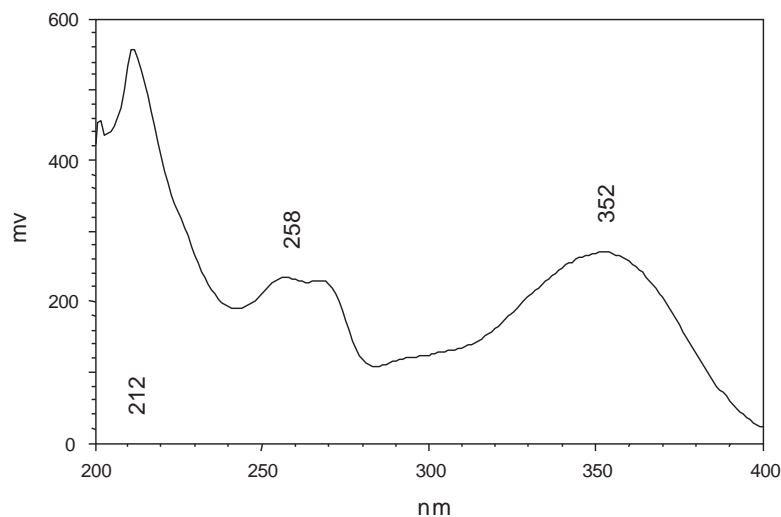


**Figura 10.** Representação de íons produtos característicos formados pela clivagem de uma C-hexose (A) e de uma O-hexose (B). O sinal  $\pm$  indica os modos de ionização, positivo ou negativo



**Figura 11.** Espectro de massas de segunda ordem de **Sn1**, avaliado em modo negativo

O espectro da absorção na região do UV de **Sn1** (Fig. 12) apresentou bandas em 212 e 352 nm, que são bandas características de flavonas. (Mabry *et al.*, 1970).



**Figura 12.** Espectro da absorção na região do UV de **Sn1**

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Espectro1) apresentou sinais na região aromática que correspondem a um flavonóide. Apresentou um dubleto em  $\delta$  6,86 de  $J = 8,0$  (H5'), um dubleto em  $\delta$  7,48 de  $J = 2,0$  Hz (H2') e um duplo dubleto em  $\delta$  7,54 de  $J = 2,5$  e  $8,5$  Hz (H6'). Apresentou, também, um singleto em  $\delta$  6,68, correspondente ao H3 de uma flavona, e um singleto em  $\delta$  6,50 (H6). Observa-se um singleto em  $\delta$  3,87, referente ao sinal de uma metoxila. A presença de uma unidade de açúcar pode ser verificada devido à presença de um sinal em  $\delta$  4,70 de  $J = 10,0$  Hz, que corresponde ao hidrogênio anomérico (H1'').

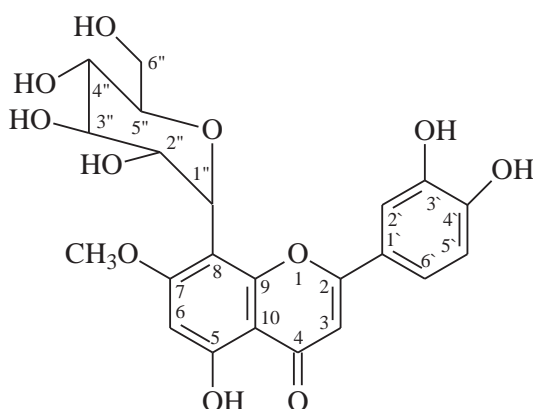
Os dados fornecidos pelos espectros bidimensionais gHMQC (Espectro 2) e gHMBC (Espectro 3) possibilitaram a atribuição dos hidrogênios e carbonos (Tabela 2). O espectro gHMBC confirmou a posição do hidrogênio em  $\delta$  6,50 na posição 6, devido à correlação deste com os carbonos em  $\delta$  105,1 (C8),  $\delta$  161,1 (C5),  $\delta$  163,8 (C7).

No espectro gHMBC, também foram observadas correlações entre o sinal em  $\delta$  3,87 (metoxila) e o carbono em  $\delta$  163,8 (C7); e entre  $\delta$  4,70 (H1'') e  $\delta$  163,8 (C7),  $\delta$  105,1 (C8) e  $\delta$  155,1 (C9). Com isso, pode-se propor que a metoxila está ligada na posição 7 e o o açúcar está ligado na posição 8.

No espectro gCOSY (Espectro 4) observou-se a correlação entre os sinais  $\delta$  6,86 e  $\delta$  7,54, que correspondem aos hidrogênios 2' e 6', evidenciando acoplamento em *orto*. Existe, também, a interação entre hidrogênios metoxílicos e hidrogênio anomérico ( $\delta$  3,87 e  $\delta$  4,70), o que confirma que o açúcar está ligado na posição 8 do núcleo flavonoidico.

O experimento TOCSY 1D (Espectro 5), mostrou que quando o hidrogênio anomérico foi irradiado em  $\delta$  4,70 este apresentou correlação com os hidrogênios em 3,40; 3,21; 3,83; 3,19; 3,37 e 3,70 indicando tratar-se de uma glicose.

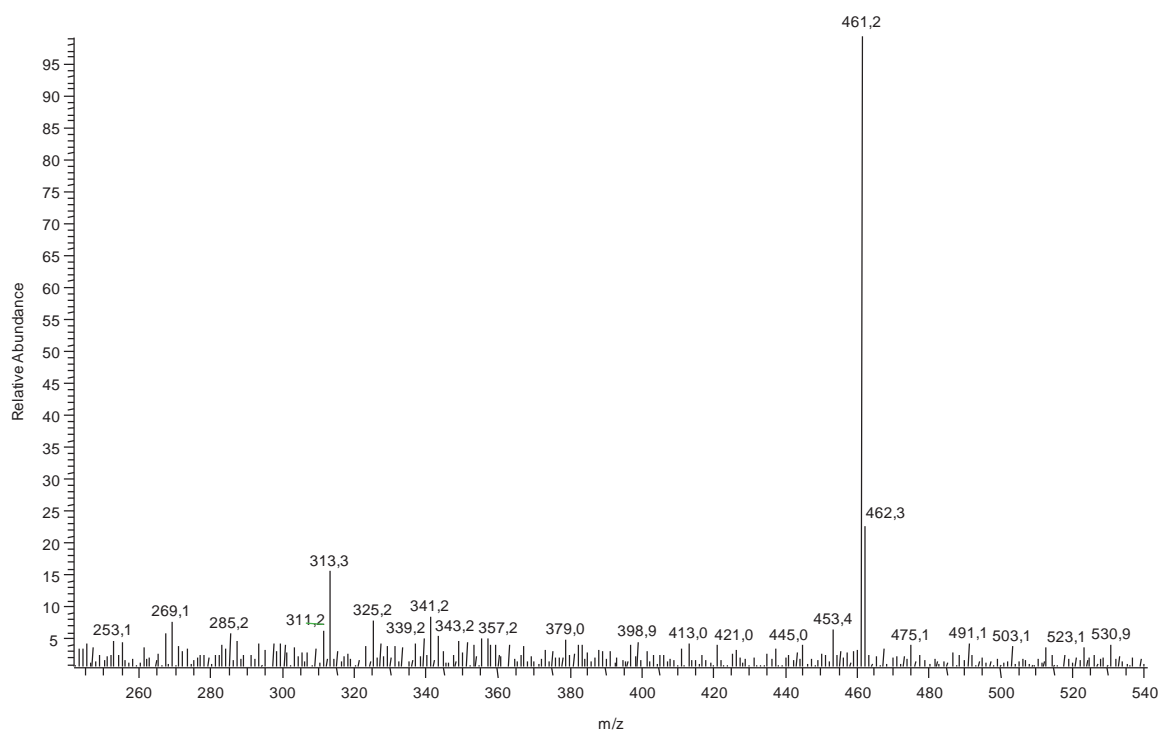
Esses dados, comparados com a literatura permitiram a identificação da 7-metoxiluteolina-8-C- $\beta$ -D-glicopiranosídeo, (Fig. 13).



**Figura 13.** Estrutura de **Sn1**

### 4.3.2 Elucidação estrutural de Sn2

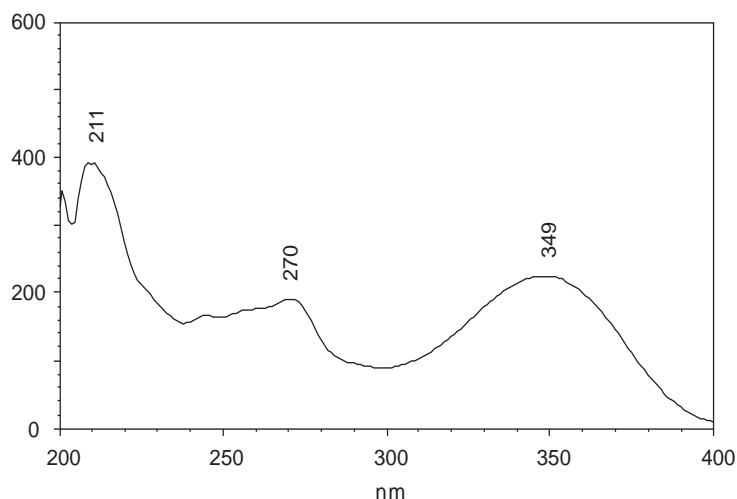
O espectro de massas de **Sn2** (Fig. 14) mostrou-se semelhante ao da substância **SN1**. Foram observados os mesmos fragmentos, indicando tratar-se também de um flavonóide C-glicosilado.



**Figura 14.** Espectro de massas de primeira ordem (modo *full-scan*) da fração **Sn2**, avaliado em modo negativo.

O espectro da absorção na região do UV de **Sn2** (Fig. 15) apresentou bandas em 270 e 349 nm, que são bandas características de flavonas. (Mabry *et al.*, 1970).





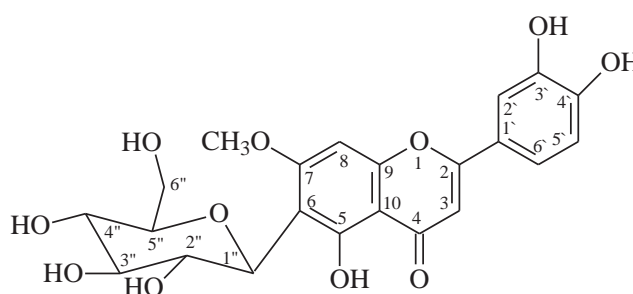
**Figura 15.** Espectro de absorção na região do UV de **Sn2**

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Espectro 6) apresentou sinais na região aromática referentes a um flavonóide. Apresentou dois dubletos em  $\delta$  6,88 ( $J = 8,5$ ;  $\text{H5}'$ ), e em  $\delta$  7,44 ( $s$ ;  $\text{H2}'$ ) e um duplo dubleto em  $\delta$  7,46 ( $J = 2,0$  e  $8,5$  Hz;  $\text{H6}'$ ). Apresentou um singleto em  $\delta$  6,72 ( $\text{H3}$ ) e em  $\delta$  6,78 ( $\text{H8}$ ). Observa-se a presença de singleto em  $\delta$  3,89, referente a uma metoxila. Verifica-se a presença de um sinal de um hidrogênio anomérico ( $\text{H1}''$ ) de um açúcar em  $\delta$  4,57 ( $J = 10,5$  Hz).

Os espectros bidimensionais  $g\text{HMBC}$  (Espectro 7) e  $g\text{HMQC}$  (Espectro 8) possibilitaram a atribuição dos hidrogênios e carbonos (Tabela 2). No espectro  $g\text{HMBC}$ , foi observada a correlação do sinal em  $\delta$  3,90 (metoxila) com o carbono em  $\delta$  163,6 ( $\text{C7}$ ).

A posição do açúcar foi determinada através da análise de correlações apresentadas no espectro  $g\text{HMBC}$  (Espectro 8) do sinal em  $\delta$  4,59 ( $\text{H1}''$ ) com  $\delta$  109,9 ( $\text{C6}$ ),  $\delta$  160,4 ( $\text{C5}$ ) e  $\delta$  104,5 ( $\text{C10}$ ), (Tabela 02).

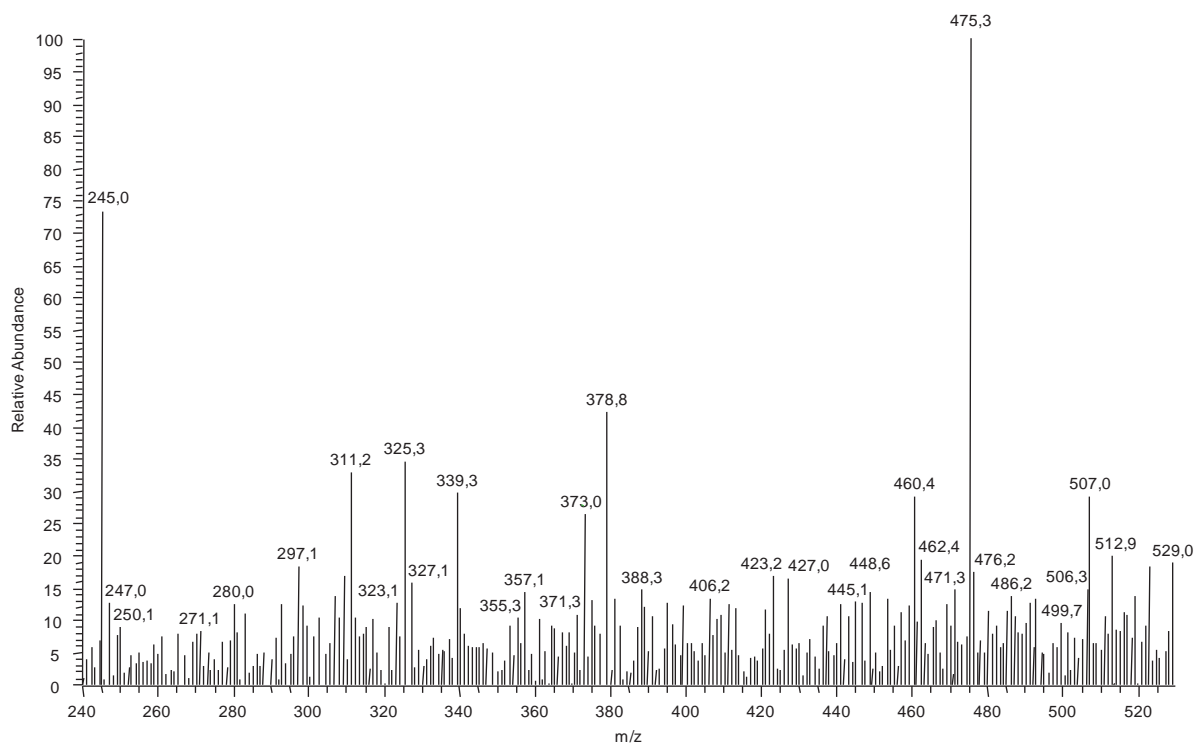
O experimento TOCSY-1D (Espectro 9), mostrou a correlação de  $\delta$  4,59 com  $\delta$  4,20;  $\delta$  3,19;  $\delta$  3,09;  $\delta$  3,18;  $\delta$  3,38 e  $\delta$  3,70, indicando tratar-se de uma glicose. Os dados desta substância foi comparado aos da literatura (Agrawal, 1989). Portanto a estrutura desta substância foi determinada como sendo 7-metoxiluteolina-6-C- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (Fig. 16).



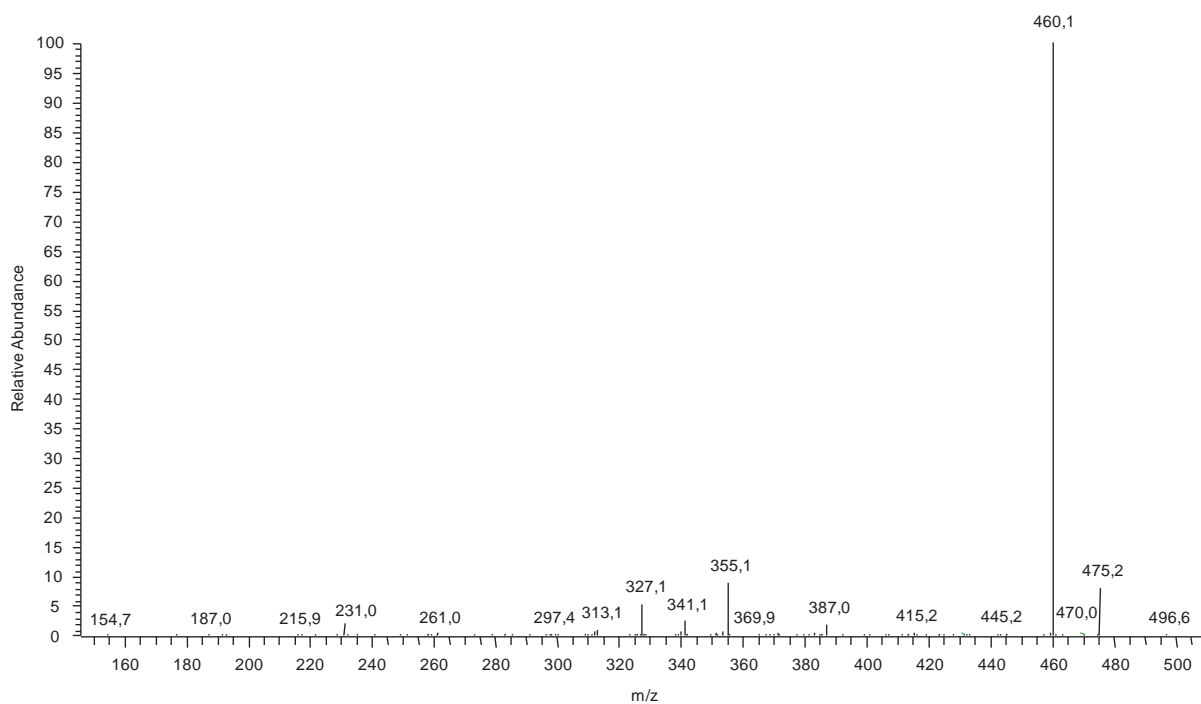
**Figura 16.** Estrutura de **Sn2**

#### 4.3.3 Elucidação estrutural de **Sn3**

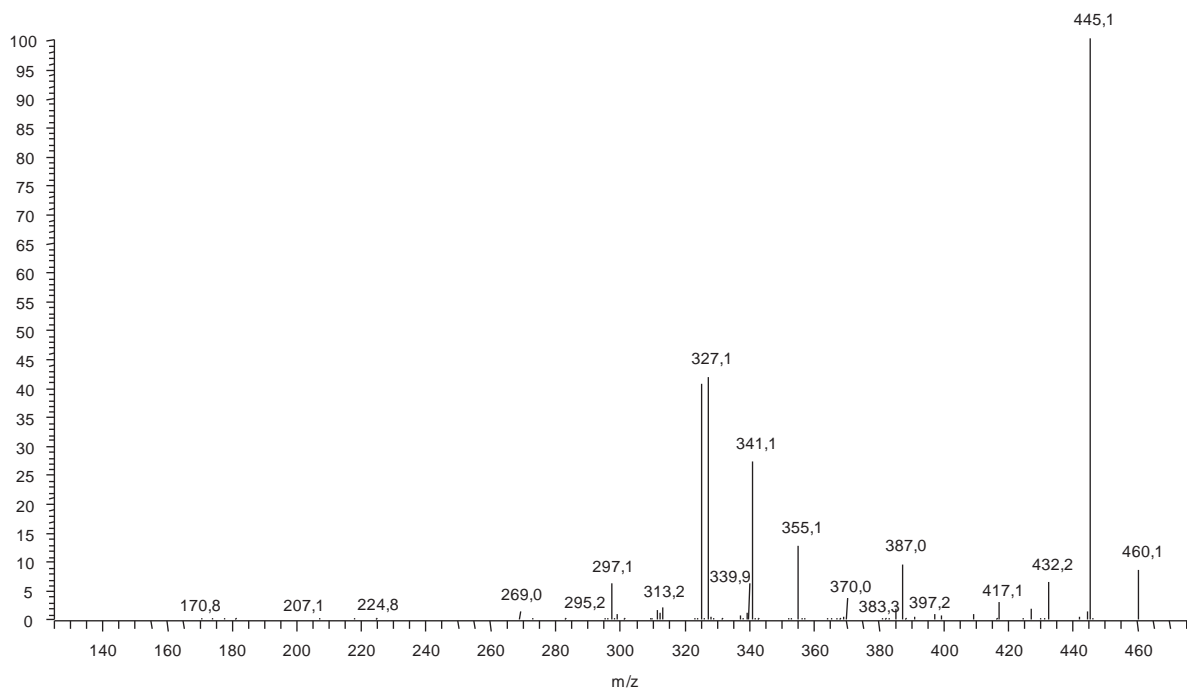
O espectro de massas de **Sn3** (Fig. 17) mostrou o sinal do íon da molécula desprotonada  $[M - H]^-$  em  $m/z$  475, o que sugere fórmula molecular  $C_{23}H_{24}O_{11}$ . O espectro de massa de segunda ordem e terceira ordem (Fig. 18 e 19) apresentou fragmentos representativos em  $m/z$  460 referente a  $[M - 15 - H]^-$ ; em  $m/z$  445 referente a  $[M - (2 \times 15) - H]^-$ ; em  $m/z$  325 referente a perda de duas metilas e fragmentos característicos de C-glicosídeo  $[M - (2 \times 15) - 120 - H]^-$ ; e finalmente em  $m/z$  297 referente a  $[M - (2 \times 15) - 120 - 28 - H]^-$ .



**Figura 17.** Espectro de massas de primeira ordem (modo full-scan) de **Sn3**, avaliado em modo negativo



**Figura 18.** Espectro de massas de segunda ordem (modo full-scan) de **Sn3**, avaliado em modo negativo



**Figura 19.** Espectro de massas de terceira ordem (modo *full-scan*) de **Sn3**, avaliado em modo negativo

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Espectro 10) apresentou sinais na região aromática referentes ao esqueleto de flavonóide. Apresentou dois dubletos em  $\delta$  6,96 ( $J = 8,0$  Hz, H5'), e em  $\delta$  7,59 ( $J = 2,0$  Hz, H2') e um duplo dubleto em  $\delta$  7,54 ( $J = 2,0$  e 8,0 Hz, H6'). Apresentou singletos em  $\delta$  6,93 (H3) e  $\delta$  6,86 (H8). Observa-se a presença de singlete em  $\delta$  3,90 (6H), de metoxilas. A presença de uma unidade de açúcar pode ser verificada devido à presença de um sinal em  $\delta$  4,59 de  $J = 10,0$  Hz, que corresponde ao hidrogênio anomérico (H1'').

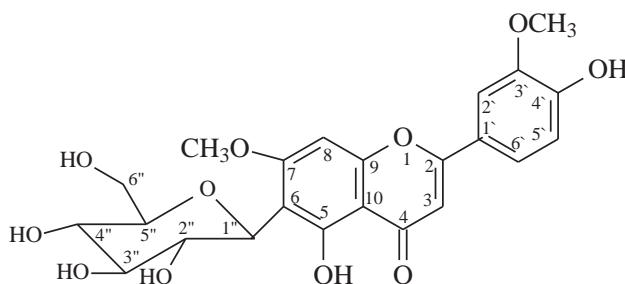
No espectro *g*COSY (Espectro 11) foram observados as sequências dos hidrogênios. O espectro *g*HSQC (Espectro 12) forneceu as correlações direta entre  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

Através do espectro *g*HMBC (Espectro 13), foi possível atribuir as posições das metoxilas, pois observa-se a correlação do sinal em  $\delta$  3,90 (metoxilas) com os carbonos em  $\delta$  147,9 (C3') e  $\delta$  163,9 (C7), (Tabela 2).

Os dados da aglicona foram comparados com a literatura (Jensen, *et al.*, 1994; Park *et al.*, 2006) e o açúcar apresentou deslocamentos semelhantes à substância **Sn3**.

A posição do açúcar foi determinada através da análise de correlações apresentadas no espectro gHMBC do sinal em  $\delta$  4,59 (H1'') com  $\delta$  109,9 (C6),  $\delta$  160,4 (C5) e  $\delta$  104,5 (C10). O experimento TOCSY-1D (Espectro 14), mostrou a correlação de  $\delta$  4,57 com  $\delta$  4,20; 3,19; 3,09; 3,18; 3,70 e 3,38, indicando tratar-se de uma glicose.

Portanto a estrutura desta substância foi determinada como sendo 3',7-dimetoxiluteolina-6-C- $\beta$ -D-glicopiranosídeo, (Fig. 20).



**Figura 20.** Estrutura de **Sn3**

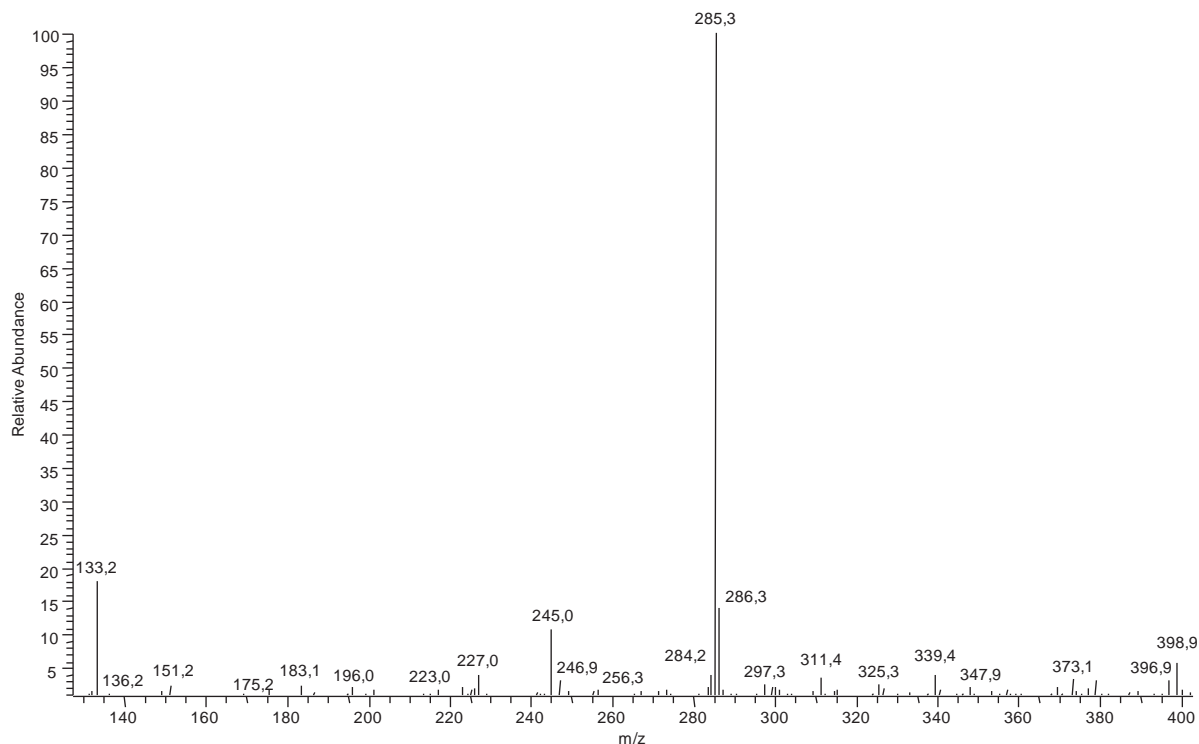
Tabela 2. Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de **Sn1-3** (11,7 T, DMSO- $d_6$ )

Posição	Sn1		Sn2		Sn3	
	$^1\text{H}$ (ppm), J (Hz)	$^{13}\text{C}^{**}$	$^1\text{H}$ (ppm), J (Hz)	$^{13}\text{C}^{**}$	$^1\text{H}$ (ppm), J (Hz)	$^{13}\text{C}^{**}$
2		164,4		163,9		164,0
3	6,68 s	102,4	6,72 s	102,5	6,93 s	103,0
4						
5	12,76 s (OH)	161,1	12,76 s (OH)		12,76 s (OH)	160,4
6	6,50 s	94,9		109,6		109,9
7		163,8		163,8		147,9
8		105,1	6,78 s	90,5	6,86 s	90,5
9		155,1		156,9		156,8
10		104,3		104,3		104,5
1'		121,6		121,4		
2'	7,48 d (2,0)	113,9	7,44 d (2,0)	145,9		121,6
3'		145,8		149,9	7,54 d (2,0)	110,1
4'		115,4		115,6		163,9
5'	6,86 d (8,0)		6,88 d (8,0)	118,3		
6'	7,54 dd (2,0; 8,0)	119,1	7,46 dd (2,0; 8,0)	119,1	7,54 d (2,0; 8,0)	150,8
3'-OCH <sub>3</sub>	-	-	-	-	3,90 s	56,0
7-OCH <sub>3</sub>	3,87 s	56,4	3,89 s	56,2	3,90 s	56,0
1''	4,70 d (10,0)	72,8	4,57 d (10,5)	72,8	4,57 d (10,5)	72,8
2''	3,40 dd (9,0; 9,0)	70,2	4,2 dd (9,0; 9,0)	69,8	4,20 dd (9,0; 9,0)	69,0
3''	3,21 dd (9,0; 9,0)	78,2	3,19 dd (9,0; 9,0)	79,8	3,19 dd (9,0; 9,0)	79,8
4''	3,83 d (9,0)	70,2	3,09 dd (9,0)	71,4	3,09 d (9,0)	
5''	3,19 m	81,6	3,18 m	81,9	3,19 m	81,9
6''	3,37 dd (11,0; 6,0)	61,4	3,70 (11,0; 6,0)	61,4	3,38 dd (11,0; 6,0)	61,7
	3,70 dd (11,0; 6,0)		3,38 dd (11,0; 6,0)		3,70 dd (11,0; 6,0)	

\*\* Dados obtidos a partir das correlações observadas nos experimentos gHMQC e gHMBC

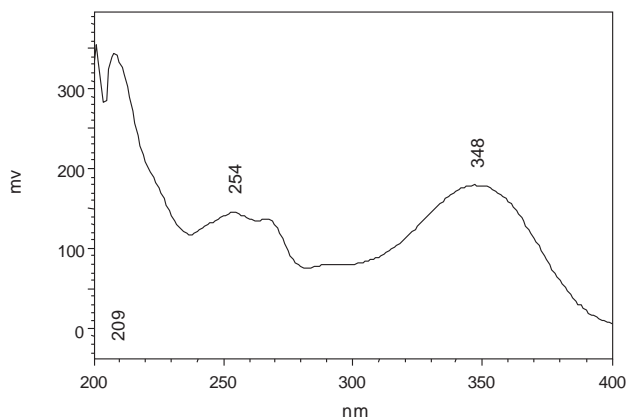
#### 4.3.4 Elucidação estrutural de Sn4

O espectro de massas (Fig. 21) apresentou íon da molécula desprotonada  $[M-H]^-$  em  $m/z$  285. Apresentou fragmentos em 151 referente à  $[M-134-H]^-$  e em 133 referente à  $[M-152-H]^-$ , além de outros sinais intensos como os de  $m/z$  245 e 227.



**Figura 21.** Espectro de massas de primeira ordem (modo *full-scan*) de **Sn4**, avaliado em modo negativo.

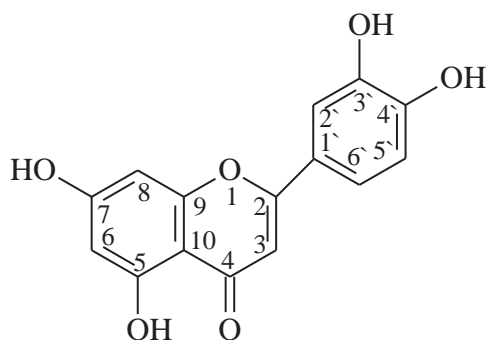
O espectro da absorção na região do UV (Fig. 22) de **Sn4** apresentou bandas em 254 e 348 nm, que são bandas características de flavonas. (Mabry *et al.*, 1970).



**Figura 22.** Espectro da absorção na região do UV de **Sn4**.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Espectro 15) apresentou sinais na região aromática, que correspondem a um flavonóide. Apresentou dois dubletos em  $\delta$  6,88 de  $J = 8,0$  Hz ( $\text{H5}'$ ), e em  $\delta$  7,38 com  $J = 2,0$  Hz ( $\text{H2}'$ ) e um duplo dubleto em  $\delta$  7,40 de  $J = 2,5$  e  $8,5$  Hz ( $\text{H6}'$ ). Apresentou, também, dois dubletos em  $\delta$  6,18 ( $\text{H6}$ ) e  $\delta$  6,44 ( $\text{H8}$ ), ambos de  $J = 2,0$  Hz, o que evidencia dois hidrogênios com acoplamento em *meta* e um singleto em  $\delta$  6,65, correspondente ao  $\text{H3}$  de uma flavona. O espectro (30)  $g\text{COSY}$  (Espectro 16) forneceu as correlações entre os hidrogrogênios.

Os dados fornecidos pelos espectros bidimensionais  $g\text{HSQC}$  (Espectro 17) e  $g\text{HMBC}$  (Espectro 18) possibilitaram a atribuição dos hidrogênios e carbonos (Tabela 3). Esses dados, comparados com a literatura (Silva *et al.*, 2008), permitiram a identificação da luteolina (Fig. 23).



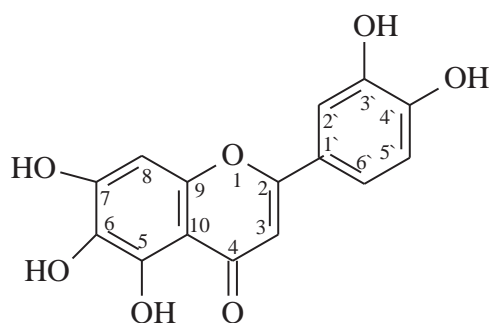
**Figura 23.** Estrutura de **Sn4**



#### 4.3.5 Elucidação estrutural de Sn5

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Espectro 19) apresentou um dubleto em  $\delta$  6,87 de  $J = 8,0$  Hz (H5'), um dubleto em  $\delta$  7,37 de  $J = 2,5$  Hz (H2') e um duplo dubleto em  $\delta$  7,38 de  $J = 2,0$  e 8,0 Hz (H6'). Apresentou um singlete em  $\delta$  6,61 (H3) e um singlete em  $\delta$  6,53 (H8). Com a ausência do sinal de H6, pode-se propor a presença de uma hidroxila nessa posição. O espectro 2D  $g\text{COSY}$  forneceu as correlações entre os hidrogênios.

Os dados observados nos espectros bidimensionais  $g\text{HMQC}$  (Espectro 21) e  $g\text{HMBC}$  (Espectro 22) possibilitaram a atribuição dos hidrogênios e carbonos (Tabela 3). Esses dados, comparados com a literatura (Santos *et al.*, 2001 e Agrawal, 1989), permitiram a identificação da 6-hidroxiluteolina (Fig. 24).

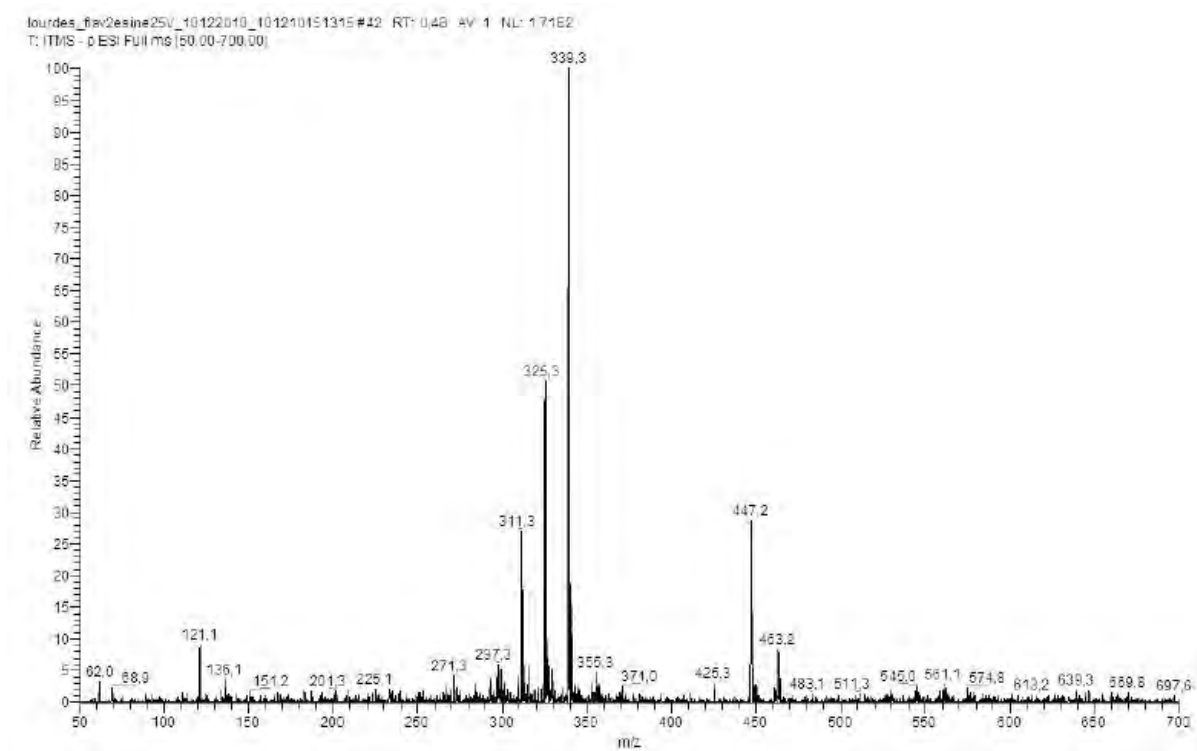


**Figura 24.** Estrutura de Sn5

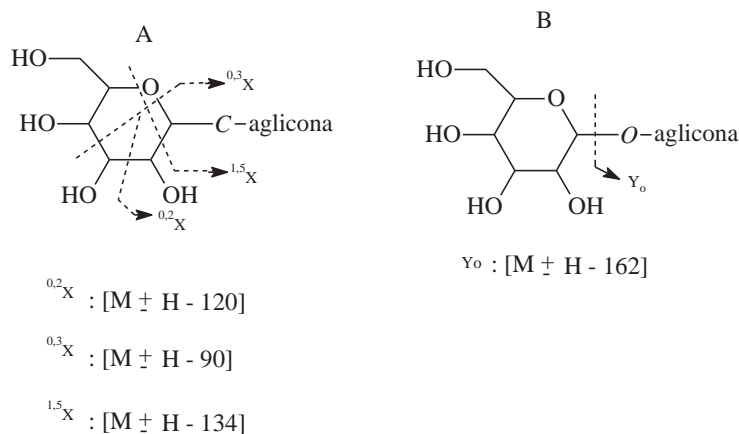
#### 4.3.6 Elucidação estrutural de Sn6

O espectro de massas da mistura de metabólitos presentes nesta fração (Fig. 25) mostrou padrão de fragmentação semelhante aos encontrados para alguns flavonoides, relatados na literatura (Cuyckens e Claeys, 2004), Fig.26.

A análise do espectro de massas (Fig. 25) foi realizada considerando-se a intensidade de picos, portanto, as substâncias foram denominadas **Sn6** e **Sn7**.

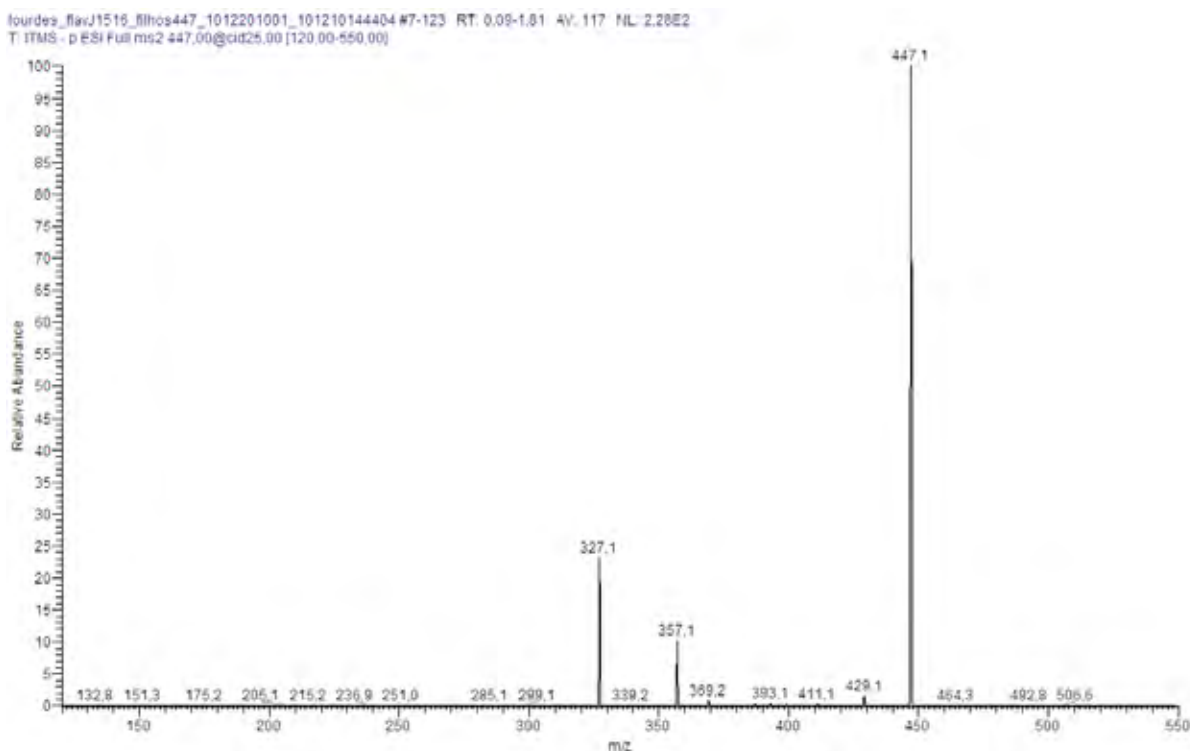


**Figura 25.** Espectro de massas de primeira ordem (modo *full-scan*) de **Sn-6**, analisado em modo negativo



**Figura 26.** Representação de íons produtos característicos formados pela clivagem de uma C-hexose (A) e de uma O-hexose (B). O sinal  $\pm$  indica os modos de ionização, positivo ou negativo (Cuyckens e Claeys, 2004)

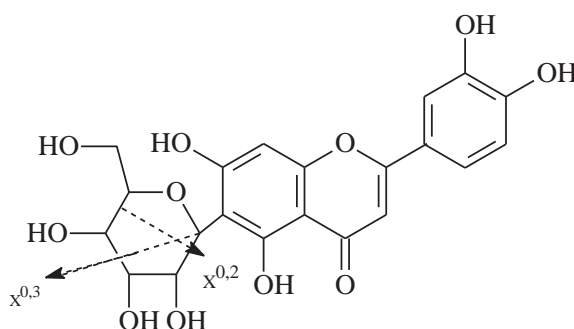
No espectro de massas de segunda ordem da substância **Sn6** (Fig. 27) foi observado o pico  $m/z$  447  $[M - H]^-$  referente à molécula desprotonada e fragmentos significativos no espectro de segunda ordem em  $m/z$  357, referente a  $[M - 90 - H]^-$  e em  $m/z$  327  $[M - 120 - H]^-$ , sugerindo a presença de um C-glicosídeo.



**Figura 27.** Espectro de massas de segunda ordem de  $m/z$  447 de **Sn6**

Como discutido anteriormente, em flavonoides C-glicosilados, o açúcar é ligado diretamente ao núcleo do flavonoide por uma ligação C–C, portanto esta clivagem é dificultada. Já em flavonoides O-glicosilados, a ligação O–C é mais susceptível a esta clivagem. Portanto, a intensidade dos picos no espectro de massas auxilia na identificação destes dois tipos de ligações.

Em flavonoides C-glicosilados a via de fragmentação preferencial é aquela que ocorre através da clivagem interna da unidade sacarídica, fornecendo perdas em 90 Da, 120 Da e 134 Da, (Fig. 28) (Cuyckens e Claeys, 2004).

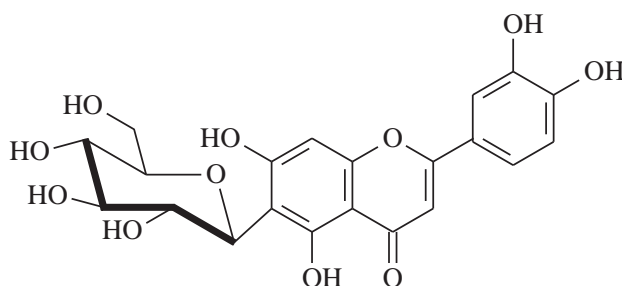


**Figura 28.** Proposta de fragmentação para **Sn6** baseada em CUYCKENS E CLAEYS, (2004). Onde:  $0,2X = [M - H - 120]^-$ ;  $0,3X = [M - H - 90]^-$ .

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **Sn6** foram detectados sinais na região aromática que correspondem a um flavonóide (Espectro 23 ). Foram observados um dubleto em  $\delta$  6,87 de  $J = 8,0$  Hz ( $\text{H}5'$ ), um dubleto em  $\delta$  7,39 de  $J = 2,0$  Hz ( $\text{H}2'$ ) e um duplo dubleto em  $\delta$  7,42 de  $J = 2,0$  e 8,0 Hz ( $\text{H}6'$ ).

Notou-se, também, um singlete em  $\delta$  6,47, correspondente ao H3 de uma flavona, e um singlete em  $\delta$  6,88 (H8).

A falta de um singlete em  $\delta$  3,87, referente ao sinal de uma metoxila, evidenciou que este flavonóide não contém a metoxila na posição C-7, sendo portanto um flavonóide. A presença de uma unidade de açúcar foi verificada devido à presença de um sinal em  $\delta$  4,58 de  $J = 10,0$  Hz, que corresponde ao hidrogênio anomérico ( $H_{1''}$ ). A posição da glicose foi determinada, considerando-se o acoplamento no espectro  $gHMBC$  entre os sinais em  $\delta$  4,58 ( $H_{1''}$ ) e o sinal do carbono em  $\delta$  109,0 (C-6). A estrutura foi determinada como sendo 7-hidroxiluteolina-6-C- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (Fig. 29).



**Figura 29.** Estutura de **Sn6**

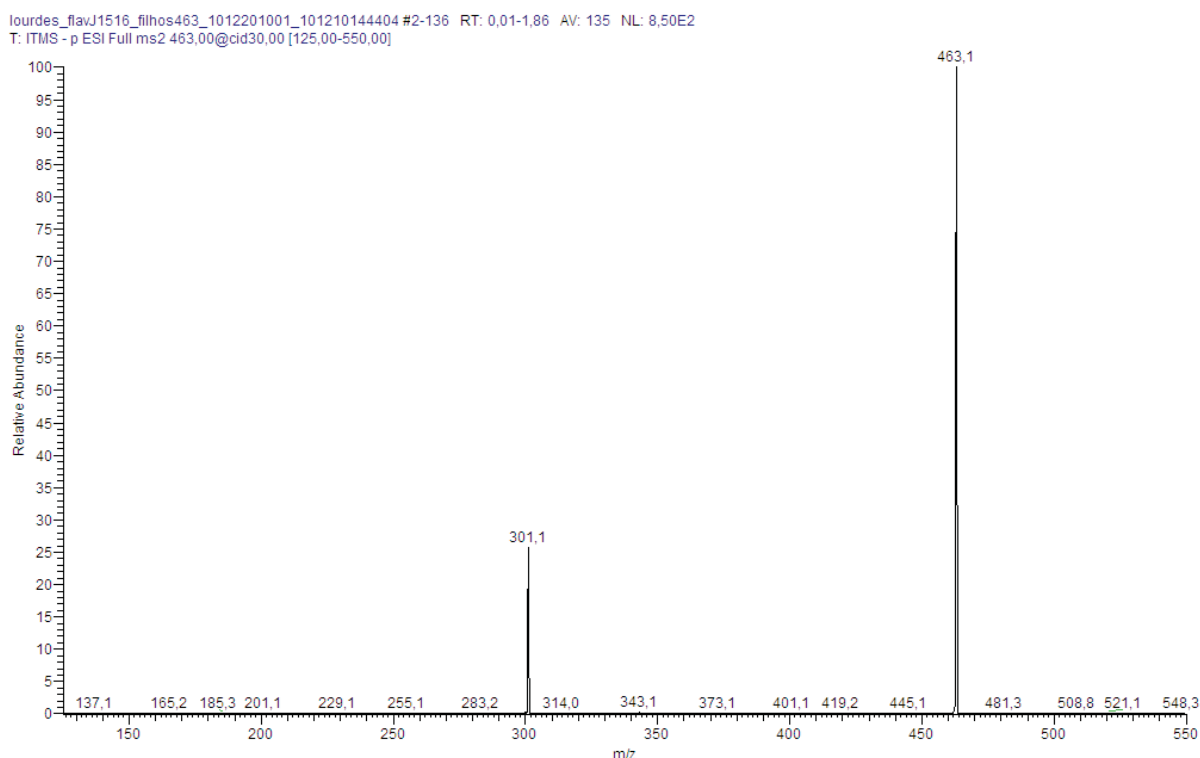
**Tabela 3.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de **Sn4-6** (11,7 T, DMSO-*d*<sub>6</sub>)

Posição	Sn4		Sn5		Sn6	
	$^1\text{H}$ (ppm), J (Hz)	$^{13}\text{C}^{**}$	$^1\text{H}$ (ppm), J (Hz)	$^{13}\text{C}^{**}$	$^1\text{H}$ (ppm), J (Hz)	$^{13}\text{C}^{**}$
2		164,1				164,2
3	6,61 s	101,9	6,61 s	102,6	6,47 s	102,2
4		181,5		181,4		181,1
5	12,77 s	147,0	12,70 s	161,5	13,53 s (OH)	161,1
6		129,4		98,6		109,0
7		152,8		164,0		163,8
8	6,50 s	93,4	6,53 s	93,8	6,86 s	93,8
9		149,9		155,2		155,1
10		104,3		103,6		104,3
1'		121,9		121,3		122,0
2'		112,9	7,37 <i>d</i> (2,0)	112,9	7,39 <i>d</i> (2,0)	113,9
3'		145,8		146,0		145,8
4'		149,4		149,7		149,8
5'	6,88 (8,0)	115,8	6,87 <i>d</i> (8,0)		6,87 <i>d</i> (8,0)	115,4
6'	7,40 (2,0; 8,0)	118,6	7,38 <i>dd</i> (2,0; 8,0)		7,42 <i>dd</i> (2,0; 8,0)	118,6
1''	-	-	-	-	4,58 <i>d</i> (10,0)	73,0
2''	-	-	-	-	3,40 <i>dd</i> (9,0; 9,0)	70,2
3''	-	-	-	-	3,18 <i>t</i> (9,0)	78,4
4''	-	-	-	-	3,20 <i>d</i> (9,0)	70,4
5''	-	-	-	-	3,14 <i>m</i>	81,2
6''	-	-	-	-	3,48 <i>dd</i> (5,5; 6,0)	61,4
					3,69 <i>dd</i> (5,5; 6,0)	

\*\* Dados obtidos a partir das correlações observadas nos experimentos gHMQC e gHMBC

### 4.3.7 Elucidação estrutural de Sn7

O perfil do espectro de massas de **Sn7** (Fig. 30) apresentou o pico correspondente ao íon da molécula desprotonada  $[M - H]^-$  em  $m/z$  463 e de fragmentos significativos em  $m/z$  301, referente a  $[M - 162 - H]^-$ . Diferentemente de C-glicosídeo (Fig 12), O-glicosídeo apresentou a quebra do açúcar intacto.



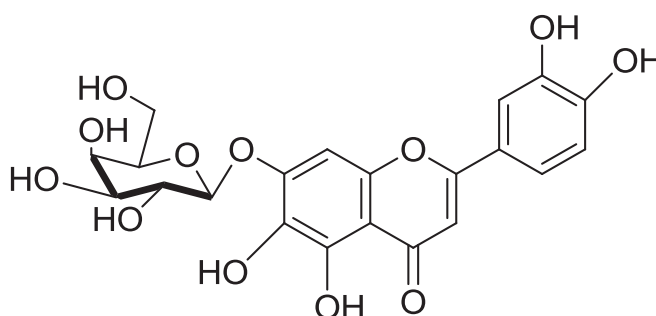
**Figura 30.** Espectro de massas de segunda ordem de  $m/z$  463 de **Sn7** analisado em modo negativo.

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  foram verificados sinais na região aromática referentes a mistura de flavonóides (Tab 3.), (Espectro 23). Foram observados dois dubletos em  $\delta$  6,89 ( $J = 8,0$ ;  $\text{H}5'$ ), e em  $\delta$  7,40 (d;  $J = 2,0$  Hz;  $\text{H}2'$ ), um duplo dubleto em  $\delta$  7,42 ( $J = 2,0$  e  $8,0$  Hz;  $\text{H}6'$ ), um singleto em  $\delta$  6,67 ( $\text{H}3$ ) e outro em  $\delta$  6,94 ( $\text{H}8$ ). Verificou-se a presença de um sinal de hidrogênio anomérico ( $\text{H}1''$ ) de açúcar, em  $\delta$  5,00 ( $J = 7,0$  Hz).

Através dos espectros bidimensionais (*g*HMQC e *g*HMBC) foi feita a atribuição dos sinais de hidrogênios e carbonos (Tabela 4) (Espectros 24, 25) . Os valores de deslocamentos químicos da aglicona e do açúcar foram comparados com dados da literatura (Harborne e Mabry, 1982)

A posição do açúcar foi determinada através da análise de correlações observadas no espectro *g*HMBC, do sinal em  $\delta$  5,00 (H1'') com  $\delta$  151,6 (C-7).

Através do experimento TOCSY 1D (Espectro 26), verificou-se a correlação do sinal em  $\delta$  5,00-H1''; com  $\delta$  3,34-H2'';  $\delta$  3,30- H-3'' ;  $\delta$  3,49-H4''; indicando tratar-se de uma galactose. A configuração - $\beta$ -D-galactopiranosídica foi deduzida mediante aos valores de constantes de acoplamento entre JH1-H2 (7,5 Hz). Portanto a estrutura de **Sn7** foi determinada como sendo 6-hidroxiluteolina-7-O- $\beta$ -D-galactopiranosideo (Fig. 31). Até a presente data, é a primeira vez que se identifica flavonóides O-glicosilados na espécie de *Syngonanthus nitens*. As espécies desse gênero apresentam predominantemente flavonóides C-glicosilados, porém é comum no gênero a hidroxila adicional na posição C-6 da flavona.

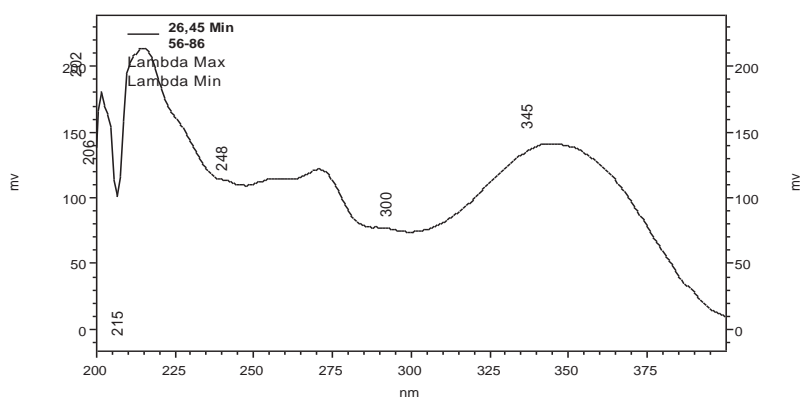


**Figura 31.** Estrutura de **Sn7**



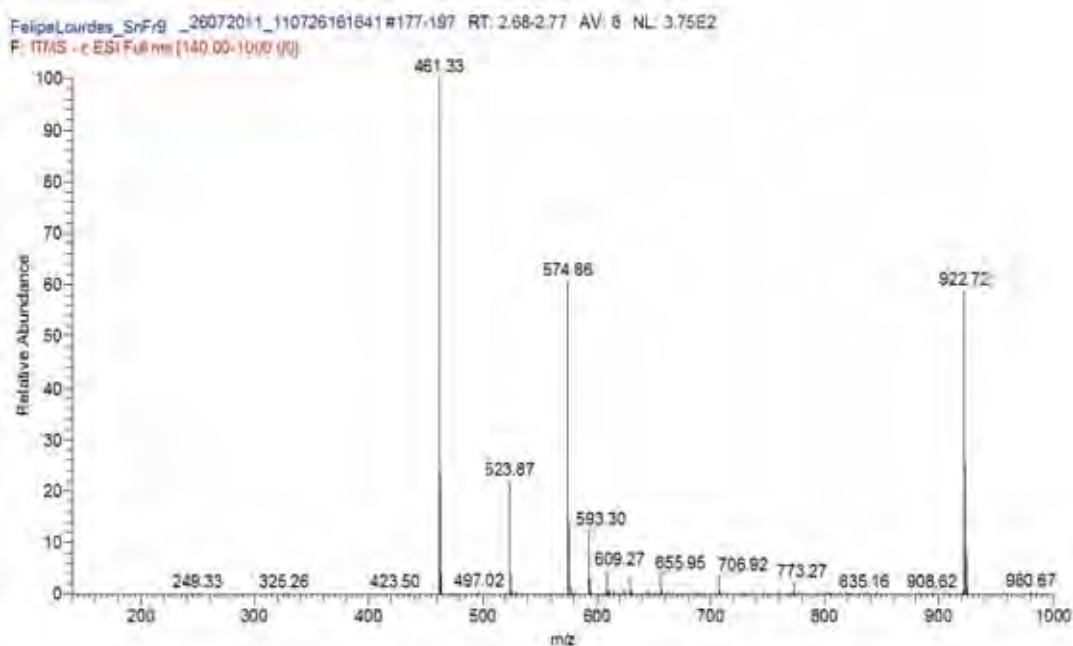
### 4.3.8 Elucidação estrutural de Sn8

A substância **Sn8** (Fig. 32) foi obtida como um sólido amorfo. O espectro no UV (Fig. 18) apresentou bandas em 248 e 345 nm, característica de uma flavona (Mabry *et al.*, 1970).



**Figura 32.** Espectro da absorção na região do UV de **Sn8**

O espectro de ESI-MS (modo negativo) mostrou o íon da molécula desprotonada  $[M - H]^-$  em  $m/z$  922.7, referente a fórmula  $C_{44}H_{42}O_{21}$ , sugerindo a natureza dimérica de flavona glicosilada (Fig. 33).



**Figura 33.** Espectro de massas de primeira ordem (modo full-scan) de **Sn8**, analisado em modo negativo

No espectro  $MS^2$ , (Fig. 34), observou-se fragmentos representativos em  $m/z$  461,3 referente a formula molecular  $C_{22}H_{21}O_{11}$ , evidenciando a unidade monomérica do dímero.



**Figura 34.** Espectro de massas de segunda ordem de  $m/z$  463 de **Sn8** analisado em modo negativo

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Tabela 4) e o espectro de ESI-MS dessa substância sugere a presença de duas hidroxilas e duas metoxilas, 10 hidrogênios aromáticos, além de hidrogênios metilênicos característicos de açúcares (Harborne, 1994).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  em DMSO- $d_6$  (Espectro 27), ampliação (Espectro 5a) evidenciou dois singletos correspondentes a hidrogênios de hidroxilas queladas à carbonila em  $\delta$  13,4 (1H) e  $\delta$  13,5 (1H). Ressonâncias equivalentes à dois grupos metoxilas foram também observados em  $\delta$  3,87 (3H) e  $\delta$  3,90 (3H). Os singletos em  $\delta$  6,75 e  $\delta$  6,78 (1H cada) correspondem à H-3 e H-3''' dos anéis C e C' respectivamente, sugerindo a natureza dimérica e que esta substância é um biflavonóide (Harborne, 1994). A existência de dubleto ( $J = 8,0$  Hz, 2 H) e duplo dubleto ( $J = 2,0$  e  $8,0$  Hz, 4 H) em  $\delta$  6,90,  $\delta$  7,46 e 7,48 foram atribuídos aos H5', H5''', H2', H2''' e H6', H6''' dos anéis B, B' respectivamente de uma luteolina.

A ausência de dois sinais de hidrogênios acoplados em meta e a presença dos singletos em  $\delta$  6,73 (1H) e  $\delta$  6,79 (1H) evidencia que o anel A das unidades da flavona estão substituídas por unidades de C-glicosídeos. Os sinais dos hidrogênios anoméricos em  $\delta$  4,61 e  $\delta$  4,59 ( $J = 11$  Hz, 1 H cada) confirmam a presença de C-glicosídeos nos anéis A e A' respectivamente.

Os espectros gHSQC (Espectro 28, Tabela 4) confirmou as ligações a  $J^1$  dos hidrogênios e carbonos e os espectros de gHMBC (Espectro 29, tabela 4.) pode confirmar as correlações à  $J^2$  e  $J^3$  dos hidrogênios e carbonos.

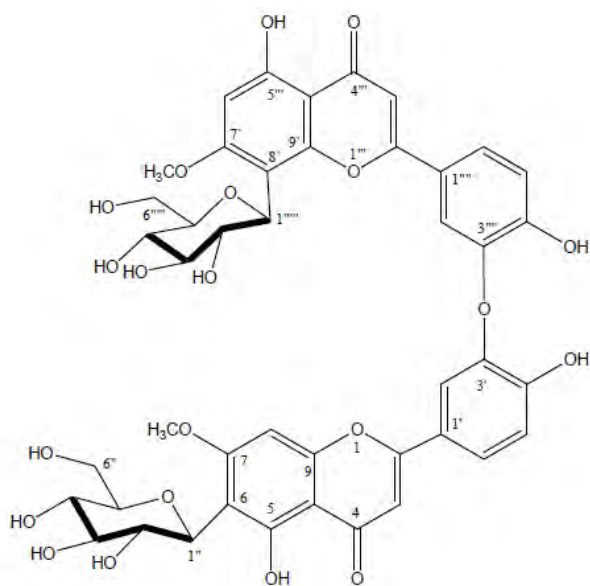
Para confirmar a ligação entre as duas unidades monoméricas da flavona, observou-se no espectro de gHMBC que o sinal do hidrogênio em  $\delta$  7,42 (H-2' e H-2''') correlaciona-se à  $J^2$  e à  $J^3$  com os carbonos em 146,0 e 150,0 (H3' e H4''') respectivamente. O deslocamento químico do C3' e do C-3''' em  $\delta$  146,0 sugere que

nesta posição existe substituição. Como foram confirmadas por gHMBC que as unidades de açúcares estão posicionados nos carbonos C-6 (anel A) e C-8 (Anel A') respectivamente, sugerimos que a ligação entre as duas unidades da flavona somente poderia ocorrer entre as posições C3' –O– C3''' dos anéis B e B'.

Para confirmar a identidade dos glicosídeos foram analisados os espectros TOCSY (Espectro 30) monodimensionais com irradiação nos sinais dos hidrogênios em  $\delta$  4,59 e  $\delta$  4,61 respectivamente, confirmando que os açúcares são  $\beta$ -glicose. Com o experimento gCOSY (Espectro 31) foi possível atribuir a sequência dos hidrogênios das unidades de glicose e a estrutura foi definida como 7-metoxiluteolina-6-C-glicopiranosídeo-(3'-O-3''')-7'-metoxiluteolina-8'-C-glicopiranosídeo, (Fig. 35).

A literatura descreve um biflavonóide isolado das folhas de *Lonicera japonica* conhecido por *ochnaflavone*, porém com somente uma glicose ligada em um dos anéis A, na posição 7 do anel da flavona através de ligação O- (Ma, Junli et al., 2009). De *Solanum melongena* também foi isolado um biflavonóide, ligado pelas posições 4'- 4''' dos anéis B, possuindo açúcares nas posições 3 do anel C conhecido por isorhamnetina-3-O- $\beta$ -D-glicopiranosídeo-(4'-O-4''')-galangina-3''-O- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (Shen et al., 2005).

Flavonóides são metabólitos comuns identificados em várias famílias de plantas, sendo inclusive em Eriocaulaceae, utilizados como marcadores taxonômicos (Dokedal, 2009; Santos et al, 2001). Os derivados de luteolina são comuns em *Syngonanthus*, porém flavonas diméricas estão sendo identificadas pela primeira vez na família Eriocaulaceae. Não consta dados espectroscópicos e espectrométricos na literatura também até o presente da 7-metoxiluteolina-6-C-glicopiranosídeo-(3'-O-3''')-7'-metoxiluteolina-8'-C-glicopiranosídeo.



**Figura 35.** Estrutura de Sn8

Tabela 4. Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de Sn7-8 (11,7 T, DMSO-d6)

Posição	Sn7			Sn8				
	$^1\text{H}$ (ppm), J (Hz)	$^{13}\text{C}^{**}$		$^1\text{H}$ (ppm), J (Hz)	$^{13}\text{C}^{**}$	Posição	$^1\text{H}$ (ppm), J (Hz)	$^{13}\text{C}^{**}$
2,		164,2		6,75 s	164,3	2"	6,78 s	164,6
3	6,67 s	102,4		-	103,2	3"	-	103,4
4		181,1		-	**	4"	-	**
5	13,53 s (OH)	161,1		-	161,0	5"	-	159,0
6		109,0		6,73 s	93,0	6"	-	110,4
7		163,8		-	164,0	7"	-	165,2
8	6,94s	93,8		-		8"	6,79 s	90,0
9		155,1		-	105,0	9"	-	105,0
10		104,3		-	104,6	10"	-	104,6
1'		122,0		-	122,2	1'''	-	122,2
2'	7,40 d(2,0)	113,9		7,46 d(2,0)	114,3	2'''	7,46 d(2,0)	114,3
3'		145,8		-	146,0	3'''	-	146,0
4'		149,8		-	150,0	4'''	-	150,0
5'	6,89 d(8,0)	115,4		6,90 d(8,0)	115,2	5'''	6,90 d(8,0)	115,2
6'	7,42 dd(2,0; 8,0)	118,6		7,48 dd(2,0; 8,0)	119,2	6'''	7,48 dd(2,0; 8,0)	119,2
4'-OCH <sub>3</sub>		-		-	-	-	-	-
7'-OCH <sub>3</sub>		-		3,87	56,0	-	-	-
7'-OCH <sub>3</sub>		-		-	-	-	3,90	56,0
1''	5,00 d(10,0)	100,8		4,61 d(11,0)	72,0	1'''''	4,59 d(11,0)	72,0
2''	3,34 dd(8,5)	72,8		4,20 dd(9,0; 9,0)	69,0	2'''''	4,00 dd(9,0; 9,0)	70,0
3''	3,30 dd(1,0;6,5)	73,0		3,18 dd(9,0; 9,0)	79,0	3'''''	3,20 dd(9,0; 9,0)	79,0
4''	3,49 dd(2,0;12,0)	68,9		3,08 d(9,0)	70,0	4'''''	3,08 d(9,0)	70,0
5''	3,21 m	**		3,12 m	82,0	5'''''	3,12 m	82,0
6''	3,68 dd(2,5;12,0)	61,0		3,70 dd(11,0; 6,0)	61,0	6'''''	3,70 dd(11,0; 6,0)	61,0
	3,69 dd(3,0;12,0)			3,30 dd(11,0; 6,0)			3,30 dd(11,0; 6,0)	

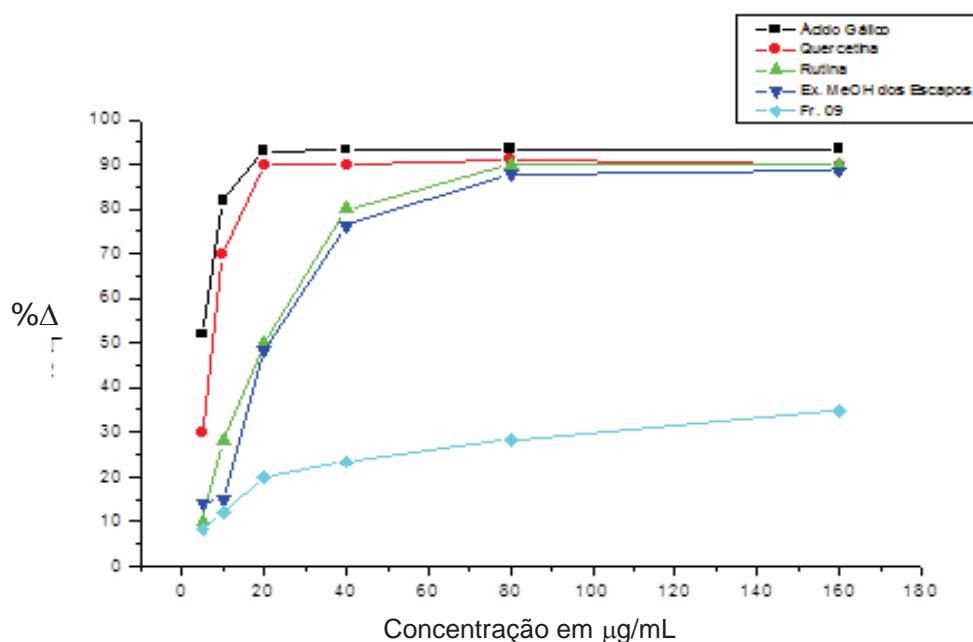
\*\* Dados obtidos a partir das correlações observadas nos experimentos gHMQC e gHMBC

## **ATIVIDADES BIOLÓGICAS**

## 4.4 ATIVIDADE BIOLÓGICA

### 4.4.1 Atividade Antioxidante

Os resultados obtidos a partir do experimento de capacidade seqüestradora de radicais livres dos extratos MeOH (escapos) foram plotados nos gráficos apresentados (Fig. 36), a fim de se comparar a atividade antioxidante do extrato com os padrões usados ácido gálico, rutina e quercetina).

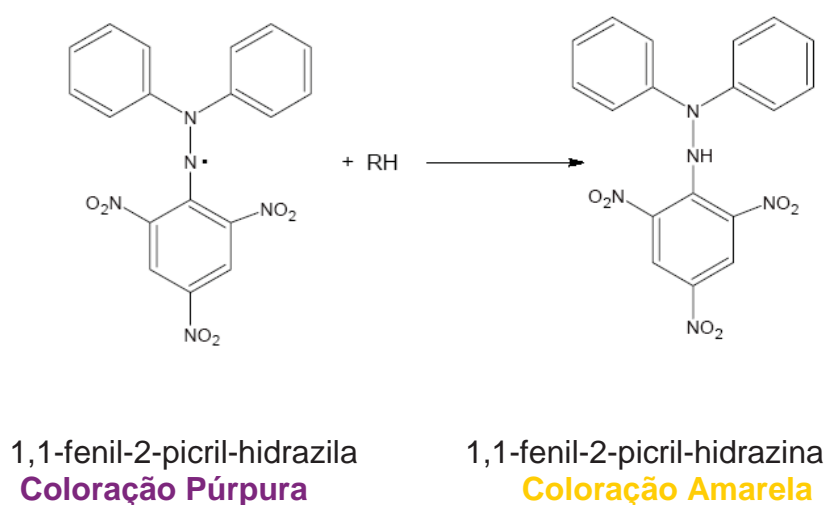


**Figura 36.** Capacidade seqüestradora de radicais livres dos extratos MeOH (escapos) de *S. nitens* sobre o DPPH. Absorbância em 517 nm após 30 min de reação.

Os ensaios colorimétricos com DPPH são um dos mais utilizados para avaliação da atividade antioxidante. O DPPH é um radical estável que apresenta coloração púrpura na forma radicalar, sendo um cromóforo que possui máximo de absorção na região do visível com  $\lambda_{max}$  em 517 nm. Na presença de um antioxidante, o DPPH sofre uma reação de redução, sendo convertido da forma radicalar 1,1-fenil-2-picril-hidrazila (DPPH\*) para forma não radicalar 1,1-fenil-2-picril-



hidrazina (Fig. 37), essa última apresenta intensa coloração amarela, com conseqüente diminuição da absorção que pode ser monitorada pelo decréscimo da absorbância em 517 nm. Com base nesse mecanismo, a avaliação da atividade antioxidante pode ser efetuada pela quantificação da atividade seqüestradora de radicais estáveis DPPH (Sousa *et al.*, 2007).



**Figura 37.** Reação de estabilização do radical livre DPPH por doação de átomos de hidrogênios de uma substância antioxidante

Para que esta reação de redução ocorra é necessário que haja no meio uma substância com capacidade de doar um hidrogênio radicalar, formando, além da 1,1-fenil-2-picril-hidrazina, um novo radical estável, sendo esta atividade chamada pelos acadêmicos como “atividade seqüestradora de radicais livres”.

A atividade antioxidante da maioria dos extratos vegetais é devido à presença de compostos fenólicos. O potencial antioxidante de determinado composto fenólico deve-se principalmente a sua capacidade redutora e estrutura química, sendo proporcional à facilidade com a qual o hidrogênio radicalar (H•) de um grupo hidroxil (OH) de sua estrutura aromática é doado para um radical livre, bem como a

habilidade do mesmo conseguir acomodar em sua estrutura (aromática) o elétron desemparelhado através do deslocamento deste ao redor de todo o sistema de elétrons da molécula (Duthie *et al.*, 2003). Os compostos fenólicos de plantas enquadram-se em diversas categorias, como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonóides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas, destacando-se como principais compostos antioxidantes os flavonóides, taninos, cumarinas e ácidos fenólicos (Sousa *et al.*, 2007).

Os flavonóides exercem uma função fundamental na defesa antioxidante sendo essencial a sua ingestão, visto que não podem ser sintetizados pelo organismo. São compostos polifenólicos, podendo ser classificados de acordo com suas características químicas e biossintéticas em diversos grupos como: Chalconas, Flavonóis, Flavonas, dihidroflavonóides (Flavanonas e Flavanonóis), Antocianidinas, Isoflavonóides, entre outros, além de apresentar potencial antioxidante maior ou menor de acordo com sua relação estrutura-atividade.

Em relação à estrutura-atividade dos flavonóides, deve-se levar em consideração principalmente três fatores estruturais que contribuirão para maior ou menor atividade antioxidante da substância, sendo eles:

- Presença do grupo diidroxí ou grupo catecol no anel B, o que confere uma maior estabilidade à forma radicalar, pois contribuirá para a deslocalização mais efetiva do elétron desemparelhado;

- Presença de uma ligação dupla-conjugada com o grupo carbonila presente na posição 4 do anel C, uma vez que contribuirá para uma maior deslocalização e estabilização da forma radicalar, visto que aumentará a deslocalização dos elétrons desemparelhados provenientes do anel B;

- Presença de grupos hidroxila nas posições 3 e 5 dos anéis C e A respectivamente, visto que contribuirá para estabilizar ainda mais a forma radicalar pela deslocalização dos elétrons do grupo carbonila da posição 4 do anel C.

Na figura 22, observa-se que o EMeOH dos escapos de *S. nitens* apresenta elevada atividade antioxidante quando comparada com padrões de quercetina, rutina e ácido gálico enquanto o dímero do flavonóide (**Sn8**) esta atividade foi menor.

#### 4.4.2 Atividade Antimicrobiana

Os dados com os resultados da atividade antimicrobiana foram tabelados e estão apresentados nas Tabelas 5 a 9.

**Tabela 5.** Atividade antifúngica dos extratos metanólicos de capítulos, escapos e flavonóides identificados nos escapos de *S. nitens*

<i>Amostras testadas</i>	<b>CIM<sup>a</sup></b>			
	<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>
<i>Capítulos</i>	1000	500	1000	250
<i>Escapos</i>	250	31,25	62,5	62,5
<i>Fr 2</i>	-	250	125	250
<i>A</i>	-	-	125	-

<sup>a</sup> Valores em µg/ml; (-) CIM > 1000 µg/mL.

Fr 2: mistura dos flavonoides (7-metoxiluteolina-6-C-β-D-glicopiranosideo + 7-metoxiluteolina -8-C-β-D-glicopiranosideo); A: (luteolina-6-C-β-D-glicopiranosideo);

**Tabela 6.** Atividade antibacteriana dos extratos metanólicos de escapos e capítulos de *S. nitens*

Amostras testadas	CIM <sup>a</sup>					
	Bactérias gram-positivas			Bactérias gram-negativas		
	<i>S.aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>S. setubal</i>
Capítulos	1000	1000	1000	-	1000	-
Escapos	250	1000	500	-	500	-
Fr 2	-	-	-	-	-	-
A	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> Valores em µg/ml; (-) CIM > 1000 µg/mL;

Fr 2: mistura dos flavonoides (7-metoxiluteolina-6-C-β-D-glicopiranosideo + 7-metoxiluteolina - 8-C-β-D-glicopiranosideo); A: (luteolina-6-C-β-D-glicopiranosideo);

**Tabela 7.** Concentração bactericida mínima (CBM) e concentração fungicida mínima (CFM) dos extratos metanólicos de escapos e capítulos de *S. nitens*

Amostras testadas	CBM <sup>a</sup>				CFM <sup>a</sup>			
	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>
Capítulos	-	-	-	-	1000	-	1000	-
Escapos	500	1000	500	500	500	31,25	62,5	250

<sup>a</sup> Valores em µg/ml; (-) CBM e CFM > 1000 µg/mL

**Tabela 8.** Concentração bactericida mínima (CBM) de flavonoides identificados em *S.nitens*

Amostras testadas	CBM <sup>a</sup>					
	Bactérias gram-positivas			Bactérias gram-negativas		
	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. setubal</i>
Fr 2	-	-	-	-	-	-
A	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> Valores em µg/ml; (-) CBM > 1000 µg/mL;

Fr 2: mistura dos flavonoides (7-metoxiluteolina-6-C-β-D-glicopiranosídeo + 7-metoxiluteolina-8-C-β-D-glicopiranosídeo); A: (luteolina-6-C-β-D-glicopiranosídeo);

**Tabela 9.** concentração fungicida mínima (CFM) de flavonoides identificados em *S.nitens*

Amostras testadas	CFM <sup>a</sup>			
	Fungos			
	<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>
Fr 2	-	250	125	250
A	-	-	125	-

<sup>a</sup> Valores em µg/ml; (-) CFM > 500 µg/mL; nt: não testados

Fr 2: mistura dos flavonoides (7-metoxiluteolina-6-C-β-D-glicopiranosídeo + 7-metoxiluteolina-8-C-β-D-glicopiranosídeo); A: (luteolina-6-C-β-D-glicopiranosídeo);

Neste estudo, as flavonas são os compostos majoritários identificados no extrato metanólico dos escapos de *S. nitens*. Muitas preparações químicas com alto teor de flavonóides tem sido utilizado com comprovada atividade antibacteriana (Bocio *et al.*, 2000 e Mucsi *et al.*, 1992).

Os resultados de CIM resumidos nas tabelas 4 e 5 mostram que o extrato metanólico dos escapos apresentou melhor resultado na prevenção do crescimento de algumas espécies de bactérias ensaiadas como *S. aureus*, *E. faecalis*, *P.*

*aeruginosa*, *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, e ainda resultados promissores para prevenir o crescimento da maioria das espécies de bactérias testadas contra todas as espécies de fungos. O menor CIM (31.25 µg/ml), obtido do extrato metanólico dos escapos foi obtido contra *C. krusei*. Os resultados da determinação da Concentração Mínima Bacterina (CMB) e da Concentração Mínima Antifúngica (CMA) (Tabelas 6 a 8) indicam também que o extrato metanólico dos escapos de *S. nitens* apresenta melhor atividade contra *C. krusei* CIM (31.25 µg/ml) e *C. parapsilosis* CIM (62,5 µg/ml).

Nos escapos foram identificados somente flavonóides C-glicosilados derivados da luteolina e um flavonóide O-glicosilado (Sn-B em mistura) enquanto que nos capítulos, estudos realizados por Pacifico (2010) identificou estes mesmo flavonóides e xantonas.

Portanto, a melhor atividade antimicrobiana apresentada pelo extrato metanólico dos escapos de *S. nitens* pode estar associada ao maior conteúdo de flavonas derivadas da luteolina. Muitos autores sugerem também o potencial antimicrobiano e antifúngico de flavonoides derivados da luteolina (Hernández *et al.*, 2000; Kuete *et al.*, 2007; Kuete *et al.*, 2008; Mbaveng *et al.*, 2008; Kuete *et al.*, 2009). Kuete *et al.*, (2008). Da família Eriocaulaceae Fang *et al.*, (2008) também identificou flavones em *Eriocaulon buergerianum*, que apresentou atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*.

Os autores concluíram que esta atividade pode ser devido a habilidade das flavonas complexar com paredes de células bacterianas e então inibir seu crescimento microbiano (Cowan, 1999; Cushnie e Lamb, 2005). Silva *et al.*, 2009 estudando o extrato metanólico das folhas de *L. spiralis* também identificou flavonas C-glicosiladas derivadas da apigenina responsáveis pela inibição do crescimento de

fungos testados . Os CIM encontrados neste estudo com os escapos de *S. nitens* foram ainda menores que os detectados por Silva *et al.*, 2009.

#### **4.4.3 Atividade Antiulcerogênica**

Nesses ensaios foram utilizados camundongos Swiss albinos, machos e fêmeas (25-40 g) e ratos Wistar machos (150 a 200 g) provenientes do Biotério Central da UNESP-Botucatu, aclimatados às condições do biotério setorial por pelo menos sete dias antes da manipulação experimental, sob temperatura ( $23 \pm 2^\circ \text{C}$ ) e ciclo claro-escuro de 12 horas. Os animais foram alimentados com ração comercial e água ad libitum.

Todos os experimentos obedeceram a protocolos experimentais aprovados previamente pela Comissão de Ética na Experimentação Animal, do Instituto de Biociências da UNESP - Botucatu. O número de animais por grupo experimental variou de 5 a 10. Os resultados foram expressos na forma de média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) dos parâmetros obtidos. Os valores médios obtidos foram submetidos à análise de variância - ANOVA, seguido pelo teste à posteriori de Dunnett em experimentos com mais de dois grupos de tratamento. O teste *t* de Student foi utilizado para a análise estatística de diferenças existentes entre dois grupos de tratamento. Foi considerado como nível de significância mínima  $p < 0,01$ .

#### **4.4.4 Etanol Absoluto**

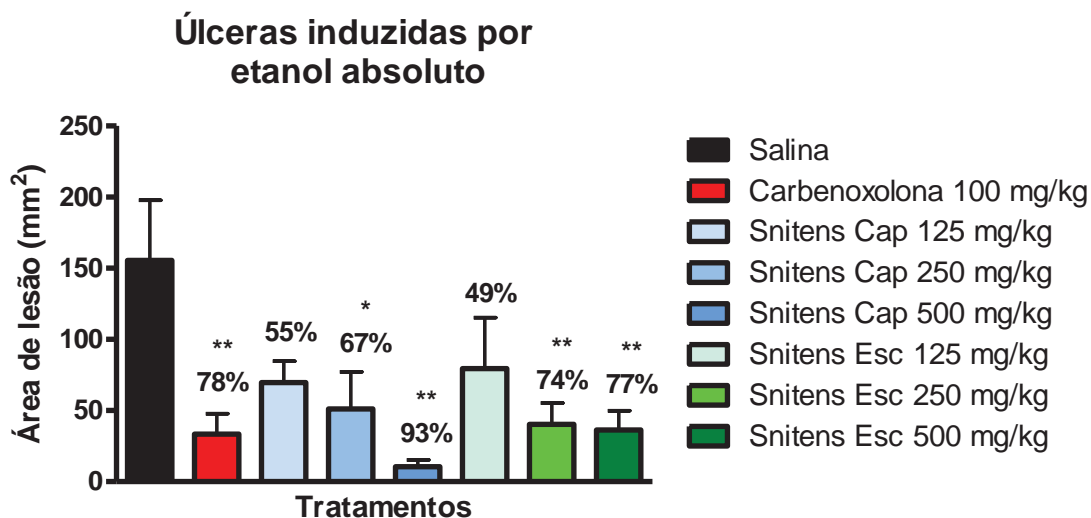
Este modelo consiste na destruição da barreira mucoprotetora e redução do fluxo sanguíneo da mucosa gástrica. Foram utilizados ratos submetidos a jejum prévio de 24 horas.

Os animais foram tratados oralmente por gavagem com carbenoxolona 100 mg kg<sup>-1</sup> (controle positivo), solução salina 0,9% ou Tween 80 a 8% no volume de 10 mL kg<sup>-1</sup> (controle negativo) e com os extratos metanólicos de capítulos e escapos em diversas doses (125, 250 e 500 mg kg<sup>-1</sup>).

Decorridos 60 minutos dos tratamentos, os animais receberam, também por via oral, 1 mL de etanol absoluto (agente indutor das lesões). Após 60 minutos do agente indutor de lesão gástrica, os animais foram mortos e seus estômagos retirados para mensuração das lesões.

A figura 36 mostra a área de lesão ulcerativa e a porcentagem de inibição destas lesões nos animais tratados com os extratos metanólicos, nas doses de 125, 250 e 500 mg kg<sup>-1</sup>, frente às lesões induzidas pelo etanol absoluto. Pode-se observar uma proteção efetiva de 51% destas lesões nos animais tratados com este extrato na dose de 500 mg kg<sup>-1</sup>. Esse resultado serviu como triagem para o delineamento de outros modelos de avaliação de atividade antiulcerogênica para os mesmos extratos.





**Figura 38.** Efeito do extrato metanólico de capítulos e escapos de *Syngonanthus nitens* no modelo de lesão ulcerativa induzida por etanol absoluto. Resultados expressos na forma de média  $\pm$  E.P.M. (n: 5) da área de lesão e na forma de porcentagem de proteção. Anova – Dunnett \*\*  $p < 0,01$ .

Os resultados indicam que ambos os extratos possuem atividade gastroprotetora no modelo realizado. Na dose de  $500 \text{ mg kg}^{-1}$ , o extrato metanólico de capítulos apresentou 93% de inibição da área da lesão e o extrato metanólico de escapos apresentou 77%. A dose de  $500 \text{ mg kg}^{-1}$  do extrato de capítulos de *S. nitens* teve melhor atividade gastroprotetora que a própria droga de referência (carbenoxolona), porém, experimentos posteriores devem ser realizados para elucidação dos mecanismos de ação envolvidos em tal efeito farmacológico.

Outras espécies desse gênero já foram testadas com relação à sua atividade antiulcerogênica e houve resultados positivos. Em *Syngonanthus bisulcatus* houve atividade gastroprotetora, devido à presença de flavonoides no extrato etanólico e frações (Coelho *et al.*, 2006). A atividade de extratos de *Syngonanthus arthrotrichus*

pode estar relacionada à presença de flavonoides derivados da luteolina (Batista *et al.*, 2004).

Existem relatos na literatura que flavonoides podem ser compostos com atividade antiúlcera, provavelmente devido às suas propriedades antioxidantes, que envolve a capacidade de sequestrar radicais livres e diminuir danos de injúrias causadas por reações oxidativas (La Casa *et al.*, 2000). Os flavonoides podem ser utilizados no tratamento da úlcera devido a sua baixa toxicidade, inclusive no tratamento de lesões associadas à infecção com *Helicobacter pylori* (Di Carlo *et al.*, 1999; Borreli, 2000).

Existem, também, relatos de compostos que possuem um sistema catecólico como o anel B de derivados da luteolina, que apresentaram atividades antioxidante e antiúlcera (Yesildada *et al.*, 2000, Coelho *et al.*, 2006).

**CONCLUSÕES**

## 5. CONCLUSÕES

Este estudo possibilitou identificar os constituintes químicos do extrato metanólico dos escapos de *Syngonanthus nitens*. O estudo possibilitou identificar por HPLC-PDA flavonas derivadas da luteolina como constituintes químicos majoritários.

O fracionamento realizado por HSCCC, HPLC-RI e HPLC-PDA forneceu as substâncias **Sn1-Sn8** que através da identificação por métodos espectroscópicos e espectrométricos confirmou a presença dos derivados da luteolina: 7-metoxiluteolina-8-C- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (**SN1**), 7-metoxiluteolina-6-C- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (**SN2**), 3',7-dimetoxiluteolina-6-C- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (**SN3**) luteolina (**SN4**), 6-hidroxiluteolina (**SN5**), luteolina-6-C- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (**Sn6**) com 6-hidroxiluteolina-7-O- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (**Sn7**) e a 7-metoxiluteolina-6-C- $\beta$ -D-glicopiranosídeo-(3'-O-3'')-7'-metoxiluteolina-8'-C- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (**Sn8**).

O extrato metanólico dos escapos apresentou atividade antioxidante equivalente a do ácido gálico (na concentração máxima de 160  $\mu\text{g/mL}$ ). Levando-se em consideração que substâncias fenólicas como os flavonóides são substâncias responsáveis pela atividade antioxidante dos vegetais, podemos sugerir que as flavonas de *S. nitens* são as responsáveis por esta atividade.

O extrato metanólico dos escapos de *S. nitens* revelou ter a melhor atividade antimicrobiana, que pode estar associada ao maior conteúdo de flavonas derivadas da luteolina.

Com relação a atividade gastroprotetora, ambos extratos apresentaram atividade. Porém o extrato metanólico dos capítulos teve melhor atividade do que a dos escapos. Para o gênero *Syngonanthus*, esta informação é relevante, pois tanto em *Syngonanthus* como em *Leiothrix* (considerados gêneros próximos) existe a

presença de xantonas somente nos capítulos, enquanto que nos escapos são predominantes as flavonas. Portanto, a atividade gastroprotetora pode estar associada a presença das xantonas nos capítulos (Santos *et al.*, 2001, Pacifico *et al.*, 2011).

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. O conhecimento da química da espécie pode auxiliar na sua taxonomia e delimitação desta dentro do gênero, assim como o conhecimento do potencial biológico de extratos e substâncias isoladas.

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 pelos extratos vegetais.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, P. K. **Carbon 13 NMR of flavonoids**. Amsterdam: Elsevier, 1989.

ANDRADE, M. J. G.; GIULIETTI, A. M.; RAPINI, A.; QUEIROZ, L. P.; CONCEIÇÃO, A. S.; ALMEIDA, P. R. M.; VAN DEN BERG, C. A comprehensive phylogenetic analysis of Eriocaulaceae: Evidence from nuclear (ITS) and plastid (*psbA-trnH* and *trnL-F*) DNA sequences. **Taxon**, v. 59, n. 2, p. 379-388, 2010.

ARAÚJO, M. G. F. **Caracterização do potencial biológico de *Leiothrix spiralis* Ruhland e *Syngonanthus nitens* (Bong.) Ruhland (Eriocaulaceae)**,. 2011. 144f - Dissertação ( Mestrado em Ciências ) – Faculdade Ciências Farmacêuticas – UNESP, São Paulo, 2011.

BATE-SMITH, E. C.; HARBORNE, J. B. Quercetagenin and patuletin in *Eriocaulon*. **Phytochemistry**, v. 8, p. 1035-1037, 1969.

BATISTA, L. M.; ALMEIDA, A. B. A.; PIETRO MAGRI, L.; TOMA, W.; CALVO, T. R.; VILEGAS, W.; SOUZA BRITO, A. R. M. Gastric antiulcer activity of *Syngonanthus arthrotrichus* SILVEIRA. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, p. 328-332, 2004.

BORRELLI, F.; IZZO, A. A. The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 581-591, 2000.

BOSIO K.; AVANZINI C.; D'AVOLIO, A.; OZINO, O.; SAVOIA, D. In vitro activity of propolis against *Streptococcus pyogenes*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 7, p. 31-174, 2000.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI), 2006. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**; Approved Standard—Seventh Edition document M7-A7.

COELHO, R. G.; VILEGAS, W.; DEVIENNE, K. F.; RADDI, M. S. G. A new cytotoxic naphthopyrone dimer from *Paepalanthus bromelioides*. **Fitoterapia**, v. 71, n.5, p. 497-500, 2000.

COELHO, R. G.; BATISTA, L. M.; SANTOS, L. C.; SOUZA BRITO, A. R. M; VILEGAS, W. Phytochemical study and antiulcerogenic activity of *Syngonanthus bisulcatus* (Eriocaulaceae). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 413-417, 2006.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews** v. 12, p. 564-582, 1999.

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents** v. 26, p.343-356, 2005

CUYCKENS, F.; CLAEYS, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 39, p. 1-5, 2004.



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, n. 5, p. 378-381, 2005.

DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A. A.; CAPASSO, F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sciences**, v. 64, p. 337-353, 1999.

DOKKEDAL, A. L.; SALATINO, A. Flavonoids of brazilian species of *Leiothrix* (Eriocaulaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 20, p. 31-32, 1992.

DOKKEDAL, A. L. **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.; SANO, P. T.; VILEGAS, W. Chemistry in *Paepalanthus* and taxonomic implications. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, p. 503-504, 2004.

DOKKEDAL, A. L.; LAVARDA, F.; SANTOS, L. C.; VILEGAS, W. Xeractinol - a new flavanonol C-glucoside from *Paepalanthus argenteus* var. *argenteus* (Bongard) Hensold (Eriocaulaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, p. 437-439, 2007.

FANG, J. J.; YE, G.; CHEN, W. L.; ZHAO, W. M. Antibacterial phenolic components from *Eriocaulon buergerianum*. **Phytochemistry**, v. 69, p. 1279–1286, 2008.

FIGUEIREDO, I. B. **Efeito do fogo em populações de capim dourado (*Syngonanthus nitens* Eriocaulaceae) no Jalapão, TO**. 2007. 56 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, 2007.

GYAMFI, M.A.; YONAIME, M.; ANIYA, Y. Free-radical scavenging action of medicinal herbs from Ghana *Thonningia sanguinea* on experimentally-induced liver injuries. **General Pharmacology**, v. 32, p. 661-667, 1999.

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 Botanica Brasilica**, v. 10, p. 329-353, 1996.

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.

HERNÁNDEZ, N. E.; TERESCHUK, M. L.; ABDALA L. R. Antimicrobial activity of flavonoids in medicinal plants from Tafí del Valle (Tucumán, Argentina). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, p. 317–322, 2000.

HILL, R. A. Naturally occurring isocoumarins. **Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe**, v. 49, p. 1-78, 1986.

IBAMA/GEREX. Unidade: Parque Nacional das Sempre-Vivas/MG – Disponível: <<http://www2.ibama.gov.br/unidades/parques/reuc/1439.htm>>, Acesso em 02/08/2004.

INSTITUTO SOCIEDADE, POPULAÇÃO E NATUREZA (ISPN). **Cerrado que te quero vivo**. Disponível em: < <http://www.ispn.org.br/arquivos/catalogo-final-baixa-completocom-capa.pdf> > Acesso em maio de 2010.

JENSEN, S.; OLSEN, C. E.; TYAGI, O. M.; BOLL, P. M.; HUSSAINI, F. A.; GUPTA, S.; BISHT, K. S.; PARMAR, V. S. Neolignans and an isoprenylated phenol from *Piper clarkii*. **Phytochemistry**, v. 36, p. 789-792, 1994.

KUETE, V.; KONGA S. I.; NGAMENI, B.; BIGOGA, D. J.; WATCHUENG, J.; NZESSE, K. R.; ETOA, F.N X.; NGADJUI, T. B.; PENLAP, B. V. Antimicrobial activity of the methanolic extract, fractions and four flavonoids from the twigs of *Dorstenia angusticornis* Engl. (Moraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 271–277, 2007.

KUETE, V.; NGAMENI, B.; SIMO, C. C. F.; TANKEU, R. K.; TCHALEUNGADJUI, B.; MEYER, J. J. M.; LALL N.; KUIATE, R. R. Antimicrobial activity of the crude extracts and compounds from *Ficus chlamydocarpa* and *Ficus cordata* (Moraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, p. 17-24, 2008.

KUETE, V.; NANAB, F.; NGAMENIC, B.; MBAVENG, A. T.; KEUMEDJIO, F.; NGADJUIB, B. T. Antimicrobial activity of the crude extract, fractions and compounds from stem bark of *Ficus ovata* (Moraceae). **Journal Ethnopharmacology**, v. 124, p. 556-561, 2009.

LA CASA, C.; VILLEGAS, I.; DE LA LASTRA, C. A.; MOTILVA, V.; CALERO, M. J. M. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, n. 1/2, p. 45-53, 2000.

LAZZARI, L. R. **Redelimitação e revisão de *Syngonanthus* Sect. *Eulepis* (Bong. Ex Koern.) Ruhland – Eriocaulaceae**. 2000. 153 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

MA, JUNLI; LI, NING; LI, XIAN. One new biflavone glucoside from leaves of *Lonicera japonica* Thunb. **Zhongguo Yaowu Huaxue Zazhi**, 19, n.1, p.63-64, 2009.

MBAVENG, A. T.; NGAMENI, B.; KUETE, V.; KONGA SIMO, I.; AMBASSA, T.; ROY, R.; BEZABI, H. M.; ETOA, F. X.; NGADJUI, B. T.; ABEGAZ, B. M.; MEYER, J. J. M.; LALL, N.; PENLAP, B. V. Antimicrobial activity of the crude extracts and five flavonoids from the twigs of *Dorstenia barteri* (Moraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, p. 483-489, 2008.

MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. **The systematic identification of flavonoids**. New York: Springer-Verlag, 1970

MAYWORM, M. A. S.; SALATINO, A. Flavonóides de quatro espécies de *Paepalanthus* Ruhl. (Eriocaulaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 7, p. 129-133, 1993.

MORAES, T.M., Silva, M.A, Rodrigues, C.M., Santos, L.C., Sannomiya, M., Rocha, L.R.M., Brito, A.R.M.S., Bauab, T.M., Vilegas, W., Hiruma-Lima, C.A. Antioxidant, Antisecretory and Gastroprotective Activities from *Leiothrix flavescens*. **Comprehensive Bioactive Natural Products**. In Efficacy, Safety & Clinical Evaluation I. V.K.Gupta (Ed.) Studium Press LLC, U.S.A. v.2, 2010

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.

MUCSI I.; GYULAI, Z.; BELADI I. Combined effects of flavonoids and acyclovir against herpesviruses in cell cultures. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v.47, p. 39:137, 1992.

PACÍFICO, M. **Estudo químico e atividades mutagênica e antiulcerogênica de *Syngonanthus nitens* (Bong.) Ruhland**, 2010. 130 f. Dissertação ( Mestrado em Química Orgânica) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista - UNESP, São Paulo, 2000.

SCHMIDT, I. B. **Etnobotânica e ecologia populacional de *Syngonanthus nitens*: sempre viva utilizada para artesanato no Jalapão, TO**. 2005. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, 2005.

PARK, B. Y; MIN, B. S., OH, S. R.; KIM, J. H.; BAE, K. H.; LEE, H. K. Isolation of Flavonoids, a biscoumarin and an amide from the flower buds of *daphne genkwa* and the evaluation of their anti-complement activity. **Phytotherapy Research**, v. 20, p. 610-613, 2006.

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.

Pesquisa e conservação do cerrado-PEQUI. **Projeto conservação e manejo do Capim dourado no Jalapão**. Disponível em < <http://www.pequi.org.br/capim.html>>  
Acesso em maio de 2010

RAMESH, P.; NAIR, A. G. R. Subramanian S.S. Flavone glycosides of *Vitex trifolia*. **Fitoterapia**, v. 57, p. 282-286, 1986.

RAMOS, C. O. C.; BORBA, F. L.; FUNCH, L. S. Pollination in Brazilian *Syngonanthus* (Eriocaulaceae) Species: Evidence for Entomophily instead of Anemophily. **Annals of Botany**, v. 96, p. 387-397, 2005.

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.

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.

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.; VILEGAS, W.; COLOMBO, L.; PLAZARES, M. C. P.; CARLOS, Z. I. In vitro cytotoxicity activity of planifolin isolated from *Paepalanthus planifolius* (Eriocaulaceae) on murine mammary and lung adenocarcinoma cellular. In: **Simpósio de Imunologia: Imunologia dos Tumores**, 2, 2005, Botucatu.

SCATENA, V. L.; LEMOS, F. J. P.; LIMA, A. A. A.. Morfologia do desenvolvimento pós-seminal de *Syngonanthus elegans* e *S. niveus* (Eriocaulaceae). **Acta Botanica Brasilica** v. 10, p. 85-91, 1996.

SANTOS, L. C.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; TORO, R.; SANO, P. T.; VILEGAS, W. 6-Methoxyquercetin-3-O-(6''-E-feruloyl)- $\beta$ -D-glucopyranoside from *Paepalanthus polyanthus* (Eriocaulaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, p. 451-456, 2002.

SANTOS, L. C.; PIACENTES, S.; MONTORO, P.; PIZZA, C.; VILEGAS, W. Atividade antioxidante de xantonas isoladas de espécies de *Leiothix* (Eriocaulaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, n. 2, p. 67, 2003.

SCHMIDT, I. B. **Etnobotânica e ecologia populacional de *Syngonanthus nitens*: sempre viva utilizada para artesanato no Jalapão, TO.** 2005. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, 2005.

SCHMIDT, I. B.; FIGUEIREDO, I. B.; SCARIOT, A. Ethnobotany and effects of harvesting on the population ecology of *Syngonanthus nitens* (Bong.) Ruhland (Eriocaulaceae), a NTFP from Jalapão Region, Central Brazil. **Economic Botany**, v. 61, p. 73-85, 2006.

SCHMIDT, I. B.; FIGUEIREDO, I. B.; BORGHETTI, F.; SCARIOT, A. Produção e germinação de sementes de “capim dourado”, *Syngonanthus nitens* (Bong.) Ruhland (Eriocaulaceae): implicações para o manejo. **Acta Botanica Brasilica**, v. 22, p. 37-42, 2007.



SILVA, J. M. C.; BATES, J. M. Biogeographic pattern and conservation in South American Cerrado: a tropical savanna hotspot. **Bioscience**, v. 52, p. 225-233, 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.

SILVA, M. A.; CARDOSO, C. A. L.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C. High-performance liquid chromatographic quantification of flavonoids **in Eriocaulaceae species and their antimicrobial activity**. **Molecules** v. 14, p. 4644-4654, 2009.

SHEN, GUANGHAI; KIEM, PHAN VAN; CAI, XING-FU; LI, GAO; DAT, NGUYEN TIEN; CHOI, YEON A.; LEE, YOUNG MI; PARK, YONG KI; KIM, YOUNG HO. Solanoflavone, A new biflavonol glycoside from *Solanum melongena*: Seeking for anti-inflammatory components. **Archives of Pharmacal Research** 28, n.6, p.657-659, 2005.

TAVARAES, D. C.; VARANDA, E. A.; ANDRADE, F. D. P.; VILEGAS, W. Evaluation of the genotoxic potential of the isocoumarin paeplantine in vivo and in vitro mammalian systems. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 68, p. 115-120, 1999.

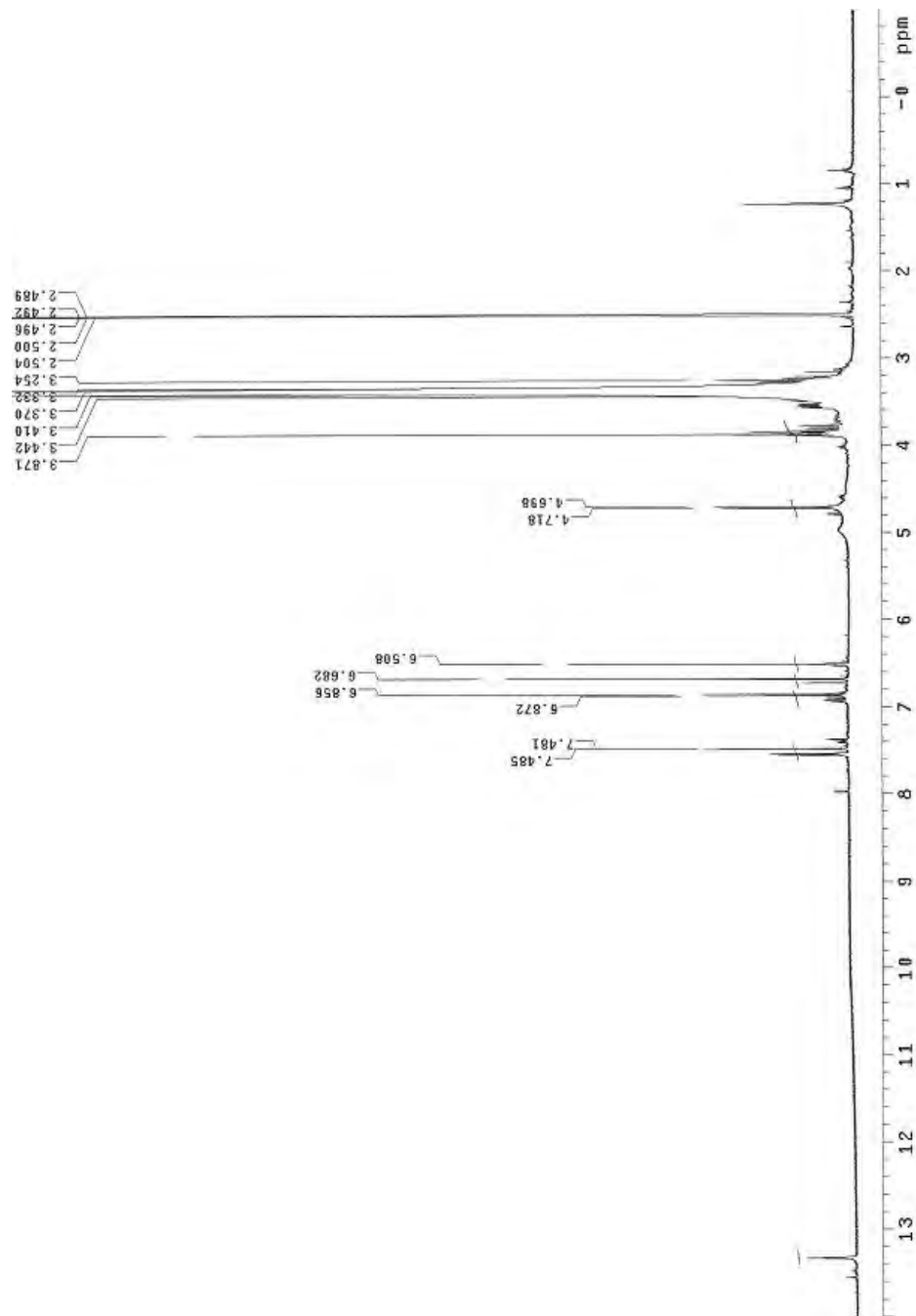
YESILADA, E.; TSUCHIYA, K.; TAKAISHI, Y.; KAWAZOE, K. Isolation and characterization of free radical scavenging flavonoid glycosides from the flowers of *Spartium junceum* by activity-guided fractionation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, p. 471-478, 2000.

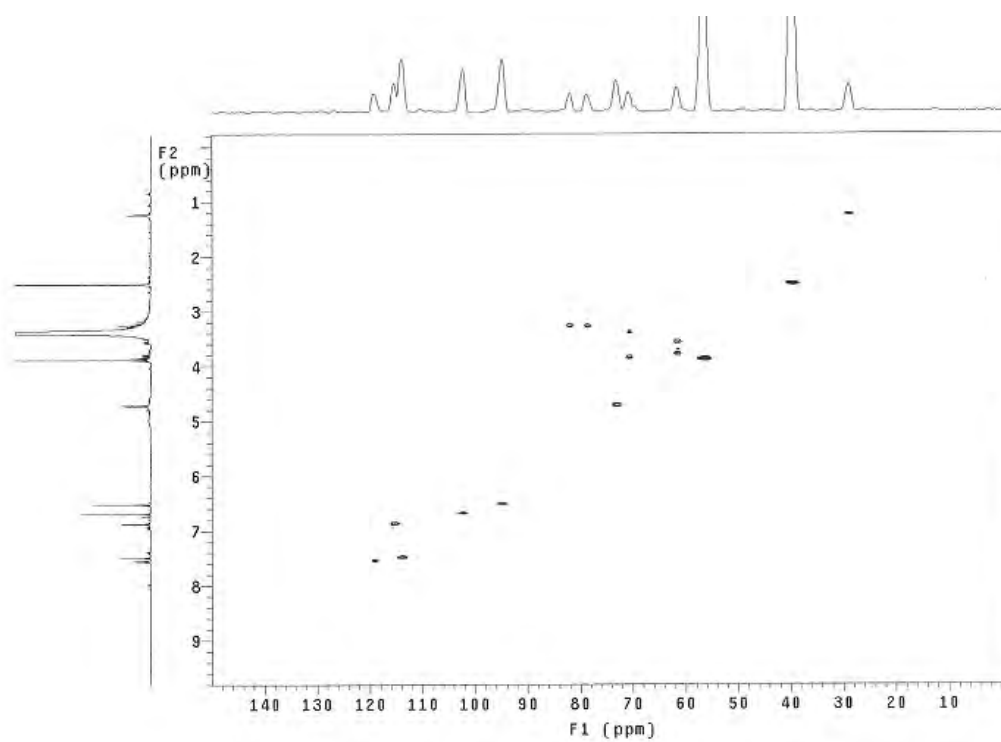
VARANDA, E. A.; RADDI, M. S. G.; DIAS, F. L. P.; ARAUJO, M. C. S.; GIBRAN, S. C. A.; TAKAHASHI, C. S.; VILEGAS, W. **Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis**, v. 17, p. 85-95, 1997.

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.

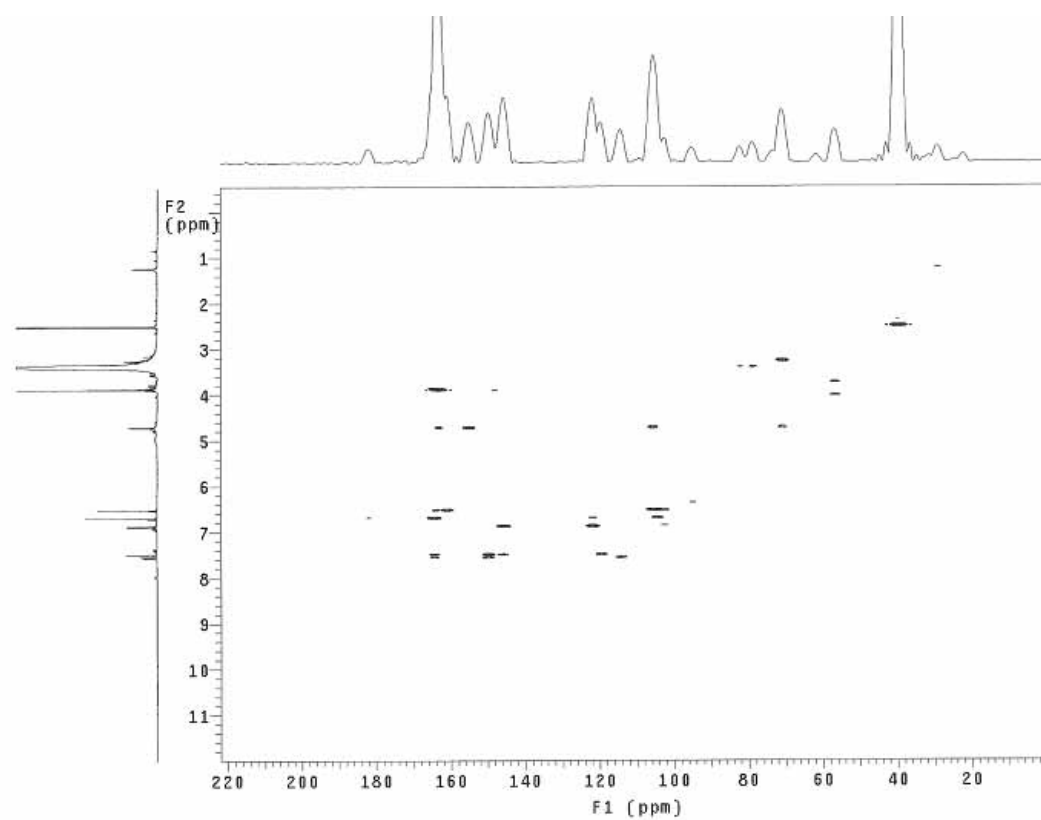
**ANEXOS**

## 7. ANEXOS

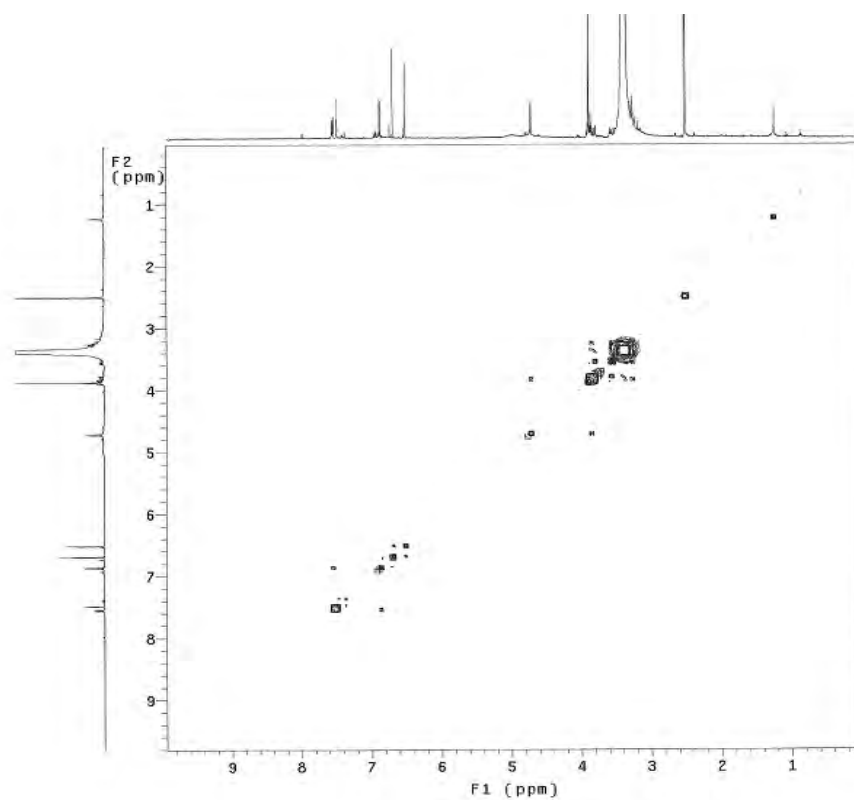
Espectro 1. de RMN H1 (DMSO-d<sub>6</sub>, 11,4 T) de Sn1



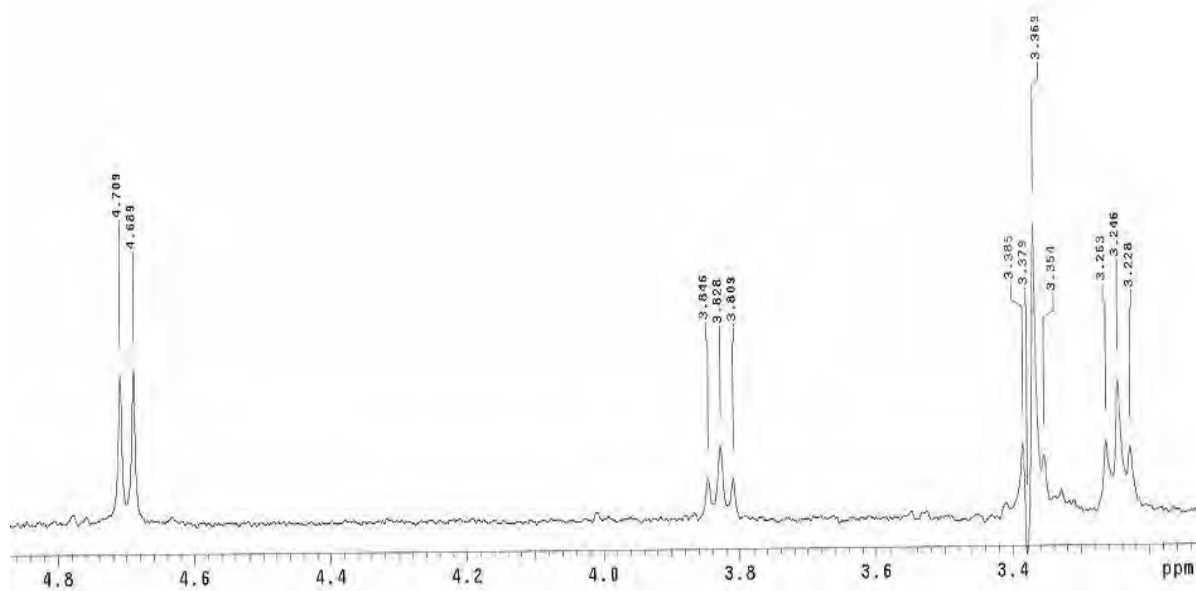
**Espectro 2.** gHSQC (11,4 T, DMSO-*d*<sub>6</sub>) de **Sn1**



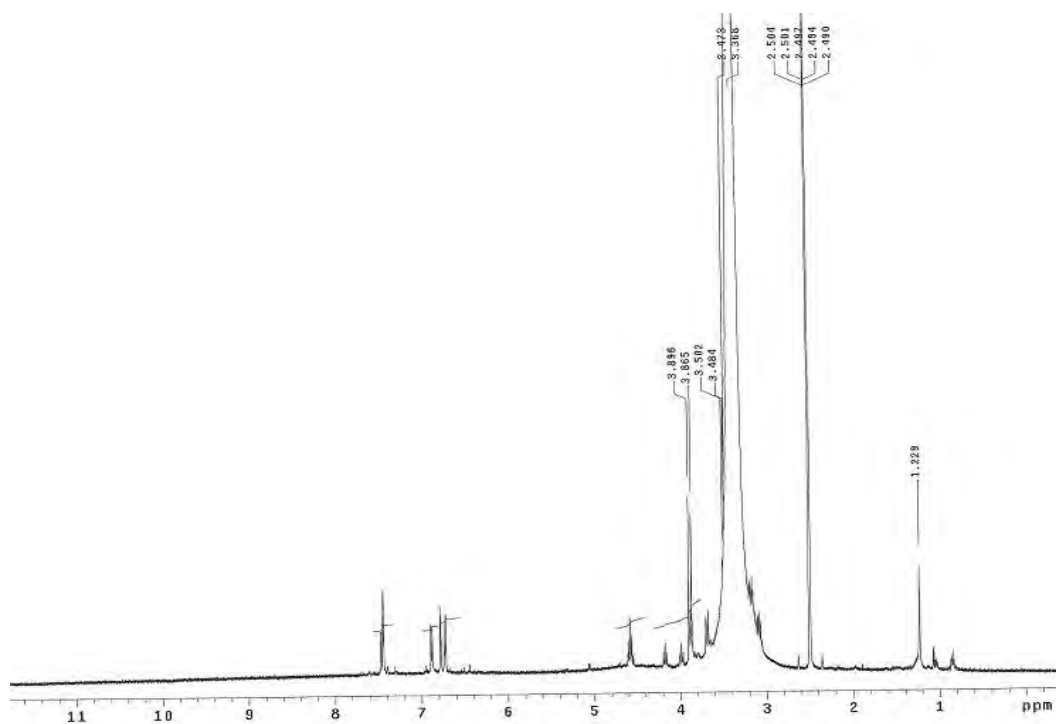
**Espectro 3.** gHMBC(11,4 T, DMSO-*d*<sub>6</sub>) de **Sn1**



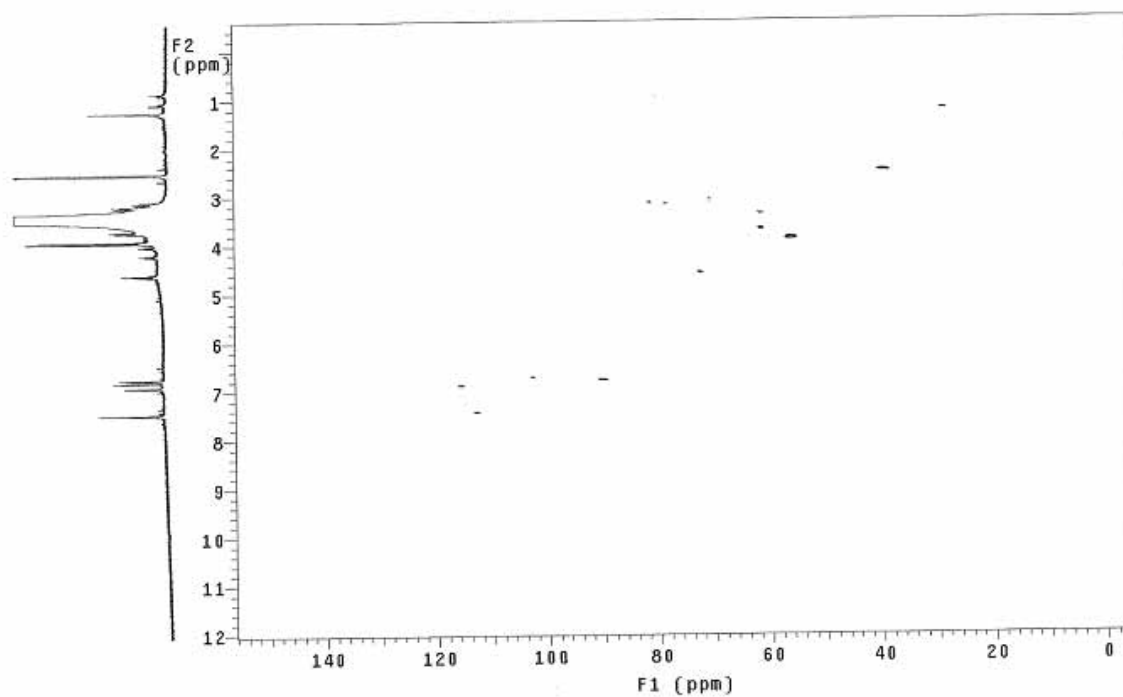
**Espectro 4.** gCOSY (11,4 T, DMSO-d<sub>6</sub>) de **Sn1**



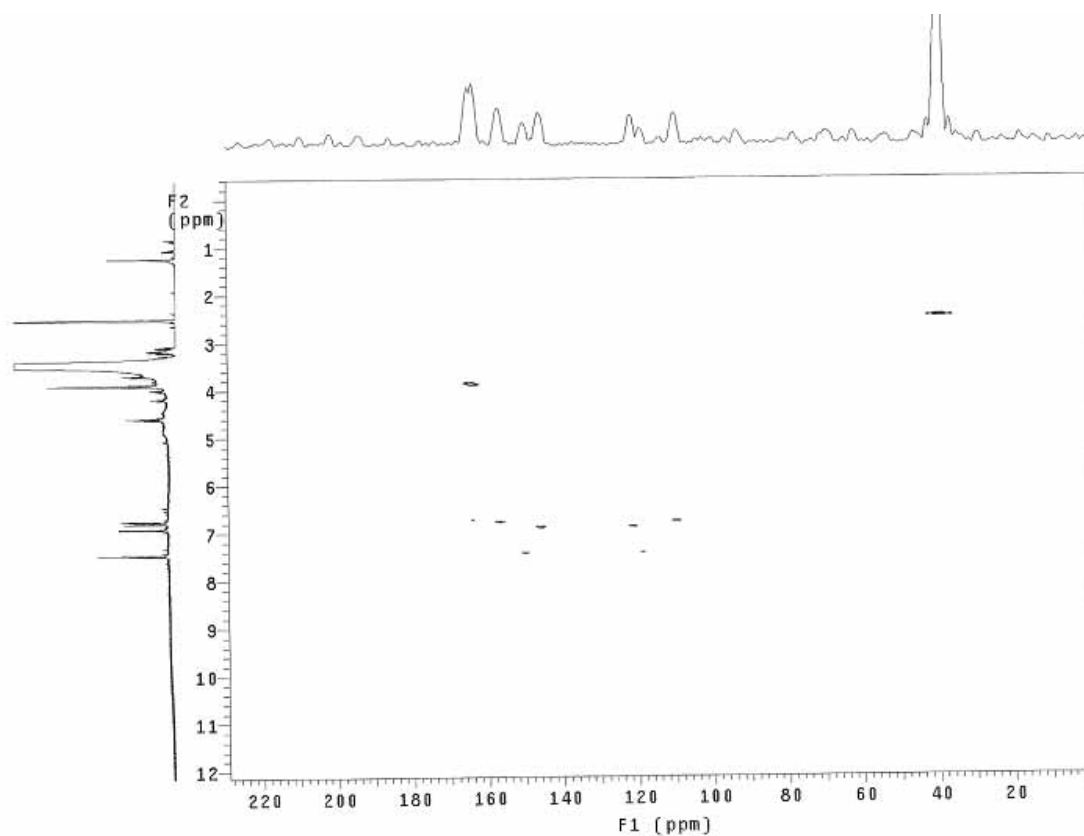
**Espectro 5.** TOCSY 1D (DMSO-d<sub>6</sub>, 11,4 T) de **Sn1**



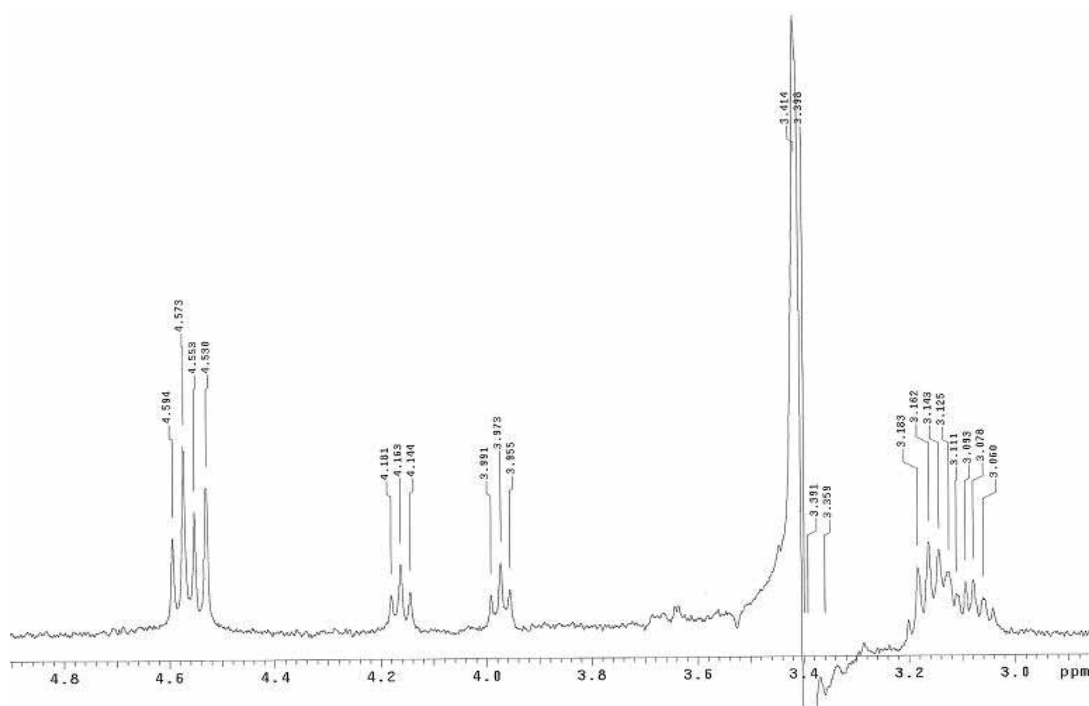
**Espectro 6.** RMN H1 (DMSO- $d_6$ , 11,4 T) de **Sn2**



**Espectro 7.** gHSQC (11,7 T, DMSO- $d_6$ ) de **Sn2**

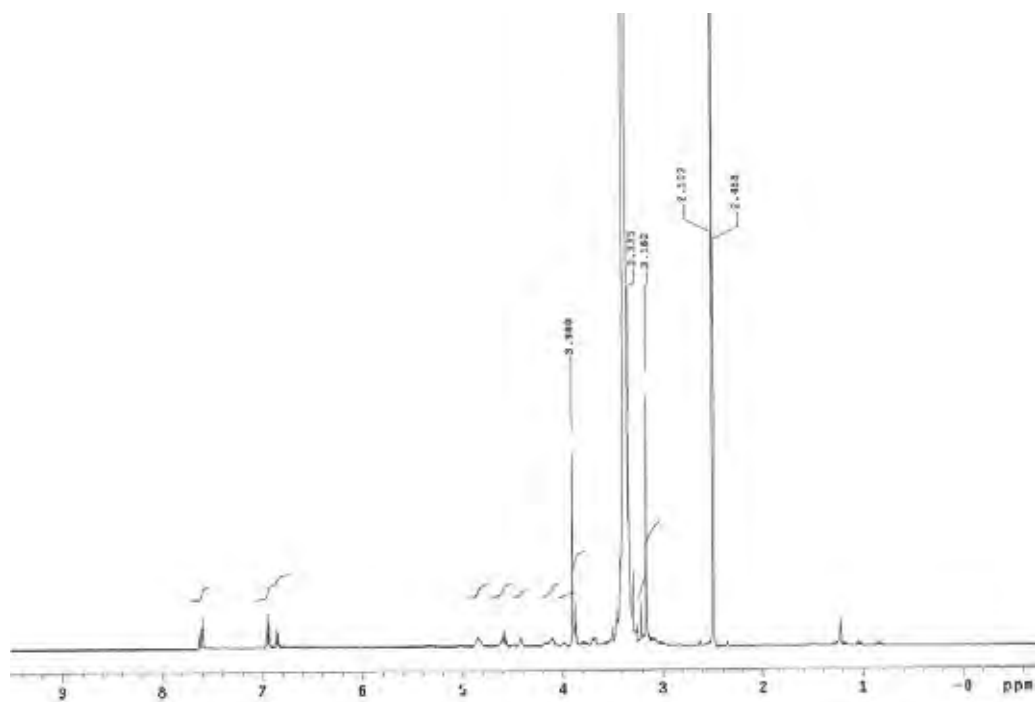


**Espectro 8.** gHMBC (11,7 T, DMSO-*d*<sub>6</sub>) de **Sn2**

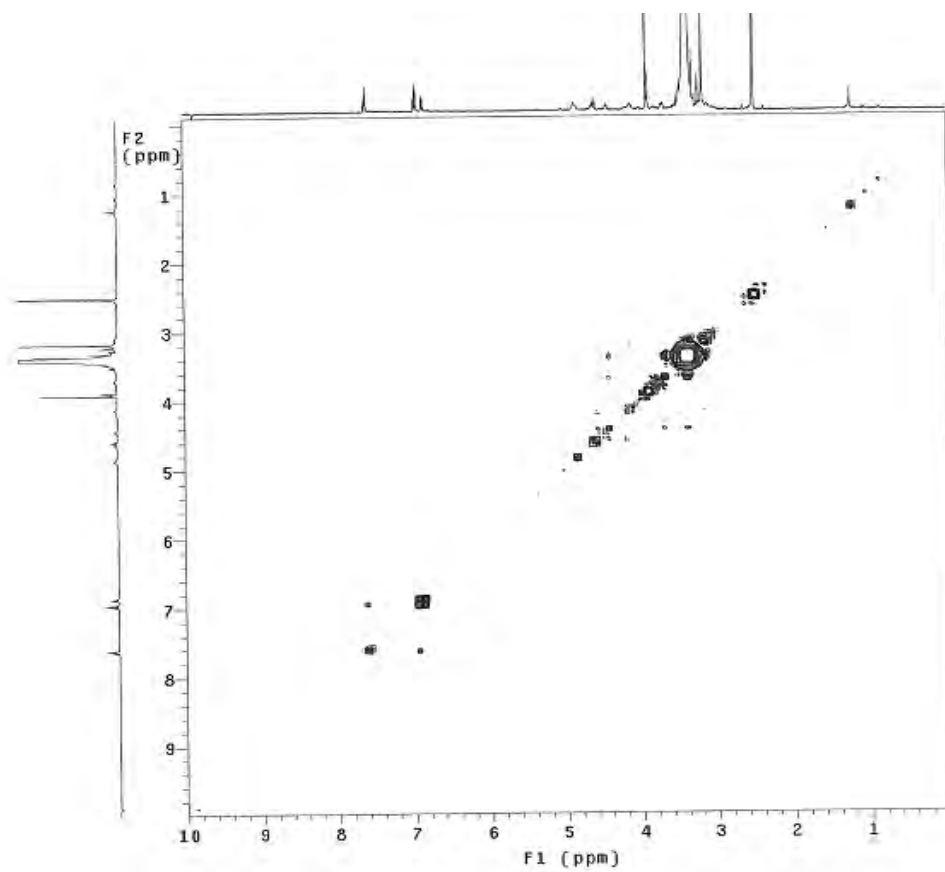


**Espectro 9.** TOCSY-1D (11,7 T, DMSO-*d*<sub>6</sub>) de **Sn2**

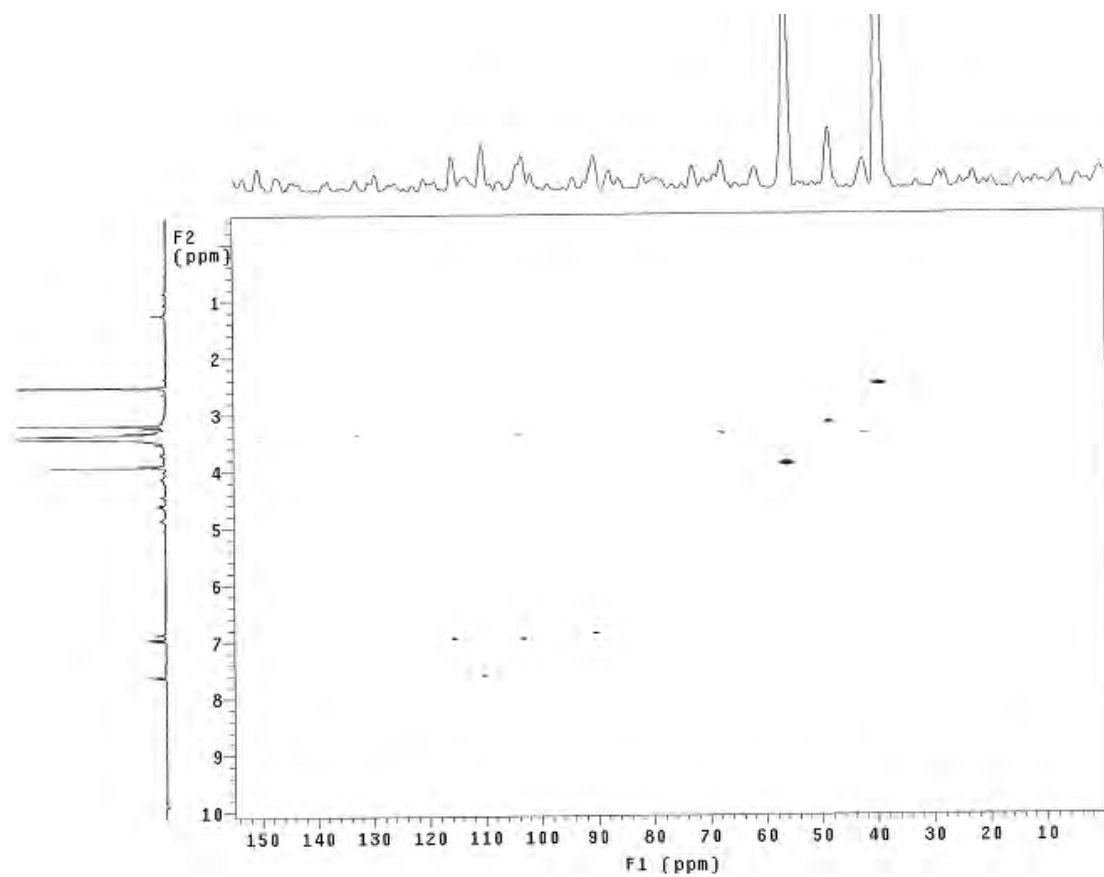




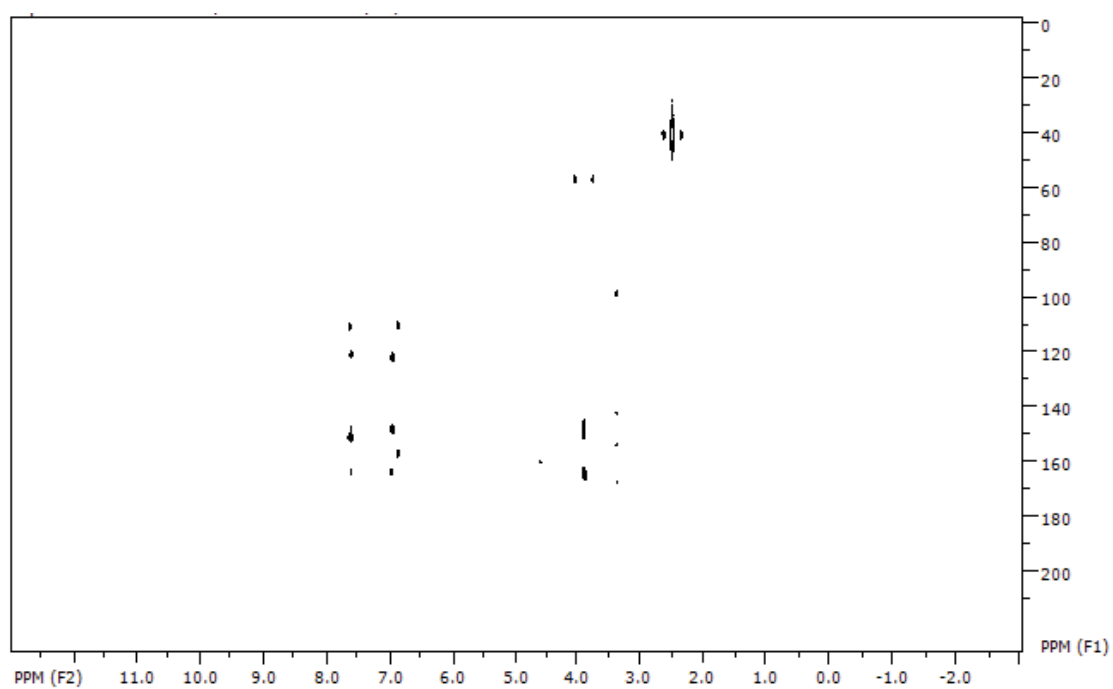
**Espectro 10.** RMN de  $^1\text{H}$  (11,7 T,  $\text{DMSO-}d_6$ ) de **Sn3**



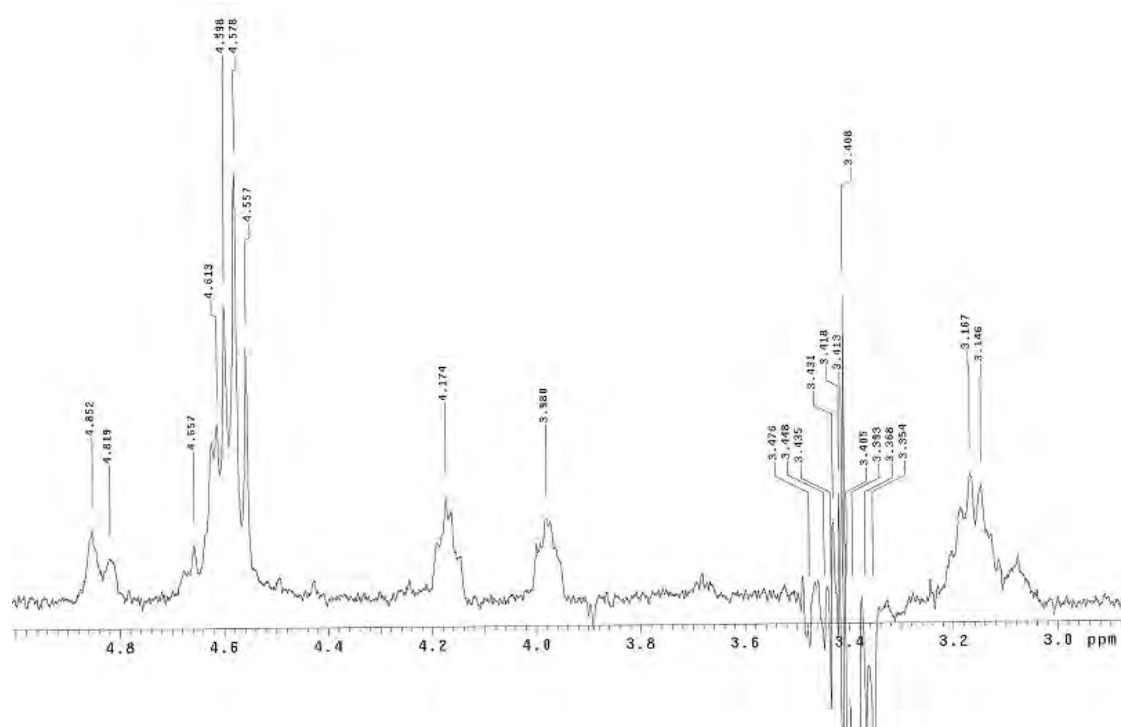
**Espectro 11.** gCOSY (11,7 T,  $\text{DMSO-}d_6$ ) de **Sn3**



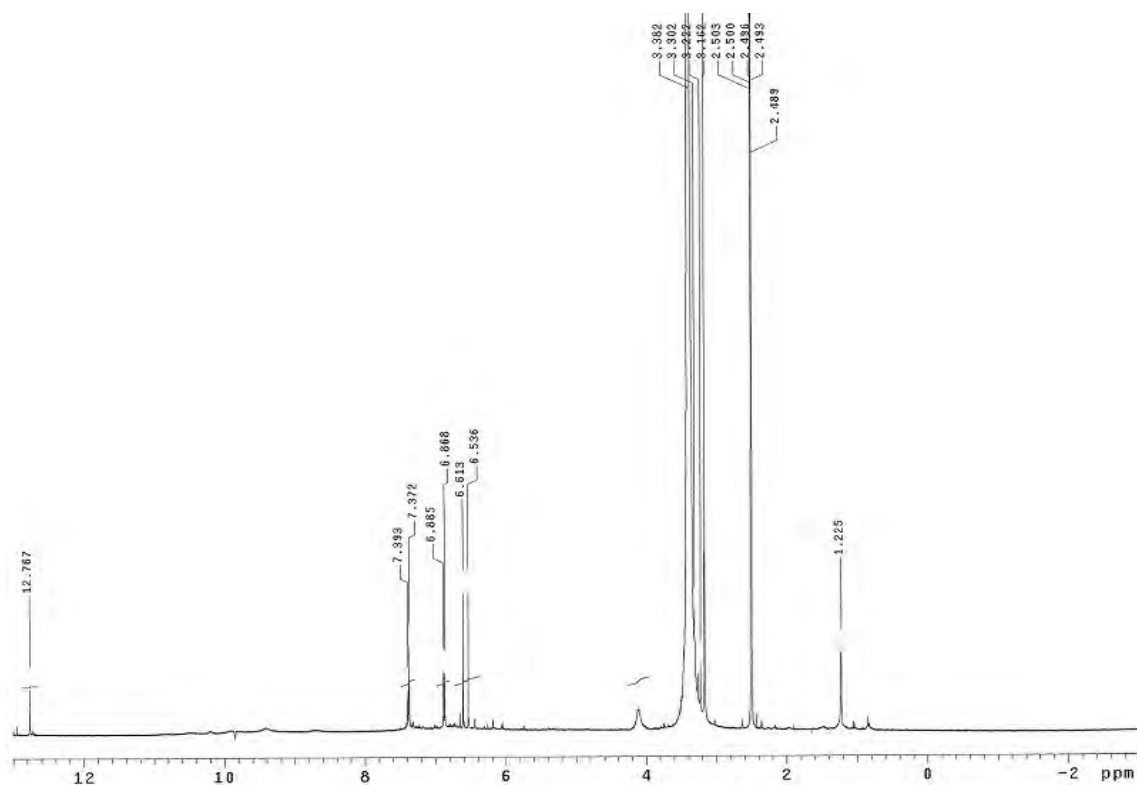
**Espectro 12.** gHSQC (11,7 T, DMSO-*d*<sub>6</sub>) de **Sn3**



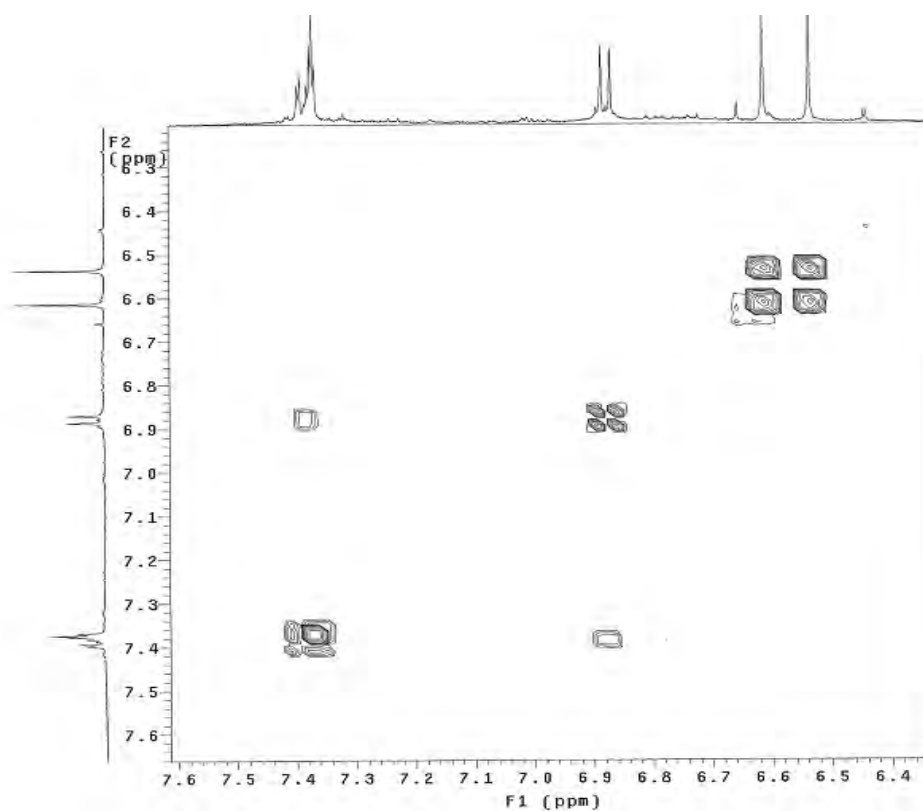
**Espectro 13.** gHSBC (11,7 T, DMSO-*d*<sub>6</sub>) de **Sn3**



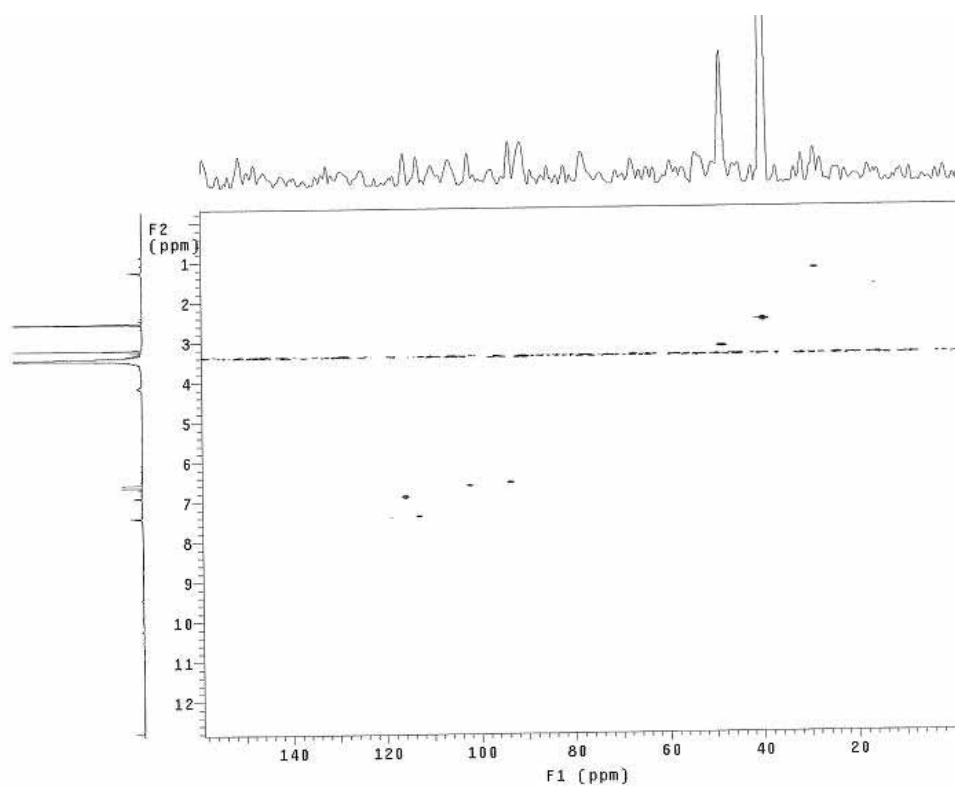
**Espectro 14 TOCSY 1D (DMSO- $d_6$ , 11,4 T) de Sn3**



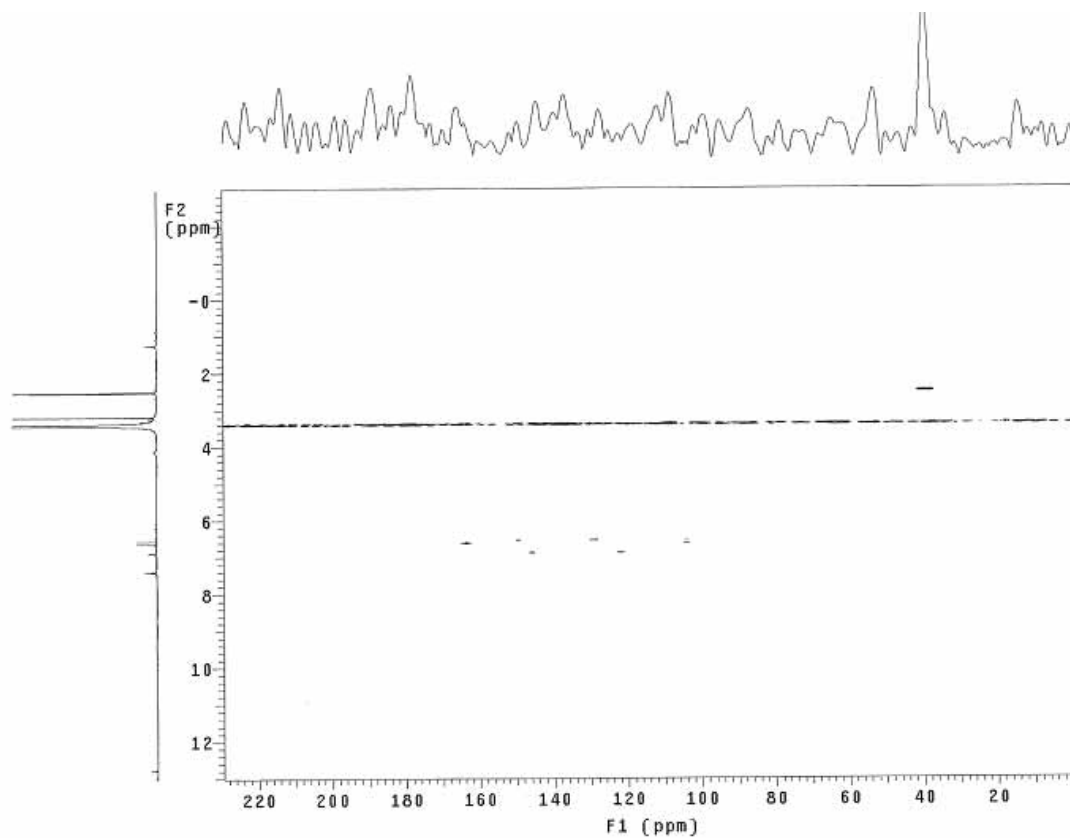
**Espectro 15. RMN de  $^1\text{H}$  (11,7 T, DMSO- $d_6$ ) de Sn4**



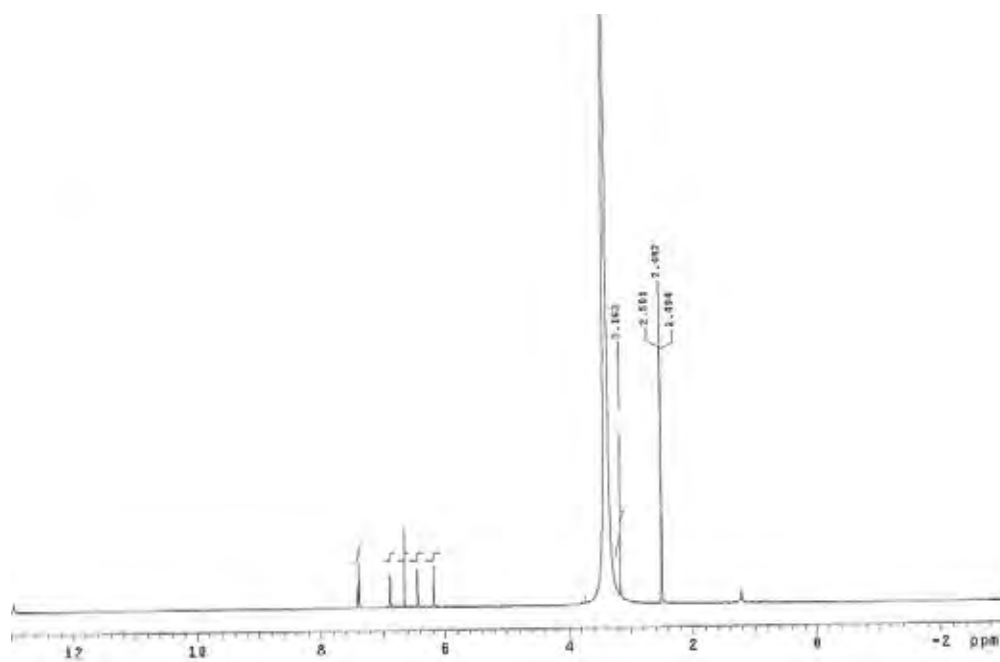
**Espectro 16.** gCOSY (11,7 T, DMSO-*d*<sub>6</sub>) de **Sn4**



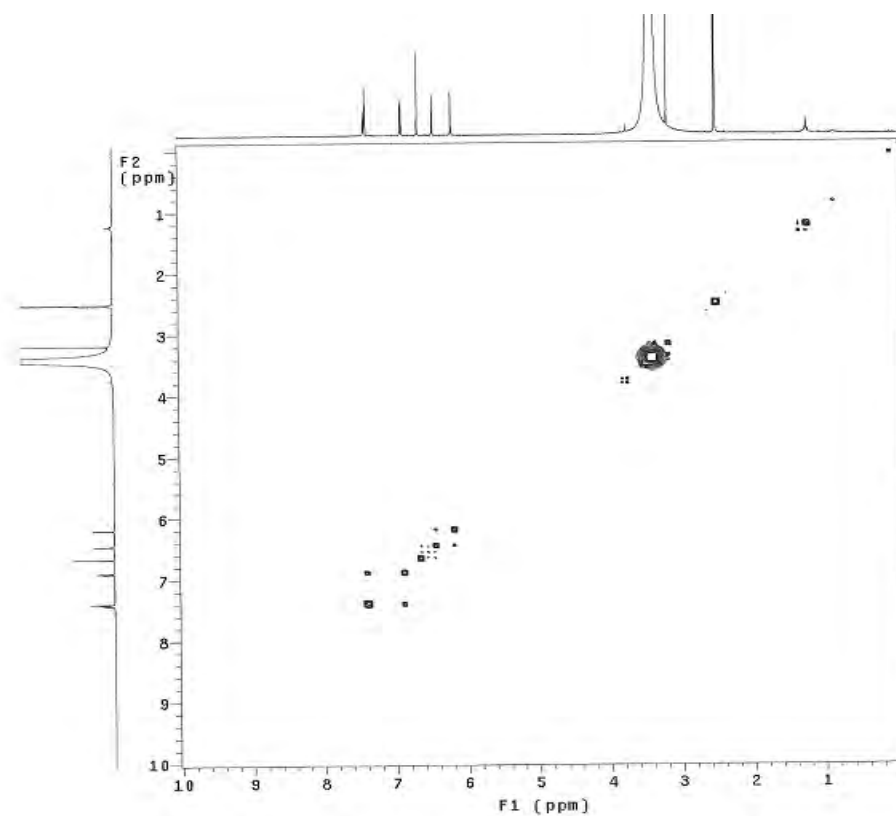
**Espectro 17.** gHMBC (11,7 T, DMSO-*d*<sub>6</sub>) de **Sn4**



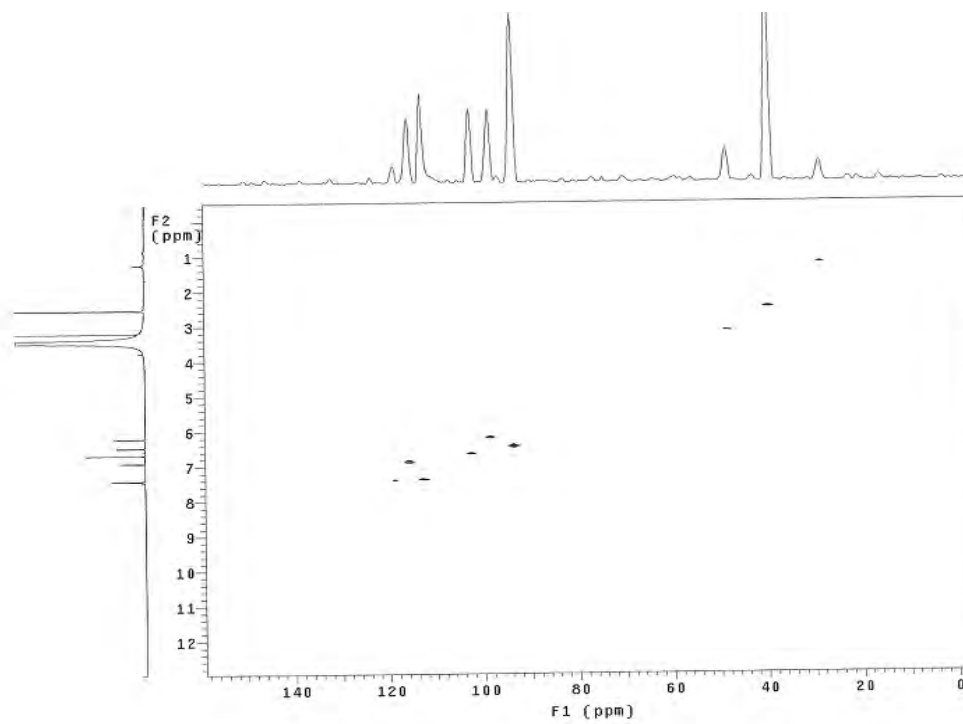
Espectro 18. gHMBC (11,7 T, DMSO- $d_6$ ) de Sn4



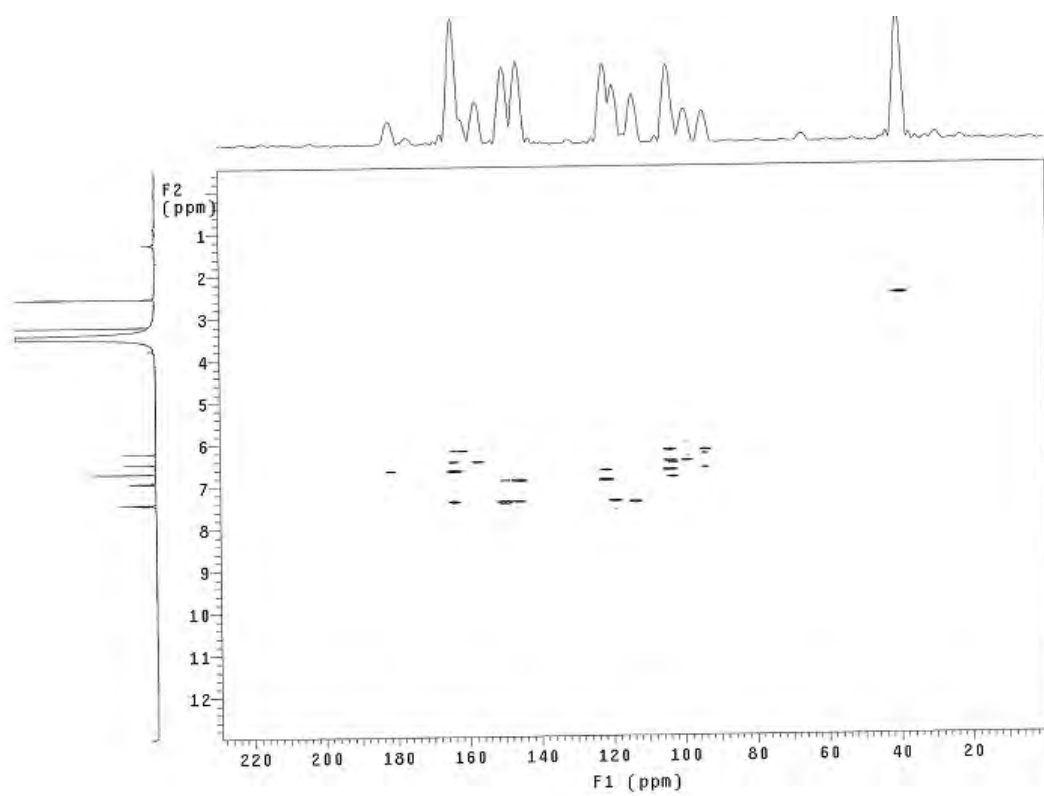
Espectro 19. RMN  $\text{H}^1$  (DMSO- $d_6$ , 11,4 T) de Sn5



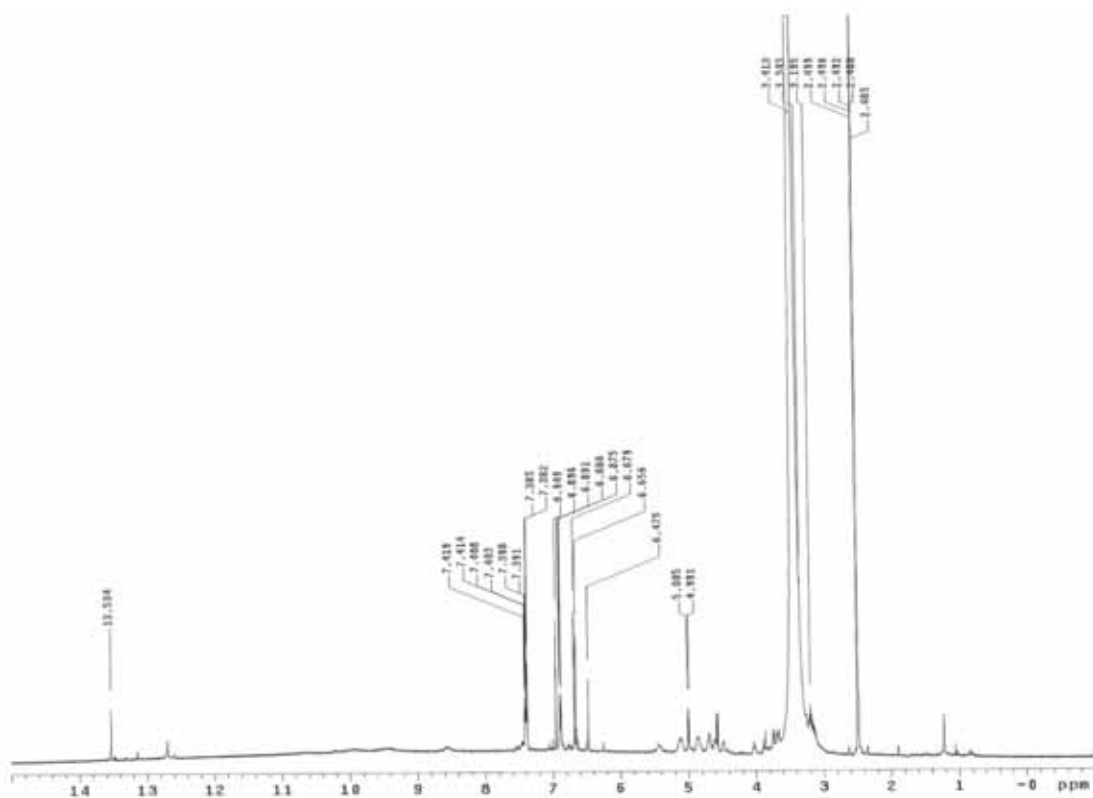
**Espectro 20.** *g*COSY (DMSO- $d_6$ , 11,4 T) de **Sn5**



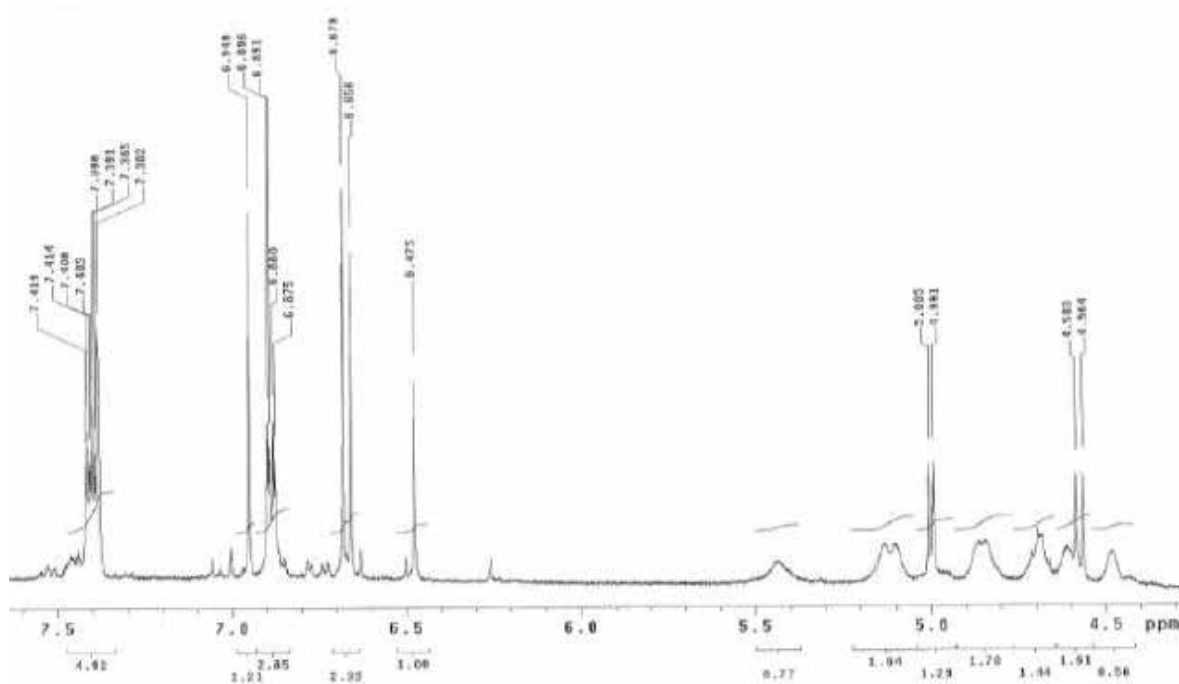
**Espectro 21.** *g*HMBC (DMSO- $d_6$ , 11,4 T) de **Sn5**



**Espectro 22.** gHMBC (DMSO-d<sub>6</sub>, 11,4 T) de **Sn5**



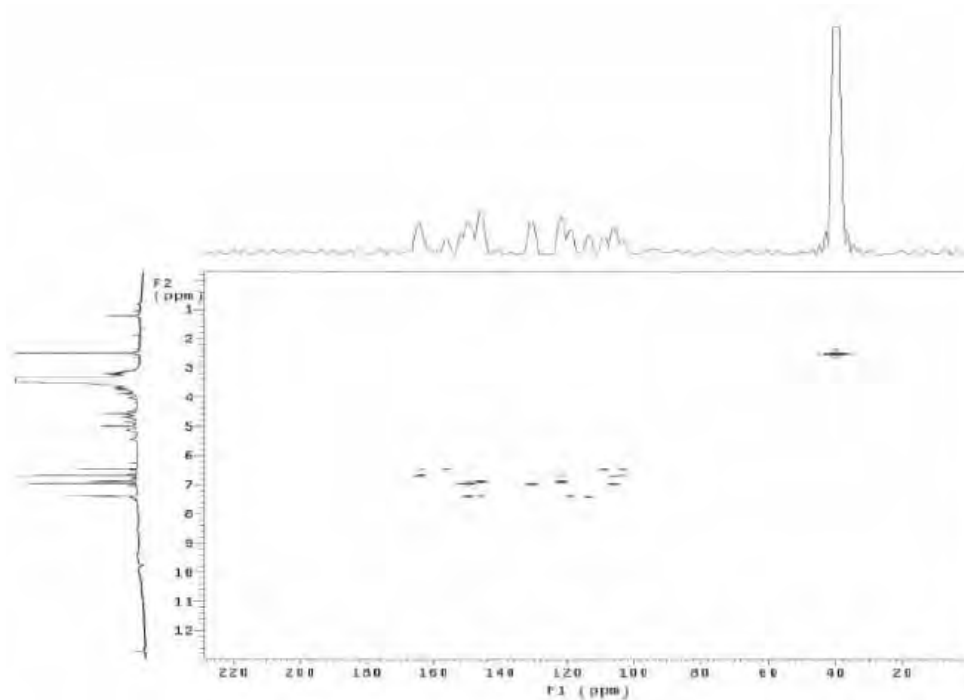
**Espectro 23.** de RMN H1 (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 11,4 T) de **Sn-6** e **Sn-7**



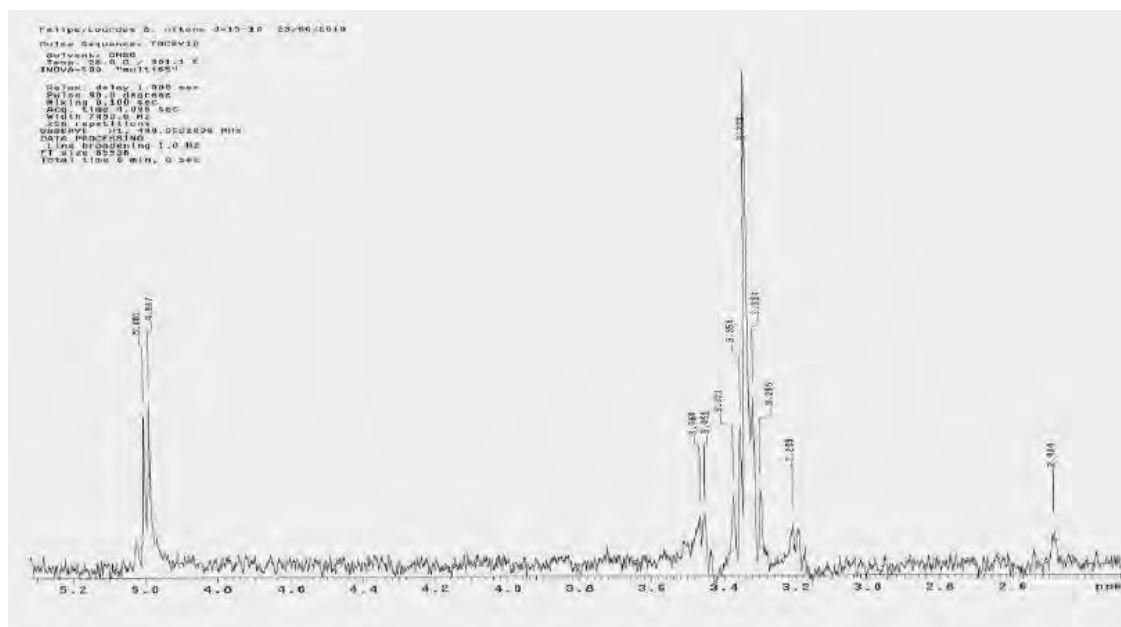
**Espectro 23a.** de RMN H1 (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 11,4 T) de **Sn-6** e **Sn-7** (expansão  $\delta$  4,5 a 7,5)



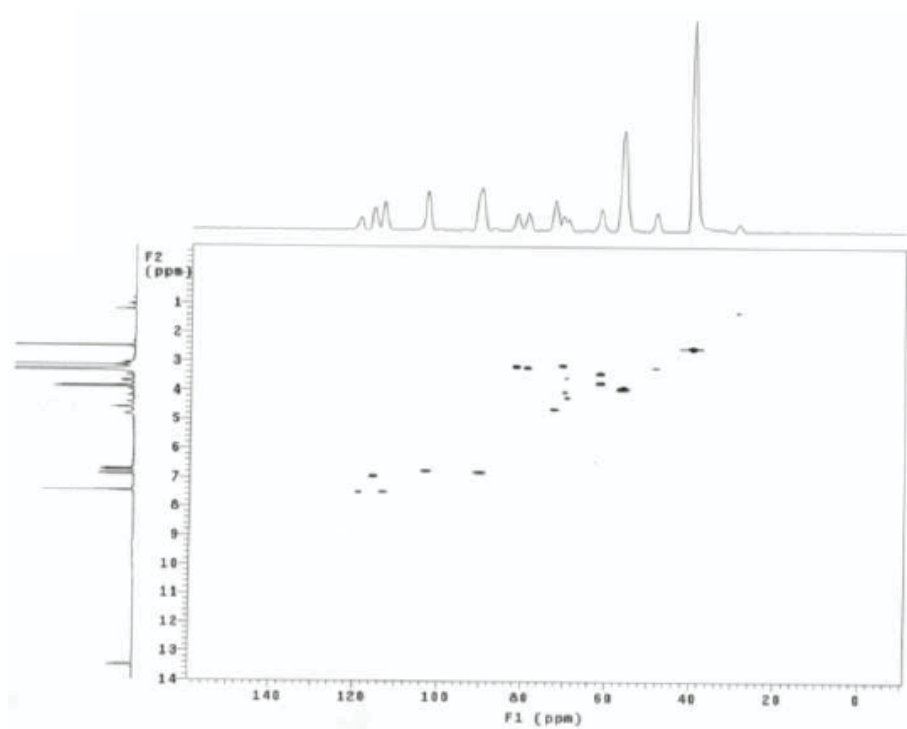




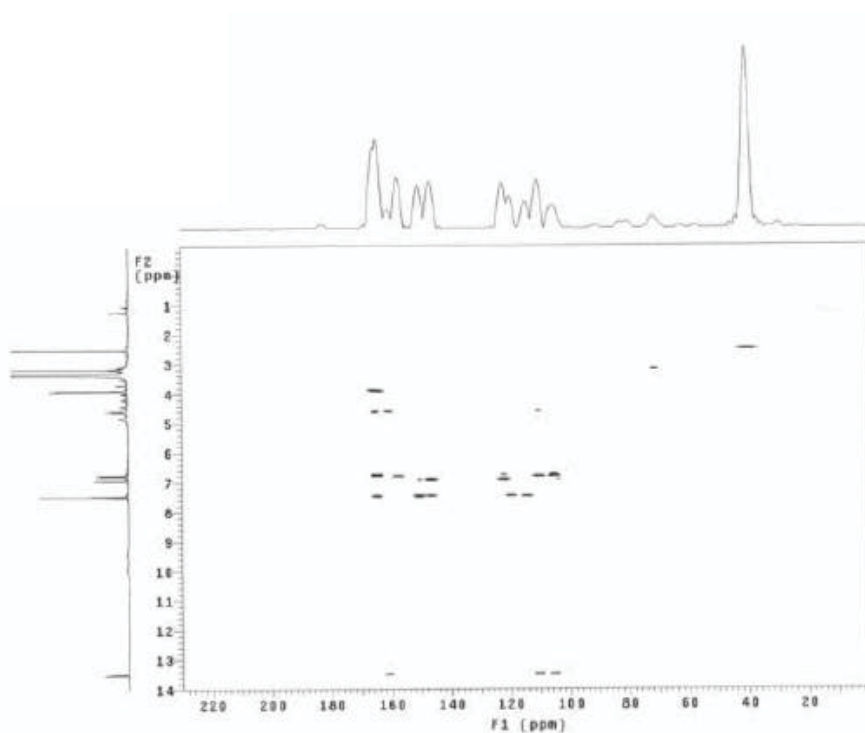
**Espectro 25.** gHMBC(11,4 T, DMSO- $d_6$ ) de Sn-6 e Sn-7



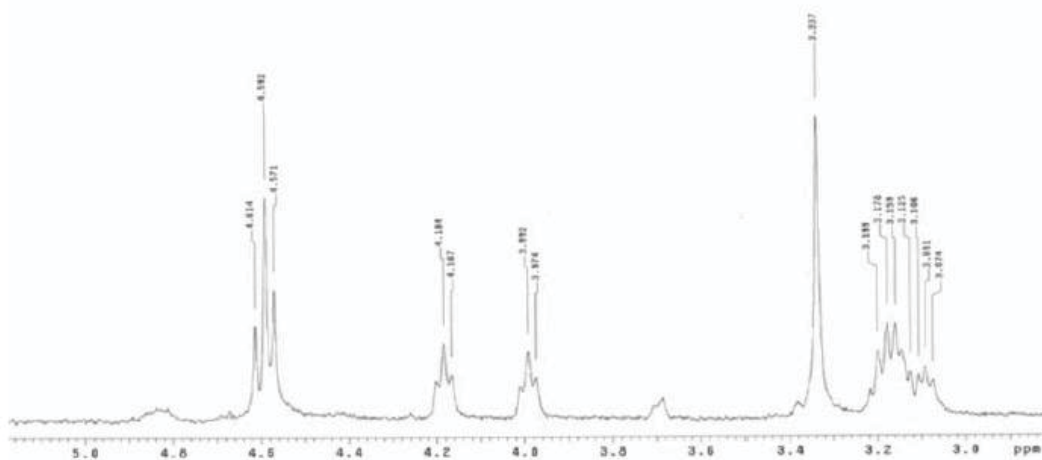




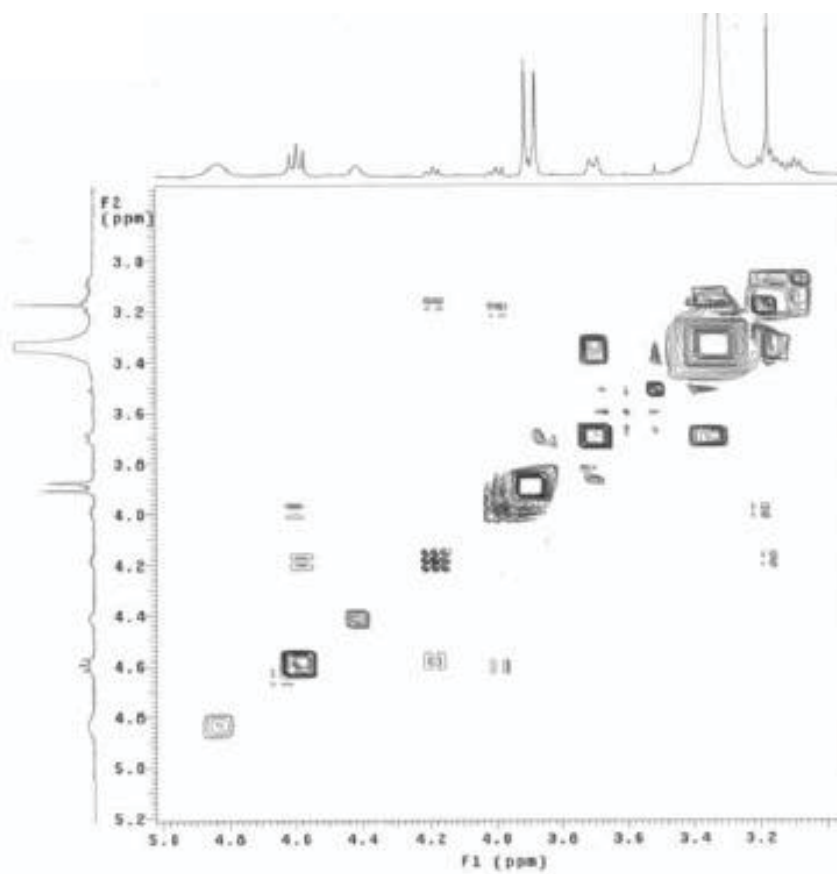
**Espectro 28.** gHSQC (11,4 T, DMSO-*d*<sub>6</sub>) de **Sn8**



**Espectro 29.** gHMBC (11,4 T, DMSO-*d*<sub>6</sub>) de **Sn8**



**Espectro 30.** TOCSY 1D (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 11,4 T) de **Sn8**



**Espectro 31.** gCOSY (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 11,4 T) de **Sn8**