

ANA CAROLINE ZANATTA SILVA

Padronização dos extratos polares das partes aéreas de
Actinocephalus divaricatus (Körn.) Sano (Eriocaulaceae)

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lourdes Campaner dos Santos

Araraquara

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

S586p Silva, Ana Caroline Zanatta
Padronização dos extratos polares das partes aéreas de
Actinocephalus divaricatus (Körn.) Sano (Eriocaulaceae) /
Ana Caroline Zanatta Silva. – Araraquara : [s.n.], 2016
141 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Lourdes Campaner dos Santos

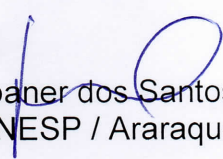
1. Metabólitos. 2. Saponinas. 3. Flavonóides.
4. Espectrometria de massa. 5. Citotoxicidade. I. Título.

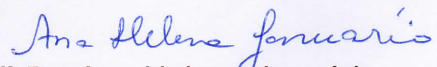
ANA CAROLINE ZANATTA SILVA

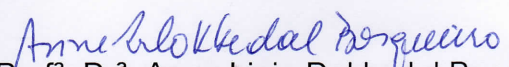
Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Química.

Araraquara, 05 de agosto de 2016.

BANCA EXAMINADORA


Profª Drª Lourdes Campaner dos Santos (Orientadora)
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP


Profª Drª Ana Helena Januário
Universidade de Franca / UNIFRAN / Franca - SP


Profª. Drª. Anne Ligia Dokkedal Bosqueiro
Faculdade de Ciências / UNESP / Bauru - SP

Dados curriculares

1. Dados pessoais

Nome: Ana Caroline Zanatta Silva

Filiação: Luiz Aurélio Silva e Maria Alice Zanatta Silva

Naturalidade: São José do Rio Preto/SP

E-mail: anaczanatta@gmail.com

2. Formação acadêmica

Graduação

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

Local: Araraquara/SP.

Curso: Química Licenciatura.

Período: 2009 – 2013.

Instituição: Universidade de Coimbra, UC, Faculdade de Ciências e Tecnologia.

Bolsista: CAPES (Programa de Licenciaturas Internacionais – PLI) Local: Coimbra, Portugal.

Curso: Química Licenciatura.

Período: (período 09/2010 – 07/2012).

Pós-graduação:

Mestrado

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

Titulo da dissertação: Padronização dos extratos polares das partes aéreas de *Actinocephalus divaricatus* (Körn.) Sano (Eriocaulaceae).

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lourdes Campaner dos Santos

Bolsista: CNPq (período 03/2014 – 05/2014)

Fapesp (período 06/2014 – 06/2016)

Local: Araraquara/SP

Período: 03/2014 – 08/2016

Estágio no exterior

Instituição: Università degli Studi di Salerno, UNISA, Departamento de Farmácia (DIFARMA), Fisciano.

Titulo do projeto: Metabolite fingerprinting of aerial parts of *Actinocephalus divaricatus* (Koern.) Sano (Eriocaulaceae) by LC-ESI-MS.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sonia Piacente.

Bolsista: FAPESP – Bolsa de Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE) (período 04/2015 – 07/2015)

Local: Salerno, Itália.

Período: 04/2015 – 07/2015

3. Artigos publicados em revistas científicas

1. COSTA, D.; RINALDO, D.; VARANDA, E.; SOUZA, J.; NASSER, A. L.; **SILVA, A. C. Z.**; BALDOQUI, D. C.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. Flavonoid Detection in Hydroethanolic Extract of *Pouteria torta* (Sapotaceae) Leaves by HPLC-DAD and the Determination of Its Mutagenic Activity. **Journal of Medicinal Food**, v. 17, n. 10, p. 1103-1112, 2014.

4. Apresentação de trabalho em congresso científico

- **Apresentação de trabalho (comunicação oral)**

1. **SILVA, A. C. Z.** Estudo fitoquímico do extrato metanólico das folhas e avaliação da atividade antioxidante das partes aéreas de *Actinocephalus divaricatus* (Eriocaulaceae). In: 54^o Congresso Brasileiro de Química, Natal - RN, 2014.

- **Apresentação de trabalho (pôster)**

1. **SILVA, A. C. Z.**; SANTOS, L. C. Metabolite profiling of the aerial parts of *Actinocephalus divaricatus* (Koern.) Sano (Eriocaulaceae) by LC-ESI-MS In: 5th Natural Products and the XXX Meeting on Micromolecular, Evolution, Brazilian Conference on Systematic and Ecology (RESEM), Atibaia - SP, 2015.

2. **SILVA, A. C. Z.**; da COSTA, D. L., M., G.; SANO, P. T.; SANTOS, L. C. Estudo fitoquímico do extrato metanólico das folhas e avaliação da atividade antioxidante das partes aéreas de *Actinocephalus divaricatus* (Eriocaulaceae). In: 54^o Congresso Brasileiro de Química, Natal - RN, 2014.

3. COSTA, D. L. G., RINALDO, D., NASSER, A. L. M., **SILVA, A. C. Z.**, BALDOQUI, D. C., VILEGAS, W., SANTOS, L. C. Quantification of flavonoids from the leaves of *Pouteria torta* (Sapotaceae) by HPLC-PAD In: 4th Natural Products and the XXX Meeting on Micromolecular, Evolution, Brazilian Conference on Systematic and Ecology (RESEM), Natal – RN, 2013.
4. **SILVA, A. C. Z.**, LIMA NETO, J. S., COSTA, D. L. G., SANO, P. T., SANTOS, L. C. Scale up from analytical HPLC to preparative MPLC for the separation of flavonoid from *Actinocephalus divaricatus* leaves In: 4th Natural Products and the XXX Meeting on Micromolecular, Evolution, Brazilian Conference on Systematic and Ecology (RESEM), Natal – RN, 2013.
5. **SILVA, A. C. Z.**, LIMA NETO, J. S., SANTOS, L. C. *Scale-up* de HPLC analítico para MPLC preparativo para a separação de flavonoide das folhas de *Actinocephalus divaricatus* (Eriocaulaceae) In: XXV CIC - Congresso de Iniciação Científica da UNESP e I Fórum Internacional de Iniciação Científica da UNESP, Barra Bonita – SP, 2013.
6. **SILVA, A. C. Z.**, RODRIGUES, C. M., VILEGAS, W. Isolamento e identificação de flavonoides de espécies do gênero *Byrsonima* (Malpighiaceae) por HPLC-PAD In: 57ª Jornada Farmacêutica da Unesp, Araraquara – SP, 2010.
8. **SILVA, A. C. Z.**, VILEGAS, W., RODRIGUES, C. M. Predição estrutural de flavonóides baseada em dados de HPLC-PAD In: 17º Encontro Regional da SBQ - Regional IPWS, Araraquara – SP, 2009.
7. **SILVA, A. C. Z.**, BORGES, M. S., NASSER, A. L. M., VILEGAS, W. Isolamento e identificação de flavonóides em *Pouteria torta* In: XXI Congresso de Iniciação Científica, São José do Rio Preto – SP, 2009.
9. **SILVA, A. C. Z.**, VILEGAS, W., NASSER, A. L. M., SILVA, M. A. Estudo fitoquímico de *Pouteria torta* utilizando cromatografia em contra corrente de alta velocidade In: XXXVIII Semana da Química, Araraquara – SP, 2008.

5. Participação em eventos científicos

1. **54º Congresso Brasileiro de Química**, Natal-RN, 03 a 07 de novembro de 2014 (Congresso).
2. **5th Natural Products and the XXX Meeting on Micromolecular, Evolution, Brazilian Conference on Systematic and Ecology (RESEM)**, Atibaia – SP, 26 a 29 de outubro de 2015 (Congresso).
3. **4th Natural Products and the XXX Meeting on Micromolecular, Evolution, Brazilian Conference on Systematic and Ecology (RESEM)**, 2013. (Congresso)
4. **XXV CIC - Congresso de Iniciação Científica da UNESP e I Fórum Internacional de Iniciação Científica da UNESP**, 2013. (Congresso)
5. **X Evento de Educação em Química - A Química como Ferramenta Interdisciplinar**, 2012. (Outra)

6. **3rd Portuguese Young Chemists Meeting**, 2012. (Encontro)
7. **III Congresso de Investigação Criminal - Novas Perspectivas e Desafios**, 2012. (Congresso)
8. **57ª Jornada Farmacêutica da Unesp**, 2010. (Outra)
9. **XV Encontro Nacional de Ensino de Química**, 2010. (Encontro)
10. **XXI Congresso de Iniciação Científica**, 2009. (Congresso)
11. **17º Encontro Regional da SBQ - Regional IPWS**, 2009. (Encontro)
12. **XXXIX Semana da Química**, 2009. (Outra)
13. **VII Evento de Educação em Química - Materiais Didáticos: Suas Aplicações**, 2009. (Outra)
14. **XXXVIII Semana da Química**, 2008. (Outra)
15. **VI Simpósio e VI Reunião de Avaliação do Programa Biota/Fapesp**, 2008. (Simpósio)

6. Organização de evento

1. **SILVA, A. C. Z.** VIII Evento de Educação em Química - Os Instrumentos de Avaliação no Ensino de Química, Araraquara – SP, 2010.
2. **SILVA, A. C. Z., SAVASSA, S. M., MACHADO, M. C., BORGES, M. S.** XXXIX Semana da Química, Araraquara – SP, 2009.

7. Bancas

Participação em banca de trabalhos de conclusão

Curso de aperfeiçoamento/especialização

1. **SILVA, A. C. Z., AMARAL, F. P., SEVERI, J. A.** Participação em banca de Emerson Gálio. **Análise de Tintas**, (Técnico em Química) E.M. Adelino Bordignon, Matão – SP, 2009.
2. **SILVA, A. C. Z., AMARAL, F. P., SEVERI, J. A.** Participação em banca de Genildo Sirineu Tomé. **Extração de metabólitos**, (Técnico em Química) E.M. Adelino Bordignon, Matão – SP, 2009.
3. **SILVA, A. C. Z., AMARAL, F. P., SEVERI, J. A.** Participação em banca de Matheus dos Santos Alves. **Tintas Emulsionadas**, (Técnico em Química) E.M. Adelino Bordignon, Matão – SP, 2009.

8. Orientações

1. Colabora na supervisão do desenvolvimento da monografia da aluna Thais Pezza, estudante do curso de Bacharelado em Química do Instituto de Química de Araraquara, no período de agosto/2015 e com finalização em dezembro, onde desenvolve o projeto intitulado “Estudo das frações polares de *Actinocephalus divaricatus* (Koern.) Sano (Eriocaulaceae) por HPLC-PDA” com bolsa PIBIC/CNPq Pró-reitoria.

“Ele bebeu, de olhos fechados. Era doce como uma festa. Essa água era muito mais que um alimento. Nasceria da caminhada sob as estrelas, do canto da roldana, do esforço do meu braço. Era boa para o coração, como um presente.”

(O pequeno príncipe,
Antoine de Saint-Exupéry)

Dedico este trabalho aos meus pais,
família e amigos.

Agradecimentos

À Deus.

Aos meus pais, por todo amor e paciência.

À minha orientadora e *mãezona* Profa. Dra. Lourdes Campaner dos Santos, pela oportunidade, confiança e ensinamentos durante todos esses anos.

À minha segunda família Araraquarense: Maiara, Leonice, Weslei, Carlos Sérgio, Daryne, Samara, Thais, Marcelo, Felipe Gregório, Felipe, Talita, Carla, Thayna. Agradeço pela amizade, pelas risadas e pelos ensinamentos.

Ao grupo da Universidade de Salerno e aos professores Profa. Dra. Sonia Piacente e Prof. Dr. Cosimo Pizza pela oportunidade de estágio e ensinamentos.

Aos amigos, professores e funcionários do Departamento de Química Orgânica.

Ao Dr. Nivaldo Borallo, pela amizade e pelos espectros de RMN.

Ao João, pela amizade, constante colaboração e pelas análises no massas.

Às funcionárias da biblioteca e da pós-graduação pela dedicação, competência e por serem sempre prestativas.

A todos os funcionários do Instituto de Química de Araraquara.

Às Profa. Dra. Tais Bauab e Profa. Dra. Iracilda Z. Carlos pela colaboração nos ensaios biológicos.

À agência de fomento FAPESP por todo suporte financeiro e pelas bolsas concedidas de mestrado e de estágio no exterior - BEPE.

RESUMO

Este trabalho descreve a caracterização química dos extratos metanólicos de capítulos, escapos e folhas de *Actinocephalus divaricatus*, descrito pela primeira vez na literatura. Primeiramente, as amostras foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada com detector de arranjo de fotodiodos (PAD) e por espectrometria de massas em tandem acoplado a um orbitrap com interface de ionização por electrospray, usando um sistema LC para a separação cromatográfica dos metabólitos (HPLC-ESI-HRMS). Esta estratégia permitiu explorar e diferenciar os metabólitos secundários presentes, sendo identificados 31 compostos incluindo 12 flavonoides, 5 naftopiranonas e 14 saponinas. Esta análise diferencial das três partes da planta contribuirá com a discussão do gênero *Actinocephalus*, uma vez que os estudos na literatura são relatados apenas para *Paepalanthus* sect. *Actinocephalus*. A separação dos metabólitos presentes nos extratos metanólicos dos escapos e folhas foi realizada empregando técnicas cromatográficas, como Sephadex, MPLC, HPLC-PAD e HPLC-IR, em que foi possível obter treze compostos: três ácidos fenólicos, sete flavonoides, duas naftopiranonas e uma saponina. As estruturas de todos os compostos foram determinadas por análise dos dados obtidos por RMN mono e bidimensionais. A padronização dos extratos metanólicos foi realizada por meio da quantificação dos flavonoides e naftopiranonas por HPLC-PAD. A metodologia foi validada avaliando-se os parâmetros de seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, exatidão e precisão. A seletividade foi confirmada por meio dos tempos de retenção e dos espectros de absorção no UV dos padrões de flavonoide e naftopiranona. Os métodos validados apresentaram alta seletividade e permitiram identificar derivados de quercetina e paepalantina glicosilados nos extratos, com limites de detecção ($2,56 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e quantificação ($7,76 - 7,77 \mu\text{g.mL}^{-1}$) satisfatórios para as condições analisadas, e valores de precisão (0,0028 a 3,90%) e exatidão (83 a 119%) dentro dos limites recomendados pela ANVISA. Os valores encontrados para derivados de quercetina glicosilados foram de 9,64, 39,96, 123,81 mg.g^{-1} de extrato para capítulos, escapos e folhas, respectivamente. Derivados de paepalantina glicosilados foram quantificados apenas nos capítulos e folhas e apresentaram 39,51 e 5,99 mg.g^{-1} de extrato de capítulos e folhas, respectivamente. O teor de fenóis encontrados foi de 126,41 246,58 mg.g^{-1} e 512,24 mg.g^{-1} de extrato para os capítulos, escapos e folhas, respectivamente. A atividade antirradicalar utilizando DPPH indicou IC_{50} superior às concentrações de extratos utilizadas ($250 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Paralelamente foi avaliada a atividade antimicrobiana utilizando cepas de bactéria (Gram-positiva e Gram-negativa) e levedura, sendo que os extratos metanólicos de capítulos, escapos e folhas apresentaram fraca sensibilidade frente aos microrganismos testados. Os valores encontrados para a citotoxicidade dos extratos utilizando o método do MTT foram baixos, sendo o melhor resultado encontrado para o extrato metanólico dos capítulos ($\text{IC}_{50} = 66,98 \mu\text{g.mL}^{-1}$) contra MCF7 (cancro da mama humana). Assim, o estudo químico realizado com a espécie *A. divaricatus* corrobora com dados da literatura que permitem afirmar que *Actinocephalus* é um novo gênero, diferenciado de *Paepalanthus* com a presença de saponinas nos escapos e folhas.

Palavras chave: Metabólitos, saponinas, flavonoides, espectrometria de massa, citotoxicidade.

ABSTRACT

This work describes the chemical characterization of the methanolic extracts of the capitulae, scapes and leaves from *Actinocephalus divaricatus*, described the first time in the literature. First, the samples were analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled with a photodiode array detector (PAD) and mass spectrometry tandem coupled to an Orbitrap with electrospray ionization interface using an LC system for separating chromatographic metabolites (HPLC-ESI-HRMS). This strategy has allowed us to explore a differentiate the secondary metabolites present, identified as 31 compounds comprising 12 flavonoids, 5 naphthopyranones and 14 saponins. This differential analysis of the three parts of the plant contributes to the discussion of the *Actinocephalus* genus, since the studies reported in the literature are only of the *Paepalanthus* sect. *Actinocephalus*. The separation of the metabolites present in the methanolic extracts of the scapes and leaves was performed using chromatographic techniques, such as Sephadex, MPLC, HPLC-PAD and HPLC-IR. It was possible to obtain thirteen compounds: three phenolic acids, seven flavonoids, two naphthopyranones and one saponin. The structures of all the compounds were determined by data analysis by mono and bidimensional NMR. The standardization of the methanolic extracts was performed by the quantification of flavonoids and naphthopyranones by HPLC-PAD. The methodology was validated by evaluating the parameters of selectivity, linearity, detection and quantitation limits, accuracy and precision. The selectivity was confirmed by the retention time and UV absorption spectra of flavonoid and standard of naphthopyranone. Validated methods showed high selectivity and identified quercetin glycosides and paepalantine derivatives in extracts, with detection limits ($2.56 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and quantification (7.76 to $7.77 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) satisfactory to the analyzed conditions, and precision values (0.0028 to 3.90%) and accuracy (83-119%) within the limits recommended by ANVISA. The values found for the quercetin glycosides derivatives were 9.64, 39.96, 123.81 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ of extract for the capitula scapes and leaves respectively. Paepalantine glycosylated derivatives were quantified only in the capitula and leaves and showed 39.51 and 5.99 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ of extract for the capitula and leaves respectively. The phenols contents found were 126.41, 246.58 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ and 512.24 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ extract for the capitula scapes and leaves respectively. The antiradical activity using DPPH showed IC_{50} higher than the concentrations of the used extracts ($250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). At the same time, the antimicrobial activity was evaluated by using bacteria and yeast strains, and the methanolic extracts of the capitula, scapes and leaves showed poor sensitivity against the tested microorganisms. The values for the cytotoxicity of the extracts using the MTT assay were low, with the best results found in the methanolic extract of the capitula ($\text{IC}_{50} = 66.98 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) against MCF7 (human breast cancer). Thus, the chemical study of the species *A. divaricatus* corroborates with the literature data has allowed us to state that *Actinocephalus* is a new genus, different from *Paepalanthus* with the presence of saponins in the scapes and leaves.

Key words: Metabolites, saponins, flavonoids, mass spectrometry, cytotoxicity.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<i>n</i> -BuOH	<i>n</i> -Butanol
CCD	Cromatografia em camada delgada
AcOEt	Acetato de etila
COSY	Correlation Spectroscopy
EMeOH	Extrato metanólico
ESI	<i>Electrospray ionization</i> (Ionização por <i>electrospray</i>)
FIA	<i>Flow Injection Analysis</i> (Análise por injeção em fluxo ou análise por inserção direta da amostra)
FIA-ESI-IT-MS	<i>Flow Injection Analysis - Electrospray Ionization - Ion Trap - Mass Spectrometry</i> (Espectrometria de Massas acoplada a um <i>ion-trap</i> com interface de Ionização por <i>Electrospray</i> e inserção direta da amostra)
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Coherence</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
HPLC-PAD	<i>High Performance Liquid Chromatography - Photodiode Array Detector</i> (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada com Detector de Arranjo de Fotodiodos)
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
<i>m/z</i>	Relação massa carga
MeOH	Metanol
MPLC	<i>Medium Pressure Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Media Pressão)
MS	<i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometria de Massas)
NP/PEG	<i>Natural product/Polyethylenoglicol reagent</i>
PAD	<i>Photodiode Array Detector</i> (Detector com Arranjo de Fotodiodos)
Ppm	Partes por milhão
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RP18	<i>Reversed Phase octadecylsilan</i> (Fase reversa octadecilsilano)
SPE	<i>Solid Fase Extraction</i> (Extração em fase sólida)
TFA	Ácido Trifluoracético
TOCSY	<i>Total Correlation Spectroscopy</i>
UV	Ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa do Estado de Minas Gerais em que se destaca a porção da Cadeia do Espinhaço compreendida entre Belo Horizonte e o Estado da Bahia.	20
Figura 2 - Padrão de arquitetura no gênero <i>Actinocephalus</i>	21
Figura 3 - Cladograma simplificado da nova circunscrição do gênero <i>Actinocephalus</i>	22
Figura 4 - Exemplos de alguns metabólitos isolados em espécies do gênero <i>Paepalanthus</i> reclassificadas ao gênero <i>Actinocephalus</i>	25
Figura 5 - Fluxograma da partição dos extratos metanólicos dos capítulos, escapos e folhas de <i>A. divaricatus</i>	33
Figura 6 - Cromatogramas do extrato bruto (metanólico) das partes aéreas de <i>A. divaricatus</i> por HPLC-PAD.	48
Figura 7 - Sistema benzoil e cinamoil.	49
Figura 8 - Diferenciação nos espectros de UV de uma flavona e um flavonol.	50
Figura 9 - Perfil por HPLC-ESI-MS do extrato metanólico das partes aéreas de <i>A. divaricatus</i>	52
Figura 10 - Espectros representativos de ESI-MS/MS para distinguir as três classes de metabólitos por meio de identificação da aglicona.	53
Figura 11 - Padrão de fragmentação para moléculas O-glicosiladas com o rearranjo de hidrogênios.	59
Figura 12 - Padrão de fragmentação de ligações interglicosídicas observado no íon m/z 639.	60
Figura 13 - Espectros ESI-MS/MS para os íons precursores m/z 609 e m/z 639.	60
Figura 14 - Espectros ESI-MS/MS de flavonoides metoxilados.	61
Figura 15 - Padrão de fragmentação de flavonoides metoxilados desprotonados.	62
Figura 16 - Espectros ESI-MS/MS de flavonoides acil-glicosilados.	63
Figura 17 - Proposta de fragmentação do composto 7.	64
Figura 18 - Espectros ESI-MS/MS de naftopiranonas.	65
Figura 19 - Exemplo de mecanismo retro-Diels-Alder para o composto 23.	67
Figura 20 - Espectro ESI-MS/MS do íon precursor m/z 777 (composto 23).	67
Figura 21 - Espectros ESI-MS/MS para saponinas com aglicona m/z 439.	68
Figura 22 - Espectros ESI-MS/MS para saponinas com aglicona m/z 455.	69
Figura 23 - Espectros ESI-MS/MS para saponinas com aglicona m/z 471.	69
Figura 24 - Fluxograma de isolamento dos compostos nos extratos metanólicos dos escapos e folhas.	70
Figura 25 - Espectro RMN ^1H de Ad1.	72
Figura 26 - Estrutura do flavonoide Ad10.	72
Figura 27 - Espectro RMN ^1H de Ad3.	74
Figura 28 - TOCSY-1D com irradiação em δ_{H} 5,55 de Ad3.	75
Figura 29 - TOCSY-1D com irradiação em δ_{H} 5,49 de Ad3.	75
Figura 30 - Mapa de contorno HSQC de Ad3.	76
Figura 31 - Mapa de contorno HMBC de Ad3.	77
Figura 32 - Estrutura do flavonoide Ad3.	78
Figura 33 - Espectro RMN ^1H de Ad4.	79
Figura 34 - Mapa de contorno HSQC de Ad4.	80
Figura 35 - Mapa de contorno HMBC de Ad4.	81
Figura 36 - Estrutura do flavonoide Ad4.	82
Figura 37 - Espectro RMN ^1H de Ad5.	83

Figura 38 - Estrutura do flavonoide Ad5.....	83
Figura 39 - Espectro de ^1H de Ad7.....	85
Figura 40 - Estrutura do flavonoide acetil-glicosilado Ad7.....	85
Figura 41 - Espectro RMN ^1H de Ad8.....	87
Figura 42 - Estrutura do flavonoide acetil-glicosilado Ad8.....	87
Figura 43 - Espectro de RMN ^1H do flavonoide Ad9.	92
Figura 44 - Mapa de contorno HSQC de Ad9.....	93
Figura 45 - Mapa de contorno HMBC de Ad9.	93
Figura 46 - Correlações do experimento HMBC referente ao anel ciclobutanico da parte truxilato (A) e da parte truxinato (B).	95
Figura 47 - Proposta de estrutura para Ad9.	96
Figura 48 - Espectro RMN ^1H da mistura de naftopiranas Ad2 (A e B).	98
Figura 49 - Espectro RMN ^1H de Ad2, expansão na região δ_{H} 3,10 a δ_{H} 5,30.	98
Figura 50 - TOCSY-1D com irradiação em δ_{H} 5,17 de Ad2.....	99
Figura 51 - TOCSY-1D com irradiação em δ_{H} 4,75 de Ad2.....	99
Figura 52 - Estruturas das naftopiranas em mistura Ad2.	101
Figura 53 - Estrutura da naftopirana Ad14.	101
Figura 54 - Identificação de Ad14 no extrato metanólico das folhas de <i>A. divaricatus</i> por co-injeção de padrão.....	102
Figura 55 - Identificação de Ad14 no extrato metanólico dos capítulos de <i>A. divaricatus</i> por co-injeção de padrão.....	102
Figura 56 - Espectro RMN ^1H da saponina Ad6.	104
Figura 57 - Espectro RMN ^1H de Ad6, expansão na região δ_{H} 1,15 a δ_{H} 3,80.	104
Figura 58 - Espectro de RMN ^{13}C DEPT 135 de Ad6.....	105
Figura 59 - Mapa de contorno COSY da saponina Ad6.	106
Figura 60 - Mapa de contorno HSQC de Ad6.....	106
Figura 61 - Mapa de contorno HMBC de Ad6.	107
Figura 62 - Correlações COSY e HMBC na aglicona da saponina Ad6.	107
Figura 63 - Estrutura da saponina Ad6.....	109
Figura 64 - Espectro RMN ^1H de Ad10.....	110
Figura 65 - Espectro de absorção no UV do ácido fenólico Ad10.	110
Figura 66 - Estrutura do ácido fenólico Ad10.	111
Figura 67 - Espectro RMN ^1H de Ad11.....	112
Figura 68 - Estrutura do ácido fenólico Ad11.	112
Figura 69 - Espectro RMN ^1H de Ad13.....	113
Figura 70 - Estrutura do ácido fenólico Ad12.	113
Figura 71 - Curvas analíticas obtidas pelo método de calibração externa das soluções padrões.	115
Figura 72 - Espectros de UV dos compostos presentes nos extratos das partes aéreas de <i>A. divaricatus</i> e o espectro correspondente do padrão.	117
Figura 73 - Gráfico comparativo entre os valores de IC_{50} para as linhagens tumorais.	122
Figura 74 - Reação do padrão de ácido gálico com o molibdênio, componente do reagente de Folin-Ciocalteu.	124
Figura 75 - Curva de calibração do ácido gálico obtida para a determinação da quantidade de fenóis totais.....	125
Figura 76 - Gráfico comparativo entre os teores de fenóis totais nos extratos metanólicos das partes aéreas de <i>A. divaricatus</i>	125
Figura 77 - Reação radicalar do DPPH com a quercetina.....	126

Figura 78 - Porcentagem de inibição de DPPH do padrão de quercetina e dos extratos metanólicos de capítulos, escapos e folhas de *A. divaricatus*. 127

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estudo químico de espécies do gênero <i>Actinocephalus</i>	24
Tabela 2 - Os parâmetros mais importantes utilizados no HPLC Calculator para a transposição do método.	34
Tabela 3 - Quantidade obtida dos extratos preparados da espécie <i>A. divaricatus</i>	47
Tabela 4 - Bandas de absorção na região do UV para os metabólitos secundários identificados partes aéreas de <i>A. divaricatus</i>	49
Tabela 5 - Quantidade obtida das frações a partir do extrato bruto e seus rendimentos.	51
Tabela 6 - Estruturas propostas de flavonoides e naftopiranonas das partes aéreas de <i>A. divaricatus</i> identificadas por HPLC-ESI-HRMS/MS.	54
Tabela 7 - Estruturas propostas de saponinas das partes aéreas de <i>A. divaricatus</i> identificadas por HPLC-ESI-HRMS/MS.	55
Tabela 8 - Proposta de identificação dos compostos fenólicos e saponinas das partes aéreas de <i>A. divaricatus</i> por LC-MS e MS/MS.	56
Tabela 9 - Deslocamentos de hidrogênio e carbono dos flavonoides (Ad1-Ad5) isolados em folhas e escapos de <i>A. divaricatus</i>	88
Tabela 10 - Deslocamentos de hidrogênio e carbono dos flavonoides Ad7 e Ad18, isolados das folhas de <i>A. divaricatus</i>	89
Tabela 11 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de Ad9.	94
Tabela 12 - Deslocamentos químicos de RMN de ^1H de Ad2.	100
Tabela 13 - Deslocamentos de RMN de ^{13}C e ^1H para a saponina Ad6.	108
Tabela 14 - Deslocamentos de hidrogênio dos ácidos fenólicos (Ad10-Ad12) isolados da fração acetato de etila das folhas de <i>A. divaricatus</i>	114
Tabela 15 - Parâmetros das curvas analíticas dos padrões dos derivados da quercetina e paepalantina.	116
Tabela 16 - Precisão intra-dia e inter-dia para o método de determinação de cada padrão.	118
Tabela 17 - Exatidão do método para os extratos metanólicos das partes aéreas de <i>A. divaricatus</i>	119
Tabela 18 - Teores dos derivados de quercetina glicosilados nos extratos metanólicos de capítulos, escapos e folhas de <i>A. divaricatus</i>	120
Tabela 19 - Teores dos derivados de paepalantina glicosilados nos extratos metanólicos de capítulos e folhas de <i>A. divaricatus</i>	120
Tabela 20 - As concentrações inibitórias mínimas (CIM) para os extratos metanólicos de capítulos, escapos e folhas de <i>A. divaricatus</i>	121
Tabela 21 - Valores de citotoxicidade para os extratos metanólicos dos capítulos, escapos e folhas de <i>A. divaricatus</i>	123
Tabela 22 - Teores de fenóis totais nos extratos metanólicos das partes aéreas de <i>A. divaricatus</i>	126

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Padronização dos extratos vegetais.....	19
1.2 A família Eriocaulaceae e o gênero <i>Actinocephalus</i>	20
1.2.1 Estudo químico do gênero <i>Actinocephalus</i>	23
2 OBJETIVOS	27
3 PARTE EXPERIMENTAL	28
3.1 Materiais, Reagentes e Soluções.....	28
3.2 Procedimentos gerais instrumentais	29
3.3 Metodologia.....	31
3.3.1 Etapa Botânica	31
3.3.2 Preparação dos extratos	31
3.3.3 Etapa cromatográfica	33
3.3.4 Padronização dos extratos vegetais.....	38
3.3.5 Atividades biológicas	40
3.3.6 Avaliação do potencial antiradicalar, fenóis totais e flavonoides totais dos extratos metanólicos de capítulos, escapos e folhas	45
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	47
4.1 Análises por LC-ESI-MS.....	51
4.2 Identificação dos compostos isolados dos extratos metanólicos das folhas e escapos.....	70
4.2.1 Flavonoides	71
4.2.2 Naftopirranonas	96
4.2.3 Saponina	103
4.2.4 Ácidos fenólicos	109
4.3 Padronização dos extratos por HPLC-PAD e validação do método	115
4.3.1 Linearidade e sensibilidade	115
4.3.2 Seletividade.....	116
4.3.3 Precisão	117
4.3.4 Exatidão	118
4.3.5 Análise dos extratos de capítulos, escapos e folhas de <i>A. divaricatus</i>	119
4.4 Atividades biológicas.....	121
4.4.1 Avaliação da atividade antimicrobiana	121
4.4.2 Determinação da citotoxicidade	122
4.5 Determinação do teor de fenóis totais.....	123
4.7 Avaliação do potencial antiradicalar	126
5 CONCLUSÕES	128
Referências	131

1 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais de plantas têm desempenhado um papel muito importante ao longo da história de vida dos seres humanos. A busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas e folhas talvez tenham sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais (KATZ; BALTZ, 2016). No início de 1900, antes da era “sintética”, 80% dos medicamentos foram obtidos de raízes, cascas e folhas (McCHESNEY et al., 2007).

Sistemas à base de plantas continuam a desempenhar um papel essencial na área da saúde, e seu uso por diferentes culturas tem sido amplamente documentado. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou em 1985 que cerca de 65% da população do mundo tem contado predominantemente com medicamentos tradicionais derivados de plantas para os seus cuidados de saúde primários, enquanto produtos vegetais também têm um papel importante, embora mais indireta na saúde do restante da população que reside principalmente nos países desenvolvidos. Uma pesquisa de compostos puros derivados de plantas utilizadas como medicamentos em países de hospedagem tradicional pela OMS e Centros de Medicina indicou que, de 122 compostos identificados, 80% foram utilizados para os mesmos fins ou relacionados etnomédicos e foram derivados de pelo menos 94 espécies de plantas (CRAGG; NEWMAN, 2013).

A quase infinita diversidade de estruturas moleculares que podem ser determinadas é resultado de que a natureza é pródiga em fornecer moléculas de complexidade estruturais dificilmente imaginadas ou elaboradas através da síntese (HARVEY, 2000). Por isso, o estudo de plantas medicinais é tão relevante, visto que é uma fonte rica de compostos biologicamente ativos e um exemplo de diversidade molecular, com reconhecido potencial para descoberta e desenvolvimento de novas drogas (MISHRA et al., 2008; KATZ; BALTZ, 2016).

1.1 Padronização dos extratos vegetais

O Brasil está entre as sete maiores “megadiversidades” do mundo, e deveria ser, portanto foco prioritário de investigação farmacológica de novas drogas (FORZZA, 2010).

O grande número de espécies ainda não estudadas torna-se mais um fator relevante para pesquisas sobre plantas e indica a potencialidade destas espécies como fontes de moléculas bioativas para o desenvolvimento de novas drogas ou moléculas protótipos (BRAGA, 2009). Contudo, grande parte das espécies vegetais utilizadas pela população não possui ação farmacológica comprovada, composição química definida e nem mesmo estudos toxicológicos, sendo indispensável a normatização e a regulamentação desses medicamentos exigidas pelo mercado mundial e pelas autoridades governamentais.

A fim de se obter produtos à base de plantas padronizados com qualidade, cuidados com a identificação apropriada da planta, estação do ano, área onde foi coletada e seus processos de extração e purificação, devem ser tomados (SAHOO et al., 2010). Entretanto, um grande problema para se estabelecer o controle químico de qualidade de um extrato vegetal é o fato das plantas serem constituídas por enorme variedade de metabólitos primários e secundários, dos quais ainda se tem um conhecimento muito limitado.

A diversidade química proveniente de plantas medicinais está diretamente associada à alta variabilidade de suas propriedades físico-químicas intrínsecas, que fazem com que a separação, a detecção e a identificação de seus substratos naturais tornem-se tecnicamente desafiadores (DUNN et al, 2011; WOLFENDER et al., 2015).

Uma forma de minimizar custos e maximizar os resultados da análise é o uso da extração por fase sólida (SPE), seguida da análise cromatográfica, o que permite a obtenção da caracterização física do extrato ou da eliminação dos possíveis interferentes àquela metodologia (CANNELL, 1998; AGNOLET et al., 2012). Além disso, o uso da espectrometria de massas acoplada a um sistema cromatográfico viabiliza um estudo qualitativo de elucidação das estruturas de compostos conhecidos ou desconhecidos em uma matriz complexa (ARDREY, 2003; YULIANA et al, 2013; WOLFENDER et al., 2015).

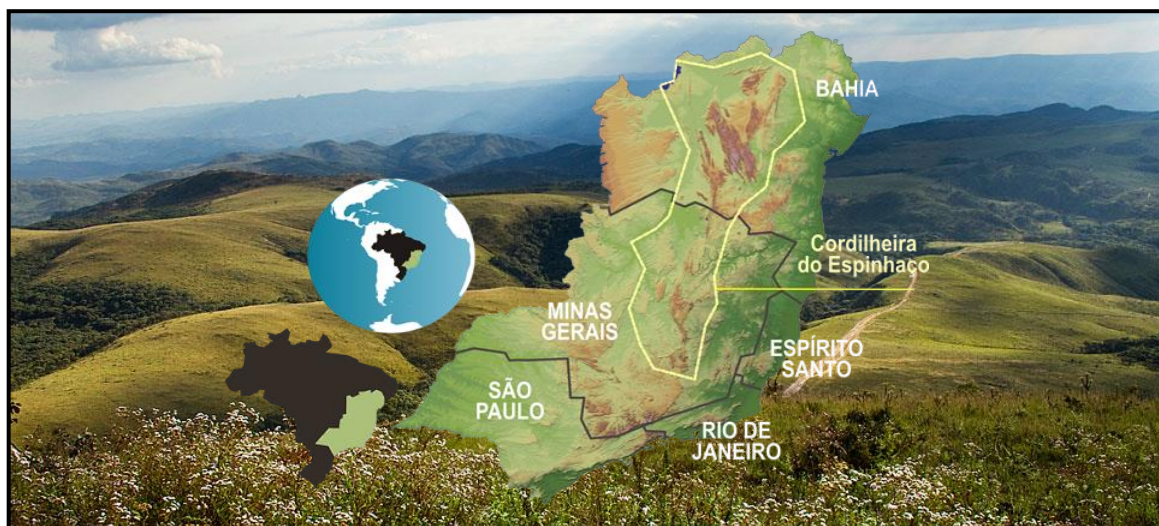
Portanto, diante desse cenário este trabalho pretende elaborar estratégias analíticas que permitirão uma avaliação quali e quantitativa dos componentes do extrato vegetal padronizado das partes aéreas de *Actinocephalus divaricatus* (Eriocaulaceae), incluindo a identificação de classes de substâncias e de possíveis marcadores químicos.

1.2 A família Eriocaulaceae e o gênero *Actinocephalus*

A família Eriocaulaceae é composta por 10 gêneros e cerca de 1400 espécies com uma distribuição de suas espécies em regiões tropicais mundo inteiro (GIULIETTI et al., 2012; The Plant List, 2013; HENSOLD, 2016).

Eriocaulaceae se destaca como uma das famílias mais representativas dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço - MG (Figura 1), pelo elevado número de taxa endêmicos desta formação geológica (COSTA; TROVÓ; SANO, 2008).

Figura 1 - Mapa do Estado de Minas Gerais em que se destaca a porção da Cadeia do Espinhaço compreendida entre Belo Horizonte e o Estado da Bahia.



Fonte: Adaptado de CARVALHO, 2016.

Paepalanthus Mart. é o maior gênero da família Eriocaulaceae com cerca de mais de 500 espécies distribuídas entre a América Central e Sul (GIULIETTI et al., 2012). Este gênero possui como principal característica a sua grande variabilidade morfológica (SCATENA; MORAES, 1996) dividida entre aos padrões de ramificação

dos escapos e os arranjos de suas inflorescências na forma de capítulos (GIULIETTI et al., 2012). Tal variabilidade torna a classificação taxonômica do gênero complicada com uma divisão usual em várias categorias infragenéricas. Entretanto, Sano (2004) iniciou as mudanças necessárias na distribuição das espécies do gênero *Paepalanthus* a fim de estabelecer coerência entre a classificação e a filogenia da família. Por meio desses estudos, a seção *Actinocephalus*, pertencente ao gênero *Paepalanthus*, foi elevada ao status de gênero (TROVÓ; SANO, 2010).

O gênero *Actinocephalus* é um dos gêneros da família Eriocaulaceae que exibe a maior diferenciação morfológica. Muita desta variação é resultado do arranjo de seus escapos em paracládios (SANO, 2004). Na maioria das espécies de Eriocaulaceae as inflorescências em forma de capítulos partem dos escapos, mas em *Actinocephalus* os escapos são arranjados em paracládios formando uma estrutura umbeliforme (ORIANI; SCATENA; SANO, 2008) (Figura 2).

Figura 2 - Padrão de arquitetura no gênero *Actinocephalus*.



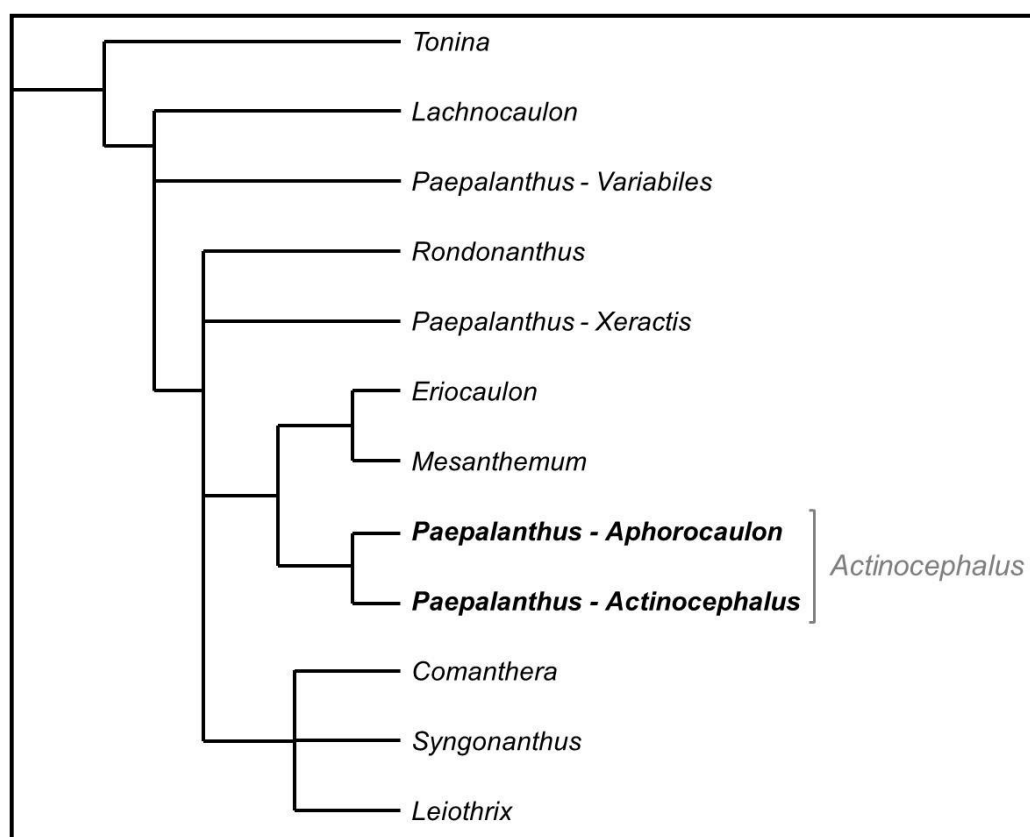
Espécie em estudo *A. divaricatus*.

Fonte: Fotos tiradas pelo Prof. Dr. Paulo Sano em Itacambira - MG.

O arranjo umbeliforme esférico peculiar presente na morfologia das espécies do gênero *Actinocephalus* (Figura 2) também foi evidenciado em espécies da subseção *Aphorocaulon* Ruhland pertencente ao gênero *Paepalanthus* (COSTA, 2005; TROVÓ; COSTA; ECHTERNACHT, 2012). Essa associação de similaridade entre os dois táxons levou a uma reavaliação da filogenia desse conjunto de espécies com a consequente inserção da subseção *Aphorocaulon* ao gênero *Actinocephalus* (COSTA; SANO, 2013).

Todas as mudanças taxonômicas em seções e subseções do gênero *Paepalanthus* e a descoberta de novas espécies permitiram atribuir uma nova circunscrição ao gênero *Actinocephalus*, de modo que este passou a ter 49 espécies, sendo 25 espécies provenientes do gênero *Paepalanthus* sect. *Actinocephalus*, 8 espécies novas descobertas e 16 espécies do gênero *Paepalanthus* subsect. *Aphoro-caulon* (Figura 3). As espécies pertencentes ao gênero *Actinocephalus* são consideradas restritas ao Brasil, com centro de diversidade localizado na Cadeia do Espinhaço. (COSTA, 2005; COSTA; SANO, 2013).

Figura 3 - Cladograma simplificado da nova circunscrição do gênero *Actinocephalus*.



Fonte: Adaptado de GIULIETTI et al., 2000; ANDRADE et al., 2011; COSTA; SANO, 2013.

1.2.1 Estudo químico do gênero *Actinocephalus*

Os estudos químicos e biológicos de espécies de plantas pertencentes ao gênero *Actinocephalus* são citados para espécies que pertenciam primeiramente ao gênero *Paepalanthus*, seção *Actinocephalus* (Körn.) Ruhland, como o trabalho de Santos (2001) que identificou flavonoides e naftopiranonas em *Paepalanthus brachypus* e *Paepalanthus robustus*. Estas espécies foram posteriormente elevadas a *Actinocephalus brachypus* (Bong.) Sano e *Actinocephalus robustus* (Silveira) Sano (ECHTERNACHT et al., 2011). Outras espécies do gênero *Paepalanthus* também foram quimicamente estudadas como *P. hilairei*, *P. robustus*, *P. denudatus*, *P. ramosus* e *P. polyanthus* (ANDRADE et al., 1999; SANTOS et al., 2002), sendo todas reclassificadas ao gênero *Actinocephalus* (SANO, 2004; COSTA; SANO, 2013).

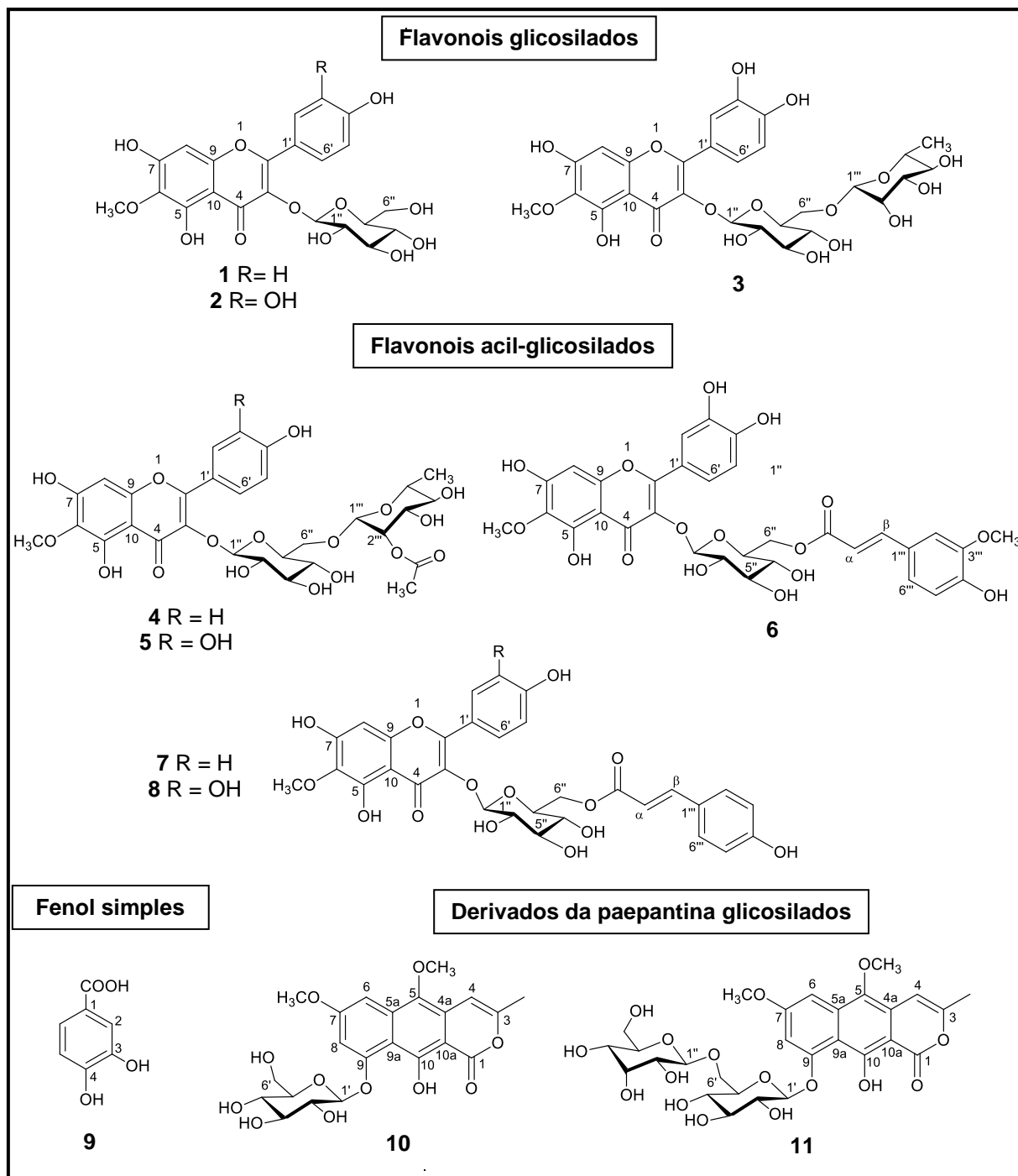
As espécies de *Paepalanthus* subsect. *Aphorocaulon* inseridas no gênero *Actinocephalus* também permitiram constatar não só um padrão morfológico estrutural, mas também uma homogeneidade nas classes de metabólitos secundários encontrados em ambos os taxa (*Paepalanthus* sect. *Actinocephalus* e *Paepalanthus* subsect *Aphorocaulon*). Estudos químicos prévios de algumas espécies pertencentes a subseção *Aphorocaulon*, como *P. macrocephalus* e *P. geniculatus*, confirmam a similarização. Assim, a Tabela 1 e a Figura 4 apresentam um panorama do estudo químico realizado com as espécies que atualmente pertencem ao gênero *Actinocephalus*, após a sua recente circunscrição.

Tabela 1 - Estudo químico de espécies do gênero *Actinocephalus*.

Espécie	Composto	Literatura
<i>Paepalanthus</i> sect. <i>Actinocephalus</i>		
<i>P. polyanthus</i>	2, 3, 6, 8	ANDRADE et al, 1999; SANTOS et al, 2002.
<i>P. hilairei</i>	1, 2, 3, 7, 10, 11	SANTOS, 1997 e 2001; ANDRADE et al, 1999.
<i>P. robustus</i>	1, 2, 7, 8, 10, 11	ANDRADE et al, 1999.
<i>P. ramosus</i>	1, 7, 9, 10, 11	ANDRADE et al, 1999; SANTOS, 2001.
<i>P. denudatus</i>	1, 7, 8, 10, 11	ANDRADE et al, 1999; BOSQUEIRO, 2000.
<i>P. microphylus</i>	10, 11	SANTOS, 2001.
<i>P. brachypus</i>	2	SANTOS, 2001.
<i>Paepalanthus</i> subsect. <i>Aphorocaulon</i>		
<i>P. macrocephalus</i>	7, 10	BOSQUEIRO, 2000.
<i>P. geniculatus</i>	1, 2, 3, 4, 5, 7, 11	AMARAL et al., 2012.

Fonte: Adaptado de SILVA, 2008.
Estruturas numeradas apresentadas na Figura 4.

Figura 4 - Exemplos de alguns metabólitos isolados em espécies do gênero *Paepalanthus* reclassificadas para o gênero *Actinocephalus*.



Fonte: Adaptado de SILVA, 2008.

As espécies previamente estudadas, que atualmente pertencem ao gênero *Actinocephalus* (apresentadas na Tabela 1), tiveram suas discussões confusas devido à tentativa de se realizar análises comparativas com o gênero *Paepalanthus*.

A composição química provou ser um caráter taxonômico importante, uma vez que os perfis químicos são bastante distintos nos *taxa* diferentes, embora não

necessariamente exclusivos. A ocorrência de flavonoides 6-metoxilados, bem como a glicosilação em C-3 parece ser uma grande tendência em *Paepalanthus*. *Actinocephalus* possui semelhança em seu perfil químico com *Paepalanthus*, que incluem derivados de flavonóis e naftopiranonas. Esta proximidade indica provavelmente uma história evolutiva comum. Porém, *Actinocephalus* pode ser distinguido de outros *taxa* pela presença de flavonoides glicosilados acilados, assim como derivados de paepalantina glicosilados. Portanto, o caráter químico reforça *Actinocephalus* como um gênero distinto e separado do gênero *Paepalanthus* (SANO, 2004; DOKKEDAL et al., 2008).

À vista disso, o estudo da espécie *Actinocephalus divaricatus* contribuirá inclusive no enriquecimento da discussão do gênero *Actinocephalus*, visto que esta espécie não possui estudos químicos e biológicos citados na literatura até o presente momento.

2 OBJETIVOS

- **Objetivos gerais:**

Contribuir com o estudo químico e biológico das partes aéreas (capítulos, escapos e folhas) de *A. divaricatus*, pertencente ao gênero *Actinocephalus*.

- **Objetivos específicos:**

A partir do extrato metanólico das partes aéreas de *A. divaricatus*:

- traçar o perfil cromatográfico por HPLC-PAD;

- isolar e identificar os metabólitos secundários;

- detectar e identificar os marcadores químicos dos extratos por HPLC-PAD e LC-ESI-MS;

- padronizar os extratos por meio da quantificação de padrões de naftopiranonas e flavonoides por HPLC-PAD;

- avaliar as atividades antiradicalar, antimicrobiana e antitumoral dos extratos metanólicos de capítulos, escapos e folhas.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Materiais, Reagentes e Soluções

Os procedimentos experimentais foram realizados utilizando solventes grau PA: acetato de etila, *n*-butanol, etanol, clorofórmio, metanol, *n*-propanol (Synthlab); para as análises em HPLC foram utilizados solventes grau HPLC: metanol (Tedia) e água purificada em sistema Milli-Q (Millipore[®]); para as análises de espectrometria de massas foram utilizados solventes grau LC/MS: metanol, água e ácido fórmico (Merck) e para a análise em RMN dos compostos isolados nos procedimentos cromatográficos foram utilizados solventes deuterados: DMSO-d₆ (Aldrich) e CD₃OD-d₄ (Aldrich).

Cartuchos de extração em fase sólida (SPE) de fase reversa a base de octadecilsilano (RP18) com 500 mg.mL⁻¹ (33 µm, Supelco[®]) foram usados na etapa de *clean-up* dos extratos e frações, sendo as soluções resultantes filtradas em membranas de PTFE (politetrafluoroetileno, *teflon*[®], Millipore[®]) com poro de 0,45 ou 0,22 µm.

Na triagem fitoquímica das frações, placas de camada delgada de sílica gel 60 em suporte de alumínio (Merck[®]) (20 x 20 cm x 0,2 mm) foram utilizadas e redimensionadas de acordo com o número de amostras. Com o uso de capilares, as amostras foram aplicadas em sua superfície e as placas foram eluídas em cuba saturada com os sistemas *n*-butanol/CH₃COOH/H₂O (65:25:15, v/v/v), CHCl₃/MeOH/*n*-propanol/H₂O (5:6:1:4, v/v/v/v, fase orgânica), acidificado com ácido acético glacial ou CHCl₃/MeOH/H₂O (43:37:20, v/v/v, fase orgânica). A revelação das placas foi feita com luz UV (Câmara com luz UV 254 nm - Chromatovue[®]) e anisaldeído/H₂SO₄, nesta ordem; outros reveladores como o iodo, NP/PEG (WAGNER; BLADT; ZGAINSKI, 1984) e sulfato cérico também foram utilizados.

3.2 Procedimentos gerais instrumentais

Os extratos e frações foram concentrados em um rotaevaporador rotativo sob pressão reduzida (Heidolph[®], Laborota 4001 – efficient) equipado com uma bomba a vácuo (Heidolph[®], Rotavac valve control).

As balanças analíticas Bioprecisa[®] FA2104N (capacidade 200 g e precisão de 0,1 mg) e Shimadzu[®] modelo AY-220 (capacidade para 220 g e precisão de 0,0001 mg) foram usadas na pesagem dos extratos e frações.

As análises cromatográficas dos extratos metanólicos de *A. divaricatus* foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (analítico, gradiente quaternário) modelo PU-2089 (Jasco[®]), acoplado a detector de arranjo de foto diodos com faixa de varredura de 195-650 nm e intervalo mínimo de 1 nm, modelo MD-2010 (Jasco[®]), sendo que para a aquisição e processamento dos dados cromatográficos foi utilizado o software ChromNAV (Chromatec[®]).

Os extratos metanólicos das partes aéreas de *A. divaricatus* foram analisados separadamente por HPLC-ESI-HRMSⁿ. Um sistema de cromatografia líquida Thermo Scientific constituído por uma bomba quaternária Accela 600 foi utilizado com um injetor automático Accela, conectado a um espectrômetro de massa híbrido linear Trap-Orbitrap (LTQ-Orbitrap XL, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemanha) com ionização por electrospray (ESI). As separações em HPLC foram conduzidas em uma coluna Waters (Milford, MA, EUA) Atlantis T3 5 µm de fase reversa C18 (150 mm x 2.1 mm d.i., 10 µm). Para a eluição das amostras foi utilizado um gradiente linear com uma fase móvel composta por água acidificada com 0,1% de ácido fórmico (solvente A) e acetonitrila acidificada com 0,1% de ácido fórmico (solvente B), de 5% a 100% (B) em 70 min. O instrumento foi calibrado utilizando-se padrões de calibração do fabricante. A faixa de aquisição foi *m/z* 230-1500, em uma resolução de 30.000. A fonte de tensão foi de 5 kV e a voltagem capilar foi de -3,5 kV, o tubo de lentes *offset* foi de 126 V e a temperatura do capilar foi fixada em 280°C. Estes experimentos foram realizados em colaboração com o grupo de Pesquisa da Prof^a. Sonia Piacente da Università degli Studi di Salerno, Itália.

Os espectros de massas foram adquiridos no modo negativo e processados no *software* Xcalibur (versão 2.0). Para a identificação e proposta estrutural dos compostos detectados foi utilizada uma biblioteca de metabólitos secundários e uma

base de dados de referência online (METLIN, KNApSACK Core System e SciFinder[®]).

O fracionamento por cromatografia por permeação em gel foi realizado em colunas de vidro com 80 cm de altura por 2 cm de diâmetro interno, empacotada com Sephadex[®] LH-20 (Pharmacia). O solvente foi bombeado para a coluna com o auxílio de uma bomba peristáltica (Pharmacia) a uma vazão de 3,0 mL.min⁻¹. As frações foram coletadas em um coletor automático Redifrac (Pharmacia).

As separações utilizando cromatografia líquida de média pressão (MPLC) foram realizadas em um sistema Buchi[®], equipado com uma bomba Gerente C-615 que comporta outras duas bombas (módulos C-601), permitindo a formação do gradiente binário de solventes 0% - 100% e uma vazão de 2,5 a 250 mL min⁻¹. As separações utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de índice de refração (HPLC-IR) foram realizadas em um sistema Shimadzu equipado com um detector de índice de refração Shimadzu RID-10A, e um injetor Rheodyne. As separações utilizando HPLC-PAD foram realizadas em um cromatógrafo líquido preparativo de gradiente binário (Jasco[®]), acoplado a um detector de arranjo de foto diodos com faixa de varredura de 195-650 nm e intervalo mínimo de 1 nm (Jasco[®]). A aquisição e processamento dos dados cromatográficos foi realizada com o *software ChromNAV* (Cromatec[®]).

As análises de RMN monodimensional: ¹H e ¹³C e bidimensional: COSY, HSQC, HMBC e TOCSY foram realizadas em espectrômetros de Ressonância Magnética Nuclear Bruker[®] Avance III HD 600 (14,1 Tesla) e Bruker[®] Fourier 300 (7,1 Tesla). Os compostos foram dissolvidos em dimetilsulfoxido deuterado (DMSO-d₆ (Aldrich)). Outros experimentos de RMN foram realizados na Università degli Studi di Salerno, Italia, em um espectrômetro Bruker[®] DRX-500 (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Alemanha). Todos os espectros, mono e bidimensionais foram adquiridos em CD₃OD (99.95%, Sigma-Aldrich) com sequências de pulsos padrão para os espectros DQF-COSY, HSQC, HMBC. O *software MestReNova* versão 6.0.2 foi utilizado na aquisição dos deslocamentos químicos de cada espectro.

3.3 Metodologia

3.3.1 Etapa Botânica

As partes aéreas de *A. divaricatus* (capítulos, escapos e folhas) foram coletadas e identificadas pelo Prof. Dr. Paulo Takeo Sano do Instituto de Biociências da USP de São Paulo, em Itacambira - MG (dados GPS: 17°05'18,21"S; 43°17'51,61"W, elev. 1001 m). A espécie encontra-se depositada no herbário do IB/USP São Paulo, sob número SANO 3965.

O Prof. Paulo Takeo Sano possui autorização de coleta registrada no IBAMA e a Prof^a. Lourdes C. dos Santos possui comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico, número: 33150-1, Data da Emissão: 19/02/2012.

3.3.2 Preparação dos extratos

a) Secagem

O material botânico coletado e identificado foi seco em estufa em ar circulante a 40°C e posteriormente triado para a separação de capítulos, escapos e folhas.

b) Moagem

Nesta etapa, o material botânico foi finamente dividido em moinho de facas com rotor vertical MAO 90 CF a fim de se facilitar a extração de seus constituintes químicos na etapa seguinte.

c) Extração

Os pós obtidos na moagem (pesados na balança - Gehaka[®], BG 4000 - com capacidade para 4040 g e precisão de 0,01 g) foram extraídos com metanol por meio da percolação.

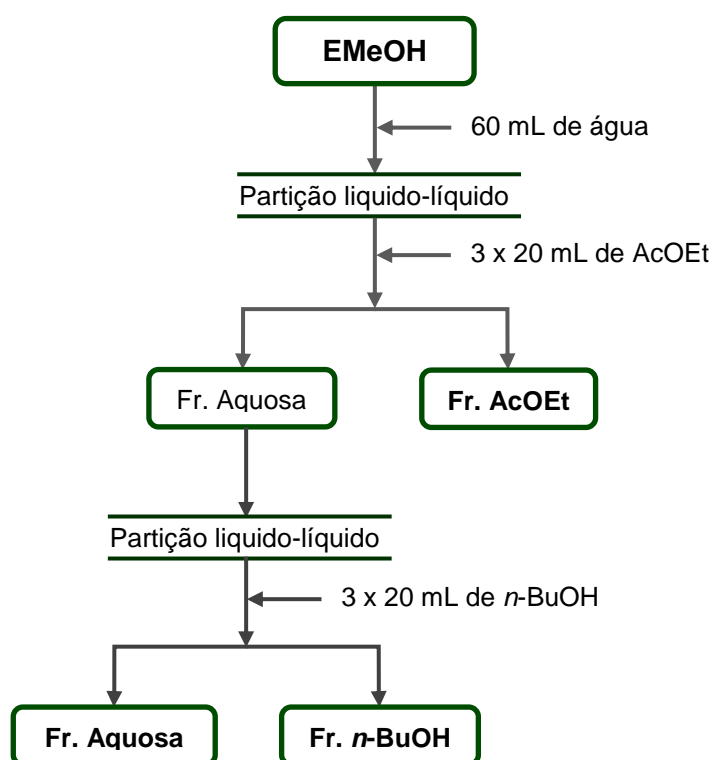
Uma quantidade fixa do pó foi intumescida com quantidade fixa do solvente extrator (metanol) durante 2 horas. Em seguida, o percolador foi empacotado homogeneamente com a mistura (pó + metanol) e o efluente foi coletado na vazão de 1,0-2,0 mL/min/Kg.

Durante a percolação foi determinado um procedimento operacional padrão visando a padronização desta etapa, seja ela em escala reduzida ou ampliada, de forma que para toda etapa de obtenção de extratos, a razão droga vegetal:solvente extrator foi mantida constante. Após a extração, os líquidos extratores foram rotoevaporados sob pressão reduzida em evaporador rotativo em temperatura inferior a 40°C. Os extratos foram transferidos para vidros tarados (balança - Marte[®], AL 200 - com capacidade para 200g e precisão de 0,001 g) e deixados em capela até completa eliminação do solvente.

d) Extração líquido-líquido

Os extratos metanólicos de capítulos, escapos e folhas de *A. divaricatus* foram submetidos a um processo de partição líquido-líquido com solventes de polaridade crescente. Para isso, foram solubilizados 4,0 g dos extratos de escapos e capítulos e 8 g do extrato das folhas em 60 e 120 mL de água, respectivamente. A solução aquosa foi particionada com acetato de etila. Após a partição, a fração aquosa foi separada da fração acetato de etila e este processo foi repetido por três vezes a fim de se esgotar os compostos solúveis nesse solvente. Em seguida, a solução aquosa foi particionada com *n*-butanol, conforme descrito anteriormente para a fração acetato de etila (Figura 5). As frações obtidas foram concentradas em rotaevaporador rotativo sob pressão reduzida a 30°C, transferidas para vidros tarados e deixadas em capela até completa eliminação dos solventes.

Figura 5 - Fluxograma da partição dos extratos metanólicos dos capítulos, escapos e folhas de *A. divaricatus*.



Fonte: Próprio autor.

3.3.3 Etapa cromatográfica

3.3.3.1 Separações em MPLC dos extratos metanólicos de escapos e folhas de *A. divaricatus*

Os extratos metanólicos dos escapos e folhas de *A. divaricatus* foram fracionados, separadamente, em um sistema MPLC, equipado com coluna de fase reversa C18 (90 g). A fim de evitar um prejudicial alargamento da banda extra-coluna, devido ao volume de injeção, e manter a sensibilidade equivalente, foi preparada uma pastilha da amostra com a fase estacionária. Portanto, no fracionamento foram pesados 1,5 g dos extratos metanólicos dos escapos e folhas de *A. divaricatus* para 4,5 g de C18.

Nesses fracionamentos foram empregados o conceito *scale-up* ou transposição cromatográfica (MAJORS, 2004). As condições de separação cromatográfica dos eluatos foram inicialmente otimizadas usando HPLC em modo

analítico e depois de estabelecido o gradiente de separação, as frações foram purificadas usando MPLC preparativo. Visando simplificar a complexidade da matriz, rica em compostos fenólicos, determinou-se métodos analíticos isocráticos nas seguintes proporções MeOH/H₂O (22/78, v/v), MeOH/H₂O (30/70, v/v), MeOH/H₂O (33/67, v/v), MeOH/H₂O (40/60, v/v), MeOH/H₂O (45/55, v/v) e MeOH/H₂O (50/50, v/v) e 100% MeOH para a limpeza da coluna.

As condições cromatográficas foram determinadas de acordo com os parâmetros das colunas utilizadas na análise e na separação dos compostos. Esse tipo de relação de transferência entre os dois modos utilizados foi determinado pelo simulador computacional HPLC Calculator v3.0 (GUILLARME et al., 2007; GUILLARME et al., 2008). Na Tabela 2 é possível verificar os parâmetros utilizados nos dois modos de separação.

Tabela 2 - Os parâmetros mais importantes utilizados no HPLC Calculator para a transposição do método.

	HPLC	MPLC
Volume morto	1,3 mL	6 mL
Diâmetro da coluna	4,6 mm	40,0 mm
Comprimento da coluna	250 mm	150 mm
Tamanho da particular	5,0 µm	50,0 µm
Vazão	1 mL.min ⁻¹	7,5 mL.min ⁻¹
Solvente	MeOH/H ₂ O	MeOH/H ₂ O
Modo de separação	Isocrático	Isocrático

O volume de amostra coletado em cada análise foi de 250 mL, resultando um total de 80 frações para o extrato metanólico das folhas e 14 frações para o fracionamento do extrato metanólico dos escapos.

As frações obtidas no fracionamento de cada extrato foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD), usando sílica gel como fase estacionária, o sistema de solvente acidificado com ácido acético glacial CHCl₃/MeOH/*n*-propanol/H₂O (5:6:1:4, v/v/v/v, fase orgânica), de fase móvel e a luz UV (254 nm) e anisaldeído como reveladores.

A separação cromatográfica do extrato metanólico das folhas de *A. divaricatus* forneceu a fração **43**, denominada **Ad1** (21,3 mg) e com base em experimentos de RMN foi identificada.

3.3.3.2 Fracionamento por permeação em gel

a) Fracionamento do extrato metanólico das folhas

O extrato metanólico das folhas de *A. divaricatus* também foi fracionado em Sephadex LH-20. O extrato metanólico das folhas (2,0 g) foram dissolvidos em metanol (15 mL) e centrifugados durante 5 min a 3200 rpm. Este passo foi repetido duas vezes. Em seguida, o sobrenadante foi fracionado em uma coluna com Sephadex LH-20, utilizando MeOH como eluente. Deste fracionamento obteve-se 97 frações com 8 mL cada. Mediante o fracionamento foi possível identificar, com base em experimentos de RMN, dois flavonoides denominados **Ad4** (24,6 mg) e **Ad5** (3,6 mg).

b) Separação da fração 10-12 dos escapos

O mesmo procedimento de separação foi utilizado para uma fração proveniente do fracionamento do extrato metanólico dos escapos em MPLC. Nesta separação, a fração **10-12** (199,9 mg) foi cromatografada em Sephadex LH-20 utilizando como eluente MeOH/H₂O (8:2, v/v). Este procedimento forneceu uma saponina denominada **Ad6** (15,7 mg) e o mesmo flavonoide isolado das folhas **Ad4** (11,4 mg) que foram identificados com base em experimentos de RMN mono e bidimensionais.

c) Separação da fração acetato de etila das folhas

A fração acetato de etila das folhas de *A. divaricatus* também foi fracionada em Sephadex LH-20 seguindo a mesma metodologia abordada na separação do extrato metanólico das folhas. Deste fracionamento obteve-se 279 frações com 5 mL cada. Mediante o fracionamento foi possível isolar um flavonoide denominado **Ad5** (2,6 mg), que foi identificado com base em experimentos de RMN.

3.3.3.3 Separações em HPLC-PAD semi-preparativo

a) Separação da fração 54-69 das folhas

A fração **54-69** (87,5 mg) resultante do fracionamento do extrato metanólico das folhas de *A. divaricatus* foi submetida a um procedimento de purificação por HPLC-PAD (semipreparativo, gradiente).

A amostra foi solubilizada em 1,5 mL da fase móvel utilizada no método de separação, que consistiu de água 64% e metanol 36% e filtrada em Millex (0,22 µm).

A separação dos compostos foi realizada em uma coluna de fase reversa C18 imobilizadas com octadecilsilano, modelo Luna (Phenomenex®) de 250 x 10 mm, com partículas de tamanho médio de 10 µm. O volume injetado foi de 200 µL, e a vazão utilizada de 4,0 mL.min⁻¹. A condição inicial da fase móvel utilizada consistiu de água 64% (eluente A) e metanol 36% (eluente B) contendo 0,1% de TFA. O método de eluição foi o gradiente com uma rampa de eluição de 30 min, variando a proporção de MeOH de 36 a 60%. Este procedimento de separação forneceu uma mistura de naftopiranonas (7 mg) denominadas **Ad2 (A e B)** que, com base em experimentos de RMN mono e bidimensionais foram identificadas.

b) Separação da fração 7 dos escapos

A fração **7** (82 mg) resultante do fracionamento do extrato metanólico dos escapos de *A. divaricatus* foi submetida a um procedimento de purificação por HPLC-PAD (semipreparativo, isocrático). A amostra foi solubilizada em 1 mL da fase móvel utilizada no método de separação, que consistiu de água 72% e metanol 28% e filtrada em Millex (0,22 µm). A coluna utilizada foi a mesma descrita anteriormente (coluna de fase reversa C18, Luna – Phenomenex®). O volume injetado foi de 100 µL, e a vazão de 4,0 mL min⁻¹. A fase móvel utilizada consistiu de água 72% (eluente A) e metanol 28% (eluente B) contendo 0,1% de TFA. O método de eluição foi o isocrático e o tempo de separação de 40 min. Este procedimento forneceu um flavonoide denominado **Ad3** (6 mg). Esse flavonoide, com base em experimentos de RMN mono e bidimensionais foi identificado.

c) Separação da fração 12 da fração acetato de etila das folhas

A fração **12** (121,4 mg) resultante do fracionamento da fração acetato de etila das folhas de *A. divaricatus* foi submetida a um procedimento de purificação por HPLC-PAD (semipreparativo, gradiente). A amostra foi solubilizada em 1,5 mL da condição inicial da fase móvel utilizada no método de separação, que consistiu de água 72% e metanol 28% e filtrada em Millex (0,22 µm). A separação dos compostos foi realizada em uma coluna de fase reversa C18 Aquasil Gold aQ de 25 cm x 20 mm x 5,0 µm (Thermo®). O volume injetado foi de 300 µL, e a vazão de 6,5 mL.min⁻¹. A condição inicial da fase móvel utilizada consistiu de água 72% (eluente A) e metanol 28% (eluente B) contendo 0,1% de TFA. O método de eluição foi o gradiente com uma rampa de eluição de 40 min, variando a proporção de MeOH de 28 a 85%. Este procedimento de separação forneceu três ácidos fenólicos, **Ad10** (4,9 mg), **Ad11** (1,1 mg) e **Ad12** (1,3 mg), que, com base em experimentos de RMN mono e bidimensionais foram identificados.

3.3.3.4 Separações em HPLC-IR

O extrato metanólico das folhas de *A. divaricatus* foi fracionado por sephadex LH-20 e a fração **31-33** (110 mg) foi analisada isocriticamente por HPLC-IR, utilizando uma coluna de fase reversa Waters RP18 (250 mm x 10 mm d.i., 10 µm), usando MeOH/H₂O (42:68) como fase móvel de eluição e vazão de 2,0 mL.min⁻¹. A separação cromatográfica rendeu uma mistura de flavonoides denominados **Ad7** e **Ad8** (2,3 mg) que, com base na análise dos experimentos de RMN mono e bidimensionais foram identificados.

3.3.3.5 Separações em MPLC semipreparativo

A fração 31-39 (~50 mg) resultante do fracionamento do extrato metanólico das folhas de *A. divaricatus* foi submetida a um procedimento de purificação por MPLC para isolamento e identificação.

A amostra foi solubilizada em 5 mL da fase móvel utilizada (MeOH/H₂O, 20:80, v/v), solubilizada em ultrassom e centrifugada, sendo que a porção solúvel da amostra foi filtrada em Millex (0,45 µm) e injetada na coluna.

A separação dos compostos foi realizada em uma coluna empacotada com a fase reversa C18, o volume injetado foi de 5 mL e a vazão de 2,5 mL.min⁻¹. A fase móvel utilizada consistiu de água 80% (eluente A) e metanol 20% (eluente B), no modo isocrático que forneceu uma mistura de flavonoides, sendo o flavonoide majoritário denominado de **Ad9** (10 mg).

Após o procedimento de purificação, realizaram-se os experimentos de RMN mono e bidimensionais para identificação do composto isolado.

3.3.4 Padronização dos extratos vegetais

A validação da metodologia, empregada na padronização dos extratos vegetais, foi realizada seguindo as recomendações do ICH (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION, 2005) para validação de procedimentos analíticos e a resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003, determinada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) intitulada “Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos” (AGÊNCIA..., 2003).

a) Soluções padrão

A padronização dos extratos vegetais seguiu com os padrões purificados disponíveis em laboratório: 6-hidroxi-7-metoxiquercetina-3-O-β-D-glicopiranosídeo e 10-hidroxi-5-7-dimetoxi-3-metil-1H-nafto[2,3c]piran-1-ona-9-O-β-D-glicopiranosídeo. As soluções de cada padrão foram utilizadas nos ensaios de linearidade, recuperação (exatidão), repetibilidade (precisão) e construção da curva analítica.

As soluções dos padrões foram utilizadas na construção da curva analítica, que consistiram na preparação de diluições seriadas a partir de uma solução estoque de 1000 µg.mL⁻¹ (500 - 7,81 µg.mL⁻¹), utilizando-se como diluente MeOH:H₂O (70:30, v/v).

O percentual de recuperação nos extratos foi avaliado através do preparo de soluções dos padrões utilizando três níveis de concentrações: 31,25, 125 e 500 µg.mL⁻¹

O ensaio de repetibilidade (precisão) foi realizado a partir da solução estoque de 1000 µg.mL⁻¹ de cada padrão que foi diluído para as concentrações de 500, 125

e $31,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$. As soluções utilizadas nos ensaios intra-dia e inter-dia foram preparadas individualmente para cada dia de injeção.

Todas as soluções preparadas foram filtradas em microfiltro de PTFE Millex[®] (0,22 μm de poro e 25 mm de diâmetro) antes de serem injetadas no cromatógrafo líquido e todos os ensaios foram realizados em triplicata para cada concentração do padrão. As áreas foram obtidas a partir da integração dos picos obtidos pelo detector PAD monitorado em 270 nm.

b) Preparação dos extratos

A preparação dos extratos consistiu em uma etapa de *clean up* por extração em fase sólida em cartuchos de RP18. Os cartuchos foram previamente ativados com MeOH (4 mL) e equilibrados com H₂O (5 mL) e MeOH/H₂O (70:30, v/v) (5 mL). Os extratos (60 mg) a serem aplicados no suporte de SPE foram previamente solubilizados em 3 mL da solução MeOH/H₂O (70:30, v/v), eluídos com a mesma proporção de fase móvel e posteriormente, secos em rotaevaporador rotativo. Após a secagem, 20 mg de cada extrato foram ressuspensos em MeOH/H₂O (70:30, v/v). O volume final da solução foi aferido em um balão volumétrico de 2 mL fornecendo uma solução com uma concentração de 10 mg.mL^{-1} . Ao fim, as soluções foram filtradas em filtro PTFE Millex[®] com tamanho de poro 0,22 μm .

c) Condições cromatográficas

As análises dos padrões e extratos metanólicos de *A. divaricatus* (capítulos, escapos e folhas) foram realizadas em uma coluna de fase reversa C18 imobilizadas com octadecilsilano, modelo Thermo Scientific[®] (250 x 4,6 mm d.i.; 5 μm), com coluna de guarda de mesma fase estacionária (4 x 3 mm d.i.) O volume de injeção foi de 10 μL , a vazão utilizada de 1 mL.min^{-1} e a temperatura do forno ajustada para 25°C.

A composição da fase móvel utilizada foi: água (eluente A) e metanol (eluente B), ambos acidificados com 0,1% de TFA, sendo que as otimizações cromatográficas decorreram de acordo com a resolução dos picos cromatográficos, sendo necessárias modificações na proporção da fase móvel e no tempo de análise.

d) Identificação e quantificação

A identificação dos compostos nos extratos foi feita por comparação de seus tempos de retenção (t_R) e espectros no UV dos padrões analisados. A quantificação dos analitos foi feita pelo método de calibração externa, permitindo assim a quantificação dos padrões utilizados que apresentaram a mesma resposta de absorção no PAD.

3.3.5 Atividades biológicas

3.3.5.1 Determinação da atividade antimicrobiana

A avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima foi realizada no laboratório de Fisiologia de Microorganismo da FCFAr - Unesp Araraquara sob a supervisão da Prof^a. Dr^a. Taís Maria Bauab.

a) Cepas microbianas

Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foram empregadas três cepas bacterianas: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Salmonella setubal* ATCC 19196. As cepas foram mantidas em caldo Mueller Hinton (CMH) acrescido de 20% de glicerol a -20° C, e, para o uso foram repicadas em CMH e incubadas a 37°C por 24 horas. Para a avaliação da atividade antifúngica foi empregada uma cepa de *Candida albicans* ATCC 18804. A cepa foi mantida em Caldo Sabouraud Dextrose (CSD) acrescido de 20% de glicerol a -20° C, e, para o uso foi repicada em CSD e incubada a 37°C por 48 horas.

b) Padronização dos inóculos bacterianos

As suspensões bacterianas de foram padronizadas a partir de uma cultura de 24 horas, em CMH, adicionando-se meio de cultura estéril até atingir turvação igual à suspensão do tubo 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente $1,0 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹). Em seguida foi verificada a leitura espectrofotométrica a 620 nm para confirmação da concentração de micro-organismos. Posteriormente, foi realizada

uma diluição 1:10 em CMH, obtendo-se uma suspensão de $1,0 \times 10^7$ UFC.mL⁻¹, a qual foi utilizada nos ensaios (CLSI, 2006; ARAÚJO et al., 2012).

c) Padronização do inóculo fúngico

A suspensão fúngica de *C. albicans* foi padronizada a partir de uma cultura de 48 horas em CSD diluídas até escala 0,5 de McFarland (10^6 UFC.mL⁻¹). A concentração das células leveduriformes foi confirmada por leitura espectrofotométrica a 620 nm. Desta suspensão foi realizada uma diluição 1/1000 obtendo-se uma suspensão de 10^3 UFC.mL⁻¹ a qual foi utilizada nos experimentos (CLSI, 2008; ARAÚJO et al., 2013).

d) Determinação da CIM para as cepas bacterianas

A CIM foi determinada pela técnica de diluição em microplacas (96 orifícios) de acordo com a metodologia descrita segundo a norma M7-A6 do *Manual Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2006) com modificações.

Os orifícios das microplacas (96 poços) foram preenchidos com 80 µL de CMH. Em seguida foram acrescentados 100 µL das soluções das amostras vegetais e realizada a diluição seriada de 1000 a $7,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Adicionalmente foram distribuídos 20 µL das suspensões dos micro-organismos em cada orifício das microplacas. Como controle positivo foi empregado o fármaco a ampicilina ($200 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Também foram realizados o controle do meio de cultura, o controle de crescimento bacteriano, o controle de esterilidade do das amostras vegetais e o controle negativo (solventes).

As microplacas foram incubadas em estufa a 37 °C por 24 horas. Os testes foram realizados em triplicata.

e) Determinação da CIM para a cepa fúngica

A avaliação da atividade antifúngica e determinação da CIM foi realizada pela técnica de microdiluição de acordo com a metodologia descrita segundo o documento M27-A3 da CLSI (2008), com modificações.

Em cada orifício das microplacas (96 poços) foi acrescentado meio de cultura RPMI 1640, ajustado ao pH 7,0 com tampão MOPs (ácido 3-[N-morfolino] propanossulfônico) e esterilizado por membrana filtrante. Adicionalmente foram acrescentados 100 µL das soluções das amostras vegetais e realizada a diluição seriada de 1000 a 7,8 µg.mL⁻¹. Em seguida foram distribuídos 100 µL das suspensões dos micro-organismos previamente padronizados em cada orifício das microplacas.

Como controle positivo foi utilizado anfotericina B (16,0 a 0,06 µg.mL⁻¹) e o fluconazol (512 a 1,0 µg.mL⁻¹). Também foi realizado o controle do meio de cultura, do crescimento leveduriforme, esterilidade das amostras vegetais e solvente. As microplacas foram incubadas em estufa microbiológica à 37°C por 48 horas. Os testes foram realizados em triplicata.

f) Leituras espectrofotométricas

Após o período de incubação de ambos os ensaios (bactérias e levedura), as microplacas foram submetidas à leitura de absorbância a 595 nm, em espectrofotômetro de microplacas (Epoch 2- Biotek®). Os valores obtidos foram considerados para a realização de cálculos que expressaram a porcentagem de viabilidade dos micro-organismos de acordo com GUDIÑA et al. (2010). A CIM foi considerada como a menor concentração da amostra vegetal capaz de inibir o crescimento de 90% das cepas (HÖRNER et al., 2008).

g) Leituras com revelador

Nos testes com as bactérias foram realizadas leituras com o revelador resazurina (100 µg.mL⁻¹) do qual 30µL foram adicionados em cada orifício das microplacas. No decorrer de 2 horas a presença de cor azul representa ausência de crescimento e de cor rosa, presença de crescimento bacteriano (PALOMINO et al., 2002). A resazurina (7-hidroxi-3H-phenoxazin-3-ona10-óxido) é considerada o indicador mais utilizado em condições de redução em meios de cultura (FUKUSHIMA et al., 2003). O mecanismo baseia-se na redução da resazurina (cor púrpura) em resarufina (cor rósea). A resazurina tem uma correlação direta com a

quantidade/proliferação de organismos vivos, que incluem células bacterianas e até células de mamíferos (O'BRIEN et al., 2000).

Para os ensaios com a cepa fúngica foram adicionados 20 µL de solução aquosa de 2% de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC), e incubação a 37°C por 3 horas. A ausência de crescimento do micro-organismo mantém as soluções dos poços incolores, enquanto a coloração vermelha representa crescimento do mesmo (ARAÚJO et al., 2013). O TTC é um indicador de oxirredução utilizado para diferenciar tecidos metabolicamente ativos daqueles não ativos, principalmente relacionado com a viabilidade celular. O mecanismo baseia-se na redução enzimática do 2,3,5-trifeniltetrazólio (incolor) em 1,3,5-trifenilformazan (cor avermelhada) em tecidos vivos devido à atividade de várias desidrogenases, enzimas importantes na oxidação de compostos orgânicos e portanto no metabolismo celular (GABRIELSON et al., 2002).

3.3.5.2 Avaliação da atividade citotóxica pela técnica de MTT

A avaliação da atividade citotóxica foi realizada no Departamento de Análises Clínicas da FCFAr - Unesp Araraquara sob a supervisão da Prof^a. Dr^a. Iracilda Z. Carlos.

a) Ajuste das concentrações das suspensões das células tumorais

As linhagens tumorais de murinos LM3 e LP07 foram cedidas pelo Instituto de Oncologia Angel H. Roffo – Buenos Aires – Argentina.

As células LM3 e LP07 foram mantidas em meio MEM, suplementado com 10 % de soro fetal bovino, 2mM L-glutamina e 80 µg.mL⁻¹ de gentamicina, em frascos plásticos (Corning) em estufa a 37 °C, com atmosfera úmida e tensão constante de 5% de CO₂. Foram realizados repiques três vezes por semana. O número de células foi determinado pela contagem em câmara hemocitométrica tipo Neubauer (Boeco), utilizando corante Azul de Tripán, a 0,04 % em PBS, e ajustado a uma concentração de 5 x 10⁴ células.mL⁻¹.

b) Ajuste das amostras avaliadas

As soluções-mãe dos extratos avaliados foram preparadas em concentração máxima de DMSO de 5% v/v, conforme os métodos convencionais. As soluções foram diluídas em MEM (Minimum Essential Medium) por diluição sucessiva nas concentrações de 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,2, 15,7 e 7,8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

c) Ensaio de viabilidade celular de células tumorais LM3 e LP07

A determinação da citotoxicidade dos extratos sobre as células tumorais foi quantificado pelo método baseado na capacidade das células viáveis de reduzirem o MTT pela ação de enzimas desidrogenases presentes na mitocôndria ativa formando cristais de formazana (MOSMANN, 1983). As amostras (200 μL) de LM3 e LP07 (5×10^4 células. mL^{-1}) foram adicionadas em placas de 96 poços e então pré-incubadas na ausência dos extratos investigados por 24 h para que as células se adaptem antes da adição dos agentes de teste. Após 24 h de incubação, formado o tapete celular, os sobrenadantes foram removidos e os extratos foram adicionados (200 μL ; 1000 – 7,8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Os efeitos dos extratos sobre as células foram determinados após 24 h de incubação. Os sobrenadantes foram removidos, e a solução de MTT (100 μL ; 1 mg.mL^{-1}) foi adicionada a cada poço contendo as amostras. O ensaio de MTT foi realizado e as placas foram incubadas durante 3 horas, o conteúdo da placa foi novamente vertido e 100 μL de álcool isopropílico foram adicionados a cada orifício para solubilizar os cristais formados. Somente células e meio de cultura foram utilizados como controle, equivalendo a 100% de viabilidade celular. A leitura da absorbância foi realizada no Fotocolorímetro multicanal UV-Vis Multiscan Ascent (Labsystems), em comprimento de onda de 540 nm e filtro de referência 620 nm.

Os valores correspondentes à concentração que reduz em 50% a viabilidade celular (IC_{50}) dos compostos foram quantificados através de curvas dose-resposta Concentração da Amostra x Viabilidade Celular utilizando o software Origin[®] 5.0. O experimento foi realizado em triplicata.

3.3.6 Avaliação do potencial antiradicalar, fenóis totais e flavonoides totais dos extratos metanólicos de capítulos, escapos e folhas

Os ensaios para avaliação do potencial antiradicalar e teor de fenóis totais foram realizados em triplicata utilizando o equipamento Thermo Plate TP-READER Basic para a leitura das absorvâncias para cada ensaio.

3.3.6.1 Avaliação do potencial antiradicalar

O potencial antiradicalar foi avaliado por meio de um ensaio espectrofotométrico, de acordo com metodologia descrita por Pauletti et al. (2003) e Brand-Williams et al. (1995) utilizando-se uma solução de DPPH 0,004 % em metanol, adicionado à amostra de interesse. As soluções estoque foram preparadas na concentração de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em metanol. Em seguida foi feita a preparação de diluições seriadas a partir da solução estoque de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ até às concentrações 250,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 125,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 62,50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 31,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 15,63 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 7,81 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ utilizando como diluente metanol.

A análise foi feita utilizando-se 20 μL de cada solução acrescido de 200 μL da solução de DPPH. A solução referência foi constituída de 20 μL de metanol acrescido de 200 μL de solução de DPPH. Após 30 minutos de reação, as absorvâncias das soluções foram medidas a 517 nm. Os padrões utilizados foram a quercetina e o ácido gálico, os quais foram submetidos ao mesmo procedimento experimental.

3.3.6.2 Determinação do teor de fenóis totais

A concentração de fenóis totais foi determinada a partir do método colorimétrico padrão de Folin-Ciocalteau (KÄHKÖNEN et al., 1999; GHASEMZADEH et al., 2010).

A análise foi realizada utilizando-se uma solução padrão de ácido gálico na concentração de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. As soluções do padrão utilizadas na construção da curva analítica consistiram na preparação de diluições seriadas a partir da solução estoque nas concentrações de 250,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 125,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 62,50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 31,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 15,63 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 7,81 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 3,91 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os extratos analisados

foram preparados na concentração de $62,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Em uma placa de 96 poços adicionou-se $150 \mu\text{L}$ de uma solução de Folin Ciocalteau 6,67% em água e $50 \mu\text{L}$ das amostras analisadas, incluindo a solução de ácido gálico em diferentes concentrações. Aguardou-se 3 minutos e adicionou-se $50 \mu\text{L}$ de uma solução de Na_2CO_3 200 mg.mL^{-1} . Após a adição de todos os reagentes, aguardou-se o tempo para reação de 2 horas e realizou-se a medida das absorvâncias a 750 nm . Esse ensaio baseia-se na reação do reagente de Folin-Ciocalteau com os fenóis presentes na amostra e na subsequente oxidação desses fenóis formando assim um composto azul (LENORE et al., 2005).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A preparação dos extratos dos capítulos, escapos e folhas de *A. divaricatus* foi realizada utilizando como método de extração a percolação e como solvente extrator o metanol, isto porque, em trabalhos anteriores realizados com espécies de Eriocaulaceae para extração dos compostos polares, essa metodologia de extração foi seguida sendo observada um maior rendimento na obtenção dos extratos e extração dos metabólitos de interesse (PACIFICO et al., 2011; ZANUTTO, 2013).

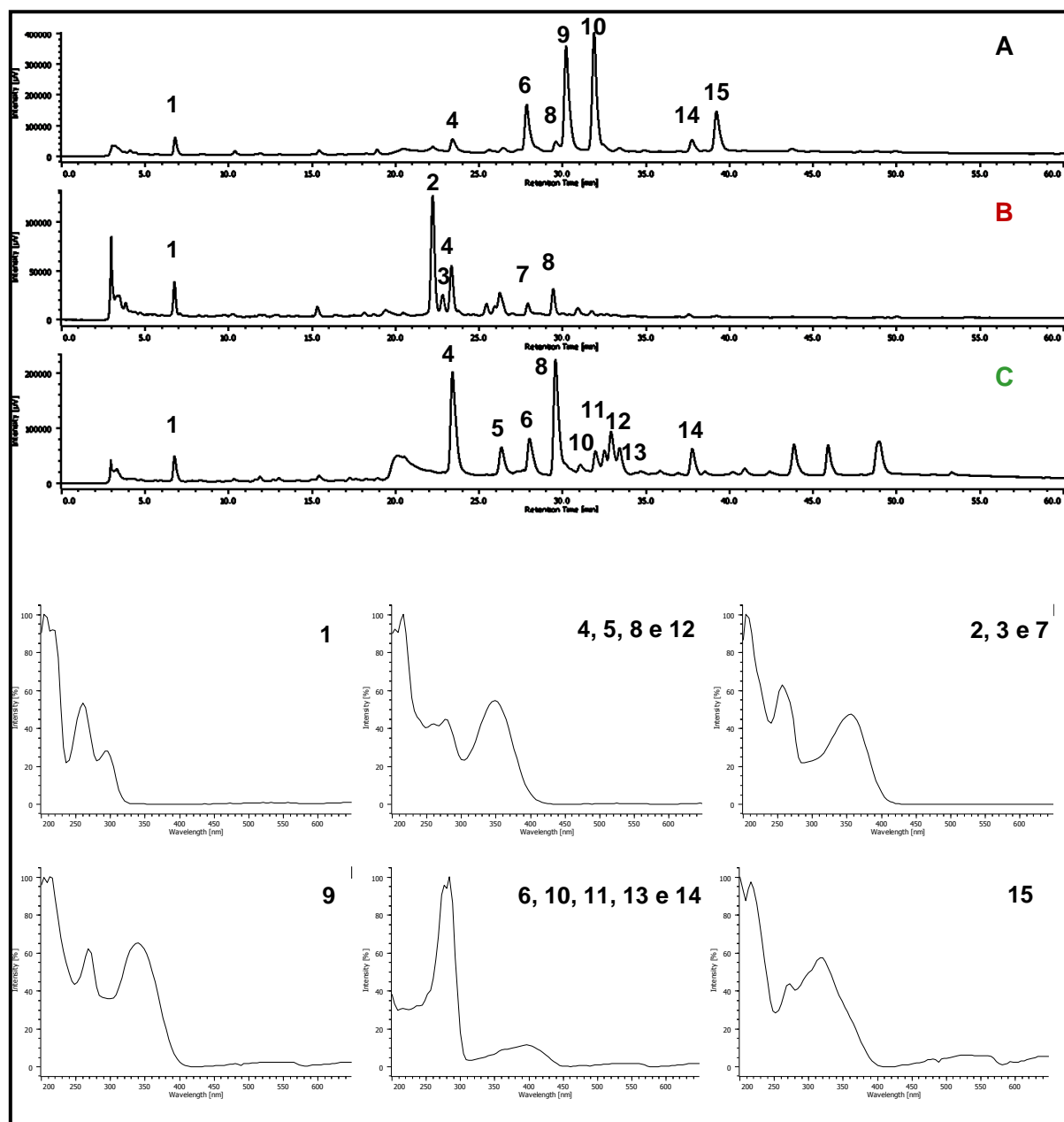
O rendimento de cada extrato também foi avaliado, sendo o melhor rendimento obtido para os escapos (Tabela 3). Essa diferença pode ser atribuída à melhor extração dos metabólitos secundários devido à relação da polaridade do solvente extrator e dos metabólitos secundários que constituem essa parte da planta.

Tabela 3 - Quantidade obtida dos extratos preparados da espécie *A. divaricatus*.

Parte da planta	Massa de planta seca moída (g)	EMeOH (g - %)
Capítulos	95,00	11,64 - 12,25
Escapos	129,53	24,27 - 18,74
Folhas	481,37	37,99 - 7,89

O baixo rendimento dos extratos tem sido uma das dificuldades no estudo de Eriocaulaceae: obter massa suficiente para o fracionamento, purificação e identificação dos compostos. Portanto, análises por técnicas acopladas como HPLC-PAD e HPLC-ESI-IT-MS/MS têm se tornado relevante nos estudos de extratos polares de Eriocaulaceae (SANTOS et al., 2001; PACIFICO et al., 2011). Assim, com o objetivo de realizar uma triagem fitoquímica rápida e identificar os compostos já conhecidos, realizou-se um perfil cromatográfico por HPLC-PAD para a determinação das classes de metabólitos majoritários dos extratos metanólicos de capítulos, escapos e folhas de *A. divaricatus*, que permitiram propor estratégias para o isolamento dos compostos presentes em cada extrato. A Figura 6 apresenta os cromatogramas monitorados em 270 nm e a Tabela 4 mostra a relação entre cada pico cromatográfico e a classe de metabólito secundário a que pertence.

Figura 6 - Cromatogramas do extrato bruto (metanólico) das partes aéreas de *A. divaricatus* por HPLC-PAD.



A) extrato metanólico dos capítulos; **B)** extrato metanólico dos escapos; **C)** extrato metanólico das folhas. Condições cromatográficas: coluna Thermo (250 x 4.60 mm, 4 μ m), HPLC-PAD (Jasco[®]), vazão 1 mL.min⁻¹, método gradiente 20% a 80% MeOH, 60 min.

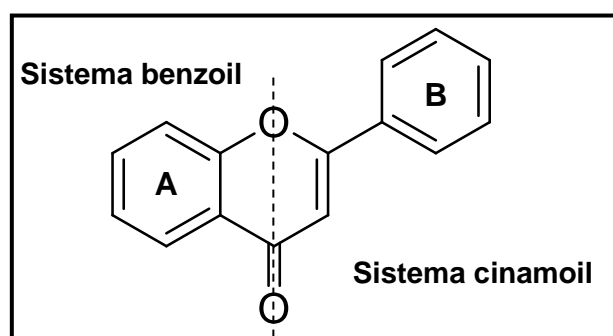
Tabela 4 - Bandas de absorção na região do UV para os metabólitos secundários identificados partes aéreas de *A. divaricatus*.

Pico	Tr (min)	Bandas de máximo de absorção (nm)	Atribuição	Parte da planta
1	6,80	260, 295	Ácido fenólico	Capítulos, escapos e folhas
2	22,18	256, 354	Flavonol	Escapos
3	22,80	256, 354	Flavonol	Escapos
4	23,38	258; 276, 347	Flavonol	Capítulos, escapos e folhas
5	26,29	258; 276, 347	Flavonol	Folhas
6	27,81	283	Naftopiranona	Capítulos e folhas
7	27,90	275, 347	Flavonol	Escapos
8	29,55	258; 276, 347	Flavonol	Capítulos, escapos e folhas
9	30,18	267, 338	Flavona	Capítulos
10	31,88	283	Naftopiranona	Capítulos e folhas
11	32,50	283	Naftopiranona	Folhas
12	32,86	258; 276, 347	Flavonol	Folhas
13	33,40	283	Naftopiranona	Folhas
14	37,74	283	Naftopiranona	Capítulos
15	39,21	271, 317	Não atribuído	Capítulos

Fonte: Adaptado de MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970.

O perfil químico por HPLC-PAD dos extratos metanólicos das partes aéreas de *A. divaricatus* (capítulos, escapos e folhas) evidenciou diferenças de metabólitos existentes nestas partes. Nos capítulos e folhas estão presentes as naftopiranonas e flavonoides enquanto que nos escapos apenas flavonoides.

Os flavonoides são reconhecidos por apresentarem a Banda II, com máximos na faixa espectral de 240-290 nm, atribuída ao anel A e da Banda I, com máximos na faixa espectral de 300-390 nm, atribuída ao anel B (MARKHAM, 1982; MERKEN; BEECHER, 2000) (Figura 7).

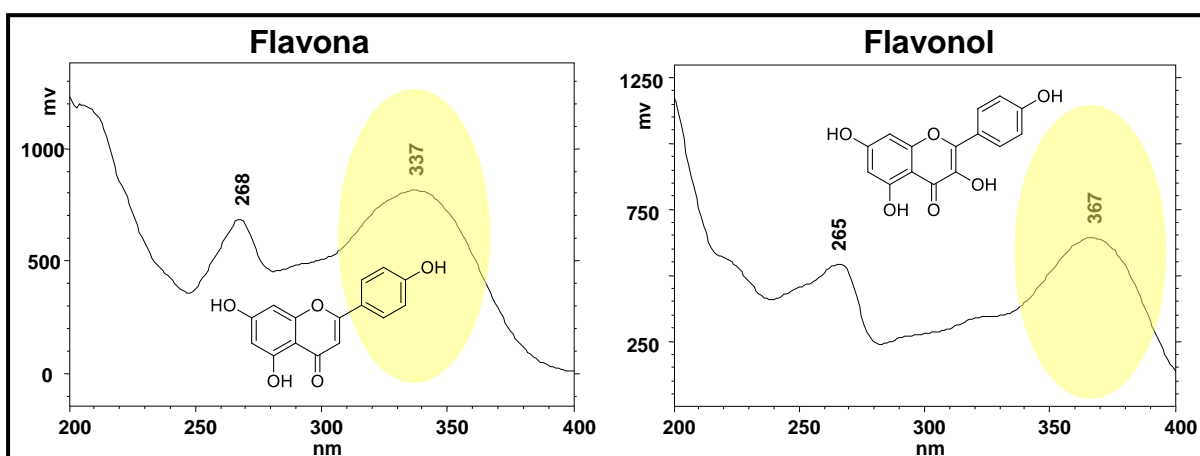
Figura 7 - Sistema benzoil e cinamoil.

Fonte: Adaptado de MARKHAM, 1982; MERKEN; BEECHER, 2000.

Os deslocamentos nos máximos de absorção das bandas I e II podem contribuir na diferenciação dos flavonoides. Assim, a análise dos espectros de UV permitiu detectar a presença majoritária de flavonóis em cada extrato avaliado. Entretanto, nos capítulos também foram observadas bandas de máximo de absorção características das flavonas.

A diferenciação dos espectros, entre uma flavona e um flavonol, pode ser verificada devido aos substituintes ligados na posição C-3 do núcleo do flavonoide, sendo hidrogênio, nas flavonas e o grupo hidroxila nos flavonóis. Por isso, a ligação do grupo hidroxila em C-3 tem o efeito significativo nos máximos de absorção dos flavonóis, dando deslocamentos batocrômicos nas bandas de absorção (BOHM, 1999). A banda I das flavonas ocorre na faixa de 304-350 nm, enquanto que a dos flavonóis aparece em 352-385 nm (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970) (Figura 8).

Figura 8 - Diferenciação nos espectros de UV de uma flavona e um flavonol.



Fonte: SILVA; RODRIGUES; VILEGAS, 2009.

Os espectros de absorção no UV para as naftopiranonas também foram confirmados com dados da literatura, uma vez que as naftopiranonas apresentam bandas bipartidas características em 270-273 nm (VILEGAS et al., 1999, PACIFICO et al., 2011).

Os espectros no UV mostraram também bandas características de ácidos fenólicos em 254-300 nm (RODRIGUES et al., 2008).

a) Estudo das frações de capítulos, escapos e folhas

Os extratos metanólicos das três partes da planta foram submetidos à partição líquido-líquido com solventes de polaridade crescente a fim de se obter um *clean up* adequado dos extratos polares (YUNES; CALIXTO, 2001), sendo que na fração acetato de etila estão presentes as agliconas e alguns monoglicosídeos e na fração *n*-butanólica, os compostos mais polares, como diglicosídeos e saponinas.

O rendimento para cada fração está apresentado na Tabela 5.

Tabela 5 - Quantidade obtida das frações a partir do extrato bruto e seus rendimentos.

Parte da planta	Fr. AcOEt (g - %)	Fr. <i>n</i> -BuOH (g - %)
Capítulos*	0,7593 - 18,98	0,8307 - 20,77
Escapos*	0,7731 - 19,33	1,8773 - 46,93
Folhas**	1,8999 - 23,71	1,6419 - 20,52

*partição realizada com 4 g de extrato metanólico; **8 g de extrato

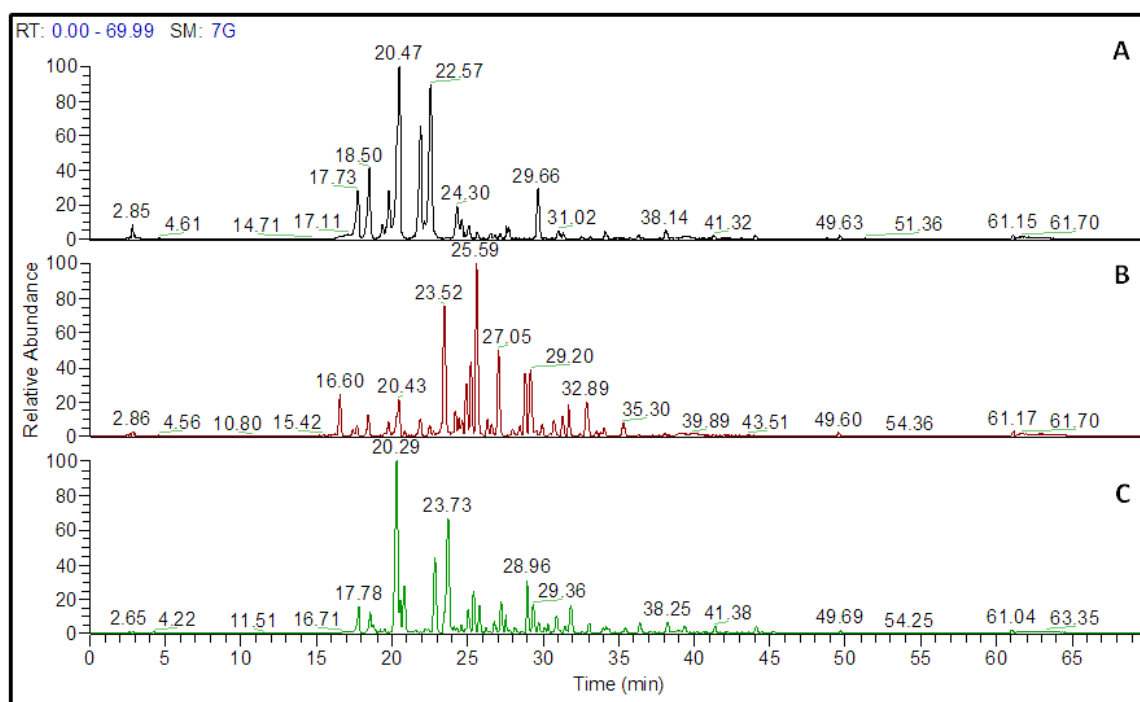
O maior rendimento calculado para capítulos e escapos foi para as frações *n*-butanólica, sendo possível estimar que a metodologia empregada concentrou os metabólitos de maior polaridade nesses extratos, enquanto que para o extrato metanólico das folhas o maior rendimento calculado foi para a fração acetato de etila, estimando assim uma maior concentração dos compostos de media polaridade nesse extrato.

4.1 Análises por LC-ESI-MS

A caracterização e diferenciação das três partes da planta (capítulos, escapos e folhas) foi realizada utilizando LC-ESI-MS/MS de alta resolução. Ao acoplar um sistema de separação como o HPLC (sistema de separação de escolha) ao espectrômetro de massas, se obtém a seletividade e a sensibilidade ideais para obtermos informações estruturais de uma matriz biológica complexa, como por exemplo, um extrato vegetal (RODRIGUEZ-ALLER et al., 2013; WOLFENDER et al., 2015). Além disso, a utilização de um espectrômetro de massas de alta resolução combina uma exatidão elevada da massa (MARI et al., 2015). Então, para a

identificação e proposta dos compostos encontrados, foi utilizada uma biblioteca de metabólitos e uma base de dados de referência. Uma vez que foi utilizado um dispositivo de alta resolução com auxílio do *software* Xcalibur 2.0, a massa e as fórmulas moleculares de cada composto puderam ser determinadas com um elevado grau de similaridade para cada pico detectado. O perfil metabólico de cada extrato metanólico das partes aéreas de *A. divaricatus* apresentou um boa resolução na separação cromatográfica dos compostos (Figura 9) permitindo identificar no espectro de massas de primeira ordem os sinais dos íons moleculares das moléculas desprotonadas [M-H]⁻.

Figura 9 - Perfil por HPLC-ESI-MS do extrato metanólico das partes aéreas de *A. divaricatus*.

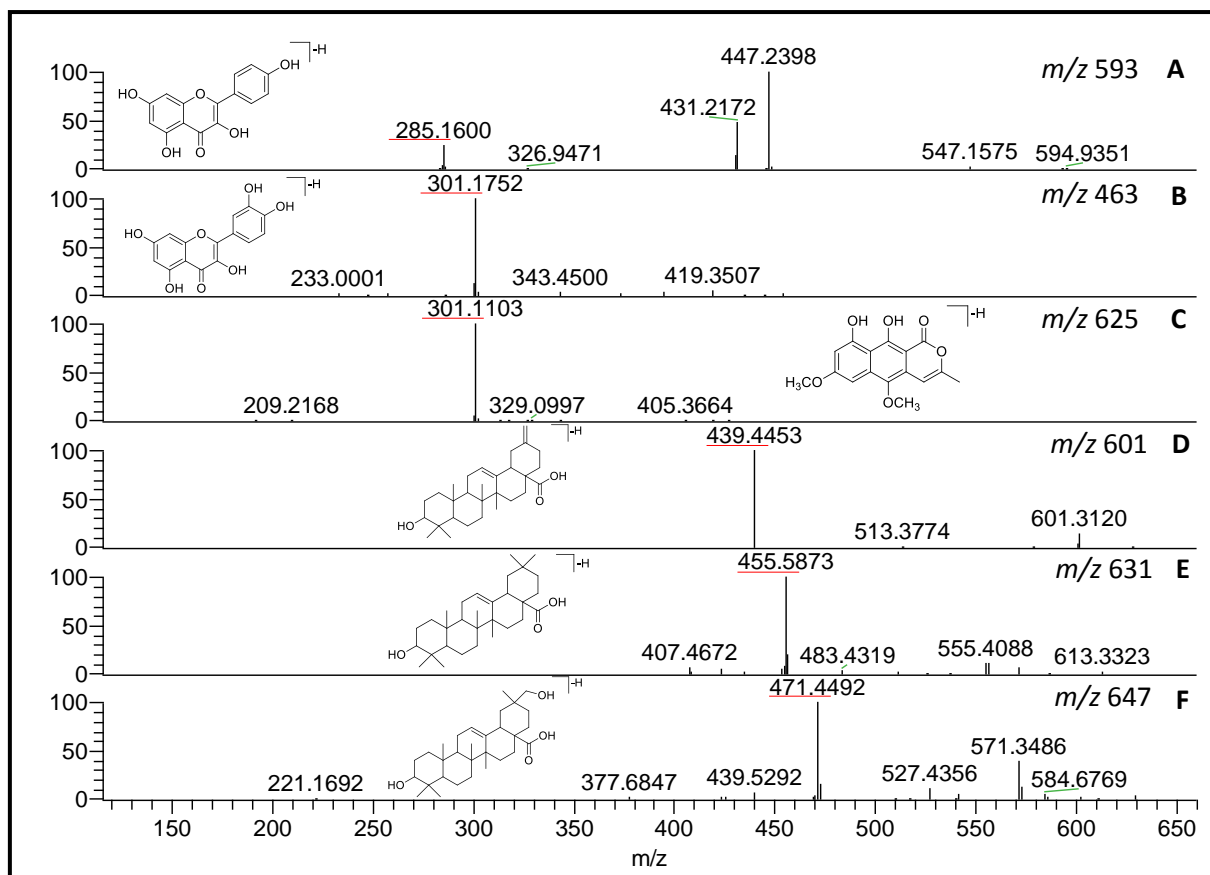


A) capítulos, B) escapos, C) folhas. Para condições cromatográficas ver seção experimental.

Uma análise mais minuciosa dos espectros de ESI-MS/MS registrados para cada pico cromatográfico permitiu atribuir três classes distintas de metabólitos: flavonoides, naftopiranonas e saponinas (Figura 10). Análise do espectro ESI-MS/MS revelou a presença de flavonoides nos extratos metanólicos dos capítulos (**3-5, 7, 11 e 12**), escapos (**1-5 e 7**) e folhas (**3-11**). As naftopiranonas foram identificadas apenas nos capítulos (**17**) e nas folhas (**13-17**). Neste estudo, o padrão de fragmentação de massa por ESI-MS também permitiu identificar a presença de

saponinas nos escapos (18-31) e nas folhas (21-24 e 26-30), sendo que esta classe de compostos é identificada pela primeira vez em espécies de Eriocaulaceae, sendo possível auxiliar na discussão taxonômica do gênero *Actinocephalus*. As Tabelas 6, 7 e 8 apresentam os compostos identificados nos capítulos, escapos e folhas.

Figura 10 - Espectros representativos de ESI-MS/MS para distinguir as três classes de metabólitos por meio de identificação da aglicona.



flavonoides: (A) kaempferol e (B) quercetina; naftopirranonas: (C) paepalantina e saponinas: (D, E, F) diferentes tipos para o esqueleto olean-12-eno.

Tabela 6 - Estruturas propostas de flavonoides e naftopiranonas das partes aéreas de *A. divaricatus* identificadas por HPLC-ESI-HRMS/MS.

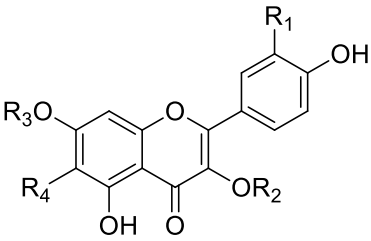
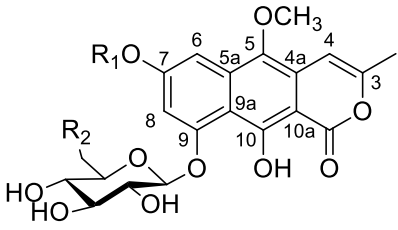
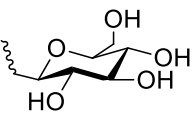
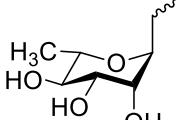
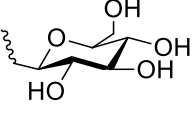
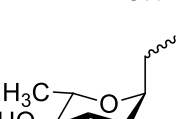
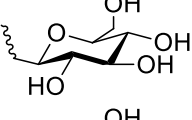
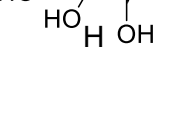
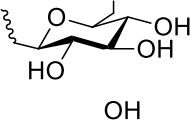
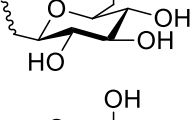
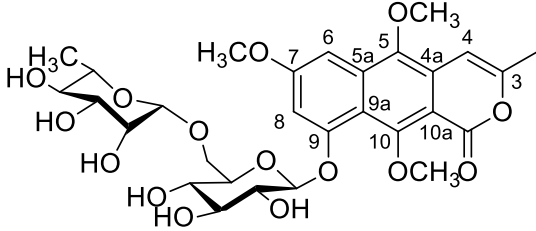
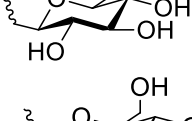
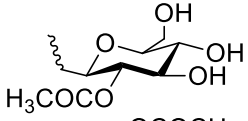
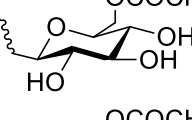
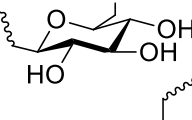
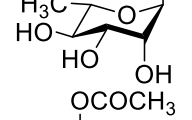
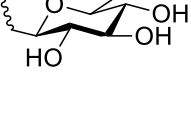
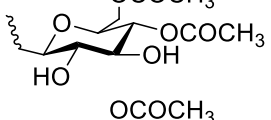
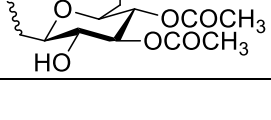
FLAVONOIDES					NAFTOPIRANONAS	
						
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₁	R ₂
1	OH			H	13	H
2	H			H	14	CH ₃
3	OH			OH	15	H
4	OH		CH ₃	OH	17	OH
5	OH		H	H		
6	H		CH ₃	OH	16	
7	OH		CH ₃	OH		
8	OH		H	H	16	
9	OH		CH ₃	H		
10	OH			CH ₃	16	
11	OH		CH ₃	OH		
12	OH		CH ₃	H	16	

Tabela 7 - Estruturas propostas de saponinas das partes aéreas de *A. divaricatus* identificadas por HPLC-ESI-HRMS/MS.

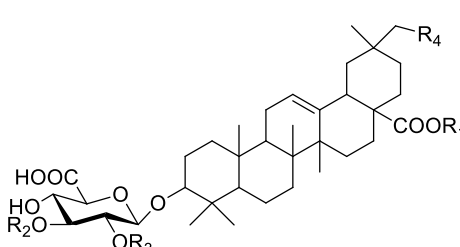
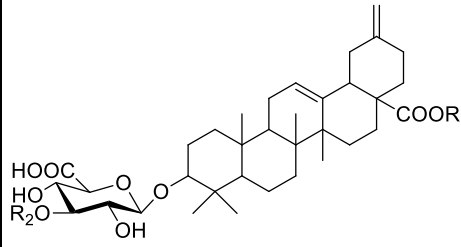
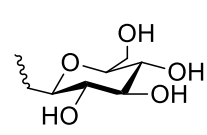
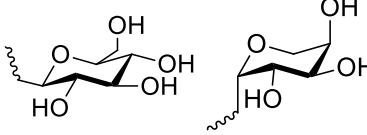
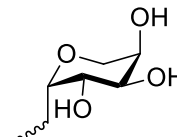
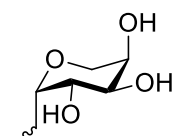
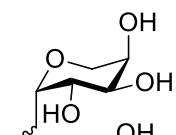
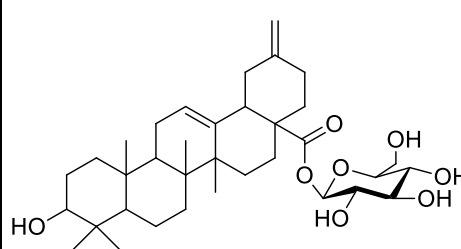
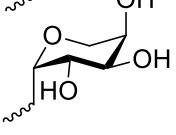
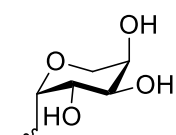
SAPONINAS					
					
R₁	R₂	R₃	R₄	R₁	R₂
18	H		H	22	
19	H	H	H	23	H
20	H	H	OH	30	
21		H	OH		
24	H	H	H		
25		H	H	31	
26	H		H		
27	H	H	OH		
28	H		OH		
29	H	H			

Tabela 8 - Proposta de identificação dos compostos fenólicos e saponinas das partes aéreas de *A. divaricatus* por LC-MS e MS/MS.

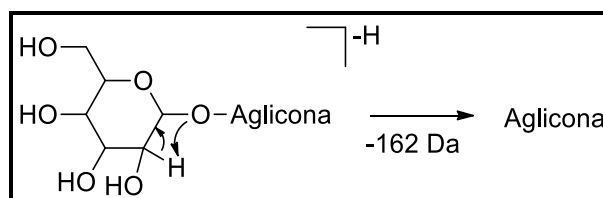
Tr (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	Íons de fragmentação (m/z)	Composto	Parte da planta	Literatura
FLAVONOIDES					
16.66	609.1433	463, 447, 301	quercetina-3-O-β-D-glicopiranosil-7-O-α-L-rhaminopiranosídeo (1)	Escapos	KACHLICKI et al., 2008
17.41	593.1483	447, 431, 285	kaempferol-3-O-β-D-glicopiranosil-7-O-α-L-rhaminopiranosídeo (2)	Escapos	KACHLICKI et al., 2008
17.76	479.0807	456, 435, 400, 359, 341, 317	6-hidroxi-quercetina-7-O-β-D-glicopiranosídeo (3)	capítulos, escapos, folhas	HEILMANN; MULLER; MERFORT, 1999
18.55	493.0964	331, 316, 287	6-hidroxi-7-metoxiquercetina-3-O-β-D-glicopiranosídeo (4)	capítulos, escapos, folhas	VILEGAS et al., 1999b
19.20	463.1223	301	quercetina-3-O-β-D-glicopiranosídeo (5)	capítulos, escapos, folhas	KACHLICKI et al., 2008
20.3	477.1017	315, 300, 287, 272	6-hidroxi-7-metoxikaempferol-3-O-β-D-glicopiranosídeo (6)	Folhas	SANTOS; SALATINO, 2000
20.52	535.1071	517, 493, 475, 330, 315, 287	6-hidroxi-7-metoxiquercetina-3-O-β-D-2"-O-acetilglicopiranosídeo (7)	capítulos, escapos, folhas	-
21.71	505.2994	301	quercetina-3-O-β-D-6"-O-acetilglicopiranosídeo (8)	Folhas	CHEN et al., 2015
22.07	519.1126	315, 300	7-metoxiquercetina-3-O-β-D-6"-O-acetilglicopiranosídeo (9)	Folhas	NEGRI; TABACH, 2013
22.42	639.1327	493, 331, 316, 287	6-metoxiquercetina-7-O-β-D-glicopiranosil-(6"→1")-O-α-L-rhaminopiranosídeo (10)	Folhas	-
22.63	577.1171	535, 517, 330, 315, 303, 287	6-hidroxi-7-metoxiquercetina-3-O-β-D-4",6"-diacetilglicopiranosídeo (11)	capítulos, folhas	-
24.30	619.1275	577, 559, 535, 330, 315	7-metoxiquercetina-3-O-β-D-3",4",6"-triacetilglicopiranosídeo (12)	Capítulos	-

Tr (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	Íons de fragmentação (m/z)	Composto	Parte da planta	Literatura
NAFTOPIRANONAS					
20.86	611.1590	596, 287, 272, 243	7,10-diidroxí-5-metoxi-3-metil-1H-nafto [2,3 c] piran-1-ona-9-O-β-D-glicopiranosil-(6→1)-O-β-D-glicopiranosídeo (13)	Folhas	AMARAL et al., 2012
22.15	625.1747	301, 286, 243	10-hidroxí-5,7-dimetoxi-3-metil-1H-nafto [2,3 c] piran-1-ona-9-O-β-D-glicopiranosil-(6→1)-O-β-alopiranosídeo (14)	Folhas	VILEGAS et al., 1997
22.84	449.1068	434, 287, 272	7,10-diidroxí-5-metoxi-3-metil-1H-nafto [2,3 c]piran-1-ona-9-O-β-D-glicopiranosídeo (15)	Folhas	AMARAL et al., 2012
23.72	623.1381	315, 300, 271, 243	5,7,10-trimetoxi-3-metil-1H-nafto [2,3 c] piran-1-ona-9-O-β-D-glicopiranosil-(6→1)-O-α-L-rhaminopiranosídeo (16)	Folhas	-
24.79	463.1223	301, 286, 243	10-hidroxí-5-7-dimetoxi-3-metil-1H-nafto[2,3c]piran-1-ona-9-O-β-D-glicopiranosídeo (17)	capítulos, folhas	VILEGAS et al., 1997; SANTOS et al., 2001
SAPONINAS					
23.19	1087.4889	925, 763, 631, 455	Ácido 3-O-[β-D-glicuronopiranosil (2→1)]-β-D-glicopiranosil-olean-12-en-28-óico-28-O-[α-L-arabinopiranosil (4→1)]-β-D-glicopiranosil éster (18)	Escapos	TAN; ZHOU; ZHAO, 1999
23.51	793.4346	631, 455	Ácido 3-O-β-D-glicuronopiranosil-olean-12-en-28-óico-28-O-β-D-glicopiranosil éster (19)	Escapos	VIDAL-OLLIVIER et al., 1989; MADL et al., 2006.
24.97	809.4291	647, 471, 410	Ácido 3-O-β-D-glicuronopiranosil-29-hidroxí-olean-12-en-28-óico-28-O-β-D-glicopiranosil éster (20)	Escapos	PÖLLMANN et al., 1997
25.07	941.4706	779, 647, 471, 410	Ácido 3-O-[β-D-glicuronopiranosil (3→1)]-α-L-arabinopiranosil-29-hidroxí-olean-12-en-28-óico-28-O-β-D-glicopiranosil éster (21)	escapos, folhas	-

Tr (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	Íons de fragmentação (m/z)	Composto	Parte da planta	Literatura
25.4	909.4449	747, 615, 439, 393	Ácido 3-O-[β-D-glicuronopiranosil (3→1)]-α-L-arabinopiranosil-30-norolean-12,20(29)-dien-28-óico-O-β-D-glicopiranosil éster (22)	escapos, folhas	HAMED et al., 2011
25.79	777.4036	615, 439	Ácido 3-O-β-D-glicuronopiranosil-30-norolean-12,20(29)-dien-28-óico-28-O-β-D-glicopiranosil éster (23)	escapos, folhas	ESPADA et al., 1990
26.78	925.4759	793, 763, 701, 631, 569, 523, 483, 455	Ácido 3-O-[β-D-glicuronopiranosil (4→1)]-α-L-arabinopiranosil-olean-12-en-28-óico-28-O-β-D-glicopiranosil éster (24)	escapos, folhas	LI et al., 2010
27.77	895.4292	763, 631, 455	Ácido 3-O-[β-D-glicuronopiranosil (2,3→1,1)]-α-L-diarabinopiranosil-olean-12-en-28-óico-28-O-β-D-arabinopiranosil éster (25)	Escapos	KAWAMURA; HITOSHI; OSHIO, 1988
28.96	763.3876	631, 455	Ácido 3-O-[β-D-glicuronopiranosil (3→1)]-α-L-arabinopiranosil-olean-12-en-28-óico (26)	escapos, folhas	LI et al., 2010
29.36	631.3459	455	Ácido 3-O-β-D-glicuronopiranosil-olean-12-en-28-óico (27)	escapos, folhas	VIDAL-OLLIVIER et al., 1989
30.92	779.4191	647, 471	Ácido 3-[β-D-glicuronopiranosil (3→1)]-α-L-arabinopiranosil-29-hidroxi-olean-12-en-28-óico (28)	escapos, folhas	-
31.44	647.3768	471	Ácido 3-O-β-D-glicuronopiranosil-29-hidroxi-olean-12-en-28-óico (29)	escapos, folhas	-
31.87	747.3926	615, 439	Ácido 3-O-[β-D-glicuronopiranosil (3→1)]-α-L-arabinopiranosil-30-norolean-12,20(29)-dien-28-óico (30)	escapos, folhas	ESPADA et al., 1991
33.49	601.2916	439	Ácido 30-norolean-12,20(29)-dien-28-óico-28-O-β-D-glicopiranosil éster (31)	Escapos	NAKAMURA et al., 2010

O estudo dos padrões de fragmentação de cada íon permitiu diferenciar e determinar o grau de glicosilação das moléculas identificadas, além de evidenciar a natureza glicosídica em todos os metabólitos glicosilados no extrato metanólico, devido as perdas características de uma ou duas unidades de açúcar a partir dos respectivos íons precursores $[M-H]^-$. Portanto, para as moléculas identificadas, o glicosídeo foi estabelecido pelo padrão de clivagem da ligação O-glicosídica com o rearranjo dos átomos de hidrogênio do grupo hidroxila da unidade de sacarídeo seguida da eliminação do monossacarídeo com perdas de 162 Da (hexose), 146 Da (deoxihexose) ou 132 Da (pentose) (Figura 11) (CABRERA, 2006; CUYCKENS; CLAEYS, 2004).

Figura 11 - Padrão de fragmentação para moléculas O-glicosiladas com o rearranjo de hidrogênios.



Fonte: modificado de CUYCKENS; CLAEYS, 2004

A posição dos glicosídeos nos flavonóis também pode ser sugerida de acordo com a análise da intensidade dos sinais dos íons produtos da molécula desprotonada da aglicona, em que os flavonoides 3-O-glicosilados apresentam uma abundância relativa dos íons produtos formados, superior à abundância relativa dos íons produtos decorrentes da fragmentação de flavonoides 7-O-glicosilados (VUKICS; GUTTMAN, 2008). Além da posição dos glicosídeos, os íons produtos formados podem caracterizar fragmentos de flavonoides O-diglicosilados e di-O-glicosilados, permitindo a diferenciação de ligações interglicosídicas. A sequência glicosídica na aglicona e a distribuição dos resíduos de açúcar para os flavonoides di-glicosilados m/z 609 (composto **1**) e m/z 639 (composto **10**) podem ser distinguidos por meio da análise dos íons produtos formados: Y_1 , Y_0 , Z_1 (VUKICS; GUTTMAN, 2008) (Figura 12). No espectro de segunda ordem do íon m/z 639, observou-se o fragmento Z_1 , o que implica que uma unidade de açúcar está ligada a outro açúcar e não diretamente ao flavonoide (Figura 12). Além disso, para o íon m/z 609, este fragmento não foi observado e a abundância relativa dos fragmentos

caracteriza um flavonoide di-O-glicosilado, com os glicosídeos ligados nas posições C-3 e C-7 do flavonoide (Figura 13). Este composto foi, subseqüentemente, isolado e identificado por experimentos de RMN, confirmando a posição glicosídica.

Figura 12 - Padrão de fragmentação de ligações interglicosídicas observado no íon m/z 639.

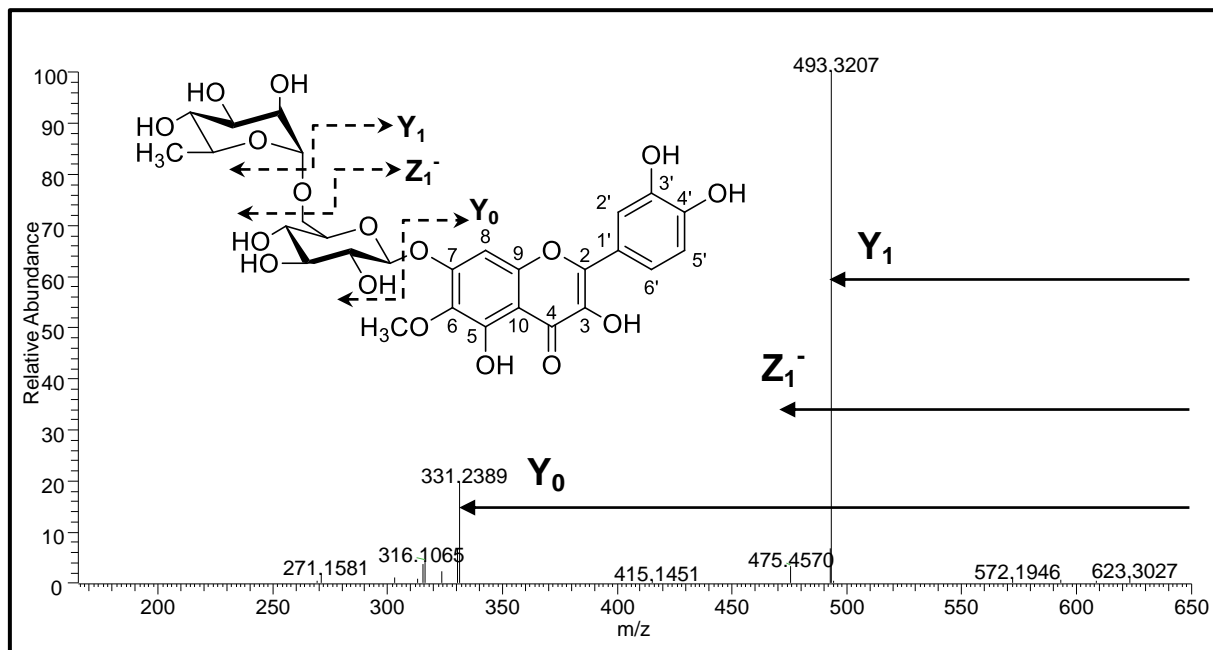
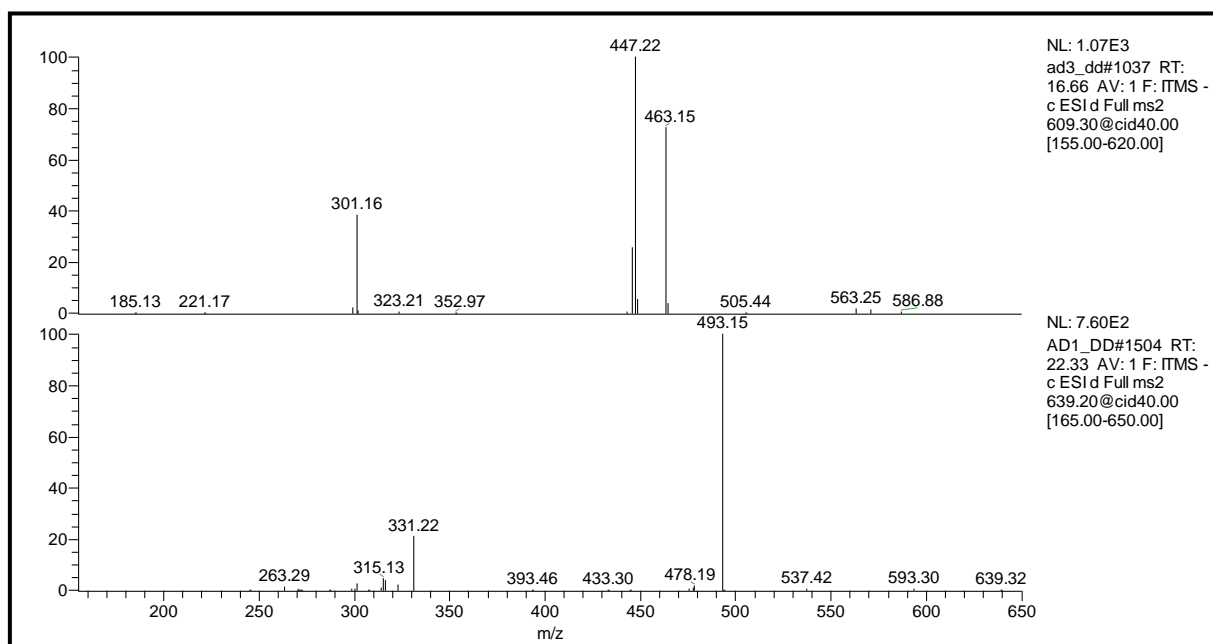


Figura 13 - Espectros ESI-MS/MS para os íons precursoros m/z 609 e m/z 639.



A análise dos espectros de massas de ESI-MS/MS dos íons precursores m/z 477 (composto **6**), m/z 493 (composto **4**), m/z 519 (composto **9**), m/z 535 (composto **7**), m/z 577 (composto **11**) e m/z 619 (composto **12**) em destaque são de flavonoides metoxilados (Figura 14).

A fragmentação de flavonoides metoxilados é bem descrita na literatura (JUSTESEN, 2001), confirmando que o íon fragmento específico do flavonoide metoxilado possui perdas de radicais metil quando analisados por eletrospray. Para estas moléculas, também foram observados um fragmento significativo em m/z 287 indicando as perdas concomitantes de 15 e 29 Da, referidos aos radicais $\bullet\text{CH}_3$ e $\text{HCO}\bullet$ sugerindo a substituição dos grupos metoxi no anel A do flavonoide (Figura 15) (JUSTESEN, 2001). Quando a posição C-6 do flavonoide não está substituída, este mecanismo não é possível e ocorre apenas a perda de 15 Da.

Figura 14 - Espectros ESI-MS/MS de flavonoides metoxilados.

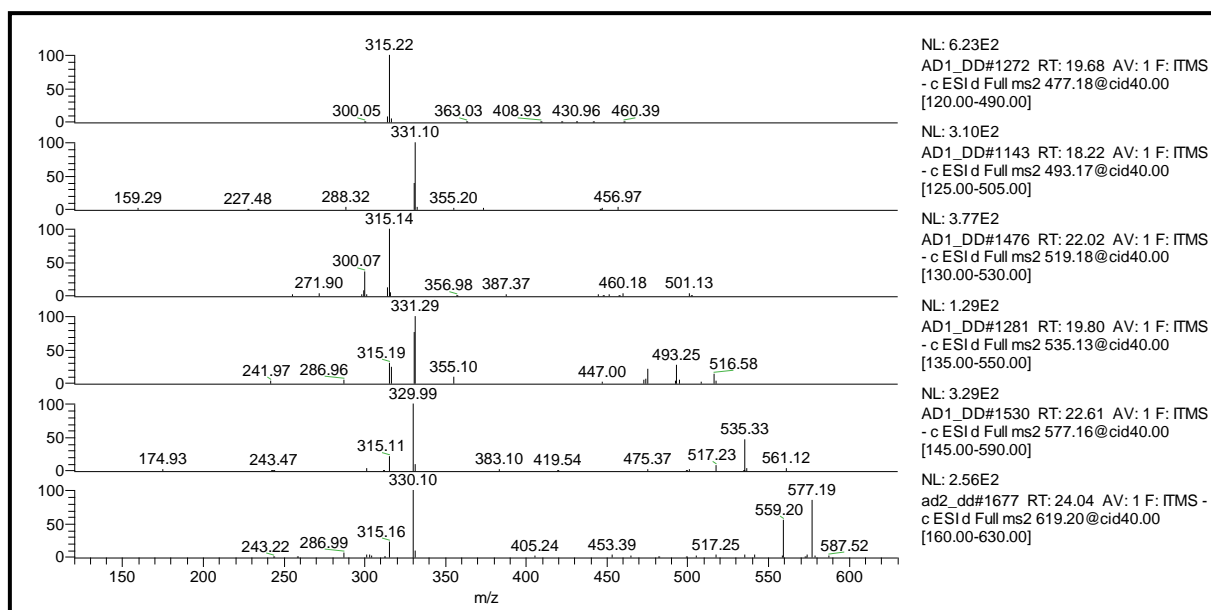
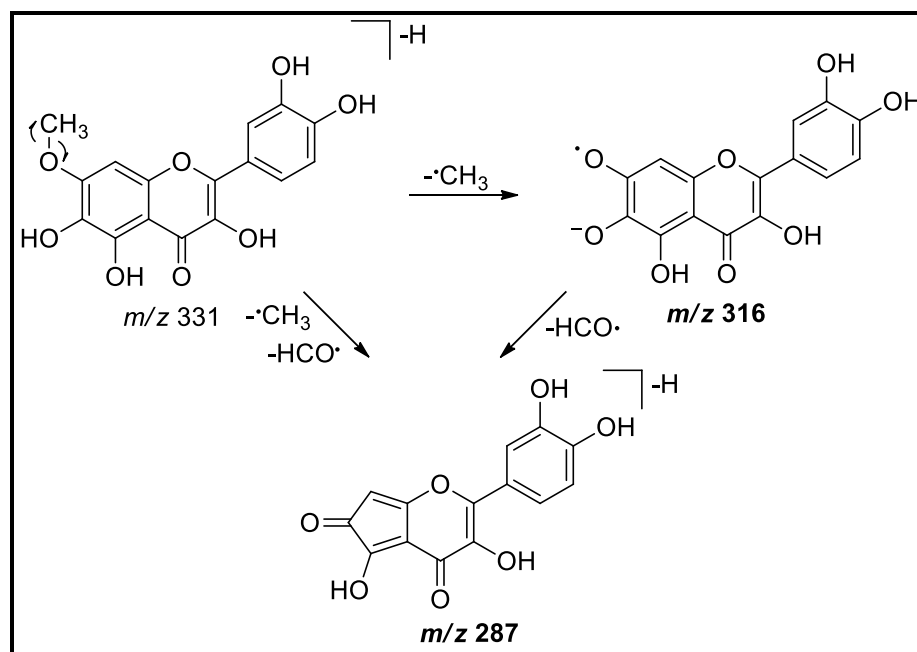
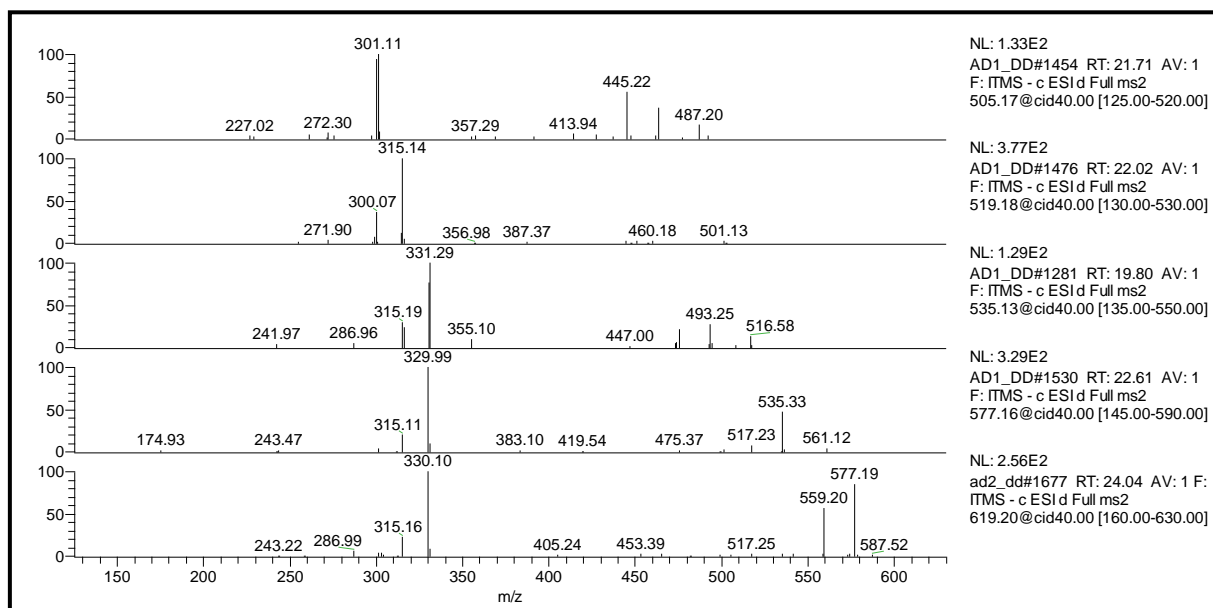


Figura 15 - Padrão de fragmentação de flavonoides metoxilados desprotonados.

Fonte: modificado de JUSTESEN, 2001.

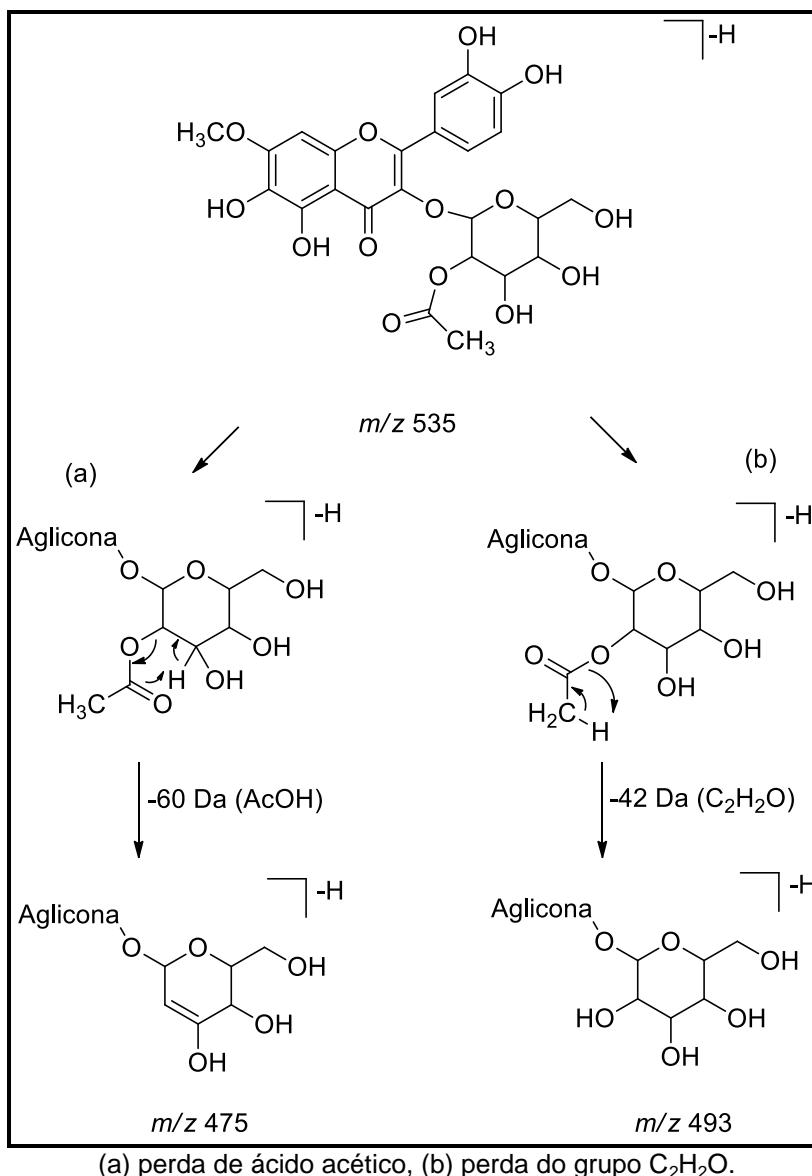
A análise do espectro de massas ESI-MS/MS dos íons precursores m/z 505 (composto **8**), m/z 519 (composto **9**), m/z 535 (composto **7**), m/z 577 (composto **11**) e m/z 619 (composto **12**) evidenciou perdas neutras relacionadas ao grupo acetil do açúcar ligado ao núcleo do flavonoide ($[\text{M}-42-\text{H}]^-$) (Figura 16).

Figura 16 - Espectros ESI-MS/MS de flavonoides acil-glicosilados.



Por conseguinte, a fragmentação de segunda ordem do grupo acetil-hexose cliva de maneira intacta com um rearranjo de hidrogênios semelhante à eliminação de resíduos monossacarídicos (Figura 11), resultando em uma perda característica de 204 Da $[M-42-162-H]^-$ (CUYCKENS; CLAEYS, 2004) (Figura 13, Tabela 8). No entanto, também são observados sinais menos intensos, relativos à fragmentação do grupo acetil, tal como ocorre no íon m/z 535 (composto **7**). Para este íon, a perda de ácido acético, em m/z 475, $[M-60-H]^-$ foi acompanhada pela formação de uma ligação dupla entre C-6 e C-5 do acetil-hexose (Figura 17-a). Outro padrão de fragmentação observado é a perda do grupo C_2H_2O , formando o íon m/z 493 $[M-42-H]^-$ (Figura 17-b) (SETTEN et al., 1998). Espectros de RMN mono e bidimensionais do composto **Ad9** (**7**) isolado (discutido no item 4.2) permitiu sugerir a identidade da molécula e de seus derivados.

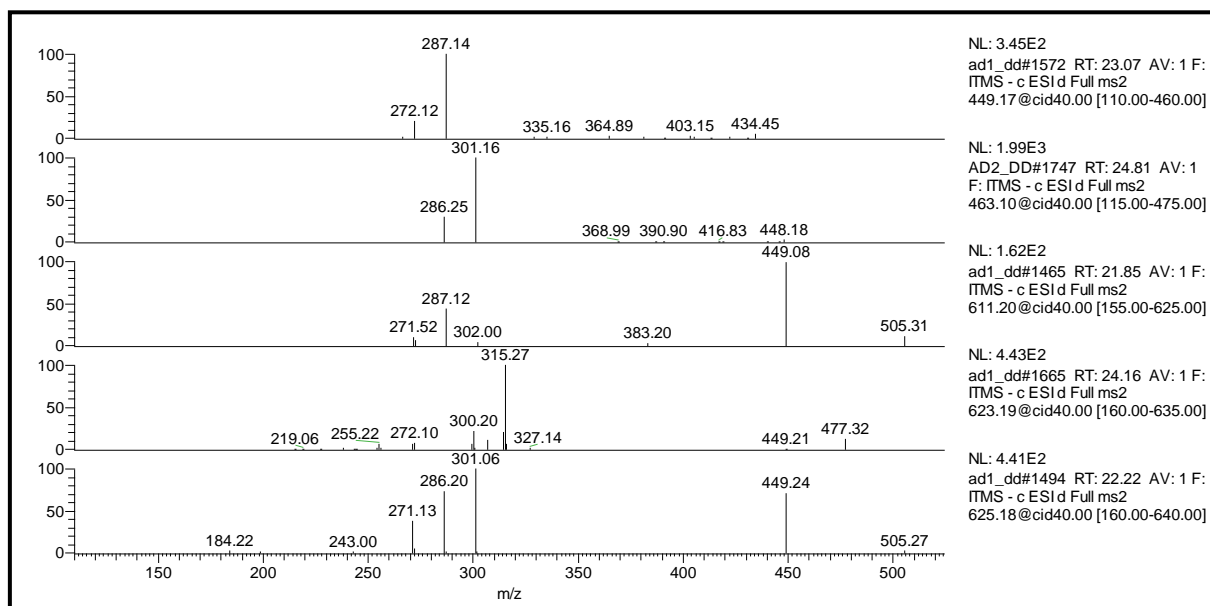
Figura 17 - Proposta de fragmentação do composto 7.



Fonte: modificado de SETTEN et al., 1998.

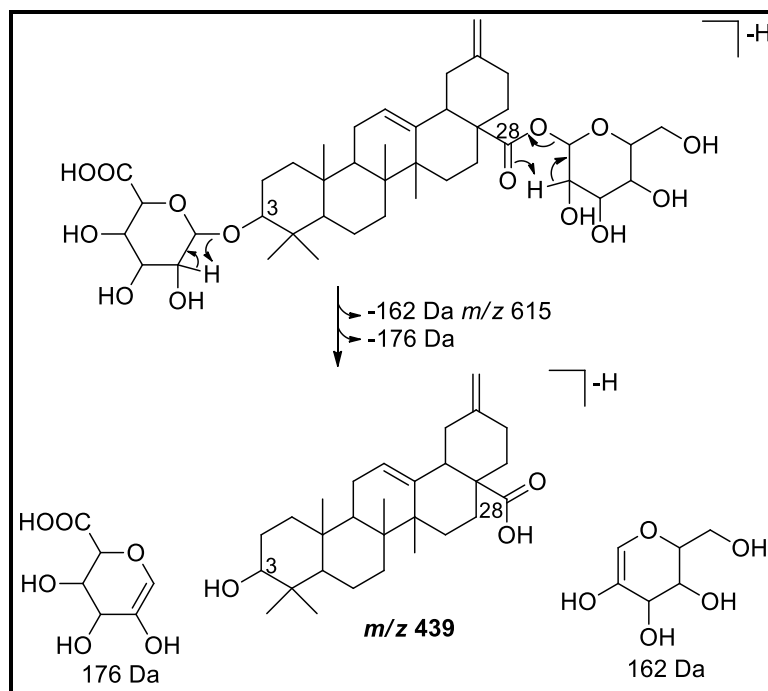
A análise do espectro de massas de ESI-MS/MS registrados para os íons com m/z 449 (composto **15**), m/z 463 (composto **17**), m/z 611 (composto **13**), m/z 623 (composto **16**) m/z 625 (composto **14**) mostraram padrões de fragmentação representativos da classe de naftopiranas derivadas da paepalantina (SANTOS et al., 2001) que se caracterizam principalmente pela presença de íons produto radicalar $[M-15-H]^+$ e outros produtos secundários formados a partir da perda de moléculas neutras (CO e H₂) (Figura 18) (Tabela 8) (AMARAL et al., 2012).

Figura 18 - Espectros ESI-MS/MS de naftopiranas.



Por fim, a análise dos espectros de massa de ESI-MS/MS para os íons com m/z próximos/acima de 700 Da apresentaram padrões de fragmentação característicos de saponinas com um esqueleto olean-12-eno (HOSTETTMANN; MARSTON, 1995). Dados da literatura (SETTEN et al., 1998) sugerem que a ligação interglicosídica na posição C-3 da aglicona da saponina (eterificada) podem ser estabelecidas pela análise dos padrões de fragmentações onde se observa uma clivagem semelhante à cisão dos monossacarídeos com rearranjo de hidrogênio, como demonstrado na Figura 11. Quando O-glicosídeo ocorrer em C-28 da aglicona da saponina (esterificada) é observado o mecanismo de rearranjo de McLafferty conforme demonstrado na Figura 14 (SETTEN et al., 1998).

Figura 14. Fragmentação da saponina **23** com rearranjo de hidrogênios para a eliminação dos substituintes.



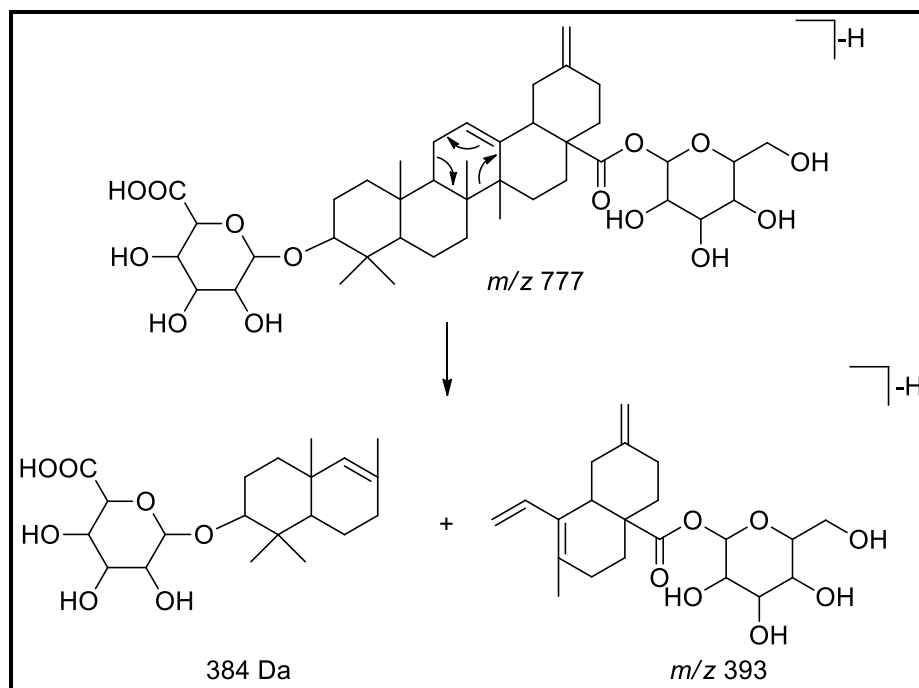
Fonte: modificado de SETTEN et al., 1998

A Tabela 8 apresenta os fragmentos das quatorze saponinas identificadas que apresentam três tipos de aglicona com íons produtos em m/z 439, 455 e 471 (compostos **18-31**). Assim, os íons representativos revelam características estruturais significativas na aglicona. Estas incluem a presença de uma ligação dupla em C12-C13 e os padrões de substituição dos anéis A, B, D e E (caracterizados pela fragmentação retro-Diels-Alder) (HOSTETTMANN; MARSTON, 1995). Um rearranjo retro-Diels-Alder a partir do esqueleto oleanano da aglicona na fragmentação MS/MS proporcionou íons fragmentos característicos no modo negativo. Estes íons foram úteis na previsão da estrutura da aglicona e na localização da posição dos monossacarídeos (Figura 19). Também foram observadas perdas de sequências de monossacarídeos (Figura 11), a presença de fragmentos da cadeia glicosídica e a perda de moléculas neutras como o CO_2 são informações importantes sobre os tipos de açúcar e as sequências de ligação (LI et al., 2010).

Tal para o íon m/z 777 (composto **23**) a saponina foi determinada pela perda consecutiva de 162 Da $[\text{M}-162-\text{H}]^-$ e 176 Da $[\text{M}-162-176-\text{H}]^-$, gerando o íon da aglicona em m/z 439 (Figura 20). Estas perdas neutras correspondem à hexose e ao ácido glucurônico, respectivamente. O mecanismo retro-Diels-Alder permitiu

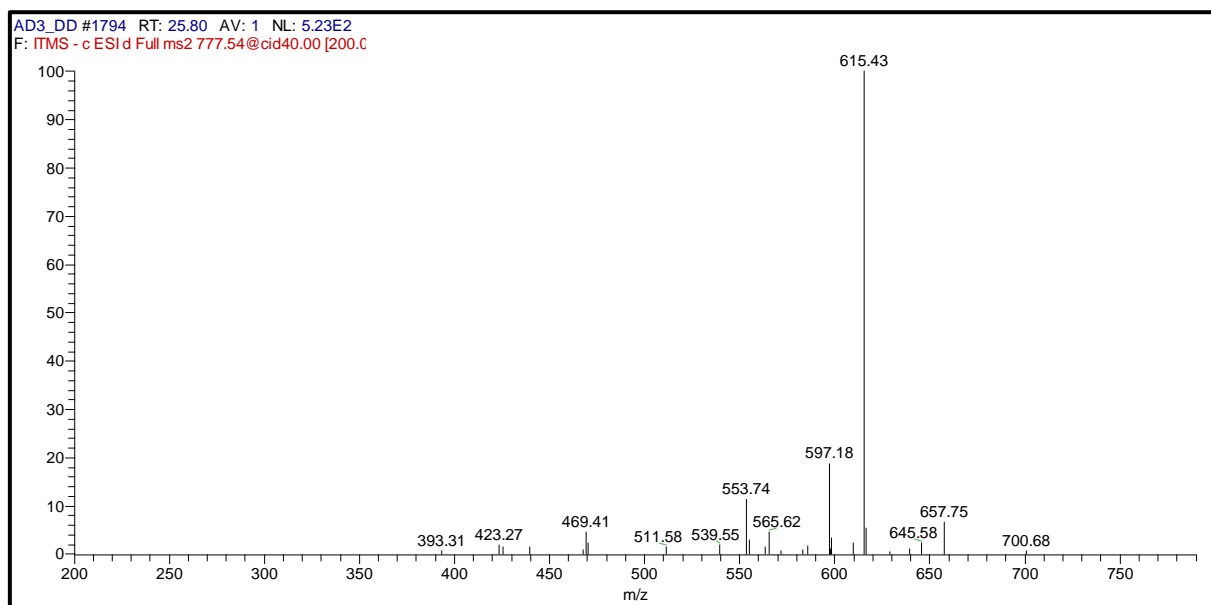
determinar as posições desses substituintes, em que a hexose está ligada em O-28 e o ácido glucurônico em O-3. A conectividade foi confirmada pelo íon produto gerado em m/z 393 (Figura 19).

Figura 19 - Exemplo de mecanismo retro-Diels-Alder para o composto **23**.



Fonte: modificado de HOSTETTMANN; MARSTON, 1995.

Figura 20 - Espectro ESI-MS/MS do íon precursor m/z 777 (composto **23**).



A fim de confirmar a estrutura proposta e a conectividade do açúcar na aglicona da saponina foi realizado o fracionamento e purificação do extrato metanólico dos escapos de *A. divaricatus* (descrito na seção 3.3.3). Deste fracionamento foi isolado o composto **Ad6 (23)**. Os espectros de RMN mono e bidimensionais desta substância (discutido no item 4.2) confirmaram a identidade da molécula.

Os íons fragmentos com m/z 471 foram detectados no ESI-MS/MS (Tabela 8). Com base na estrutura do composto **23** e comparando o padrão de fragmentação com a literatura, foi possível propor que na posição C-20 da saponina estão ligados um grupo CH_2OH e um grupo metila. Esta proposta pôde ser feita devido à posição da hidroxila que favorece a clivagem da ligação por meio de um rearranjo de hidrogênios resultando na perda neutra de 32 Da (metanol) (XIA et al., 2015). Este padrão de fragmentação foi observado nos compostos com m/z 809 (composto **20**), m/z 941 (composto **21**), m/z 779 (composto **28**) e m/z 647 (composto **29**) (Tabela 8).

O mesmo estudo dos padrões de fragmentação foi realizado para as agliconas com m/z 455 e 471 para a determinação da aglicona e dos substituintes. As Figuras 21 a 23 apresentam os espectros ESI-MS/MS para os três tipos de agliconas identificadas, m/z 439, 455 e 471.

Figura 21 - Espectros ESI-MS/MS para saponinas com aglicona m/z 439.

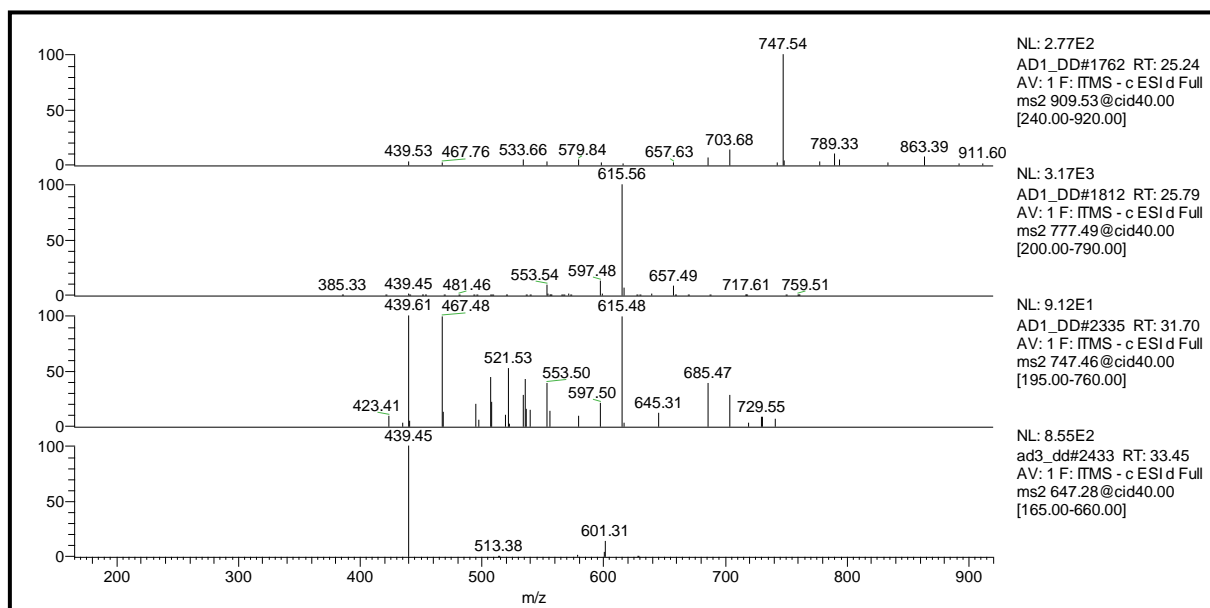
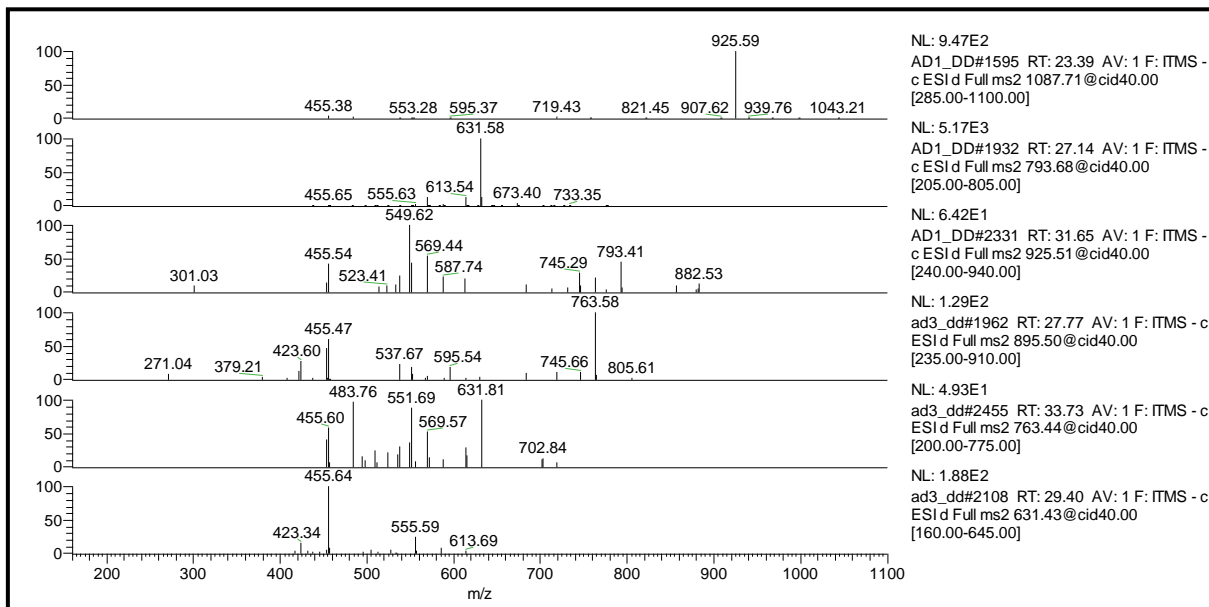
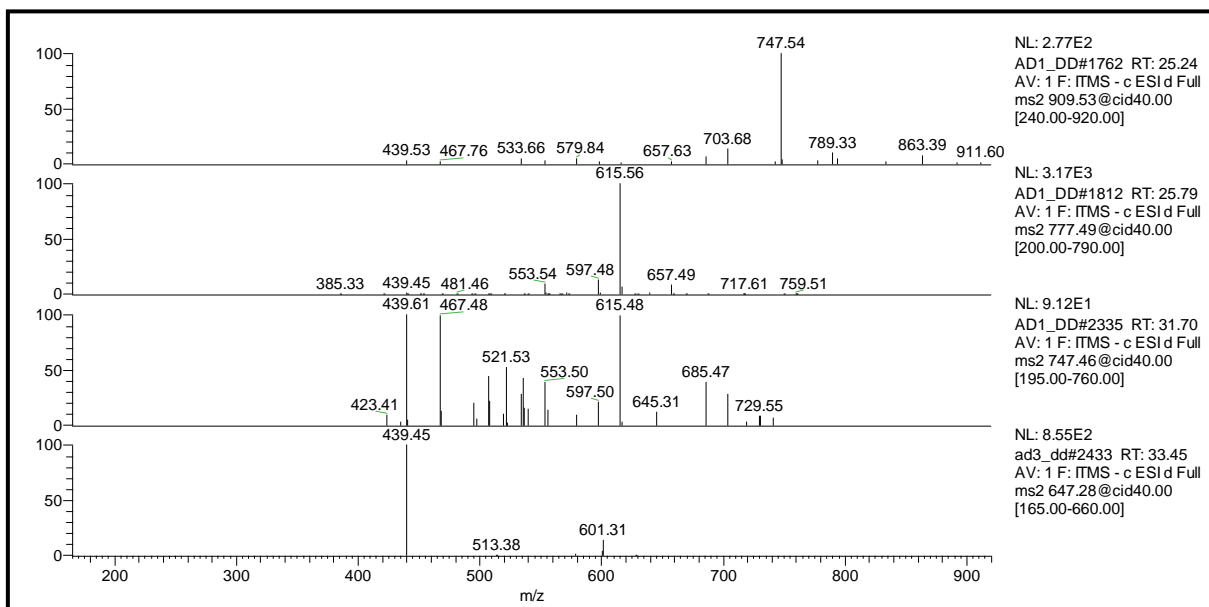


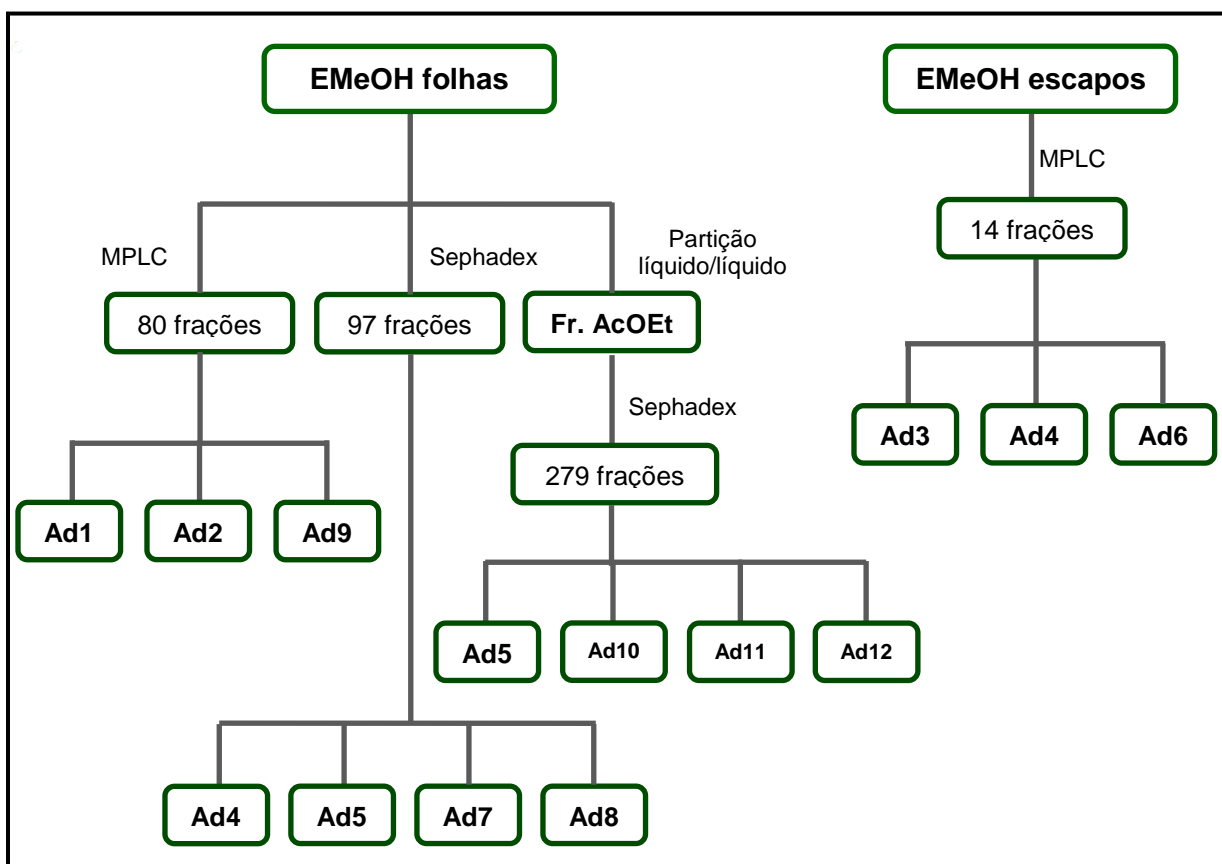
Figura 22 - Espectros ESI-MS/MS para saponinas com aglicona m/z 455.Figura 23 - Espectros ESI-MS/MS para saponinas com aglicona m/z 471.

4.2 Identificação dos compostos isolados dos extratos metanólicos das folhas e escapos

A análise preliminar qualitativa dos extratos por HPLC-PAD e LC-MS permitiu desenvolver estratégias significativas de separação em escala preparativa dos metabólitos de interesse. O estudo fitoquímico dos extratos metanólicos das folhas e escapos permitiu a obtenção de compostos isolados para complementar/auxiliar a identificação de alguns metabólitos encontrados no perfil por LC-MS e também na quantificação desses metabólitos por HPLC-PAD.

As etapas de isolamento de cada composto estão apresentadas na Figura 24.

Figura 24 - Fluxograma de isolamento dos compostos nos extratos metanólicos dos escapos e folhas.



4.2.1 Flavonoides

4.2.1.1 Identificação de Ad1

O espectro de RMN de ^1H de **Ad1** (Figura 25, Tabela 9), evidenciou sinais de deslocamentos químicos na região de hidrogênios aromáticos, característicos de um flavonoide derivado da quercetina. Os sinais em δ_{H} 7,62 (1H, d, $J = 2,2$ Hz) e em δ_{H} 7,61 (1H, dd, $J = 2,2; 8,3$ Hz) foram atribuídos ao H-2' e H-6', respectivamente. Outro sinal com deslocamento químico em δ_{H} 6,85 (1H, d, $J = 8,3$ Hz) correspondeu ao H-5'. O singlete em δ_{H} 6,84 é típico do H-8, quando o anel A é substituído na posição 6 (HARBORNE, 1996), indicando assim que o anel A está tetrassubstituído. O singlete com deslocamento químico em δ_{H} 3,91 (3H, s) foi atribuído aos hidrogênios metoxílicos. A posição do grupo metoxila foi determinada pelo deslocamento de seus hidrogênios, que quando ligados na posição C-7 da aglicona encontram-se mais desblindados (VILEGAS et al., 1999b). O sinal em δ_{H} 5,49 (d, $J = 7,5$ Hz) foi atribuído ao hidrogênio anomérico da unidade glicopiranosil com configuração β (HARBORNE, 1996). Os deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C puderam ser atribuídos a partir dos espectros de HSQC e HMBC (espectros não apresentados) (Tabela 9). A posição glicosídica na aglicona foi determinada pelos experimentos HMBC que mostraram correlações a longa distância entre o sinal do hidrogênio anomérico em δ_{H} 5,18 (H-1"glc) com o carbono em δ_{C} 133,6 (C-3). Portanto, diante dos dados apresentados de ^1H (Tabela 9), sugerimos para este composto a estrutura da 6-hidroxi-7-metoxiquercetina-3-O- β -D-glicopiranosídeo (Figura 26).

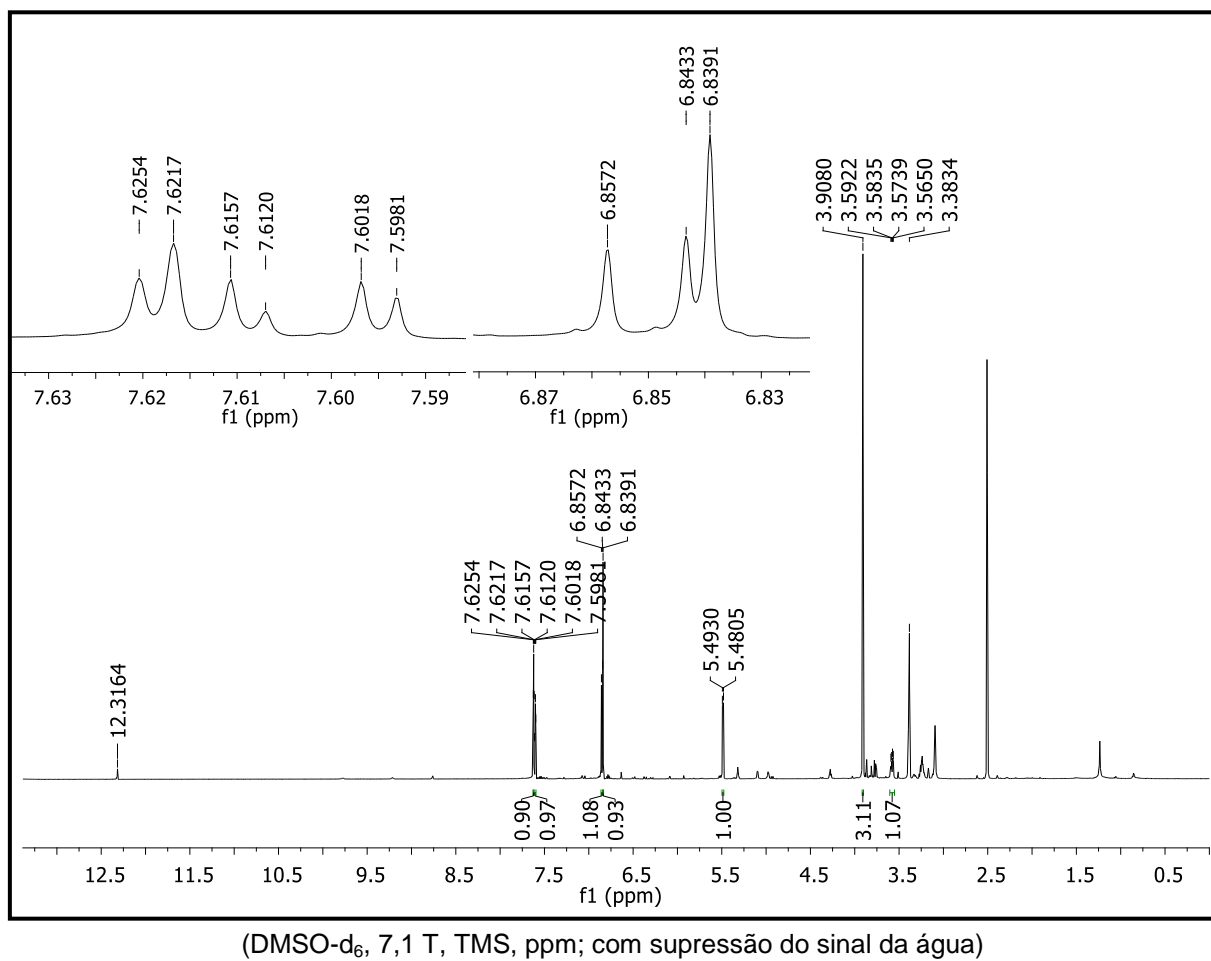
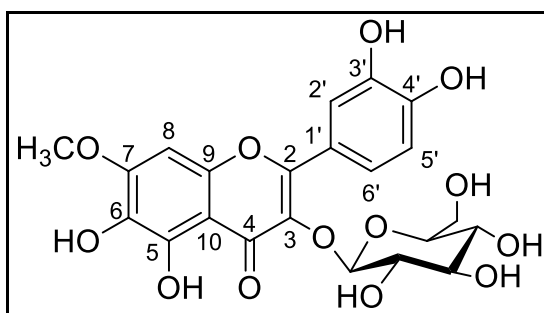
Figura 25 - Espectro RMN ^1H de Ad1.

Figura 26 - Estrutura do flavonoide Ad1.



4.2.1.2 Identificação de Ad3

O espectro de RMN de ^1H de **Ad3** (Figura 27, Tabela 9), evidenciou sinais de deslocamentos químicos na região de hidrogênios aromáticos, característicos de um flavonoide derivado da quercetina. O sinal em δ_{H} 7,62 (1H, d, $J = 1,8$ Hz) apresenta um hidrogênio com acoplamento em meta que foi atribuído ao H-2'; outro sinal indicando o acoplamento dos hidrogênios em orto/meta em δ_{H} 7,61 (1H, dd, $J = 1,8$; 9,0 Hz) ao H-6' e o sinal de deslocamento químico em δ_{H} 6,86 (1H, d, $J = 9,0$ Hz) referente ao acoplamento em orto do H-5'. Dois dupletos com deslocamentos químicos em δ_{H} 6,44 (1H, d, $J = 1,8$ Hz) e δ_{H} 6,80 (1H, d, $J = 1,8$ Hz) indicam hidrogênios meta-acoplados atribuídos aos hidrogênios H-6 e H-8 do anel A do flavonoide, confirmando a aglicona da quercetina. Os sinais em δ_{H} 5,49 (1H, d, $J = 7,2$ Hz) e δ_{H} 5,55 (1H, sl) foram atribuídos aos hidrogênios anoméricos sugerindo que o composto possui duas unidades glicosídicas. A constante de acoplamento do sinal em δ_{H} 5,49 indica uma configuração β para o açúcar (HARBORNE, 1996). Os experimentos de TOCSY com irradiação nos hidrogênios anoméricos confirmaram o sistema de spins de cada açúcar sendo possível atribuí-los a uma unidade de glicose e arabinose (Figuras 28 e 29). Os deslocamentos químicos de RMN ^{13}C foram atribuídos a partir dos espectros de HSQC (Figura 30) e HMBC (Figura 31) (Tabela 9). As posições glicosídicas na aglicona foram determinadas pelos experimentos HMBC (Figura 30) que mostraram correlações a longa distância entre o sinal do hidrogênio anomérico em δ_{H} 5,49 (H-1"glc) com o carbono em δ_{C} 134,0 (C-3), e entre o sinal do hidrogênio anomérico em δ_{H} 5,55 (H-1"ram) com o carbono em δ_{C} 161,9 (C-7). Portanto diante dos dados apresentados de ^1H e ^{13}C (Tabela 9) é sugerido para este composto a estrutura de um flavonoide di-O-glicosilado: quercetina-3-O- β -D-glicopiranosídeo-7-O- α -L-rhaminopiranosídeo (Figura 32).

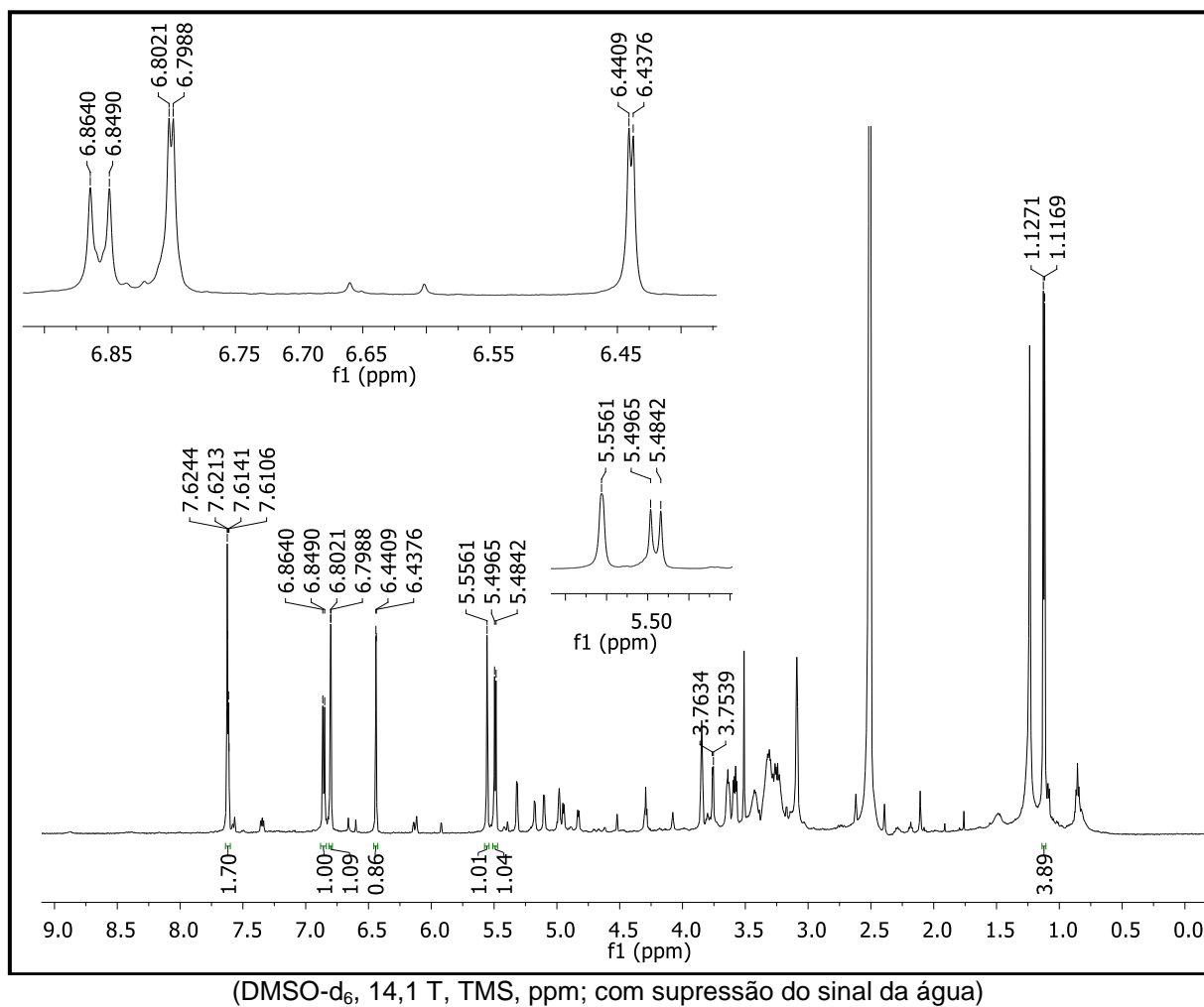
Figura 27 - Espectro RMN ^1H de Ad3.

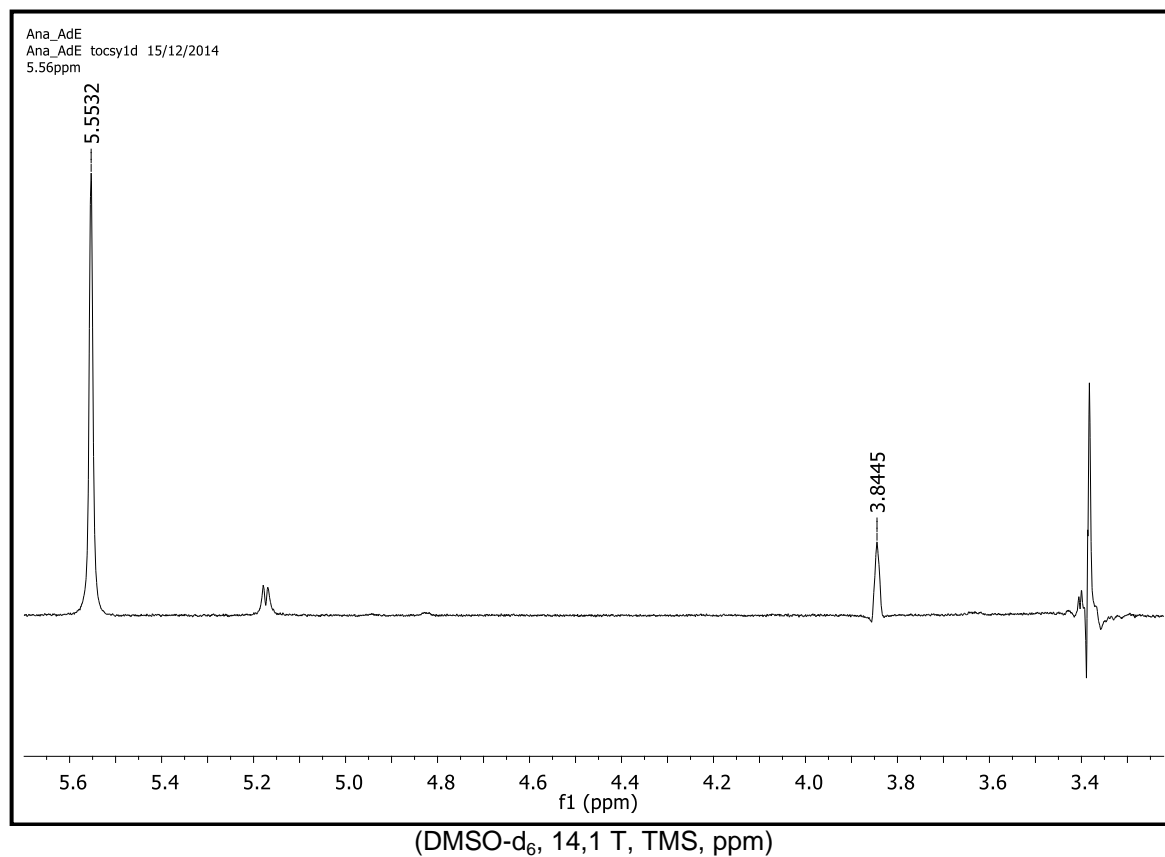
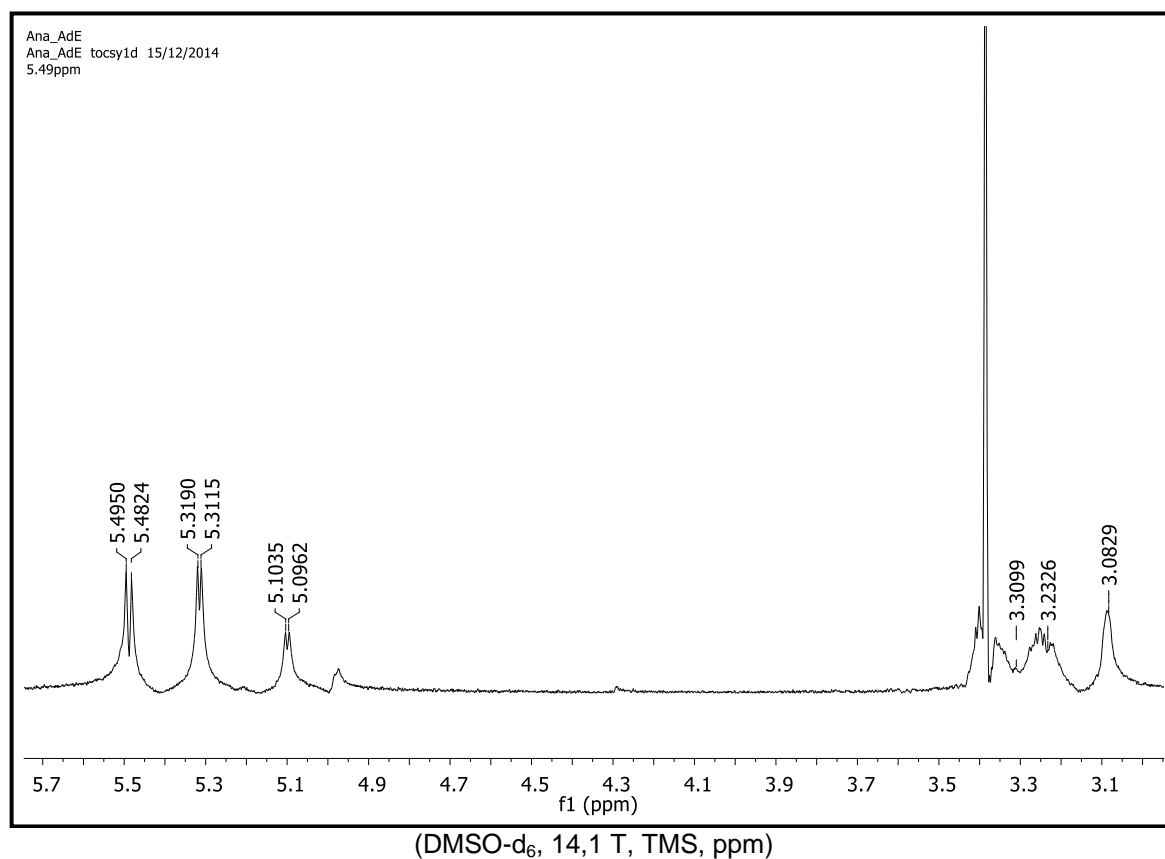
Figura 28 - TOCSY-1D com irradiação em δ_H 5,55 de Ad3.Figura 29 - TOCSY-1D com irradiação em δ_H 5,49 de Ad3.

Figura 30 - Mapa de contorno HSQC de Ad3.

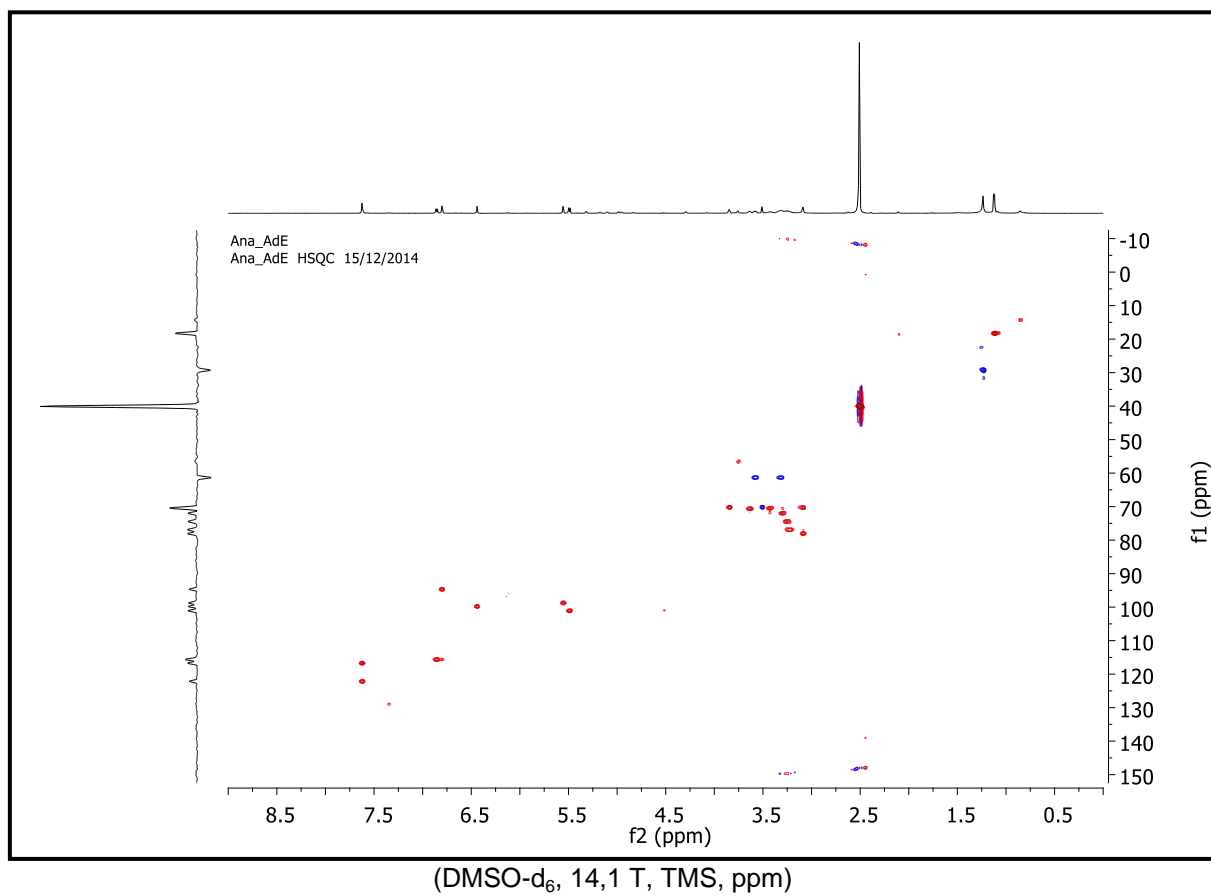
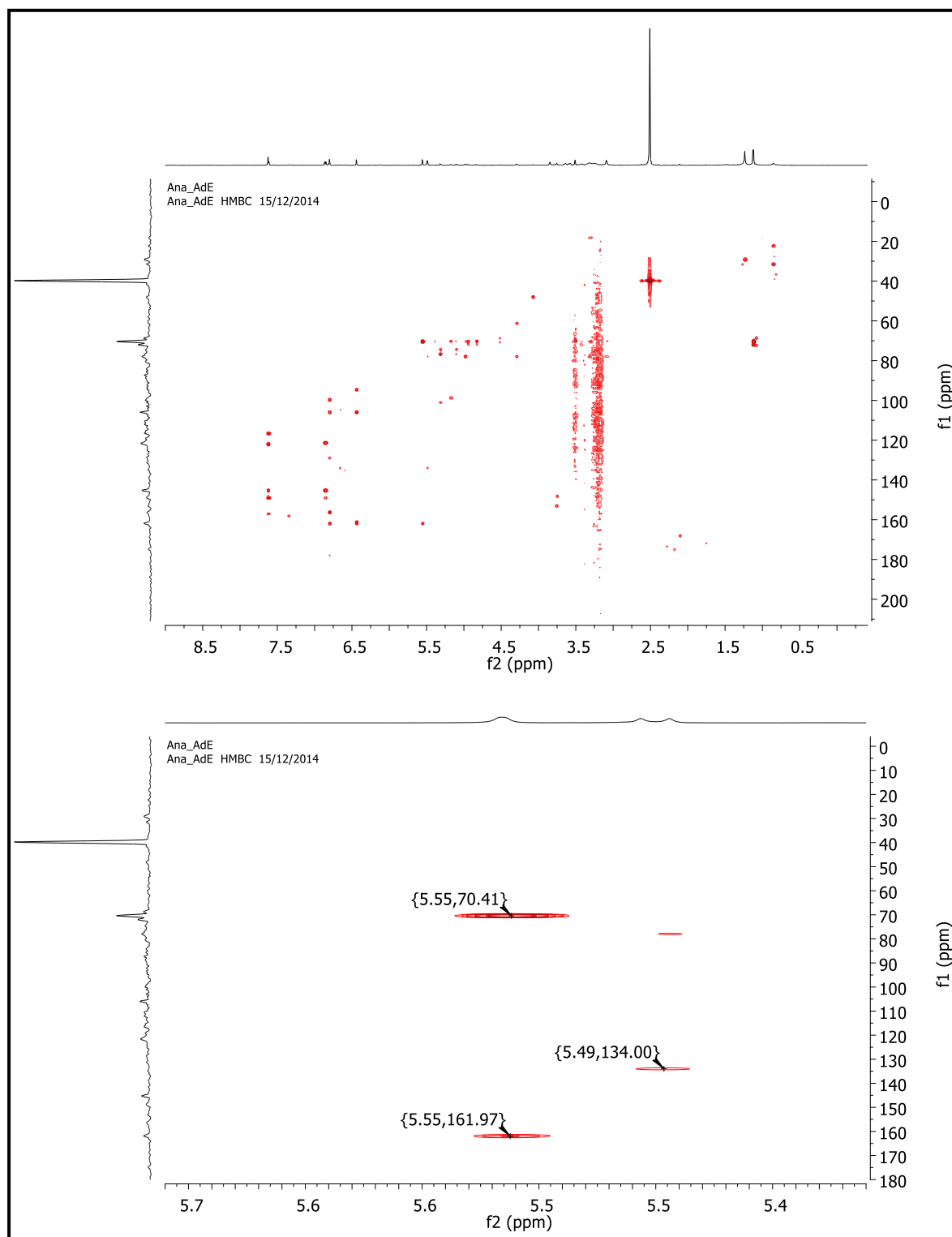
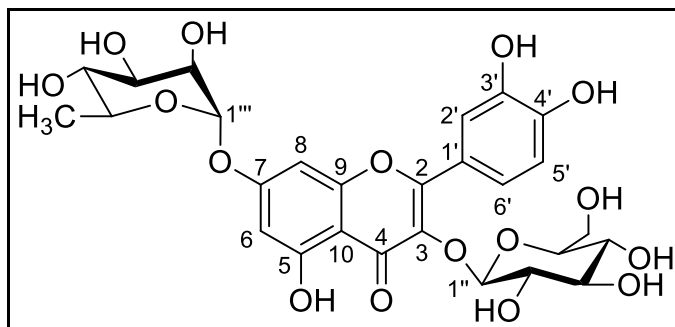


Figura 31 - Mapa de contorno HMBC de Ad3.



(DMSO-d₆, 14,1 T, TMS, ppm, expansão na região (f1) δ_H 5,40 a δ_H 5,70 e (f2) δ_C 4 a δ_C 170)

Figura 32 - Estrutura do flavonoide **Ad3**.

4.2.1.3 Identificação de *Ad4*

O espectro de RMN de ^1H de **Ad4** (Figura 33, Tabela 9), evidenciou sinais de deslocamentos químicos na região de hidrogênios aromáticos, característicos de um flavonoide derivado da quercetina. Os sinais em δ_{H} 7,71 (1H, d, $J = 1,8$ Hz) e em δ_{H} 7,53 (1H, dd, $J = 1,8; 8,4$ Hz) foram atribuídos ao H-2' e H-6', respectivamente. Outro sinal com deslocamento químico em δ_{H} 6,89 (1H, d, $J = 8,4$ Hz) correspondeu ao H-5'. O singlete em δ_{H} 6,82 é típico do H-8, quando o anel A é substituído na posição 6 (HARBORNE, 1996), indicando que o anel A está tetrassubstituído. O sinal em δ_{H} 5,01 (1H, d, $J = 7,5$ Hz) foi atribuído ao hidrogênio anomérico de uma unidade de açúcar com configuração β (HARBORNE, 1996). Os deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C puderam ser atribuídos a partir dos espectros de HSQC (Figura 34) e HMBC (Figuras 35) (Tabela 9). As posições glicosídicas na aglicona foram determinadas pelos experimentos HMBC (Figura 35) que mostraram correlações a longa distância entre o sinal do hidrogênio anomérico em δ_{H} 5,01 (H-1''glc) com o carbono em δ_{C} 152,0 (C-7). Portanto, diante dos dados apresentados de ^1H e ^{13}C (Tabela 9), sugerimos para este composto a estrutura da 6-hidroxi-quercetina-7-O- β -D-glicopiranosídeo (Figura 36).

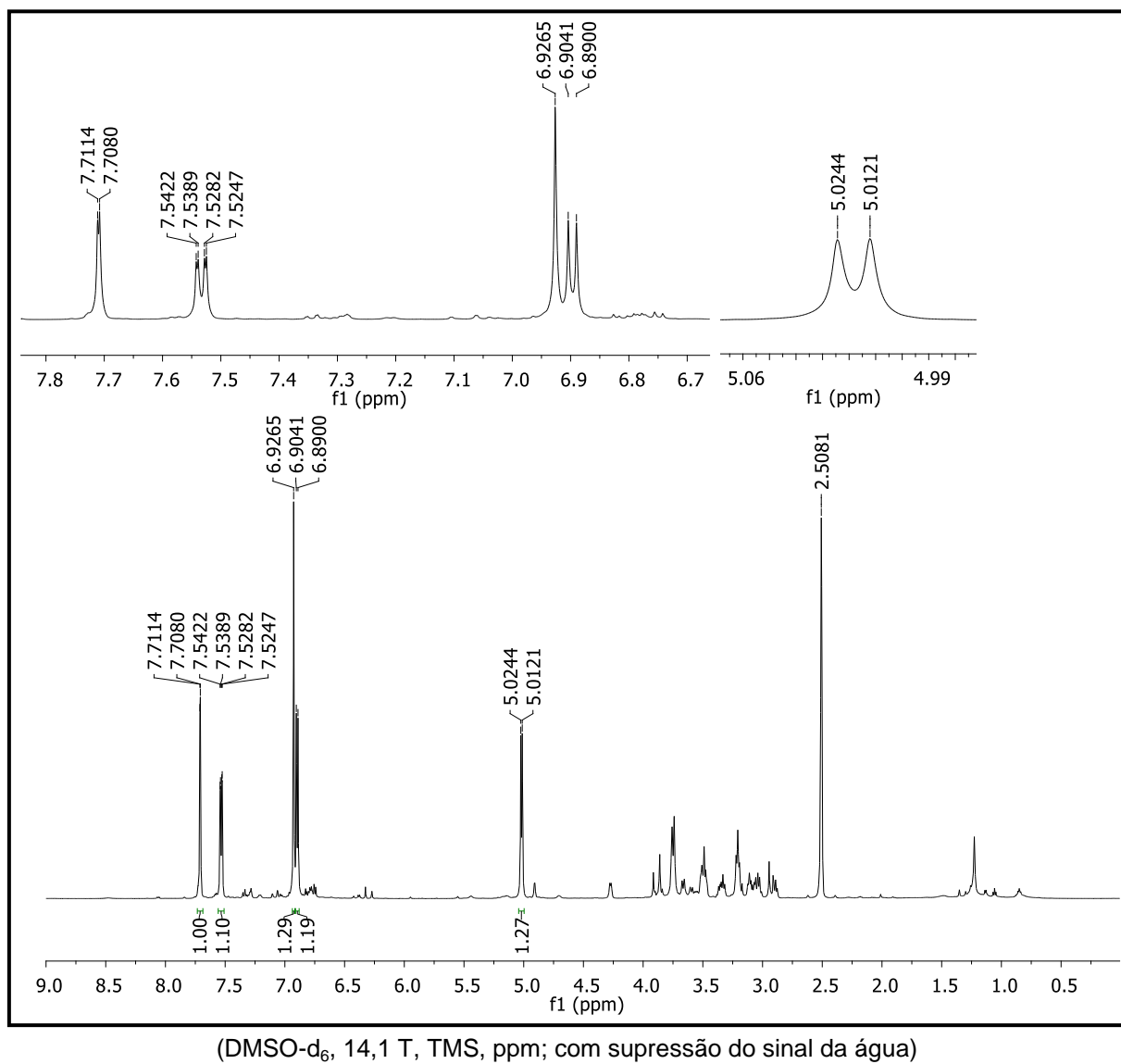
Figura 33 - Espectro RMN ^1H de Ad4.

Figura 34 - Mapa de contorno HSQC de Ad4.

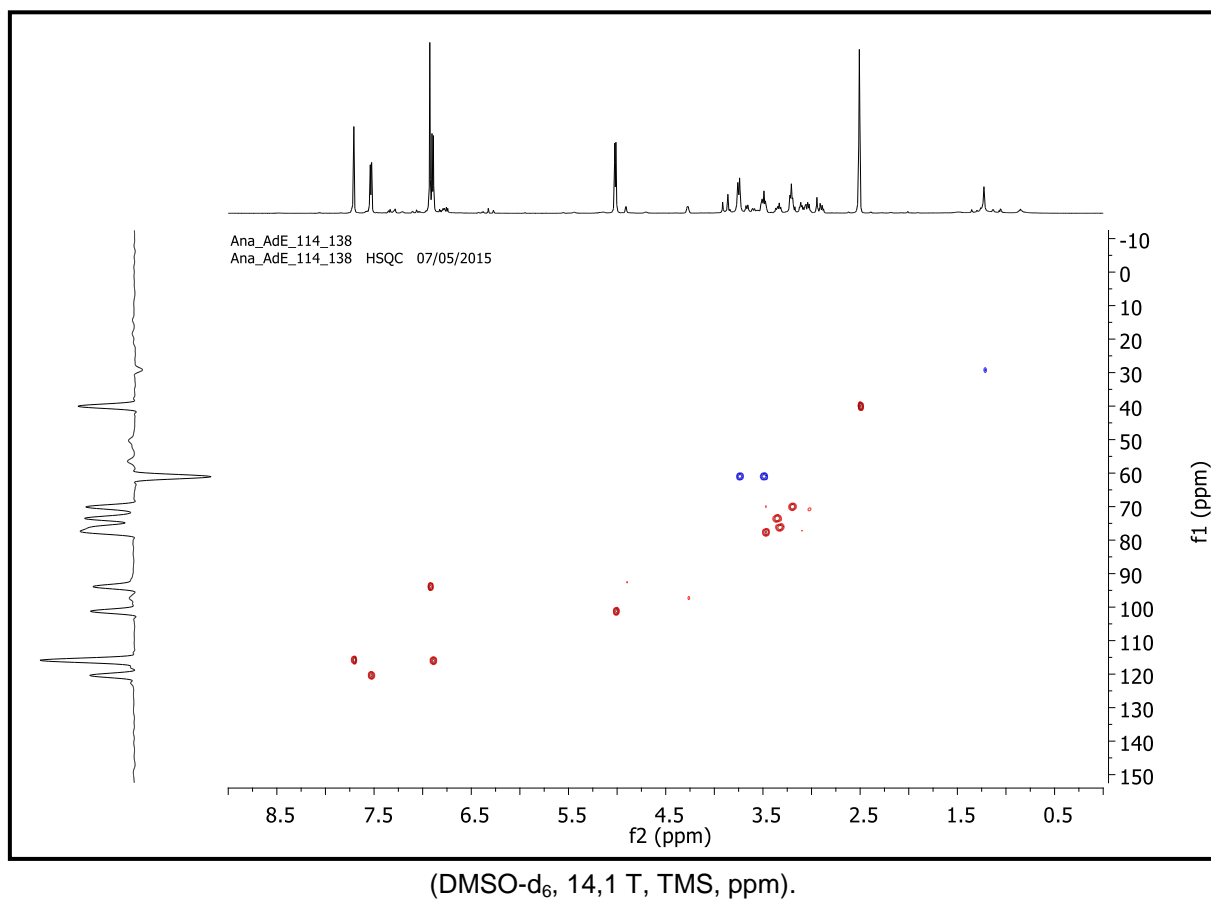
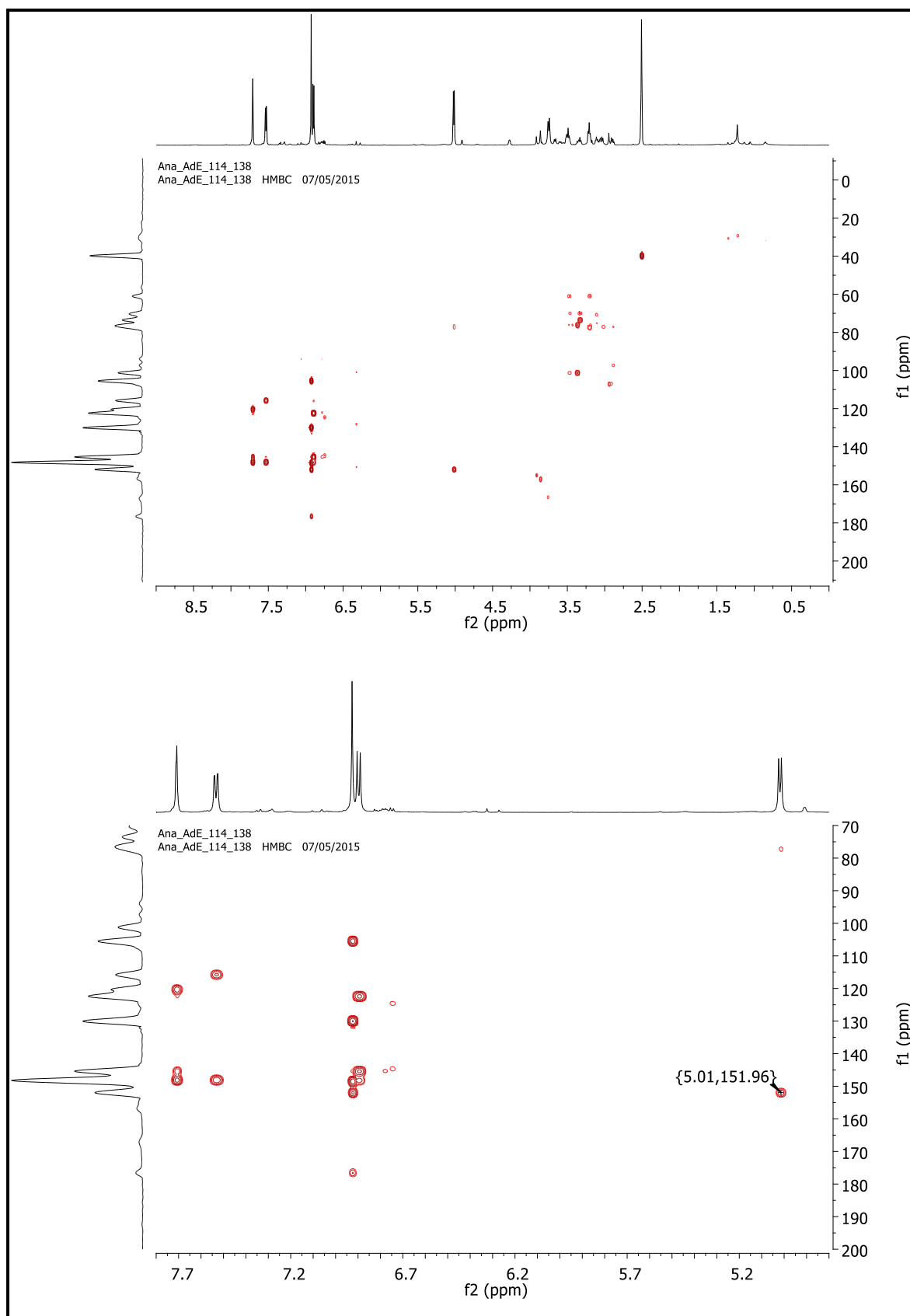
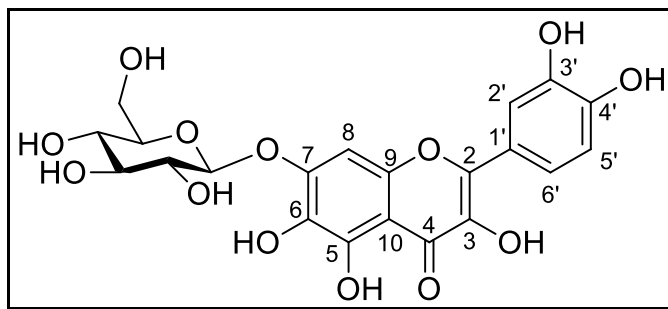


Figura 35 - Mapa de contorno HMBC de Ad4.



(DMSO-d₆, 14,1 T, TMS, ppm, expansão na região (f1) δ_H 4,80 a δ_H 7,80 e (f2) δ_C 70 a δ_C 200)

Figura 36 - Estrutura do flavonoide **Ad4**.

4.2.1.4 Identificação de Ad5

O espectro de RMN de ^1H de **Ad5** (Figura 37, Tabela 9), evidenciou sinais de deslocamentos químicos na região de hidrogênios aromáticos, característicos de um flavonoide derivado da quercetina. Os sinais em δ_{H} 7,72 (1H, d, $J = 1,8$ Hz) e em δ_{H} 7,57 (1H, dd, $J = 1,8; 8,4$ Hz) foram atribuídos ao H-2' e H-6', respectivamente. Outro sinal com deslocamento químico em δ_{H} 6,88 (1H, d, $J = 8,4$ Hz) correspondeu ao H-5'. O singlete em δ_{H} 6,82 é típico do H-8, quando o anel A é substituído na posição 6 (HARBORNE, 1996), indicando assim que o anel A está tetrassubstituído. O singlete com deslocamento químico em δ_{H} 3,91 (3H, s) foi atribuído aos hidrogênios metoxílicos. A posição do grupo metoxila foi determinada pelo deslocamento de seus hidrogênios, que quando ligados na posição C-7 da aglicona encontram-se mais desblindados (VILEGAS et al., 1999b). Portanto, diante dos dados apresentados de ^1H (Tabela 9), sugerimos para este composto a estrutura da 6-hidroxi-7-metoxiquercetina (Figura 38).

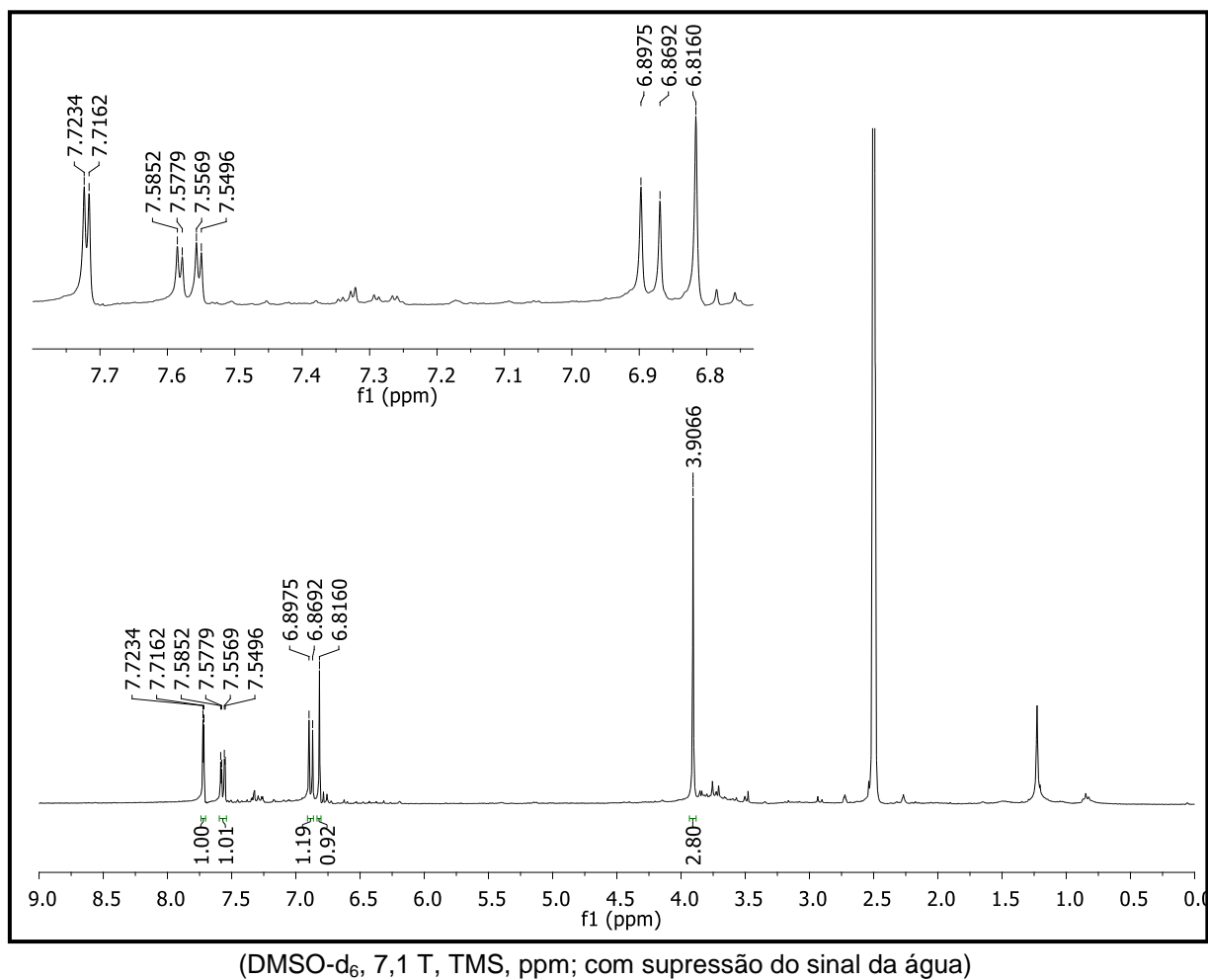
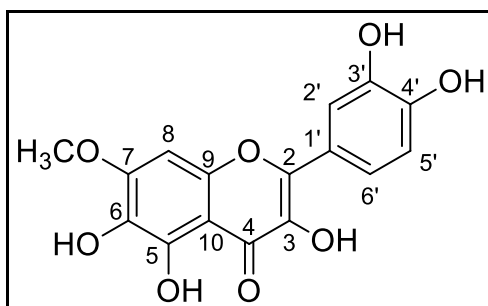
Figura 37 - Espectro RMN ^1H de Ad5.

Figura 38 - Estrutura do flavonoide Ad5.



4.2.1.5 Identificação de Ad7

O espectro de RMN de ^1H da mistura de **Ad7** (Figura 39, Tabela 10), evidenciou sinais de deslocamentos químicos na região de hidrogênios aromáticos, característicos de um flavonoide derivado da quercetina. Os sinais dos hidrogênios em δ_{H} 7,77 (1H, d, $J = 1,8$ Hz) e em δ_{H} 7,63 (1H, dd, $J = 1,8; 8,5$ Hz) referem-se aos H-2' e H-6', respectivamente. Outro sinal com deslocamento químico em δ_{H} 6,91 (1H, d, $J = 8,5$ Hz) é correspondente ao H-5'. O singlete em δ_{H} 6,80 é típico do H-8, quando o anel A é substituído na posição 6 (HARBORNE, 1996), indicando que o anel A está tetrassubstituído. O singlete (3H, s) a δ_{H} 4,00 confirma a presença de um grupo metoxílico. A presença do sinal do carbono em δ_{C} 56,8 é indicativo de que o grupo metoxila está vizinho a um átomo de carbono contendo oxigênio (VILEGAS et al., 1999b). O sinal em δ_{H} 5,29 (d, $J = 7,5$ Hz) foi atribuído ao hidrogênio anomérico da unidade glicopiranosil com configuração β (HARBORNE, 1996). Os deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C puderam ser atribuídos a partir dos espectros de HSQC e HMBC (espectros não apresentados) (Tabela 10). A posição glicosídica na aglicona foi determinada pelos experimentos HMBC que mostraram correlações a longa distância entre o sinal do hidrogênio anomérico em δ_{H} 5,29 (H-1"glc) com o carbono em δ_{C} 133,3 (C-3). O espectro de RMN da substância **Ad7** foi similar a da quercetina-3-O-glicopiranosídeo, exceto o deslocamento químico observado para o H-2" da glicose (δ_{H} 5,00) e um sinal adicional em δ_{H} 2,16 (s) correspondente a uma função acetil (Tabela 10). O espectro de HMBC mostrou a correlação de δ_{C} 172,6 e o sinal dos hidrogênios a δ_{H} 5,00 (H-2"glc) e δ_{H} 2,16, confirmando a presença de um grupo acetil em C-2" da glicose. Portanto, diante dos dados apresentados de ^1H e ^{13}C (Tabela 10), sugerimos para este composto a estrutura da nova 6-hidroxi-7-metoxiquercetina-3-O- β -D-2"-O-acetilglicopiranosídeo (Figura 40).

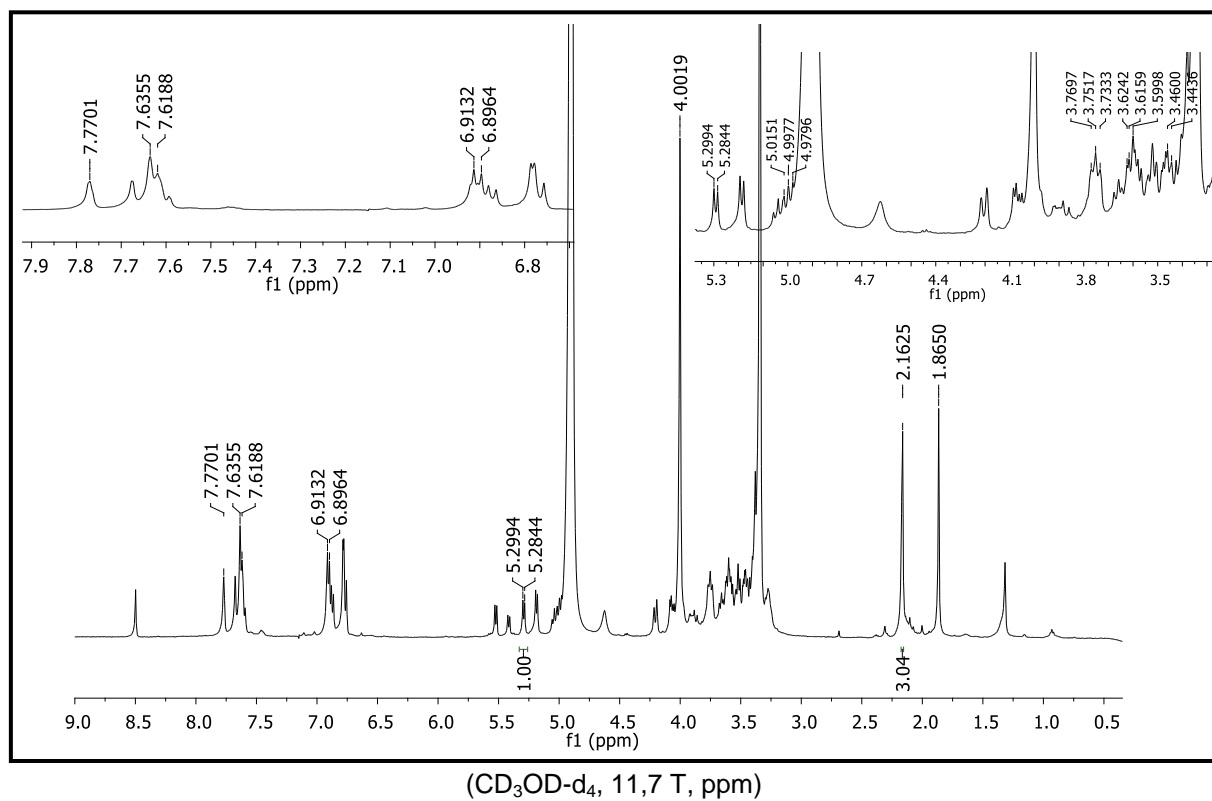
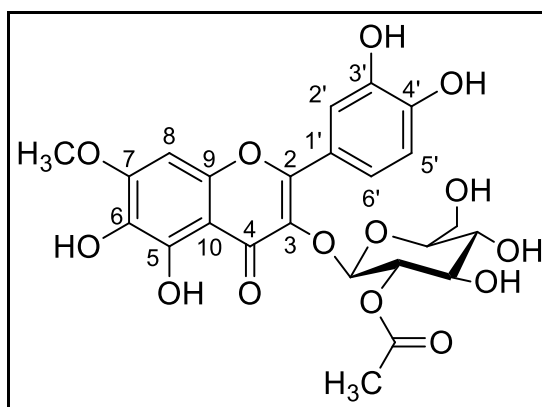
Figura 39 - Espectro de ^1H de Ad7.

Figura 40 - Estrutura do flavonoide acetil-glicosilado Ad7.



4.2.1.6 Identificação de Ad8

O espectro de RMN de ^1H de **Ad8** (Figura 41, Tabela 10), evidenciou sinais de deslocamentos químicos na região de hidrogênios aromáticos, característicos de um flavonoide derivado da quercetina. Os sinais dos hidrogênios em δ_{H} 7,68 (1H, d, $J = 1,8$ Hz) e em δ_{H} 7,63 (1H, dd, $J = 1,8; 8,0$ Hz) referentes à H-2' e H-6', respectivamente. Outro sinal com deslocamento químico em δ_{H} 6,87 (1H, d, $J = 8,0$ Hz) correspondeu ao H-5'. O singlete em δ_{H} 6,76 é típico do H-8, quando o anel A é substituído na posição 6 (HARBORNE, 1996), indicando que o anel A está tetrassubstituído. O singlete (3H) a δ_{H} 4,00 confirma a presença de um grupo metoxílico. A presença do sinal do carbono em 56,8 é indicativo de que o grupo metoxila está vizinho à um átomo de carbono contendo oxigênio. Outro singlete a δ_{H} 1,87 correspondente ao grupo metila (-CH₃) foi atribuído ao grupo acetil. O sinal em δ_{H} 5,18 (d, $J = 7,5$ Hz) foi atribuído ao hidrogênio anomérico da unidade glicopiranosil com configuração β (HARBORNE, 1996). Os deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C puderam ser atribuídos a partir dos espectros de HSQC e HMBC (espectros não apresentados) (Tabela 10). A posição glicosídica na aglicona foi determinada pelos experimentos HMBC que mostraram correlações a longa distância entre o sinal do hidrogênio anomérico em δ_{H} 5,18 (H-1"glc) com o carbono em δ_{C} 133,0 (C-3) e a correlação dos hidrogênios grupo metila com a carbonila do grupo acetil δ_{C} 172,0 (espectros não mostrados). A posição do grupo acetil também pôde ser determinada pela correlação do H-4" do açúcar com a carbonila do grupo acetil (δ_{H} 1,87). Portanto, diante dos dados apresentados de ^1H e ^{13}C (Tabela 10), sugerimos para este composto a estrutura da nova 6-hidroxi-7-metoxiquercetina-3-O- β -D-4"-O-acetilglicopiranosídeo (Figura 42).

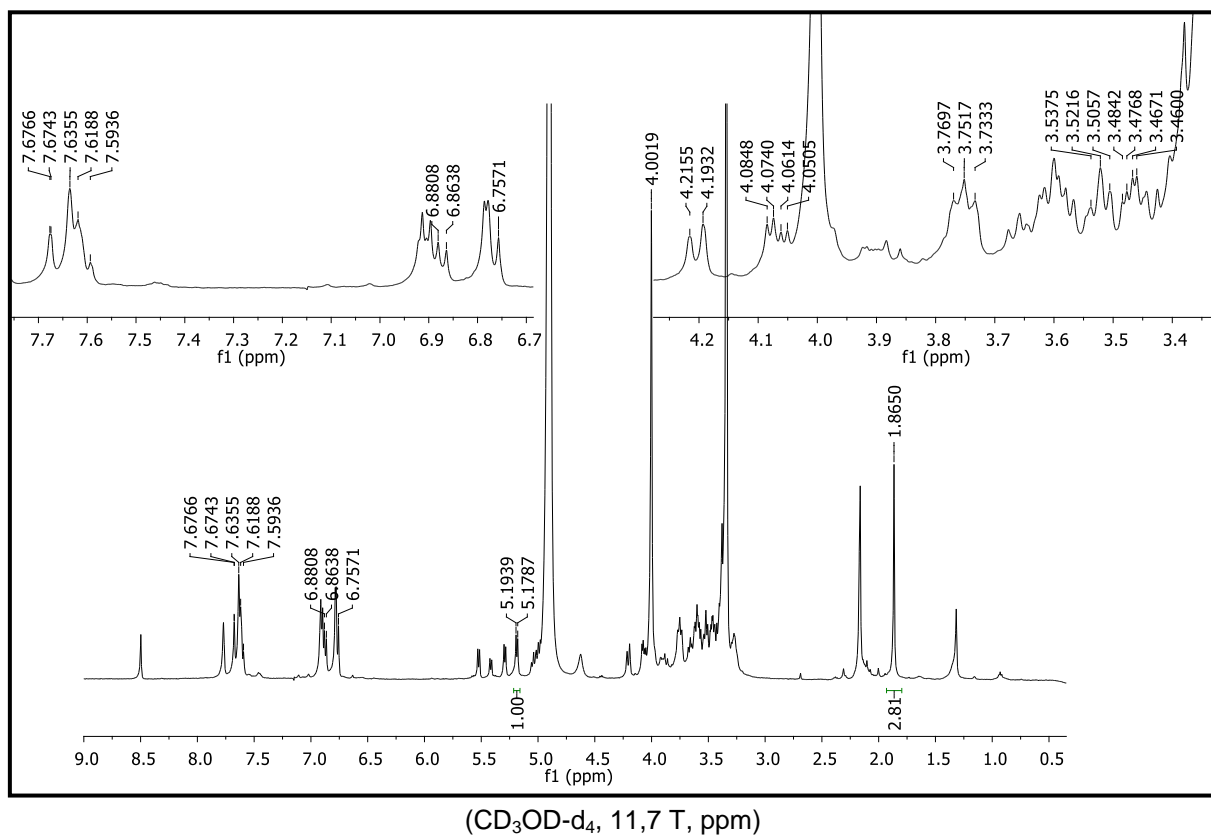
Figura 41 - Espectro RMN ^1H de Ad8.

Figura 42 - Estrutura do flavonoide acetil-glicosilado Ad8.

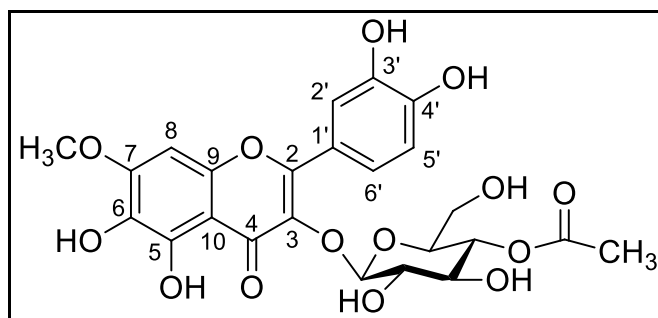


Tabela 9 - Deslocamentos de hidrogênio e carbono dos flavonoides (Ad1-Ad5) isolados em folhas e escapos de *A. divaricatus*.

Posição	Ad1*		Ad3**		Ad4**		Ad5*		¹³ C
	¹ H (J = Hz)	¹³ C	¹ H (J = Hz)	¹³ C	¹ H (J = Hz)	¹³ C	¹ H (J = Hz)	¹³ C	
2		156,7		156,9		-		-	--
3		133,6		134,0		-		-	--
4		177,9		178,0		176,6			--
5		154,9		156,3		-		-	--
6		130,2	6,44 d (1,8)	99,8		130,1			--
7		149,2		161,9		152,0			--
8	6,84 s	91,3	6,80 d (1,8)	94,7	6,92 s	93,9	6,82 s		--
9		147,0		-		148,4			--
10		105,6		106,0		105,5			--
1'		122,0		121,4		122,4			--
2'	7,62 d (2,2)	130,1	7,62 d (1,8)	116,7	7,71 d (1,8)	115,8	7,72 d (2,2)		--
3'	-	115,6	-	145,3	-	145,4	-		--
4'	-	147,0	-	149,0	-	148,1	-		--
5'	6,85 d (8,3)	115,6	6,86 d (9,0)	115,6	6,89 d (8,4)	116,0	6,88 d (8,5)		--
6'	7,61 dd (2,2 e 8,3)	130,1	7,61 dd (1,8 e 9,0)	122,2	7,53 dd (1,8 e 8,4)	120,3	7,57 dd (2,2 e 8,5)		--
Açúcar	Glicose		Glicose		Glicose		--		
1''	5,49 d (7,5)	101,1	5,49 d (7,2)	101,1	5,01 d (7,5)	101,3	--		--
2''	3,54 dd (7,5 e 9,5)	74,5	3,23 dd (7,2 e 9,5)	76,9	3,36 dd (7,5 e 9,5)	73,6	--		--
3''	3,47 dd (9,5 e 9,5)	78,0	3,08 dd (7,2 e 9,5)	77,9	3,32 dd (9,0 e 7,5)	76,3	--		--
4''	3,38 dd (9,5 e 9,5)	76,8	3,31 (9,0 e 9,0)	71,8	3,20 (9,0 e 9,0)	70,0	--		--
5''	3,25 ddd (9,5, 5,0 e 3,0)	70,3	3,20 m	77,5	3,47 m	77,7	--		--
6a''	3,74 dd (12,0 e 3,0)	61,3	3,32 dd (12,0 e 2,5)	61,4	3,49 dd (12,0 e 2,5)	61,0	--		--
6b''	4,25 dd (12,0 e 5,0)		3,57 dd (12,0 e 5,0)		3,74 dd (12,0 e 5,0)		--		--
Açúcar	--		Rhaminose		--		--		
1'''	--	--	5,55 d	98,8	--	--	--		--
2'''	--	--	3,84 dd	70,2	--	--	--		--
3'''	--	--	3,63 dd	70,7	--	--	--		--
4'''	--	--	3,29 dd	71,9	--	--	--		--
5'''	--	--	3,08 m	70,3	--	--	--		--
6'''	--	--	1,12 d (6,0)	18,0	--	--	--		--
7-OCH ₃	3,89 (s)	56,7	--	--	--	--	3,91 (s)		--

Deslocamentos químicos foram comparados com a literatura: HARBORNE, 1996 e AGRAWAL, 1989. Espectros obtidos em DMSO-d₆, *7,1 T, ** 14,1 T.

Tabela 10 - Deslocamentos de hidrogênio e carbono dos flavonoides **Ad7** e **Ad8**, isolados das folhas de *A. divaricatus*.

Posição	Ad7		Ad8	
	¹ H (J = Hz)	¹³ C	¹ H (J = Hz)	¹³ C
2		-		-
3		-		-
4		179,2		179,2
5		-		-
6		130,7		130,7
7		-		-
8	6,80 s	91,8	6,80 s	91,8
9		150,9		150,9
10		106,6		106,6
1'		-		-
2'	7,77 d (1,8)	117,3	7,68 d (1,8)	117,3
3'	-	-	-	-
4'	-	-	-	-
5'	6,91 d (8,5)	115,5	6,87 dd (8,0)	115,5
6'	7,63 dd(1,8 e 8,5)	123,0	7,63 dd (2,0 e 8,0)	123,0
Açúcar	Glicose		Glicose	
1"	5,29 d (7,5)	104,0	5,18 d (7,5)	104,0
2"	5,00 dd (9,0 e 9,0)	75,4	3,52 dd (7,5 e 9,0)	75,4
3"	3,46 dd (9,0 e 9,0)	77,7	3,47 dd (9,0 e 9,0)	77,7
4"	n. d.	71,0	4,98 dd (9,0 e 9,0)	71,0
5"	3,26 m	78,1	3,75 ddd (9,5, 5,0 e 3,0)	78,1
6a"	3,61 dd(12,0 e 2,5)	62,2	4,20 dd(12,0 e 1,5)	62,2
6b"	3,74 dd(12,0 e 5,0)		4,07 dd(12,0 e 5,5)	
7-OCH ₃	4,00 (s)	56,8	4,00 (s)	56,8
CH ₃ CO-2	2,16 (s)	20,3		
CH ₃ CO-4			1,87 (s)	20,3

Deslocamentos químicos foram comparados com a literatura: HARBORNE, 1996 e AGRAWAL, 1989. Espectros obtidos em: *CD₃OD-d₄, 11,7 T.

4.2.1.7 Identificação de Ad9

O espectro de RMN de ¹H (Figura 43, Tabela 11) do composto **Ad9** evidenciou sinais de deslocamentos químicos de hidrogênios na região de alta frequência a δ_H 7,84 (dd, $J = 2,0$ e $8,5$), δ_H 7,40 e 7,43 (dd, $J = 2,0$ e $8,5$), além de sinais em δ_H 7,69 e 7,31 (2H, d, $J = 2,5$) (d, $J = 8,6$) atribuídos aos hidrogênios anel B de um flavonoide e um singleto em 6,91 atribuídos aos hidrogênios H-8 do anel A do flavonoide. Na região de hidrogênios anoméricos foi identificado o sinal em δ_H 5,01 (d, $J = 6,6$ Hz), que foram confirmados nos experimentos COSY (espectros não apresentados), como sendo de β -arabinopiranosídeos (RODRIGUES, 2011). Análise detalhada dos espectros de RMN bidimensionais de HSQC (Figura 44),

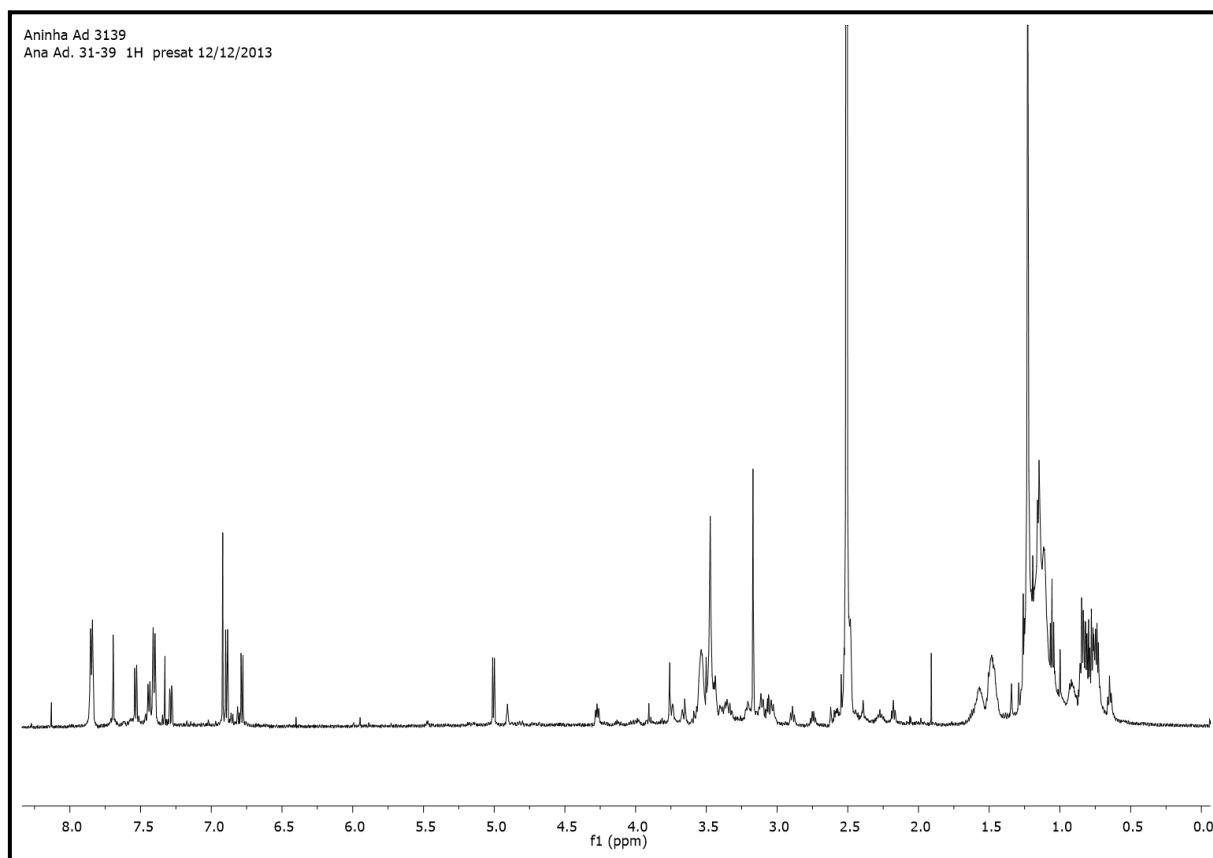
HMBC (Figura 45) e COSY (espectro não apresentado) confirmou a presença da aglicona do 6-hidroxi-*quercetina*.

O deslocamento químico dos hidrogênios metilênicos (desblindados) ligados na posição C-2 da arabinose, sugeriram que a hidroxila ligada a esta posição da arabinose do composto **Ad9** está acilada. O espectro de ^1H RMN indicava ainda a presença de hidrogênios pertencentes a unidades lignânicas, identificadas como di-(4-hidroxifenil)-ciclobutano-dicarboxílico. Em particular, o espectro evidenciou ainda sinais de hidrogênios na região aromática a δ_{H} 6,78 (1H, d, $J = 8,5$), 6,88 (1H, d, $J = 8,5$) e δ_{H} 6,28 (1H, d, $J = 8,5$), 7,53 (1H, d, $J = 8,5$), correspondentes ao grupo 4-hidroxifenil, e sinais de hidrogênios metínicos a 3,53; 3,55; e 3,17 e 3,54 (ddd, $J = 10,2$; 8,6; 2,3 Hz) (Tabela 11), característicos de hidrogênios de um anel ciclobutil tetrasubstituído (MONTAUDO; CACCAMESE, 1973). No espectro de HMBC (Figura 45) pode-se observar dois sinais de carbonos a δ_{C} 173,6 e 171,8, referentes as carbonilas do grupo acila e outros quatro carbonos sp^3 em δ_{C} 41,9; 41,1; 48,9 e 46,7.

As correlações no espectro de HMBC (Figura 44) evidenciaram que os sinais dos hidrogênios a 3,53 e 3,55 apresentavam correlações com os carbonos das carbonilas dos grupos acilas (173,6 e 171,8) e dos carbonos (116,0 e 115,5) dos grupos 4-hidroxifenil. Com estas informações foi possível deduzir que a unidade acíclica do composto **Ad9** poderia ser do tipo truxinil ($[7''/7''', 8''/8''']$ -lignana) ou do tipo truxililica ($[7''/8''', 8''/7''']$ -lignana) (BEN-EFRAIM; GREEN, 1974). No espectro HMBC (Figura 45) as correlações entre os hidrogênios a δ_{H} 3,79 e 3,51 com os carbonos dos grupos carboxílicos a δ_{C} 171,8 e 173,6 confirmaram a presença de um derivado truxilato com dois grupos acilas. Esta hipótese foi confirmada também com os experimentos de correlação COSY entre os hidrogênios a δ_{H} 3,79 e 3,51 (espectro não apresentado). A consideração de que as correlações apresentadas nos espectros HMBC do composto **Ad9** entre os hidrogênios $7''$ com os carbonos dos grupos carboxílicos não deviam estar presentes em um derivado truxinílico, utilizada como modelo na Figura 46. A presença de duas unidades de 6-hidroxi-*quercetina* glicosilados ligados ao anel ciclobutanico foi determinada devido ao deslocamento químico dos hidrogênios observados (desblindados) do anel ciclobutanico, quando confrontados com valores dos hidrogênios correspondentes ao do ácido truxílico (CHI et al., 2006). No entanto, a não equivalência dos sinais de

RMN por toda a molécula não evidenciava a presença de uma molécula de glicose quiral no dímero, como apresentado por (EL-ANSARI et al., 1995) que identificaram o dímero da apigenina-7-O-(6''-p-cumaroil)-O-β-D-glicopiranosideo-truxinato.

Comparações com outros dados da literatura foram realizados, como AMARAL et al. (2012) que identificou o dímero do truxinato, porém contendo um derivado do kaempferol, o 6-metoxikaempferol e com a glicose ligada ao núcleo do flavonoide. Ainda para confirmar a estrutura é necessário registrar os experimentos de massas. Porém, com os dados obtidos de RMN mono e bidimensionais podemos sugerir que o composto **Ad9**, representa o um dímero formado pelas ligações cabeça-cauda de flavonoides derivados da 6-hidroxiQuerçetina, formada através de um processo de cicloadição entre os carbonos etilênicos de dois ácidos cinâmicos. Na literatura são descritos alguns produtos diméricos provenientes de anéis ciclobutânicos derivados de vários ácidos fenilpropanoicos (ISAZA et al., 2001). No entanto, são descritos poucos ésteres de diflavonoides de ácidos dicarboxílicos (HORIE et al., 1986; ITOKAWA; MORITA; MIHASHI, 1981), entre eles, estão os compostos isolados de *Stachys aegyptiaca* (CHI et al., 2006), e as isoladas de *Monochaetum multiflorum* (ISAZA et al., 2001) e recentemente de *Paepalanthus geniculatus* (AMARAL et al., 2012), reclassificada atualmente em *Actinocephalus geniculatus* porém com a aglicona de 6-metoxikaempferol e tendo como açúcar a glicose. Portanto este é o primeiro relato de um éster diflavonoídico da 6-hidroxiQuerçetina, contendo cada unidade da aglicona ligada a uma arabinose e contendo uma parte truxilato como a estrutura proposta na Figura 47.

Figura 43 - Espectro de RMN ^1H do flavonoide **Ad9**.

(DMSO- d_6 , 14,1 T, TMS, ppm; com supressão do sinal da água)

Figura 44 - Mapa de contorno HSQC de Ad9.

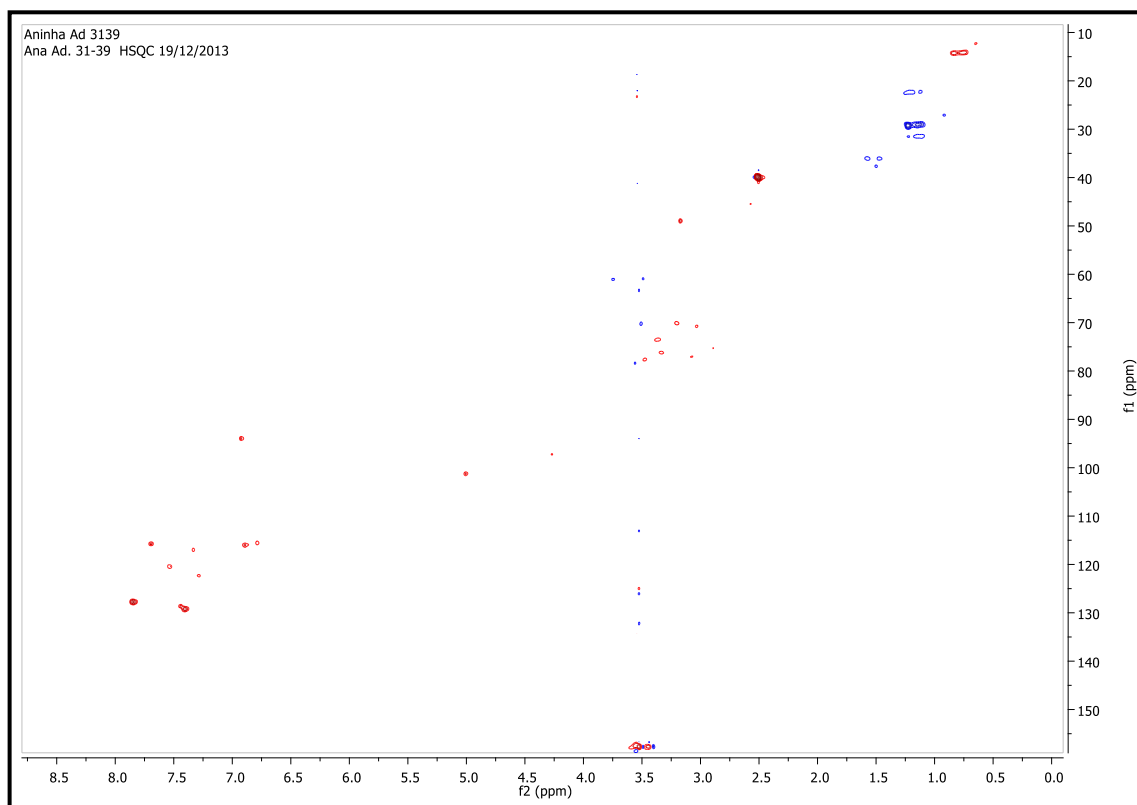
(DMSO-d₆, 14,1 T, TMS, ppm)

Figura 45 - Mapa de contorno HMBC de Ad9.

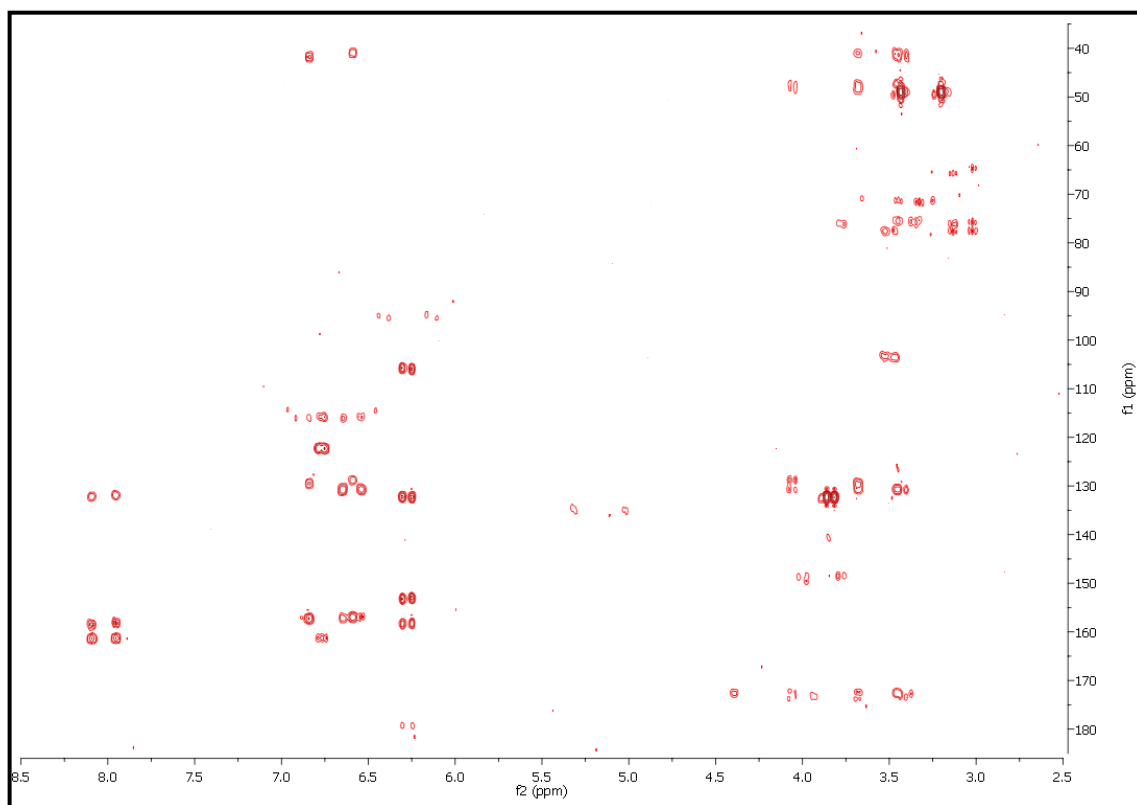
(DMSO-d₆, 14,1 T, TMS, ppm)

Tabela 11 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de Ad9.

Posição	Literatura: AMARAL et al., 2012		Composto Ad9	
	^1H (J = Hz)*	^{13}C *	^1H (J = Hz)**	^{13}C **
2	-	160,1	-	153,1
		160,1		153,1
3	-	133,6	-	130,0
		133,6		130,0
4	-	178,0	-	178,7
		178,0		178,7
5	-	150,0	-	151,0
		150,1		151,0
6	-	131,0	-	129,9
		131,0		129,9
7	-	157,1	-	151,6
		157,1		151,6
8	6,32 s e 6,27 s	94,9	6,91 s	94,1
		95,3		94,1
9	-	152,0	-	151,3
		152,0		151,3
10	-	104,6	-	105,0
		104,6		105,0
1'	-	121,0	-	121,0
		121,0		121,2
2'	8,11 d (8,6) e 7,97 d (8,5)	132,1	7,84 dd (2,0; 8,5) ; 7,69 dd (2,0; 8,5)	127,0
		131,9		127,0
3'	6,80 d (8,6) e 6,76 d (8,5)	115,8	-	139,8
		115,8		139,7
4'	-	157,1	-	146,0
		157,1		149,5
5'	6,80 d (8,6) e 6,76, d (8,5)	115,8	7,69 d (8,5)	115,8
		115,8	7,69 d (8,5)	117,0
6'	8,11 d (8,6)	132,1	7,40 dd (2,0; 8,5)	129,5
	7,97 d (8,5)	131,9	7,43 dd(2,0; 8,5)	129,3
OCH ₃ (C6)	3,87 s e 3,83 s	60,7	-	153,1
		60,7		153,1
Glicose			Arabinose	
1''	5,33 d (8,8) e 5,03 d (8,8)		5,03 d (6,6)	101,0
			5,03 d (6,6)	101,0
2''	3,54 dd (8,8, 9,0)	75,4	3,36	73,5
	3,48 dd (8,8, 9,0)	75,3	3,31 t (8,5)	73,5
3''	3,46 dd (9,0, 9,0)	77,4	3,54 t (8,5)	77,0
	3,46 dd (9,0, 9,0)	77,4	3,48 t (8,5)	77,6
4''	3,15 dd (9,0, 9,0)	71,5	3,20 m	69,9
	3,05 dd (9,0, 9,0)	71,5	3,03 m	70,3
5''	3,25 m	76,1	3,53 dd (3,0;13,5)	66,9
	2,75 m	75,7		66,9
6''	3,95 dd (2,5, 12,0)	65,5	-	-
	3,79 dd (4,5, 12,0)	64,5		
	4,41 dd (2,5, 12,0)			
	3,37 dd (4,5, 12,0)			
Truxinil			Truxinil	
1'''	-	114,6	-	112,0
1'''	-	114,6		112,0
2'''	6,60 d (8,5)	128,8	7,28 d (8,5),	122,9
2'''	6,85 d (8,5)	129,4	7,53 d (8,5)	122,7
3'''	6,56 d (8,5)	115,7	6,78 d (8,5),	116,0
3'''	6,66 d (8,5)	115,7	6,88 d (8,5)	115,5
4'''	-	156,9	-	154,0
4'''		157,2		147,7

5'''	6,56 <i>d</i> (8,5)	115,7	6,78 <i>d</i> (8,5),	116,0
5'''	6,66 <i>d</i> (8,5)	115,7	6,88 <i>d</i> (8,5)	115,5
6'''	6,60 <i>d</i> (8,5)	128,8	7,28 <i>dd</i> (2,0; 8,5),	122,9
6'''	6,85 <i>d</i> (8,5)	129,4	7,53 <i>dd</i> (2,0; 8,5)	122,7
7'''	4,07 <i>ddd</i> (10,2, 8,6, 2,3)	40,9	3,53 <i>ddd</i> (10,2, 8,6, 2,3)	41,9
7'''	3,69 <i>ddd</i> (10,2, 8,6, 2,3)	41,9	3,55 <i>ddd</i> (10,2, 8,6, 2,3)	41,1
8'''	3,47 <i>ddd</i> (10,2, 8,6, 2,3)	48,5	3,17 <i>ddd</i> (10,2, 8,6, 2,3)	48,9
8'''	3,44 <i>ddd</i> (10,2, 8,6, 2,3)	47,2	3,54 <i>ddd</i> (10,2, 8,6, 2,3)	46,7
9'''	-	173,2	-	173,6
9'''	-	171,4	-	171,8

Deslocamentos químicos foram comparados com a literatura: AMARAL et al., 2012.

Espectros obtidos em: *CD₃OD-d₄, 14,1 T, **DMSO-d₆, 14,1 T.

Figura 46 - Correlações do experimento HMBC referente ao anel ciclobutânico da parte truxilato (A) e da parte truxinato (B).

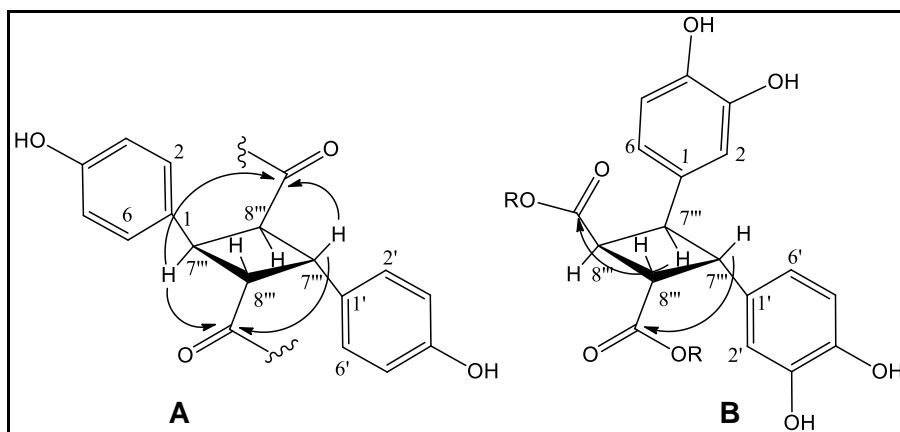
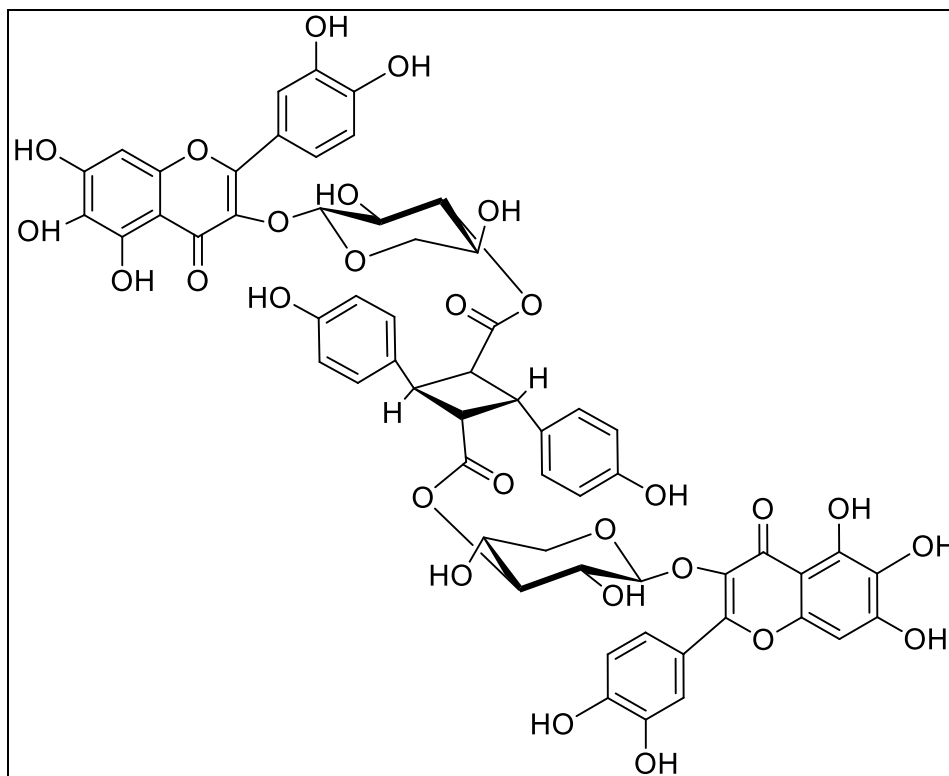


Figura 47 - Proposta de estrutura para **Ad9**.

4.2.2 Naftopiranonas

4.2.2.1 Identificação de Ad2

O espectro de RMN de ^1H (Figura 48 e 49, Tabela 12) forneceu o perfil de uma mistura de compostos, onde foi possível sugerir a existência de dois compostos majoritários, sendo uma aglicona derivada da paeplantina (A) e outra da vioxantina (B). Observou-se a aglicona (A) com dois sinais de hidrogênios *meta*-acoplados ($J = 1,5$ Hz) δ_{H} 6,99 e δ_{H} 6,93, que foram atribuídos a H-8 e H-6 respectivamente e um sinal de hidrogênio em δ_{H} 6,66 (1H, s), referente a H-4. É também evidente um sinal δ_{H} 2,28 (3H, d, $J = 6,1$ Hz), correspondente a um grupo metílico, os sinais em δ_{H} 3,82 (3H) e δ_{H} 3,94 (3H), correspondentes a dois grupos metoxílicos. Ainda foram observados outros sinais em δ_{H} 4,49 e δ_{H} 3,01 correspondentes a H-3 e H-4 respectivamente de uma vioxantina (B) (SCUDAMORE et al., 1993).

Sinais de hidrogênios anoméricos foram também observados em δ_H 5,11 e δ_H 4,75 (d, $J = 7,5$ e $7,8$ Hz). As constantes de acoplamentos possibilitaram indicar a configuração β (PAWAN et al., 1992).

A posição do dissacarídeo na aglicona (A) foi estabelecida considerando-se os deslocamentos químicos dos hidrogênios e comparando os dados com os da literatura (SANTOS et al., 2001). A Tabela 12 apresenta os valores de 1H que foram atribuídos mediante experimentos RMN de 1H e TOCSY 1D. No experimento TOCSY 1D (Figura 50 e 51), irradiação dos sinais de hidrogênios anoméricos em δ_H 5,11 e δ_H 4,75 possibilitaram verificar a natureza dos glicosídeos como sendo uma glicose e uma alose (SANTOS et al., 2001). Portanto, uma das estruturas (A) foi determinada como sendo 10-hidroxi-5,7-dimetoxi-3-metil-1H-nafito[2,3c]piran-1-ona-9-O- β -D-glicopiranosil-(6 \rightarrow 1)-O- β -D-alopiranosídeo (Figura 52).

Este composto já foi anteriormente identificado em *P. planifolius*, *P. hilairei*, *P. polyanthus* e *P. ramosus* (SANTOS et al., 2001).

Os demais sinais do espectro de RMN de 1H foram comparados com os da literatura (SCUDAMORE et al., 1993) revelando-se semelhantes aos da vioxantina. A presença de dois outros singletos que foram atribuídos a H-6' [δ_H 6,74; s, (H-6/H-6')] e H-5 [δ_H 6,94; s, (H-5/H-5')] respectivamente, evidenciando que a ligação do dímero encontra-se nas posições C-8/C-8'. O singlete (6H) em δ_H 1,24 foi atribuído a CH_3 -11 de um sistema que não possui dupla ligação. Para confirmar a estrutura do dímero, faz-se necessário o registro do espectro de massas. Porém, pela comparação dos dados de RMN deste composto com os da literatura podemos sugerir que o outro composto em mistura seja a vioxantina (B) (Figura 52). Este composto já foi isolado de vários fungos (NG; JUST; BLANK, 1969, ZEECK et al., 1979, SCUDAMORE et al., 1993) de líquens (ELIX et al., 2004) e também de algumas espécies de *Paepalanthus* (PROVOST; GARCIA, 1990). As atividades biológicas deste composto já é bem documentada também na literatura (CÁLGARO-HELENA et al., 2006, DEVIENNE et al., 2007, TEIXIERA et al., 2011).

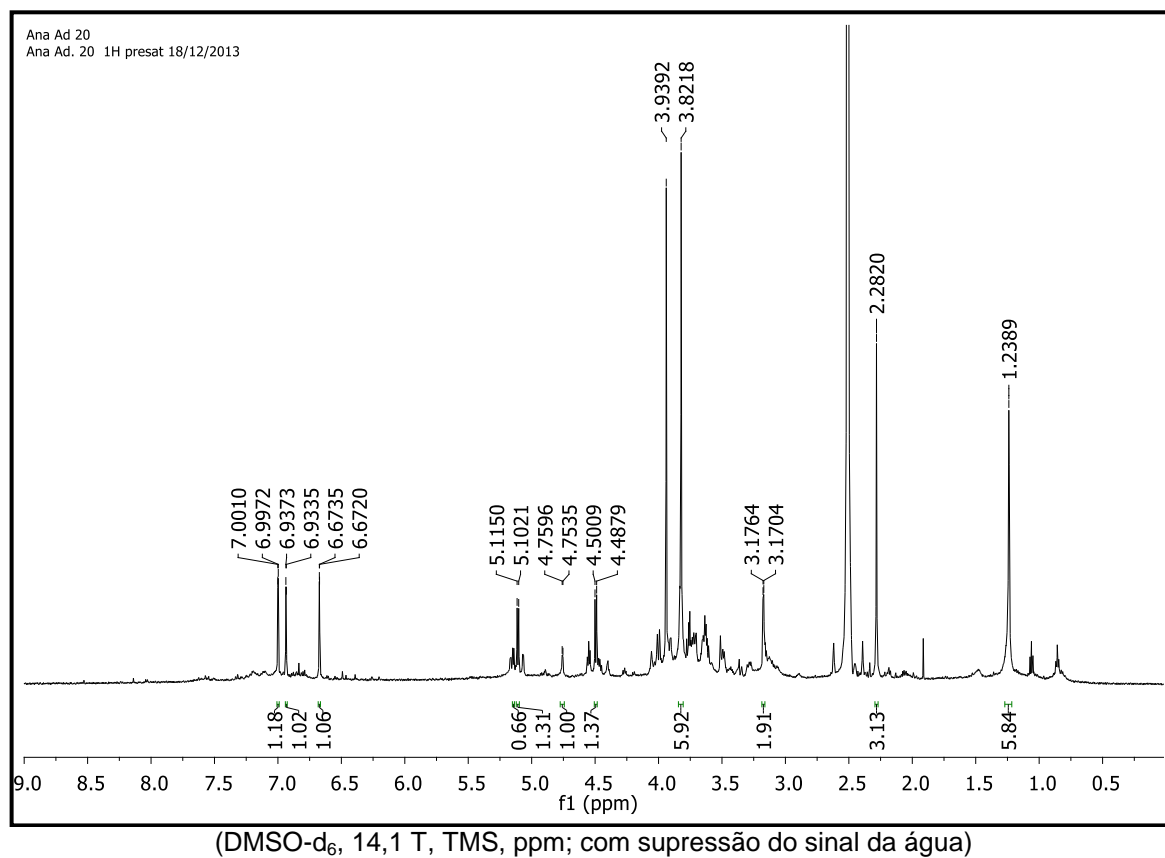
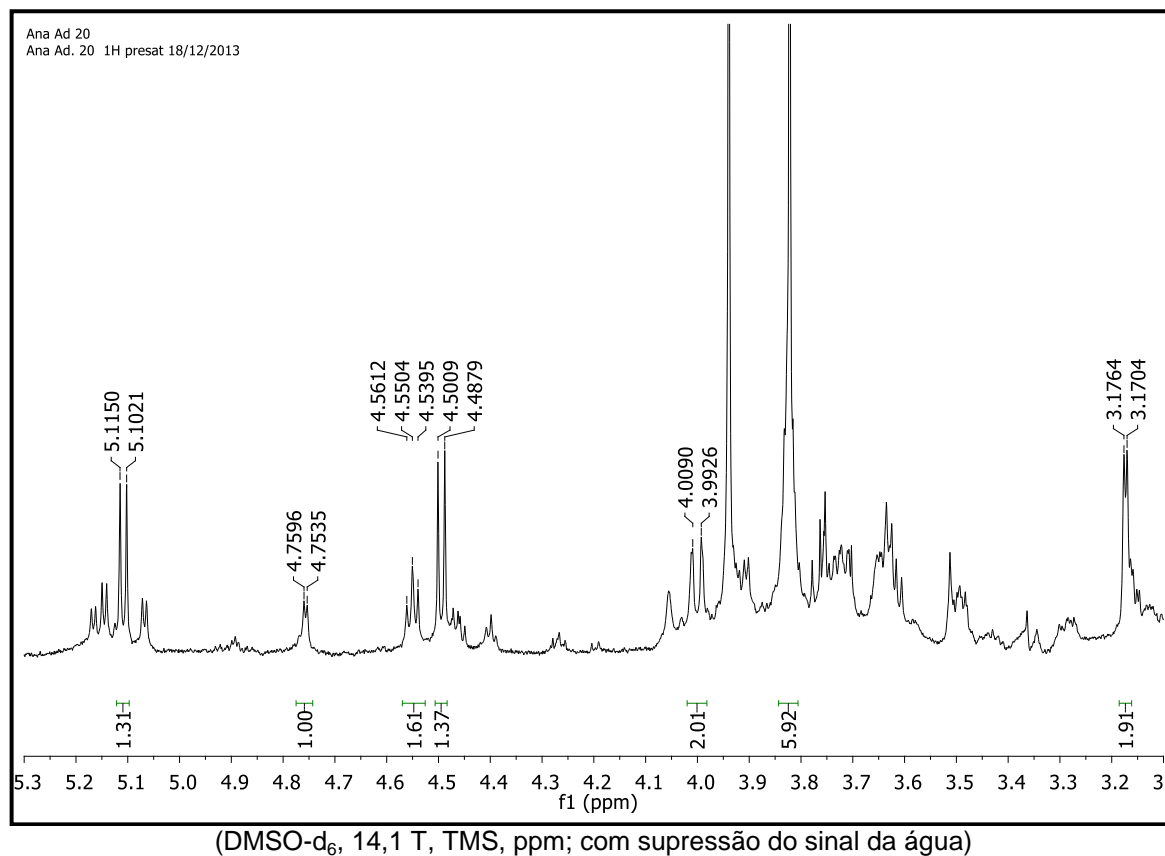
Figura 48 - Espectro RMN ^1H da mistura de naftopiranas **Ad2** (A e B).Figura 49 - Espectro RMN ^1H de **Ad2**, expansão na região δ_{H} 3,10 a δ_{H} 5,30.

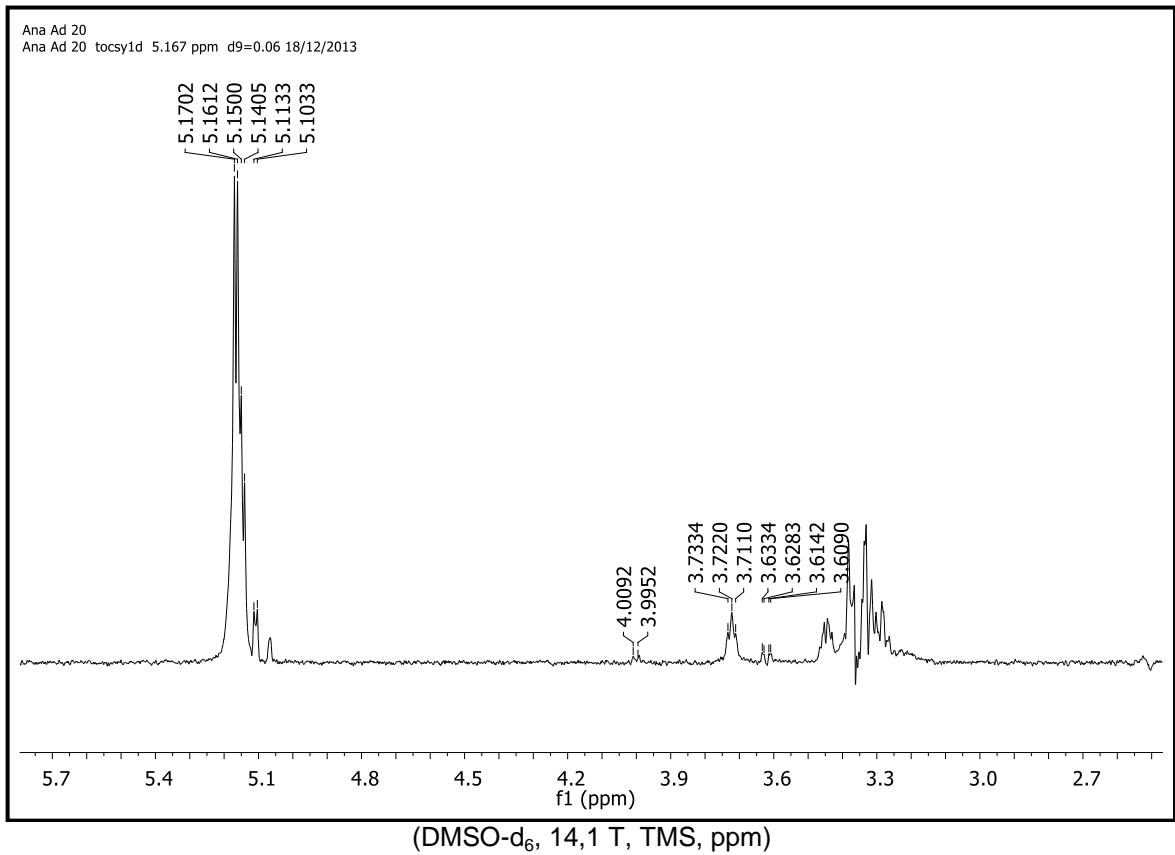
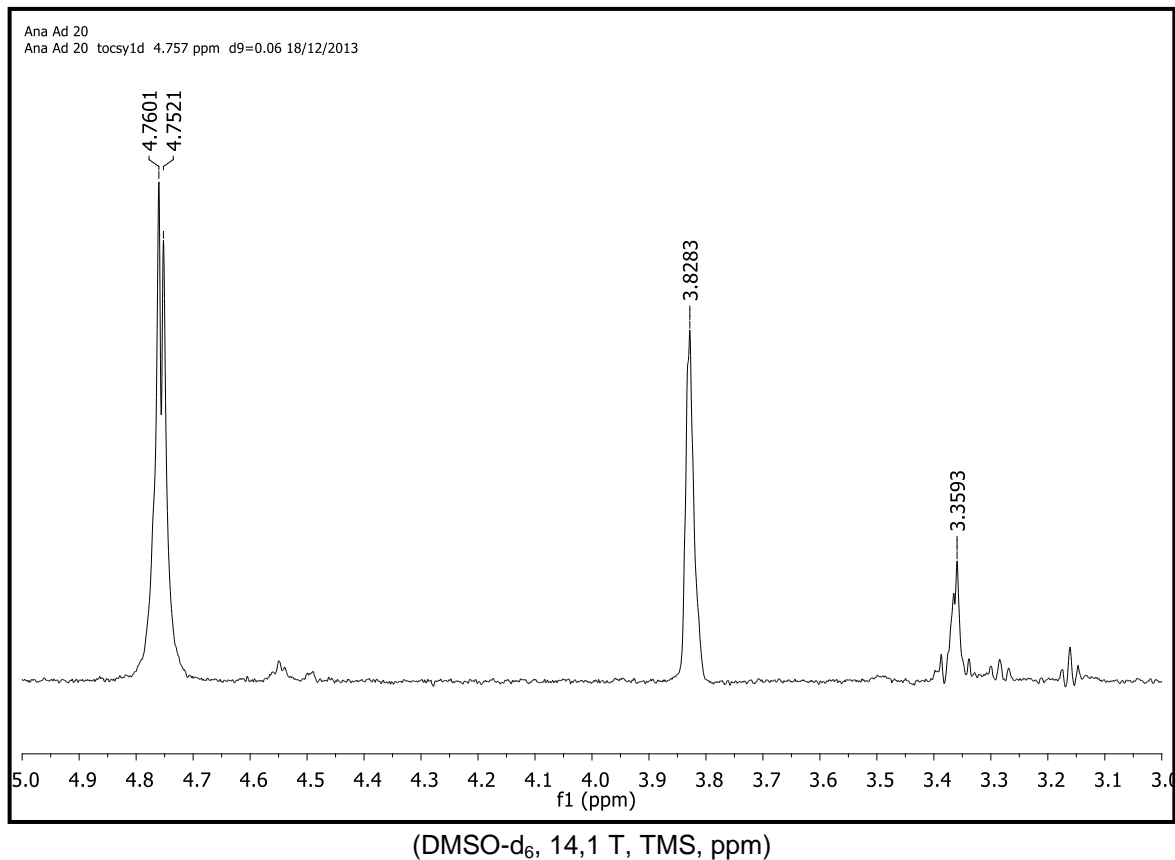
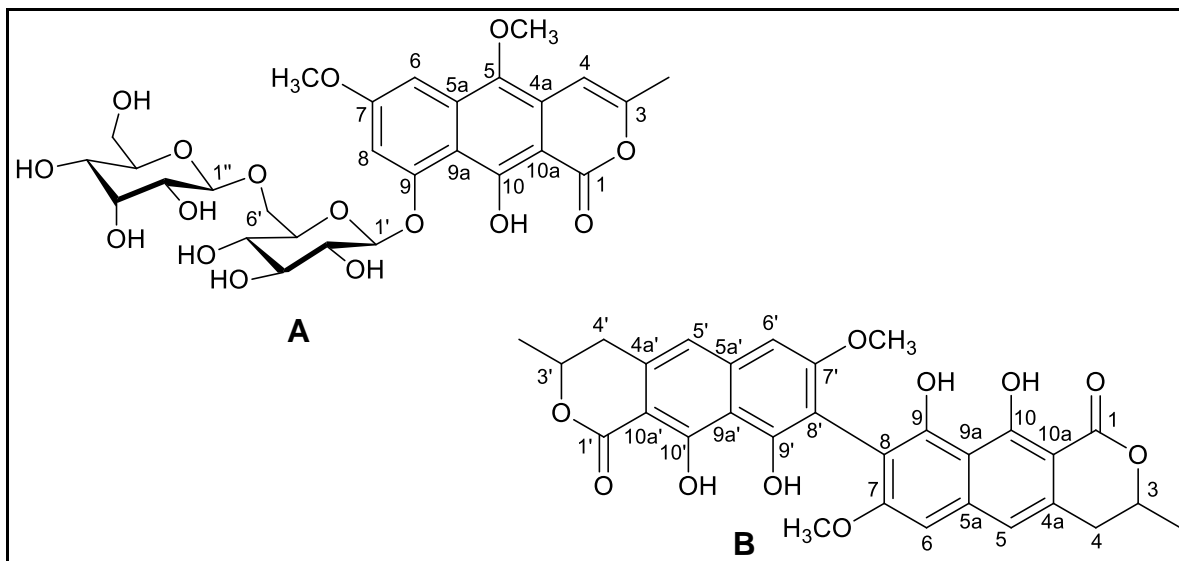
Figura 50 - TOCSY-1D com irradiação em δ_H 5,17 de Ad2.Figura 51 - TOCSY-1D com irradiação em δ_H 4,75 de Ad2.

Tabela 12 - Deslocamentos químicos de RMN de ^1H de Ad2.

Posição	^1H 1A	Literatura	^1H 1B	Literatura
1	-	-		
H-3	-	-	4,49 (m)	4,75 (m)
H-4	6,62 s	6,64 s	3,01 (m)	3,01(m)
4a	-	-		
H-5	-	-	6,94 (s)	6,95 (s)
H-6	6,99 d (2,35)	6,86 d (2,35)	6,74 (s)	6,70 (s)
7	-	-	-	
H-8	6,93 d (2,35)	6,96 d (2,35)	-	
9	-	-	-	
9a	-	-	-	
10	-	-	-	
10a	-	-	-	
H-11	2,28 (s)	2,25 (s)	1,24 (s)	1,56 (s)
OCH ₃	3,82 (s)	3,79 (s)	3,82 (s)	3,84 (s)
OCH ₃	3,94 (s)	3,92 (s)	-	
OH ₉	-	-	9,70 (s)	9,70 (s)
OH ₁₀	12,5 (s)	12,0 (s)	Não observado	13,79 (s)
Glucose	-	-		
1	5,11 d (7,8)	5,03 d (7,5)		
2	3,72 dd (9,0; 9,0)	3,70 dd (7,90; 9,0)		
3	3,62 dd (9,0; 9,0)	3,59 dd (9,0; 9,0)		
4	3,60 dd (9,0; 9,0)	3,55 dd (9,0; 9,0)		
5	3,83 m	3,84 m		
6	3,99 dd (5,0; 11,4)	3,91 dd (5,0; 11,4)		
	4,25 dd (2,5; 11,4)	4,25 dd (2,5; 11,4)		
Alose	-	-		
1	4,75 (7,4)	4,78 d (7,4)		
2	3,36 dd (2,8; 7,4)	3,45 dd (2,8; 7,4)		
3	3,82 dd (2,8; 2,8)	4,13 dd (2,8; 2,8)		
4	3,51 dd (2,8; 9,2)	3,55 dd (2,8; 9,2)		
5	3,76 m	-		
6	3,69 dd (5,0; 12,0)	-		
	3,89 dd (3,0; 12,0)			

Deslocamentos químicos foram comparados com a literatura:

A) SANTOS et al., 2001 e **B)** SCUDAMORE et al., 1993.

Figura 52 - Estruturas das naftopiranas em mistura **Ad2**.**A:** 10-hidroxi-5,7-dimetoxi-3-metil-1H-nafto[2,3c]piran-1-ona-9-O- β -D-glicopiranosil-(6 \rightarrow 1)-O- β -D-alopiranosídeo; **B:** vioxantina.

4.2.2.1 Identificação de **Ad14**

A naftopiranona **Ad14** pôde ser identificada sem que fosse necessária a etapa de isolamento. Para isso, foram utilizados experimentos de co-injeção dos extratos com o padrão do composto e a comparação dos espectros de UV apresentando bandas bipartidas características em 270-273 nm (VILEGAS et al., 1999, PACIFICO et al., 2011). O padrão utilizado na determinação foi a 10-hidroxi-5-7-dimetoxi-3-metil-1H-nafto[2,3c]piran-1-ona-9-O- β -D-glicopiranosídeo (Figura 53). Este derivado de paepalantina foi detectado nos extratos de capítulos e folhas e posteriormente quantificado como apresentado no item 4.3.5.

Os cromatogramas de cada análise estão apresentados nas Figuras 54 e 55.

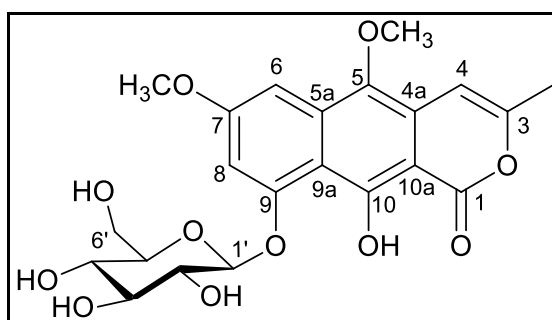
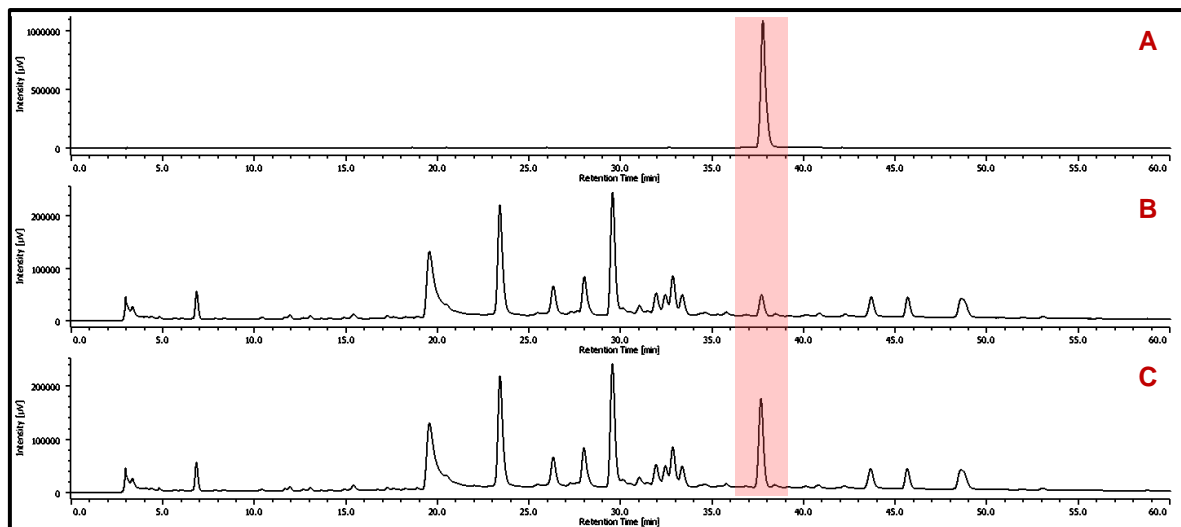
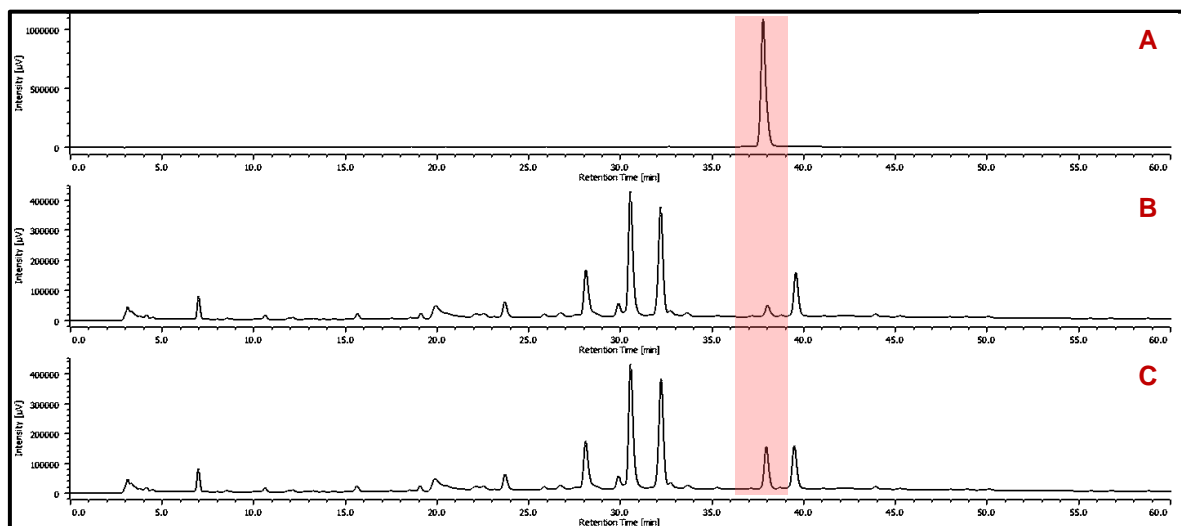
Figura 53 - Estrutura da naftopiranona **Ad14**.

Figura 54 - Identificação de **Ad14** no extrato metanólico das folhas de *A. divaricatus* por co-injeção de padrão.



A) padrão 10-hidroxi-5-7-dimetoxi-3-metil-1H-nafto[2,3c]piran-1-ona-9-O- β -D-glicopiranosídeo; **B)** Extrato metanólico das folhas de *A. divaricatus*; **C)** co-injeção do padrão no extrato. Condições cromatográficas: coluna Thermo (250 x 4.60 mm, 4 μ m), HPLC-PAD (Jasco[®]), vazão 1 mL.min⁻¹, método gradiente 20% a 80% MeOH, 60 min.

Figura 55 - Identificação de **Ad14** no extrato metanólico dos capítulos de *A. divaricatus* por co-injeção de padrão.



A) padrão 10-hidroxi-5-7-dimetoxi-3-metil-1H-nafto[2,3c]piran-1-ona-9-O- β -D-glicopiranosídeo; **B)** Extrato metanólico dos capítulos de *A. divaricatus*; **C)** co-injeção do padrão no extrato. Condições cromatográficas: coluna Thermo (250 x 4.60 mm, 4 μ m), HPLC-PAD (Jasco[®]), vazão 1 mL.min⁻¹, método gradiente 20% a 80% MeOH, 60 min.

4.2.3 Saponina

4.2.3.1 Identificação de Ad6

O espectro de RMN de ^1H de **Ad6** (Figura 56 e 57, Tabela 13) evidenciou sinais de deslocamentos característicos de uma saponina triterpênica (HOSTETTMANN; MARSTON, 1995). O espectro de ^1H mostrou um duplete em δ_{H} 4,23 (d, $J = 7,8$ Hz) atribuído ao hidrogênio anomérico de um β -piranosídeo. Além disso, o espectro RMN de ^1H apresentou sinais na região do açúcar correspondente a outro hidrogênio anomérico em δ_{H} 5,21 (d, $J = 8,4$ Hz) correspondendo a um β -glicopiranosídeo. No experimento de DEPT (Figura 58) com polarização a 135° permitiu a determinação dos carbonos primários, secundários e terciários. As sequências de hidrogênios do núcleo triterpênico foram confirmadas pelo experimento de correlação H-H COSY (Figura 59). Com base nas análises dos experimentos HSQC (Figura 60) e HMBC (Figura 61 e 62) foram atribuídas as posições do ácido glucurônico e da glicose, na posição C-3 e em C-28 (grupo carboxilo), respectivamente. O composto **Ad6** também exibiu sinais referentes a duas ligações olefínicas, uma com deslocamento δ_{H} 5,23 e δ_{C} 122,6 e 143,3, indicando uma ligação dupla $\Delta^{12(13)}$, e outro em δ_{H} 4,60 e δ_{C} 107,6 e 148,1, devido à ligação dupla entre os carbonos C20-C29. Por fim, foram identificados cinco átomos de carbono sp^3 em δ_{C} 15,6, 16,7, 17,1, 25,9 e 28,0 referentes aos seis grupos metila ligados ao núcleo triterpênico. Esses dados quando comparados com a literatura (ESPADA et al., 1990) corroboram com o esqueleto noroleano (Tabela 13). Assim, o composto **Ad6** foi identificado como ácido 3-O- β -D-glicuronopiranosil-30-norolean-12,20(29)-dieno-28-óico-28-O- β -D-glicopiranosil éster (Figura 63).

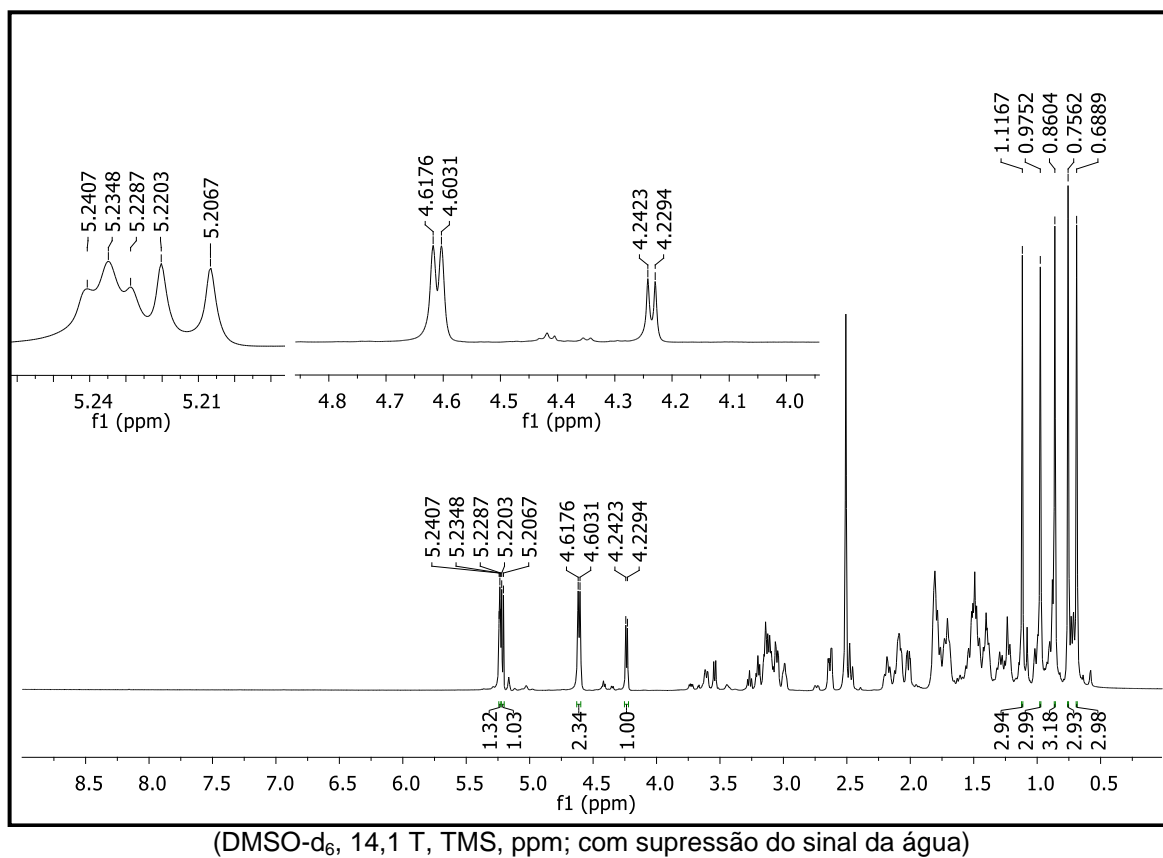
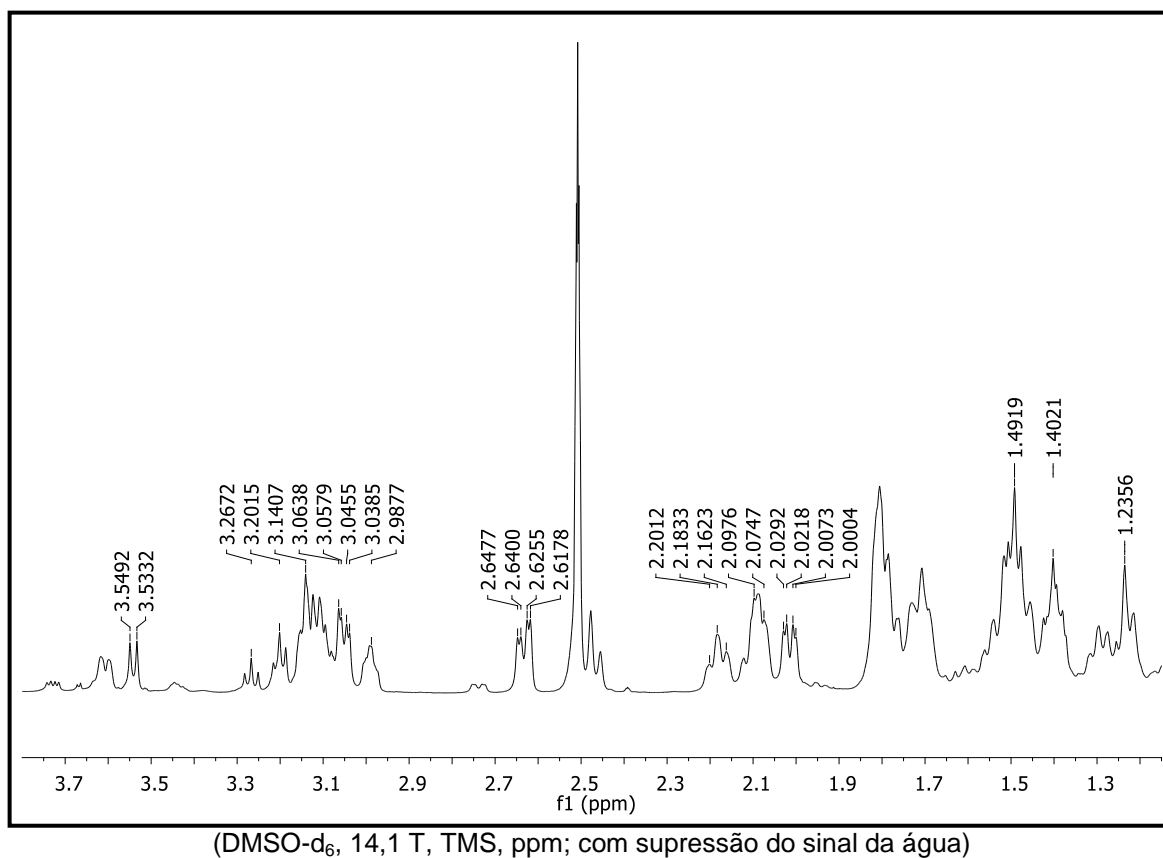
Figura 56 - Espectro RMN ^1H da saponina Ad6.Figura 57 - Espectro RMN ^1H de Ad6, expansão na região δ_{H} 1,15 a δ_{H} 3,80.

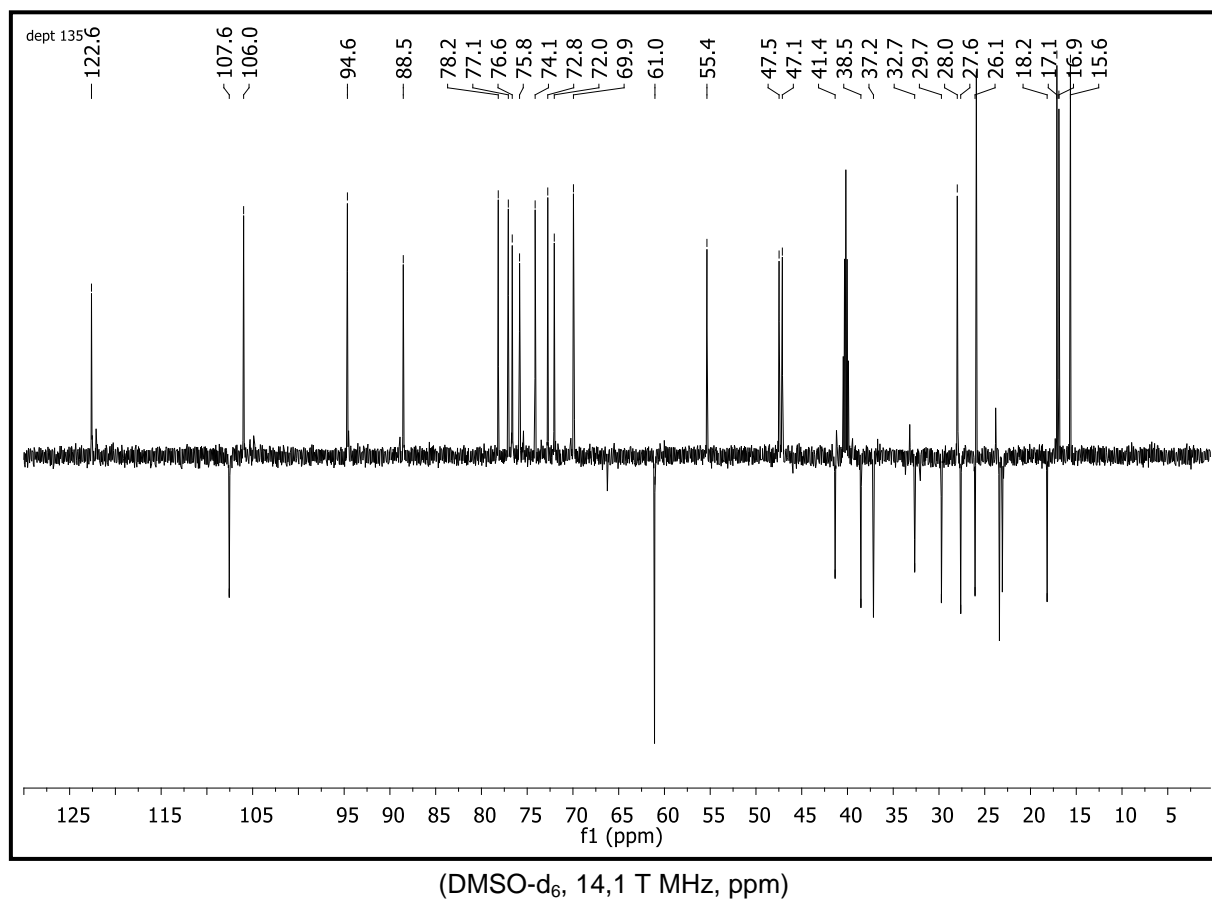
Figura 58 - Espectro de RMN ^{13}C DEPT 135 de Ad6.

Figura 59 - Mapa de contorno COSY da saponina Ad6.

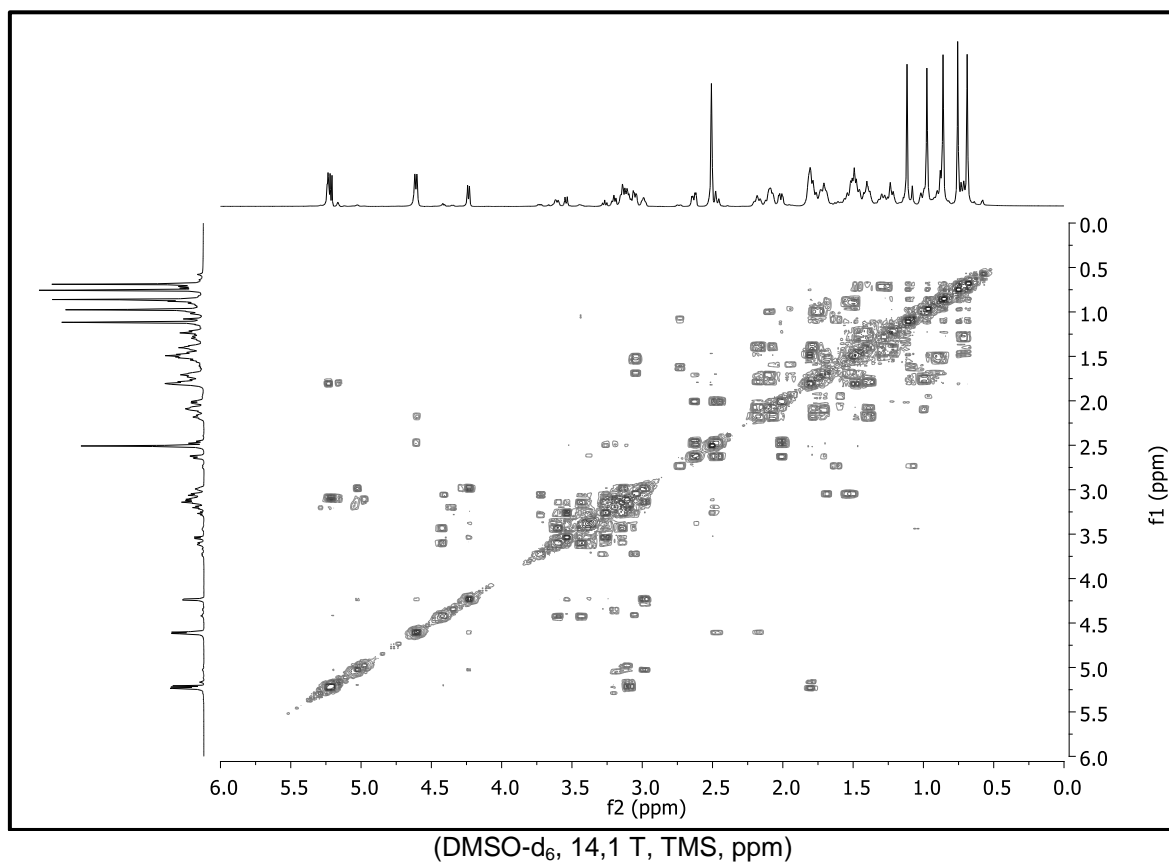


Figura 60 - Mapa de contorno HSQC de Ad6.

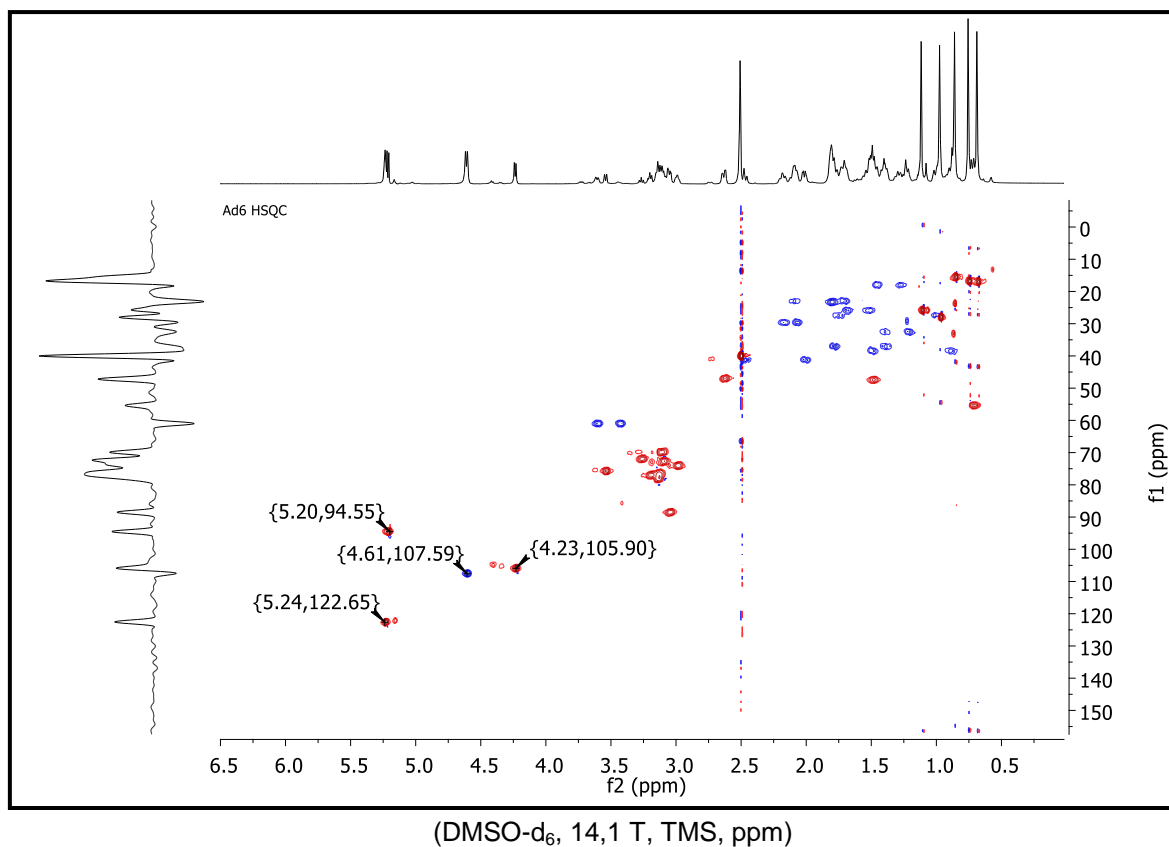


Figura 61 - Mapa de contorno HMBC de Ad6.

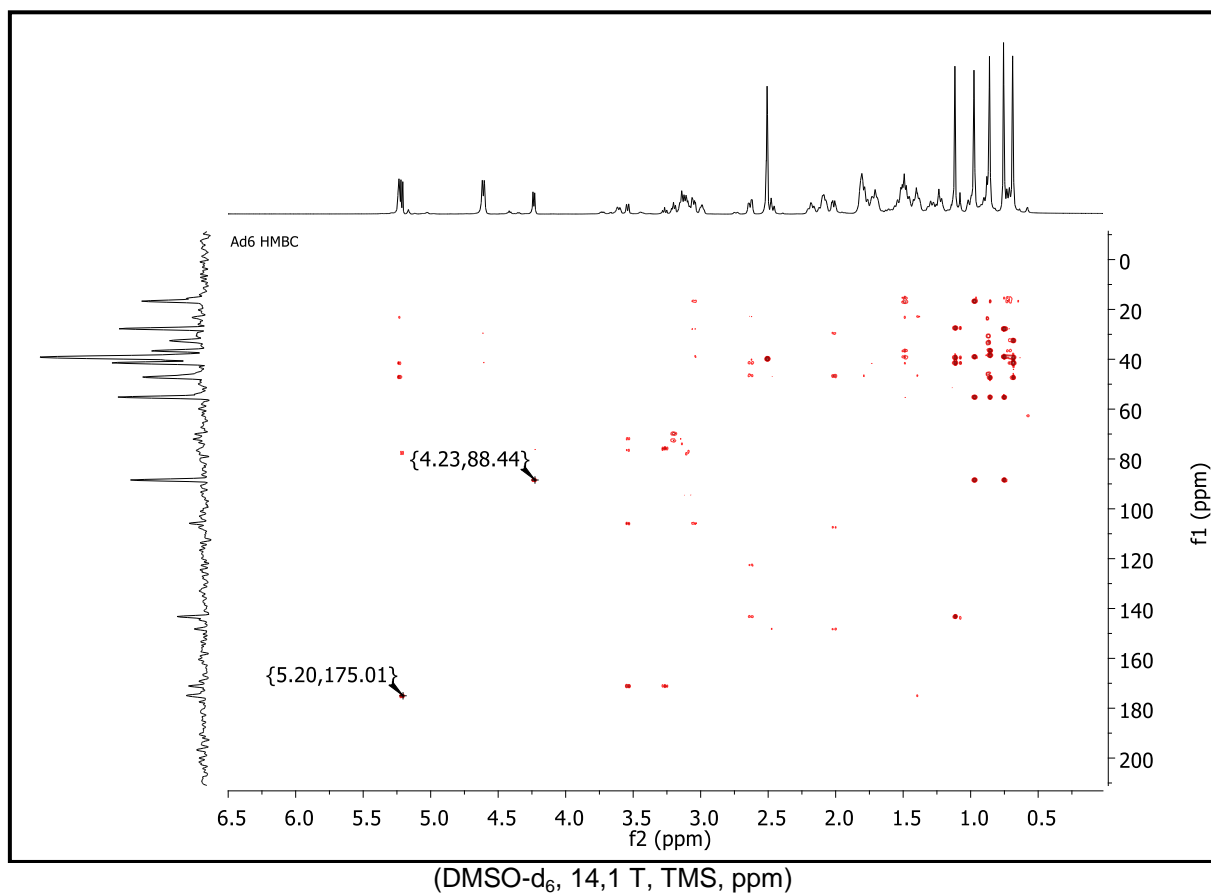


Figura 62 - Correlações COSY e HMBC na aglicona da saponina Ad6.

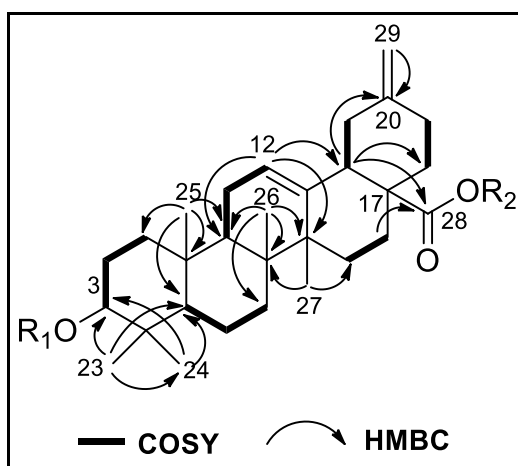
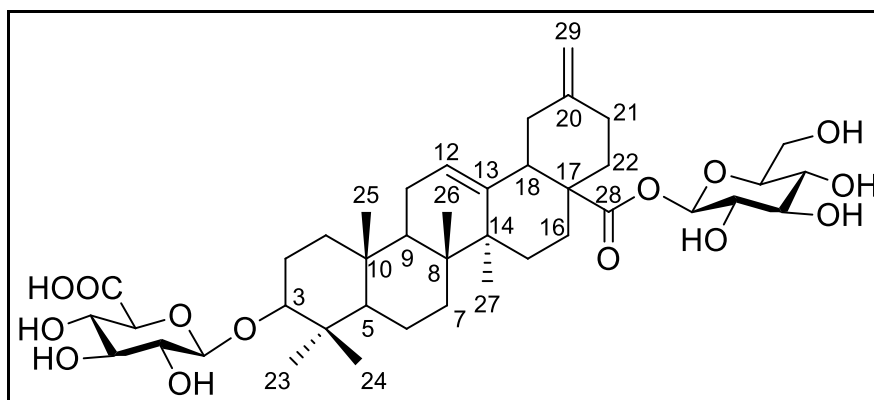


Tabela 13 - Deslocamentos de RMN de ^{13}C e ^1H para a saponina **Ad6**.

Posição	Composto Ad6*		Literatura**	
	δ_{C}	$\delta_{\text{H}} (J = \text{Hz})$	δ_{C}	$\delta_{\text{H}} (J = \text{Hz})$
1	38,3	0,88; 1,48	39,3	
2	25,2	1,75; 1,46	26,4	2,20, 1,81, m
3	88,4	3,05, dd (10,8, 4,8)	88,9	3,36, dd (12,5, 4,9)
4	39,0	-	39,7	-
5	55,2	0,72	55,6	
6	18,0	1,29; 1,47	18,3	
7	32,3	1,22; 1,41	32,9	
8	39,4	-	41,5	-
9	47,3	1,47, m	47,7	1,57, m
10	36,5	-	37,4	-
11	23,0	2,07; 1,79	23,4	2,03, 1,68, m
12	122,6	5,23	123,5	5,39, bs
13	143,3	-	143,3	-
14	41,5	-	41,9	-
15	27,4	1,22; 1,13	28,0	
16	25,9	1,76; 1,46	26,4	
17	47,2	-	47,1	
18	47,1	2,61	47,4	3,08, dd (13,9, 4,2)
19	41,4	1,44; 1,99	41,9	2,57, d (13,4), 2,18, m
20	148,1	-	148,4	-
21	38,6	1,39; 1,78	38,5	
22	29,6	2,07; 2,15	29,9	
23	28,0	0,96, s	28,0	1,28, s
24	16,7	0,75, s	16,7	0,95, s
25	15,6	0,85, s	15,3	0,78, s
26	17,1	0,68, s	17,2	1,03, s
27	25,9	1,11, s	25,8	1,22, s
28	175,1	-	175,7	-
29	107,6	4,60, d (9,0)	107,1	4,66, bs
Ácido glucurônico				
1'	105,9	4,23, d (7,8)	107,0	5,02, d (7,8)
2'	72,7	2,98, dd (7,5)	75,3	4,09, dd (7,5)
3'	75,7	3,54, m	77,5	4,66, m
4'	73,1	3,26, dd (8,8)	73,2	4,60, dd (8,8)
5'	79,0	3,14, m	79,1	3,99, m
6'	171,1	-	172,8	-
Glicose				
1"	94,6	5,21 d (8,2)	95,7	6,24, d (7,9)
2"	72,7	3,09 dd (7,8; 7,8)	73,8	4,12, dd (8,5; 8,5)
3"	77,0	3,19 dd (7,8; 7,8)	77,9	4,37, dd (8,5; 8,5)
4"	70,0	3,12 m	71,0	4,31, dd (8,5; 8,5)
5"	77,8	3,13 m	78,6	4,45, m
6"	61,0	3,61 dd (12,0; 3,0)	62,1	
		3,42 dd (12,0; 5,0)		

Deslocamentos químicos foram comparados com a literatura ESPADA et al., 1990. Espectros obtidos em: *DMSO- d_6 , 14,1 T; ** $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 5,87 T.

Figura 63 - Estrutura da saponina **Ad6**.

4.2.4 Ácidos fenólicos

4.2.4.1 Identificação de Ad10

A análise dos deslocamentos químicos no espectro de RMN ^1H de **Ad10** (Figura 64, Tabela 14) apresentou sinais de hidrogênios aromáticos na região de 6-8 ppm. Os sinais em δ_{H} 7,32 (1H, d, $J = 1,9$ Hz) e em δ_{H} 7,28 (1H, dd, $J = 1,9; 8,2$ Hz) foram atribuídos ao H-2 e H-6, respectivamente. Outro sinal com deslocamento químico em δ_{H} 6,77 (1H, d, $J = 8,2$ Hz) correspondeu ao H-5.

O espectro de absorção no UV de **Ad10** apresentou máximos de absorção em 260 nm e em 293 nm, que são característicos de ácidos fenólicos (Figura 65). Portanto, diante dos dados de ^1H (Tabela 14) e de ultravioleta apresentados, propõe-se para este composto a estrutura do ácido 3,4 diidroxibenzoico, nomeado também como o ácido protocatecuico (Figura 66).

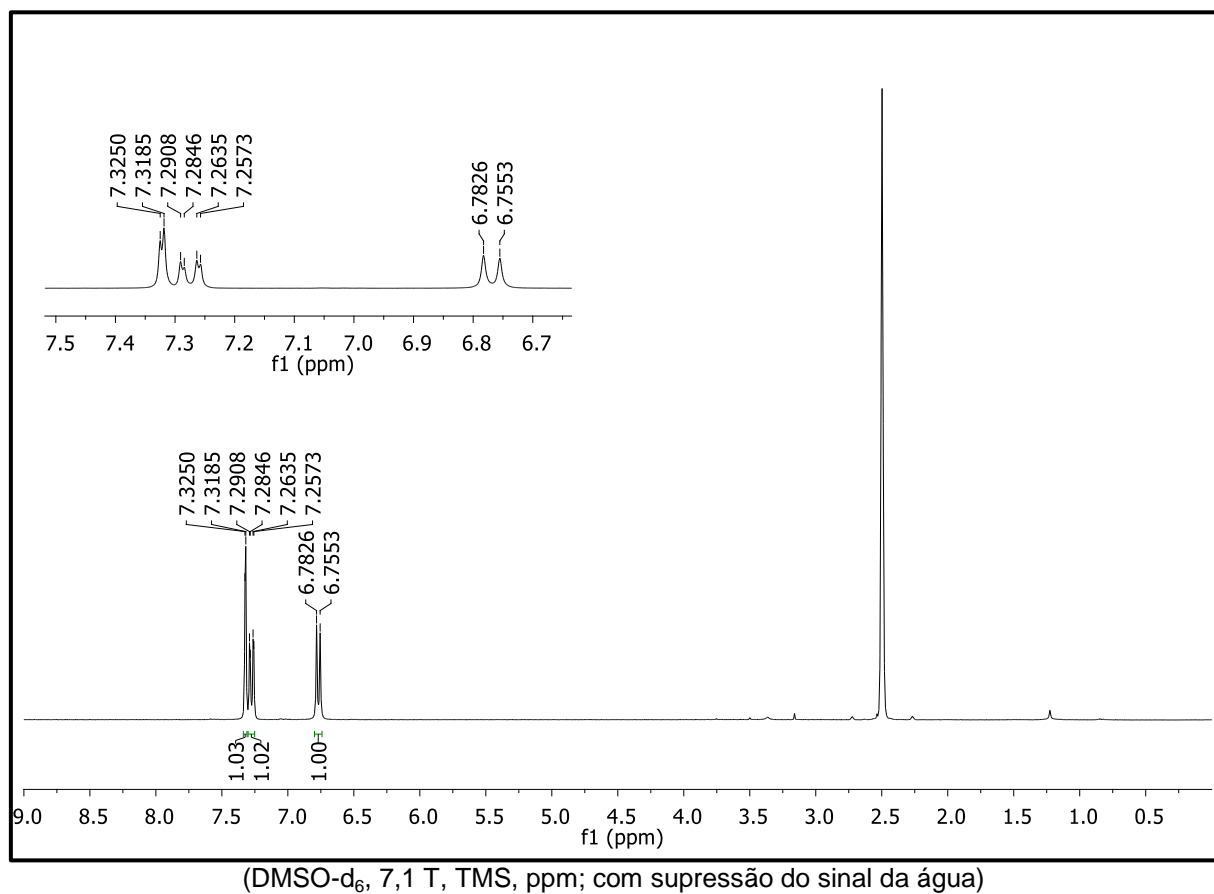
Figura 64 - Espectro RMN ^1H de Ad10.

Figura 65 - Espectro de absorção no UV do ácido fenólico Ad10.

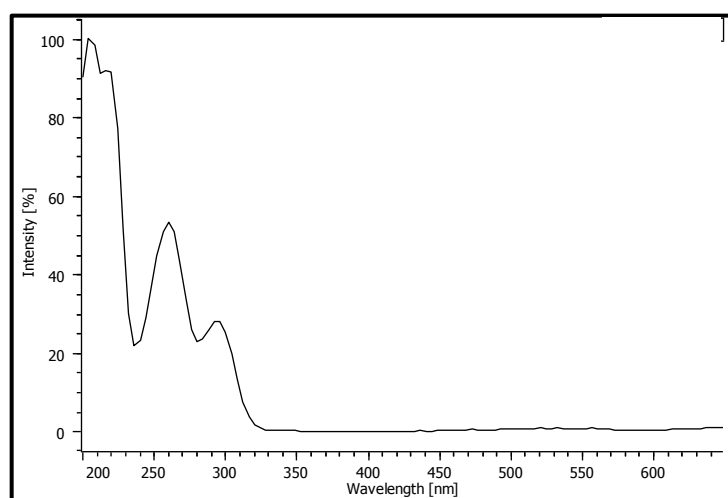
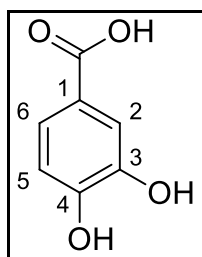
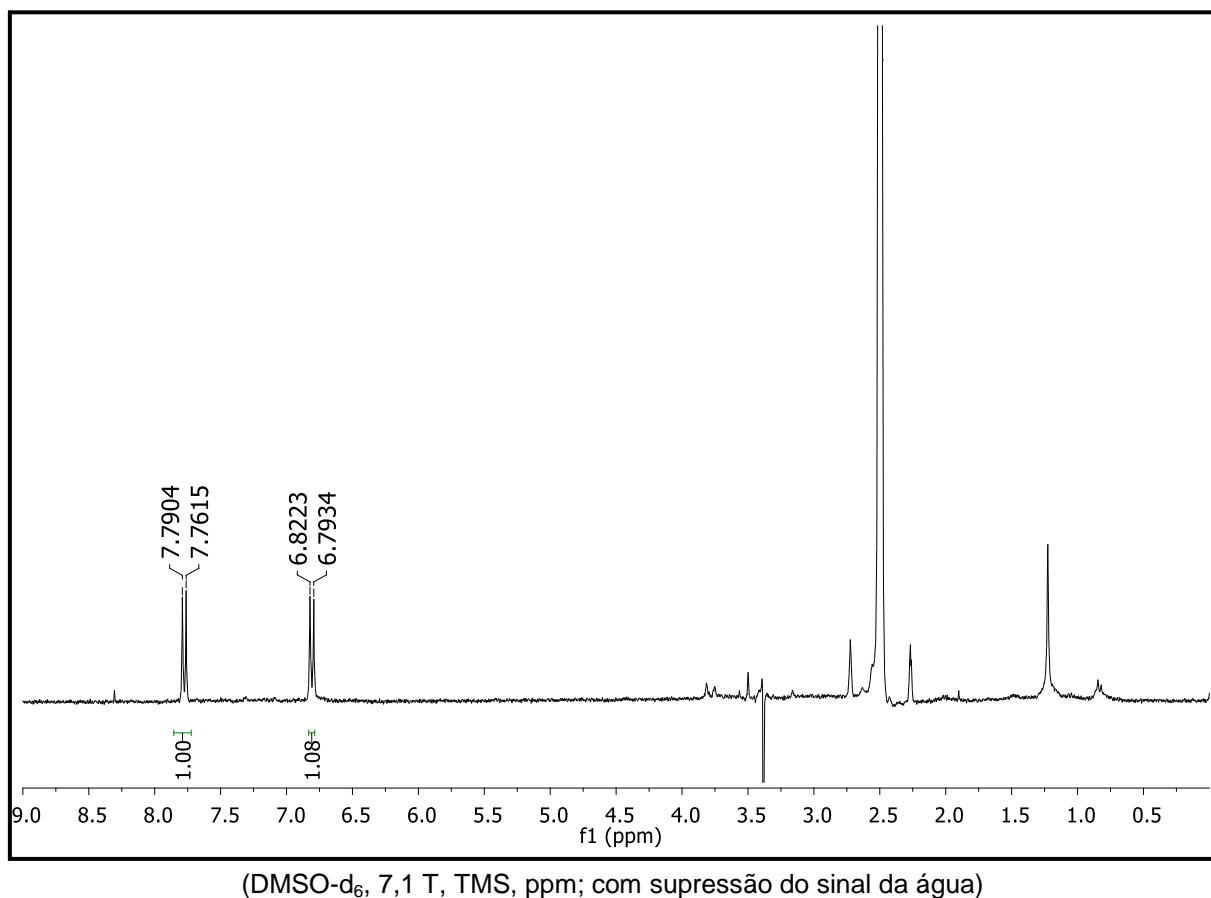
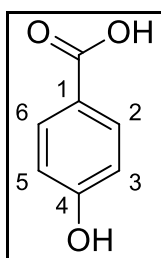


Figura 66 - Estrutura do ácido fenólico **Ad10**.

4.2.4.2 Identificação de Ad11

A análise dos deslocamentos químicos no espectro de RMN ^1H de **Ad11** (Figura 67, Tabela 14) apresentou sinais de hidrogênios aromáticos na região de 6-8 ppm. Os sinais em δ_{H} 7,78 (2H, d, $J = 8,7$ Hz) e em δ_{H} 6,81 (2H, dd, $J = 8,7$ Hz) foram atribuídos aos hidrogênios com acoplamento em orto referentes aos hidrogênios H-2/H-6 e H3-H5, respectivamente.

O espectro de UV de **Ad11** apresentou o mesmo padrão de absorção observado para o composto **Ad10** (Figura 65). Portanto, diante dos dados de ^1H (Tabela 14) e de ultravioleta apresentados, propõe-se para este composto a estrutura do ácido *p*-hidroxibenzoico (Figura 68).

Figura 67 - Espectro RMN ^1H de **Ad11**.**Figura 68** - Estrutura do ácido fenólico **Ad11**.

4.2.4.3 Identificação de **Ad12**

A análise dos deslocamentos químicos no espectro de RMN ^1H de **Ad12** (Figura 69, Tabela 14) apresentou sinais de hidrogênios aromáticos na região de 6-8 ppm. Os sinais em δ_{H} 7,34 (1H, d, $J = 2,0$ Hz) e em δ_{H} 7,30 (1H, dd, $J = 2,0; 8,2$ Hz) foram atribuídos ao H-2 e H-6, respectivamente. Outro sinal com deslocamento

químico em δ_H 6,80 (1H, d, $J = 8,2$ Hz) correspondeu ao H-5. O singlete (3H) a δ_H 3,75 confirma a presença de um grupo metoxílico.

O espectro de UV de **Ad12** apresentou o mesmo padrão de absorção observado para o composto **Ad10** (Figura 65). Portanto, diante dos dados de 1H (Tabela 14) e de ultravioleta apresentados, propõe-se para este composto a estrutura do ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico, conhecido como o ácido vanilínico (Figura 70).

Figura 69 - Espectro RMN 1H de **Ad13**.

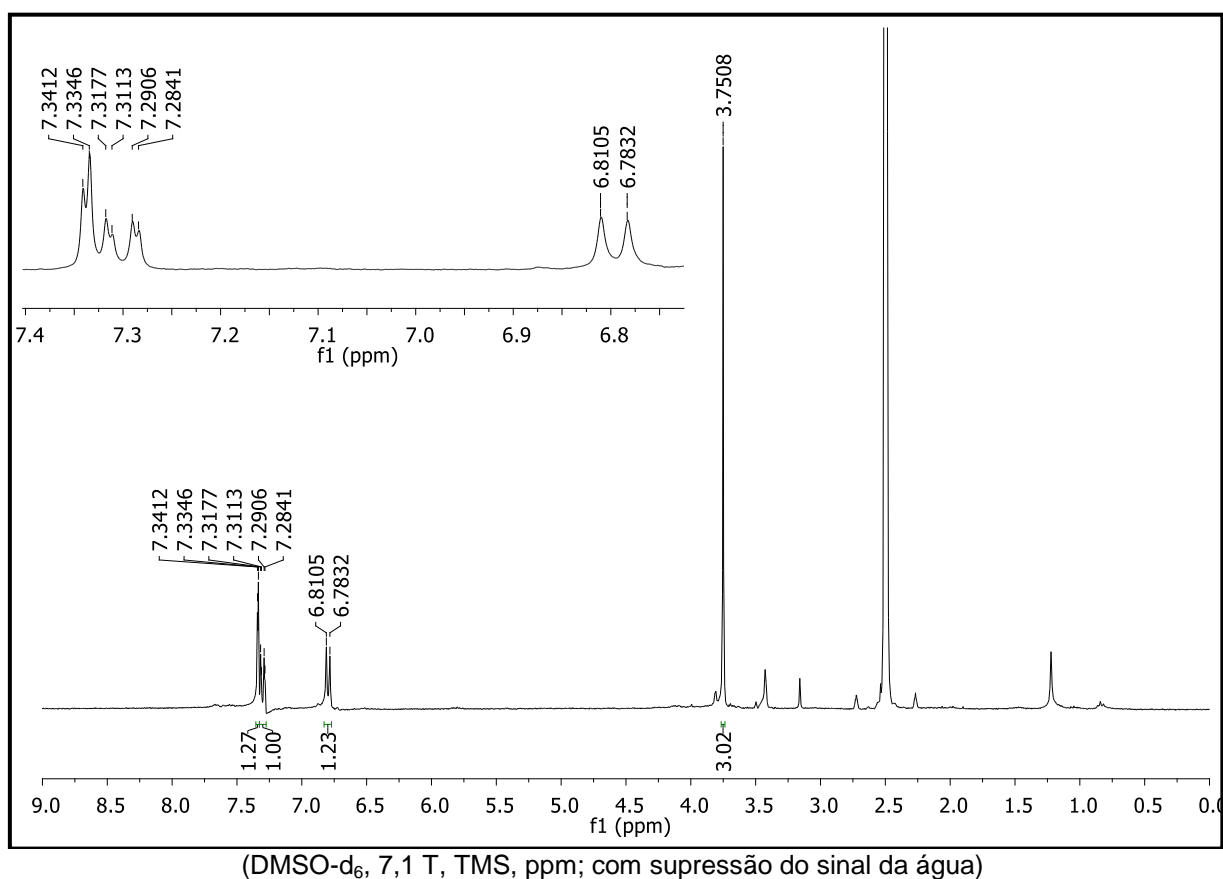


Figura 70 - Estrutura do ácido fenólico **Ad12**.

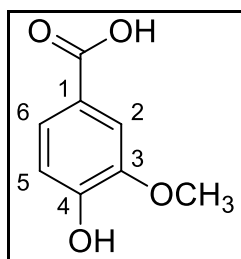


Tabela 14 - Deslocamentos de hidrogênio dos ácidos fenólicos (**Ad10-Ad12**) isolados da fração acetato de etila das folhas de *A. divaricatus*.

Posição	Ad10 ¹ H (J = Hz)	Ad11 ¹ H (J = Hz)	Ad12 ¹ H (J = Hz)
1	-	-	-
2	7,32 d (2,0)	7,78 d (8,7)	7,34 d (2,0)
3	-	6,81 d (8,7)	-
4	-	-	-
5	6,77 (8,2)	6,81 d (8,7)	6,80 d (8,2)
6	7,28 dd (1,9; 8,2)	7,78 d (8,7)	7,30 dd (2,0; 8,2)
3-OCH ₃	-	-	3,75 s

Espectros obtidos em: *DMSO-d₆, 7,1 T.

4.3 Padronização dos extratos por HPLC-PAD e validação do método

A padronização dos extratos metanólicos de capítulos, escapos e folhas de *A. divaricatus* se deu pela quantificação de derivados de quercetina e paepalantina glicosilados. Os padrões utilizados foram confirmados pela coinjeção dos padrões por HPLC-PAD e pela análise por HPLC-ESI-MS/MS. Essas análises permitiram identificar cada padrão nos extratos e determinar que o extrato metanólico dos escapos não possui nafopiranonas.

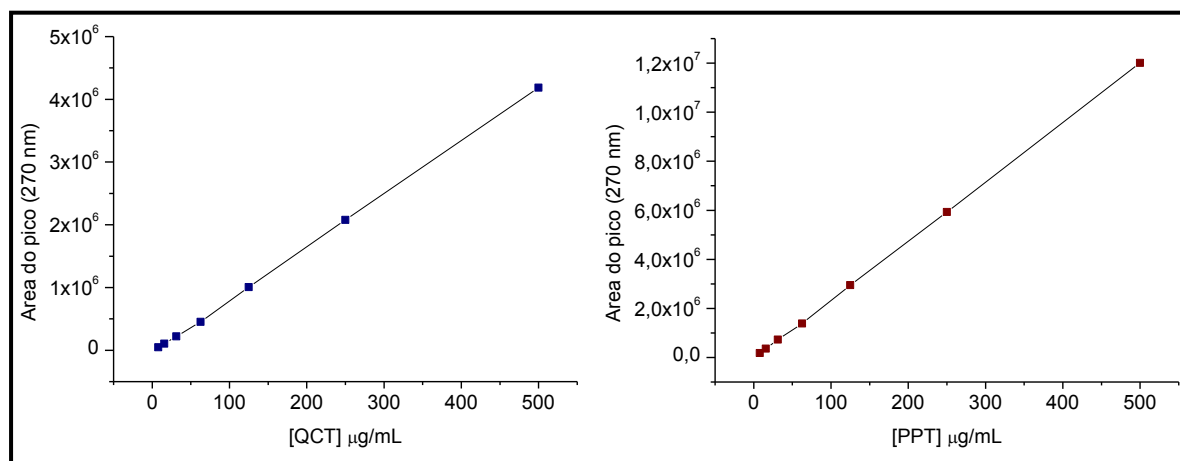
A validação do método foi realizada para os padrões 6-hidroxi-7-metoxiquercetina-3-O- β -D-glicopiranosídeo (QCT) e 10-hidroxi-5-7-dimetoxi-3-metil-1H-nafto[2,3c]piran-1-ona-9-O- β -D-glicopiranosídeo (PPT).

O estudo dos parâmetros avaliados geraram informações quanto ao desempenho da validação do método assim como a estimativa de incertezas associadas aos resultados.

4.3.1 Linearidade e sensibilidade

Os valores das áreas dos picos cromatográficos foram relacionados com os sete níveis de concentrações utilizadas (7,81, 15,63, 31,25, 62,50, 125,00, 250,00 e 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) para a construção das curvas analíticas de cada padrão (QCT e PPT) (Figura 71).

Figura 71 - Curvas analíticas obtidas pelo método de calibração externa das soluções padrões.



No intervalo de linearidade avaliado para cada padrão, as regressões lineares apresentaram coeficientes de correlação (r^2) superiores a 0,99, estando dentro dos valores exigidos pela ANVISA para análises de princípios ativos em matéria prima vegetal. Esses resultados indicam uma boa proporcionalidade entre a concentração do padrão e a área do pico cromatográfico no intervalo de concentração analisado (AGÊNCIA..., 2003).

Os parâmetros estatísticos que determinaram a linearidade de cada curva analítica estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 - Parâmetros das curvas analíticas dos padrões dos derivados da quercetina e paepalantina.

Padrão	Coeficiente linear (a)	Coeficiente angular (b)	Fator de correlação (r^2)	Faixa linear ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	LD ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
QCT	40333	8448,2	0,9998	7,77 - 500	2,56	7,77
PPT	46145	24048	0,9999	7,76 - 500	2,56	7,76

Os valores de limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) foram calculados com base na curva de calibração de cada padrão (RIBANI et al., 2004). As equações utilizadas estão apresentadas abaixo:

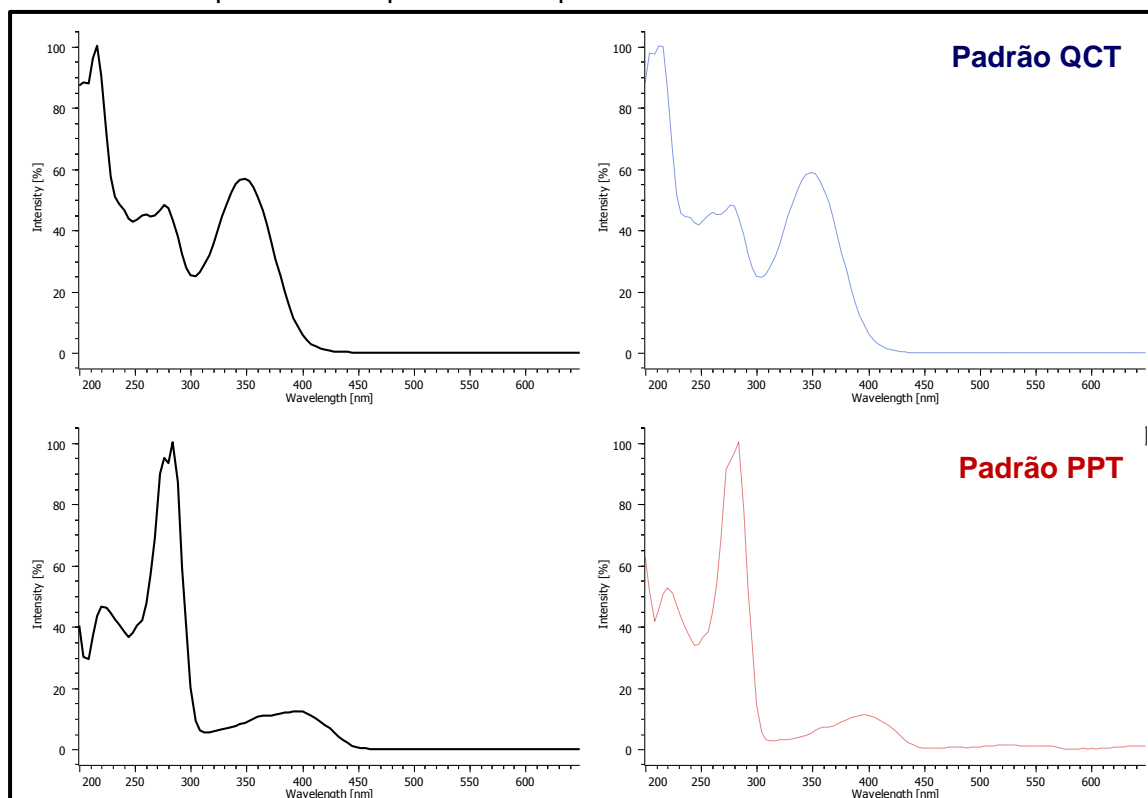
$$\text{LD} = \frac{3,3 \cdot \text{DPa}}{\text{IC}} \quad \text{LQ} = \frac{10 \cdot \text{DPa}}{\text{IC}} \quad (1)$$

onde **DPa** é o desvio padrão do intercepto com o eixo y das três curvas analíticas e **IC** é a inclinação da curva analítica.

4.3.2 Seletividade

A seletividade está relacionada com a capacidade do método em medir exatamente o composto de interesse em presença de outros componentes da matriz complexa (extrato vegetal) (RIBANI et al., 2004). Nesse caso, a seletividade pode ser comprovada pela similaridade entre os espectros de UV do padrão com os picos obtidos pelas análises dos extratos de capítulos, escapos e folhas de *A. divaricatus* (Figura 72).

Figura 72 - Espectros de UV dos compostos presentes nos extratos das partes aéreas de *A. divaricatus* e o espectro correspondente do padrão.



4.3.3 Precisão

A repetibilidade (intra-dia) e a precisão intermediária (inter-dia) do método foram avaliadas em relação aos t_R e as áreas dos picos dos padrões de QCT e PPT. A precisão de cada padrão foi avaliada pelo desvio padrão relativo (DPR) em três níveis de concentração: 31,25, 125 e 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Tabela 16). Foram realizadas nove determinações com os três níveis de concentrações (3 concentrações/3 replicatas).

Tabela 16 - Precisão intra-dia e inter-dia para o método de determinação de cada padrão.

Padrão	Tempo de retenção (DPR %)		Área do pico (DPR %)	
	Intra-dia	Inter-dia	Intra-dia	Inter-dia
31,25 µg.mL ⁻¹				
QCT	0,039	0,041	0,40	1,08
PPT	0,064	0,15	0,12	3,83
125,00 µg.mL ⁻¹				
QCT	0,29	0,34	1,23	2,53
PPT	0,0028	0,28	0,21	3,77
500 µg.mL ⁻¹				
QCT	0,09	0,41	0,38	3,94
PPT	0,11	0,11	1,88	3,90

Os resultados encontrados para os experimentos intra-dia e inter-dia estão dentro do limite estabelecido pela RE 899/03, sendo considerados métodos precisos aqueles com desvio padrão relativo menor que 5% (AGÊNCIA..., 2003). Portanto, os métodos propostos para cada padrão apresentam precisão satisfatória.

4.3.4 Exatidão

A exatidão dos métodos foi avaliada pela taxa de recuperação de cada padrão (Tabela 17), que foi calculada de acordo com a equação 2:

$$\text{Exatidão} = \frac{C_f - C_{nf}}{C_T} \cdot 100 \quad (2)$$

onde C_f é a concentração do analito fortificada com padrão, C_{nf} é a concentração do analito não fortificada com o padrão (branco) e C_T é a concentração do padrão teórica.

A taxa de recuperação foi avaliada em três níveis de concentração: 31,25 µg.mL⁻¹ (menor concentração para os teores de QCT e PPT, para cada extrato avaliado), 125 µg.mL⁻¹ (concentração intermediária) e 500 µg.mL⁻¹ (concentração máxima).

Tabela 17 - Exatidão do método para os extratos metanólicos das partes aéreas de *A. divaricatus*.

(QCT) Exatidão (%)			
Conc. add ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Capítulos	Escapos	Folhas
31,25	86,40 \pm 3,03	83,69 \pm 0,77	98,50 \pm 0,53
125,00	100,84 \pm 0,77	84,05 \pm 1,36	102,48 \pm 1,31
500,00	107,06 \pm 3,65	84,26 \pm 4,46	119,40 \pm 1,59
(PPT) Exatidão (%)			
Conc. add ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Capítulos	Folhas	
31,25	108,50 \pm 0,50	108,05 \pm 1,65	
125,00	113,14 \pm 0,94	111,10 \pm 2,35	
500,00	118,29 \pm 4,80	114,85 \pm 4,85	

Os valores calculados para a taxa de recuperação de cada padrão nos extratos das partes aéreas de *A. divaricatus* apresentaram-se dentro da taxa percentual aceitável de 80 a 120% determinada pela ANVISA para análises de princípio ativo em matéria prima vegetal. Deste modo, o método empregado para a determinação dos derivados de quercetina e paepalantina apresenta uma boa exatidão (AGÊNCIA..., 2003).

4.3.5 Análise dos extratos de capítulos, escapos e folhas de *A. divaricatus*

A quantificação por HPLC-PAD foi feita pela construção da curva analítica baseada nas variações das concentrações dos padrões utilizados, sendo que para isso foi feita a correlação das áreas dos picos (resposta do detector) com as concentrações correspondentes.

Os teores dos compostos presentes em cada extrato foi determinado pela interpolação de suas áreas na curva de calibração de cada padrão e estão apresentados nas Tabelas 18 e 19.

Tabela 18 - Teores dos derivados de quercetina glicosilados nos extratos metanólicos de capítulos, escapos e folhas de *A. divaricatus*.

Capítulos			
Tr (min)	[] ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	[] (mg.g^{-1}) extrato	[] (mg.kg^{-1}) capítulos
23,40	96,46 \pm 1,19	9,64 \pm 0,12	101,54 \pm 1,26
Teor total	96,46 \pm 1,19	9,64 \pm 0,12	101,54 \pm 1,26
Escapos			
Tr (min)	[] ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	[] (mg.g^{-1}) extrato	[] (mg.kg^{-1}) escapos
20,08	260,72 \pm 1,68	26,07 \pm 0,17	201,28 \pm 1,30
21,27	28,68 \pm 0,41	2,87 \pm 0,04	22,14 \pm 0,31
22,17*	53,78 \pm 1,41	5,50 \pm 0,14	41,52 \pm 1,09
36,15	56,45 \pm 0,06	5,65 \pm 0,01	43,58 \pm 0,04
Teor total	399,63 \pm 3,55	39,96 \pm 0,36	308,52 \pm 2,74
Folhas			
Tr (min)	[] ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	[] (mg.g^{-1}) extrato	[] (mg.kg^{-1}) folhas
23,29*	452,96 \pm 1,04	45,30 \pm 0,10	94,10 \pm 2,17
26,32	117,72 \pm 1,18	11,77 \pm 0,12	99,89 \pm 0,91
27,99	135,65 \pm 2,75	13,56 \pm 0,27	104,72 \pm 2,12
29,53	445,16 \pm 3,94	44,52 \pm 0,39	347,67 \pm 7,68
31,02	25,25 \pm 0,87	2,53 \pm 0,09	19,50 \pm 0,67
31,93	61,34 \pm 1,80	6,13 \pm 0,18	47,35 \pm 1,39
Teor total	1238,08 \pm 26,98	123,81 \pm 2,70	700,23 \pm 14,94

* flavonoide 6-hidroxi-7-metoxiquercetina-3-O- β -D-glicopiranosídeo**Tabela 19** - Teores dos derivados de paepalantina glicosilados nos extratos metanólicos de capítulos e folhas de *A. divaricatus*.

Capítulos			
Tr (min)	[] ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	[] (mg.g^{-1}) extrato	[] (mg.kg^{-1}) capítulos
27,82	89,20 \pm 0,57	8,92 \pm 0,06	93,90 \pm 0,60
31,87	271,70 \pm 1,03	27,17 \pm 0,10	286,00 \pm 1,08
37,72*	34,26 \pm 0,66	3,42 \pm 0,07	36,06 \pm 0,70
Teor total	395,16 \pm 2,26	39,51 \pm 0,23	415,96 \pm 2,38
Folhas			
Tr (min)	[] ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	[] (mg.g^{-1}) extrato	[] (mg.kg^{-1}) folhas
32,46	9,61 \pm 0,11	0,96 \pm 0,01	10,12 \pm 0,12
33,47	11,95 \pm 0,05	1,20 \pm 0,01	12,58 \pm 0,05
37,70*	38,26 \pm 0,45	3,83 \pm 0,05	40,27 \pm 0,48
Teor total	59,82 \pm 0,61	5,99 \pm 0,07	62,97 \pm 0,65

* 10-hidroxi-5-7-dimetoxi-3-metil-1H-nafto[2,3c]piran-1-ona-9-O- β -D-glicopiranosídeo

Como apresentado na Tabela 18 as folhas apresentaram o maior teor de flavonoides derivados da quercetina glicosilado, enquanto que os capítulos (Tabela 19) apresentaram maior teor em naftopiranonas.

4.4 Atividades biológicas

4.4.1 Avaliação da atividade antimicrobiana

Os resultados de CIM para as atividades antibacteriana e antifúngica mostraram que os extratos de capítulos, escapos e folhas de *A. divaricatus* possuem baixa atividade. Os extratos dos capítulos e escapos apresentaram atividade para a bactéria gram-negativa *E. coli* na concentração de 1000 µg.mL⁻¹. O extrato dos escapos foi único que apresentou atividade para a bactéria gram-negativa *S. setubal* e o extrato das folhas, o único para a bactéria gram-positiva *S. aureus*, ambos na concentração de 1000 µg.mL⁻¹. Os três extratos testados não se apresentaram ativos frente à cepa de levedura *C. albicans*, sendo, portanto a concentração inibitória mínima superior a 1000 µg.mL⁻¹.

Os resultados obtidos para os extratos metanólicos de capítulos, escapos e folhas frente às linhagens de bactérias e fungos estão apresentados na Tabela 20.

Tabela 20 - As concentrações inibitórias mínimas (CIM) para os extratos metanólicos de capítulos, escapos e folhas de *A. divaricatus*.

Amostras Avaliadas	CIM ^a			
	Bactéria Gram-negativa		Bactéria Gram-positiva	Levedura
	<i>E. coli</i>	<i>S. Setubal</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
Capítulos	1000,0	–	–	–
Escapos	1000,0	1000,0	–	–
Folhas	–	–	1000,0	–
Ampicilina	15,6	< 7,8	< 7,8	
Anfotericina B				< 7,8

^a valores em µg.mL⁻¹; (–) CIM > 1000 µg.mL⁻¹

De acordo com a escala de inibição proposta na literatura (HOLETZ et al. 2002; RIOS; RECIO; VILLAR, 1988), a concentração inibitória mínima de

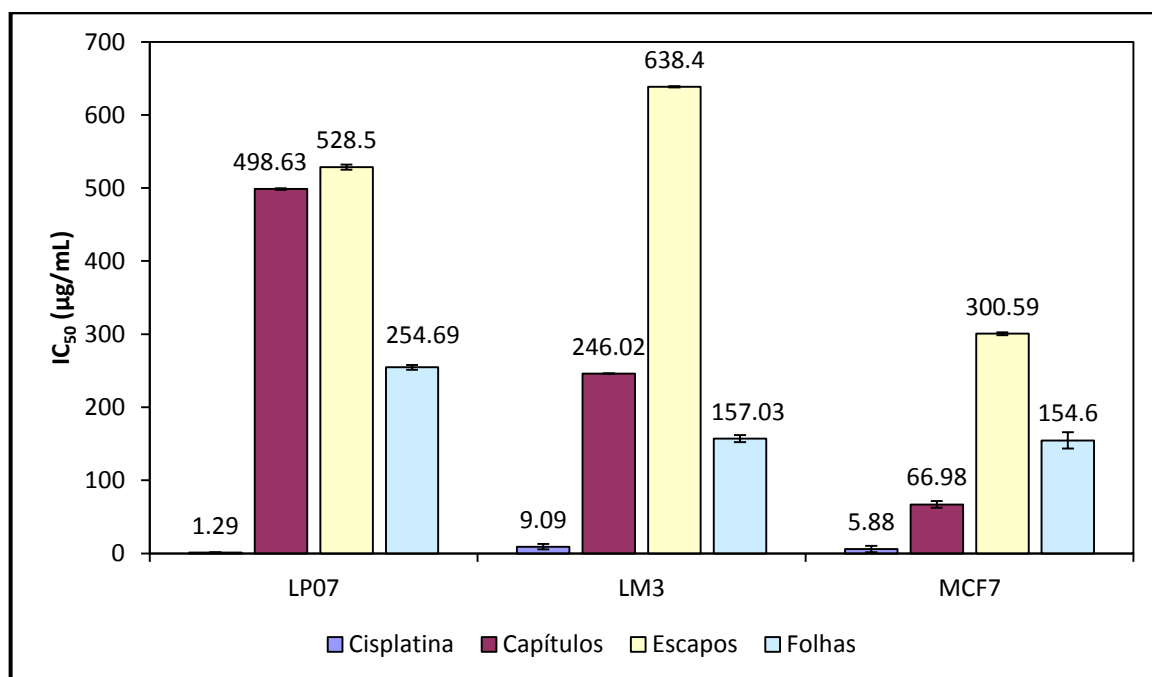
Padronização dos extratos polares de Actinocephalus divaricatus (Eriocaulaceae)

1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ é considerada fraca para extratos vegetais, ou seja, as linhagens não apresentam sensibilidade frente aos extratos testados.

4.4.2 Determinação da citotoxicidade

Os ensaios biológicos do efeito inibitório pelo método MTT de crescimento celular causado por todos os extratos avaliados de *A. divaricatus* (capítulos, escapos e folhas) e a cisplatina (controle positivo) foram realizados *in vitro* contra linhas de células de tumores de murinos, LM3 (adenocarcinoma mamário) e LP07 (adenocarcinoma de pulmão) e células de tumores humana, MCF7 (cancro da mama humana). A dose citotóxica para 50% das células (IC_{50}) foi definida utilizando o método estatístico de curva dose-resposta sigmoideal e estão apresentados na Figura 73 e na Tabela 21.

Figura 73 - Gráfico comparativo entre os valores de IC_{50} para as linhagens tumorais.



LP07 (adenocarcinoma de pulmão murino); LM3 (adenocarcinoma mamário murino) e MCF7 (cancro da mama humana).

Tabela 21 - Valores de citotoxicidade para os extratos metanólicos dos capítulos, escapos e folhas de *A. divaricatus*.

Extratos metanólico	IC ₅₀ (µg.mL ⁻¹ ± DPR ^a)		
	LP07	LM3	MCF7
Cisplatina	1.29 ± 0.40	9.09 ± 3.70	5.88 ± 4.30
Capítulos	498.63 ± 1.03	246.02 ± 0.43	66.98 ± 4.56
Escapos	528.50 ± 3.52	638.40 ± 0.96	300.59 ± 2.03
Folhas	254.69 ± 3.31	157.03 ± 4.89	154.60 ± 11.19

LP07 (adenocarcinoma de pulmão); LM3 (adenocarcinoma mamário) e MCF7 (cancro da mama humana).

^aDPR = Desvio Padrão Relativo

O melhor resultado que causou uma redução significativa do número de células foi para o extrato metanólico dos capítulos (IC₅₀ = 66,98 µg.mL⁻¹) contra MCF7 (cancro da mama humana). Os outros extratos metanólicos dos escapos e folhas e outra gama de concentrações do extrato metanólico dos capítulos não causaram qualquer redução significativa do número de células quando comparado com a cisplatina.

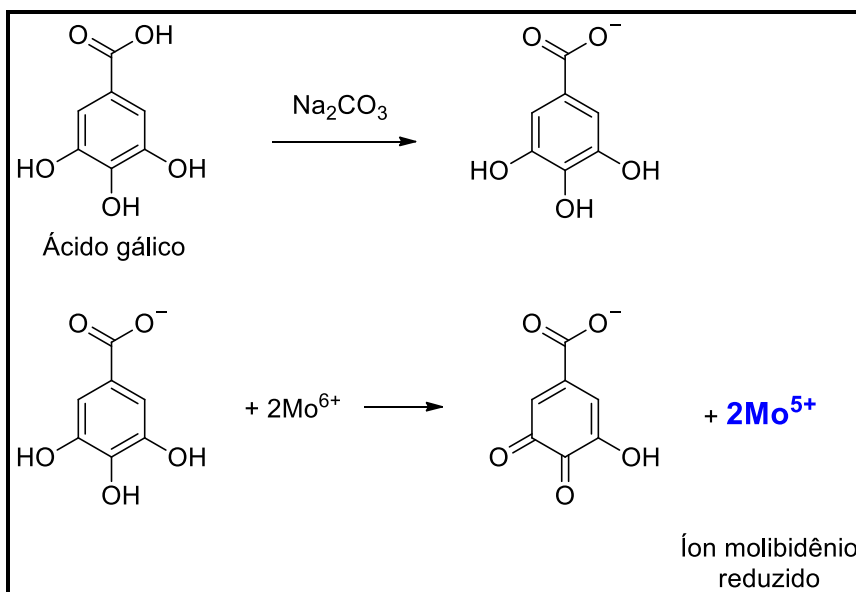
A diferença na inibição encontrada para o extrato metanólico dos capítulos, pode ser devido ao teor superior de naftopiranonas presentes neste extrato, (como determinado na etapa de quantificação), visto que, esta classe de metabólito possui atividade mutagênica comprovada na literatura (VARANDA et al., 1997; SILVA et al., 2007).

4.5 Determinação do teor de fenóis totais

O método colorimétrico de Folin-Ciocalteu foi utilizado na determinação do teor de fenóis totais presente nos extratos metanólicos de capítulos, escapos e folhas de *A. divaricatus*.

A determinação dos compostos fenólicos é baseada na redução em meio alcalino do molibidênio VI em molibidênio V, sendo este azul e que pode ser medido opticamente a 750 nm (HUANG; OU; PRIOR, 2005) (Figura 74).

Figura 74 - Reação do padrão de ácido gálico com o molibdênio, componente do reagente de Folin-Ciocalteu.



Fonte: Adaptado de SINGLETON et al., 1999.

A quantificação por espectrofotômetro foi realizada a partir da construção da curva analítica baseada nas variações das concentrações do padrão ácido gálico, sendo feita a correlação entre a absorbância em 750 nm (resposta do espectrofotômetro) com as concentrações correspondentes do padrão (Figura 75).

Os teores dos compostos fenólicos presentes em cada extrato foi determinado pela interpolação de suas áreas na curva do padrão fenólico e estão apresentados na Figura 76 e Tabela 22.

Figura 75 - Curva de calibração do ácido gálico obtida para a determinação da quantidade de fenóis totais.

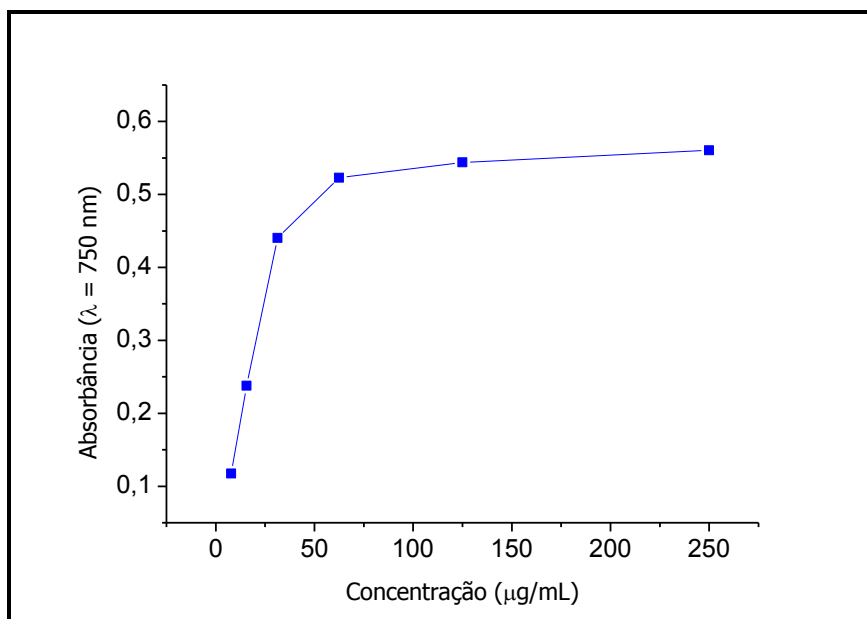


Figura 76 - Gráfico comparativo entre os teores de fenóis totais nos extratos metanólicos das partes aéreas de *A. divaricatus*.

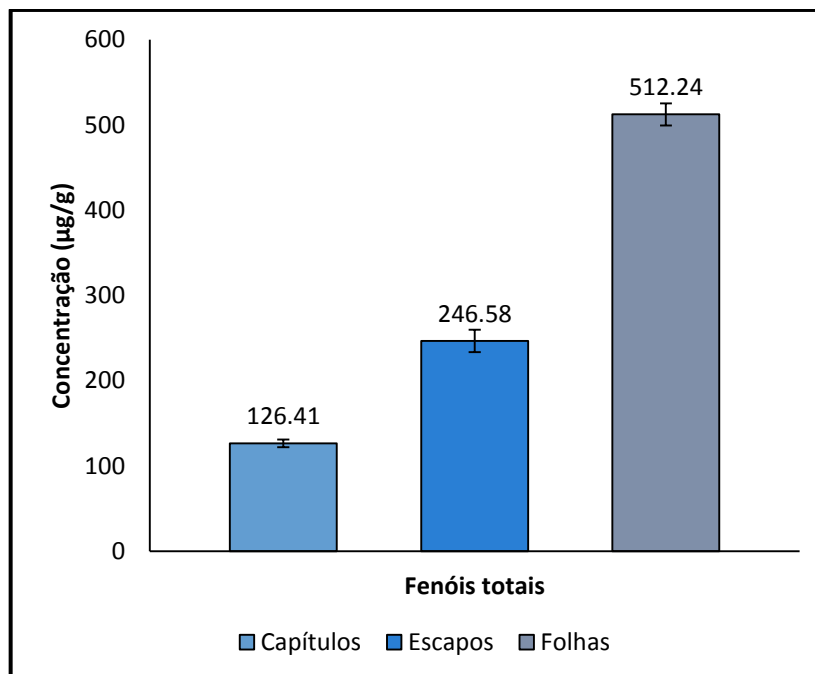


Tabela 22 - Teores de fenóis totais nos extratos metanólicos das partes aéreas de *A. divaricatus*.

Parte da planta	[] (mg.g ⁻¹) extrato ± DPR
Capítulos	126,41 ± 4,45
Escapos	246,58 ± 13,18
Folhas	512,24 ± 12,89

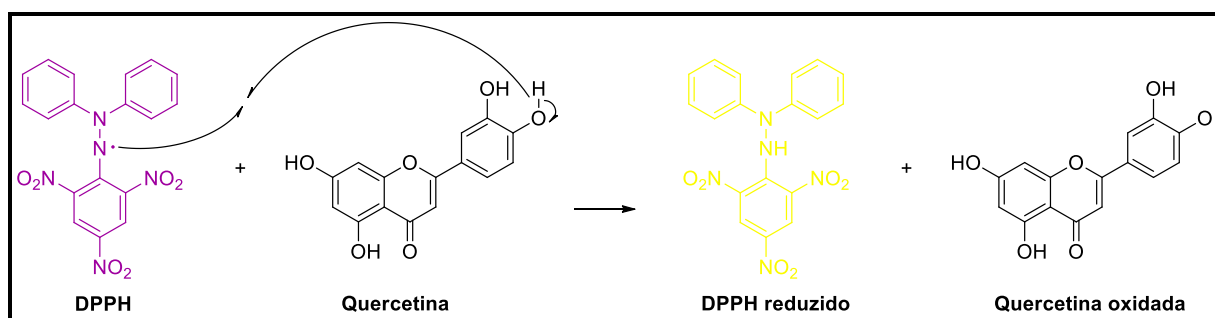
O maior teor de ácidos fenólicos foi encontrado para o extrato metanólico das folhas: 512,24 mg.g⁻¹ (± 12,89).

4.7 Avaliação do potencial antiradicalar

O ensaio de DPPH foi realizado para a avaliação do potencial de eliminação dos radicais livres dos extratos metanólicos de capítulos, escapos e folhas de *A. divaricatus*.

O DPPH é um radical estável em solução e tem coloração púrpura absorvendo a 515 nm em metanol. A determinação do potencial antiradicalar baseia-se na redução da espécie radicalar ao aceitar um átomo de hidrogênio (H) a partir da molécula antioxidante, assim, a cor púrpura muda para o amarelo acompanhada da diminuição na absorbância a 515 nm (BRAND-WILLIAMS et al., 1995; MISHRA; OJHA; CHAUDHURY, 2012) (Figura 77). A mudança de cor foi monitorada por um espectrofotômetro e utilizada para a determinação dos parâmetros das propriedades antioxidantes.

Figura 77 - Reação radicalar do DPPH com a quercetina.

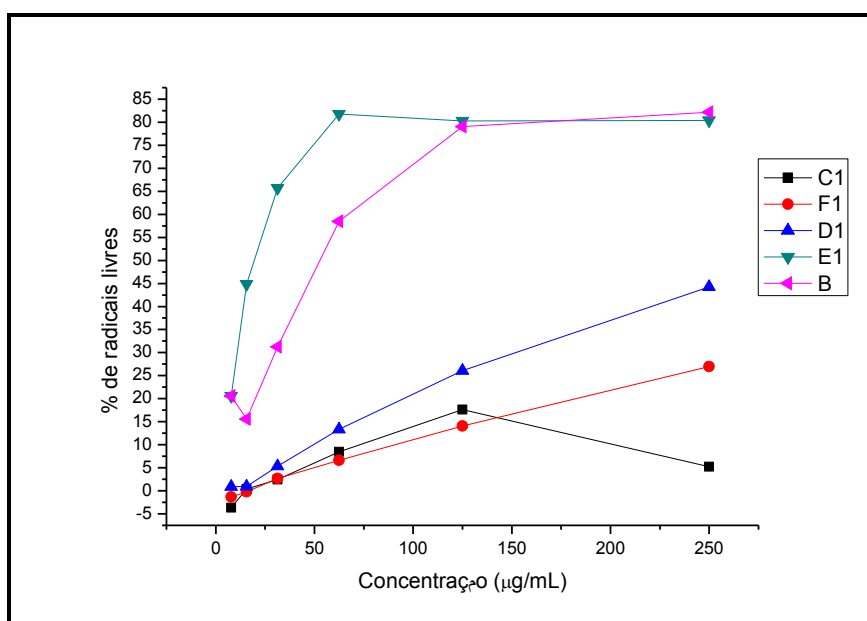


Fonte: Adaptado de JOVANOVIC et al., 1994

A avaliação do potencial antiradicalar foi determinada por meio da construção da curva analítica baseada nas variações das concentrações de cada amostra com

o percentual de captura dos radicais livres. Os valores foram determinados considerando a redução dos radicais livres em 50% (IC_{50}) que foram definidos pelas curvas dose-resposta sigmoidal apresentadas na Figura 78.

Figura 78 - Porcentagem de inibição de DPPH do padrão de quercetina e dos extratos metanólicos de capítulos, escapos e folhas de *A. divaricatus*.



C1: Capítulos, F1: Escapos, D1: Folhas, E1: padrão de ácido gálico, B: padrão de quercetina.

Os extratos metanólicos de capítulos, escapos e folhas de *A. divaricatus* não apresentaram atividade antioxidante considerada, sendo o valor de redução dos radicais livres, para cada extrato, superiores à concentração máxima utilizada no ensaio ($IC_{50} > 250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). A baixa atividade dos extratos pode ser atribuída ao alto teor de compostos glicosilados presentes, que diminuem o mecanismo de ação antiradicalar dos compostos.

5 CONCLUSÕES

O estudo da espécie *A. divaricatus* está sendo descrito pela primeira vez na literatura, assim, o estudo dos extratos metanólicos dessa espécie possibilitou a identificação de metabólitos secundários e a padronização dos extratos pela quantificação de flavonoides e naftopiranonas.

A caracterização cromatográfica por LC-PAD, juntamente com o estudo por espectrometria de massas de alta resolução proporcionou o perfil químico qualitativo dos extratos metanólicos de capítulos, escapos e folhas de *A. divaricatus* sem o isolamento prévio dos metabólitos já conhecidos. A análise dos espectros de UV evidenciou diferenças de metabólitos existentes nas três partes da planta: nos capítulos e folhas estão presentes as naftopiranonas e flavonoides enquanto que nos escapos apenas flavonoides. A análise dos espectros ESI-MS permitiu a identificação dos compostos presentes em cada parte da planta por comparação com os padrões de fragmentação conhecidos na literatura, sendo possível propor a estrutura de 12 flavonoides, 5 naftopiranonas e 14 saponinas.

O fracionamento dos extratos metanólicos dos escapos e folhas permitiu o isolamento de 7 flavonoides: 6-hidroxi-7-metoxiquercetina-3-O- β -D-glicopiranosídeo, quercetina-3-O- β -D-glicopiranosídeo-7-O- α -L-rhaminopiranosídeo, 6-hidroxi-7-metoxiquercetina, a nova 6-hidroxi-7-metoxiquercetina-3-O- β -D-(2"-O-acetil)-glicopiranosídeo, a nova 6-hidroxi-7-metoxiquercetina-3-O- β -D-(4"-O-acetil)-glicopiranosídeo e o novo éster diflavonoídico da 6-hidroxi-7-metoxiquercetina; 2 naftopiranonas: 10-hidroxi-5,7-dimetoxi-3-metil-1H-nafito [2,3 c] piran-1-ona-9-O- β -D-glicopiranosil-(6 \rightarrow 1)-O- β -D-alopiranosídeo e vioxantina e 1 saponina: ácido 3-O- β -D-glicuronopiranosil-30-norolean-12,20(29)-dieno-28-óico-28-O- β -D-glicopiranosil éster e três ácidos fenólicos: o ácido protocatecuico, o ácido *p*-hidroxibenzoico e o ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico.

A avaliação quantitativa dos teores de flavonoides e naftopiranonas foi determinada pelo desenvolvimento de método analítico por HPLC-PAD. Os métodos apresentaram boa linearidade e seletividade na determinação dos compostos de interesse.

Os métodos utilizados apresentaram boa precisão, para as análises de repetibilidade e precisão intermediária, com valores de desvio padrão relativo na faixa de 0,0028 a 3,90%.

A taxa de recuperação de 83 a 119% conferiu aos métodos uma boa exatidão.

A quantificação dos derivados de quercetina e paepalantina apresentou diferenças significativas nas concentrações desses metabólitos em cada parte da planta. A maior concentração de derivados da quercetina foi encontrada no extrato metanólico das folhas ($123,81 \pm 2,70 \text{ mg.g}^{-1}$ de extrato). Enquanto, que a maior concentração de derivados da paepalantina foi encontrada no extrato metanólico dos capítulos ($39,51 \pm 0,23 \text{ mg.g}^{-1}$ de extrato).

Os teores de fenóis totais encontrados para os extratos metanólicos foi de 126,41, 246,58 e 512,24 mg.g^{-1} de extrato para os capítulos, escapos e folhas, respectivamente.

Os extratos avaliados não apresentaram uma boa atividade antiradicalar, sendo o valor de redução dos radicais livres, para cada extrato, superiores à concentração máxima utilizada no ensaio ($\text{IC}_{50} > 250 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$). Essa baixa atividade pode ser atribuída ao alto teor de compostos glicosilados presentes como visto nos teores desses metabólitos determinados pela quantificação.

Os extratos apresentaram fraca sensibilidade para a atividade antimicrobiana frente às cepas de bactérias e levedura testadas. Os melhores valores de concentração inibitória mínima foi encontrado para o extrato metanólico dos escapos que se mostrou ativo frente às cepas de *S. aureus* e *E. coli*.

A citotoxicidade dos extratos foi considerada baixa, quando comparado com o padrão de controle cisplatina, sendo o melhor resultado encontrado para o extrato metanólico dos capítulos ($\text{IC}_{50} = 66,98 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$) contra MCF7 (cancro da mama humana). Os outros extratos metanólicos dos escapos e folhas e outra gama de concentrações do extrato metanólico dos capítulos não causaram qualquer redução significativa do número de células quando comparado com a cisplatina. A diferenciação encontrada pode ser atribuída ao alto teor de naftopiranonas neste extrato, visto que esta classe de metabólito possui atividade antitumoral comprovada na literatura.

Os resultados apresentados contribuem para o conhecimento da composição química e padronização dos extratos metanólicos das partes aéreas de *A. divaricatus*.

Pelo estudo químico de *A. divaricatus* foi possível determinar a presença majoritária de flavonoides 6-oxigenados, 7-metoxilados e de flavonoides acilados.

Esses dados são relevantes na diferenciação genérica de *Actinocephalus* e *Paepalanthus*. As espécies incluídas na nova circunscrição do gênero *Actinocephalus*, anteriormente classificadas como *Paepalanthus* sect. *Actinocephalus* e *Paepalanthus* subsect. *Aphorocaulon* apresentavam não apenas uma similaridade morfológica, mas também uma homogeneidade nos metabólitos secundários presentes. Além disso, a presença de saponinas nos escapos e folhas define o gênero *Actinocephalus* como um gênero distinto do gênero *Paepalanthus*, uma vez que a classe de saponinas é descrita pela primeira vez na família Eriocaulaceae. Assim, este estudo químico sugere que novos estudos devam ser realizados com as espécies do gênero *Paepalanthus*, subseção *Actinocephalus* para a reclassificação taxonômica destas espécies no gênero *Actinocephalus*.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução n. 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 02 jun. 2003. Disponível em: <http://redsang.ial.sp.gov.br/site/docs_leis/vm/vm1.pdf>. Acesso em: 20 maio 2016.
- AGNOLET, S.; WIESE, S.; VERPOORTE, R.; STAERK, D. Comprehensive analysis of commercial willow bark extracts by new technology platform: combined use of metabolomics, high-performance liquid chromatography-solid-phase extraction-nuclear magnetic resonance spectroscopy and high-resolution radical scavenging assay. **Journal of Chromatography A**, v. 1262, p. 130-137, 2012.
- AGRAWAL, P. K. **Carbon¹³ NMR of flavonoids**. Amsterdam: Elsevier, 1989. 564 p.
- AMARAL, F. P.; NAPOLITANO, A.; MASULLO, M.; SANTOS, L. C.; FESTA, M.; VILEGAS, W.; PIZZA, C.; PIACENTE, S. HPLC-ESI-MSⁿ profiling, isolation, structural elucidation and evaluation of the antioxidant potential of phenolics from *Paepalanthus geniculatus*. **Journal Natural Products**, v. 75, p. 547-556, 2012.
- ANDRADE, F. D. P.; SANTOS, L. C.; DOKKEDAL, A. L.; VILEGAS, W. Acyl glucosylated flavonols from *Paepalanthus* species. **Phytochemistry**, v. 51, p. 411-415, 1999.
- ANDRADE, M. J. G.; GIULIETTI, A. M.; VAN DEN BERG, C.; HARLEY, R. *Blastocaulon* (Eriocaulaceae), a synonym of *Paepalanthus*: morphological and molecular evidence. **Taxon**, v. 60, n. 1, p. 178-184, 2011.
- ARAÚJO, M. G. F.; HILÁRIO, F.; NOGUEIRA, L. G.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C.; BRUNETTI, I. L.; SOTOMAYOR, C. H.; BAUAB, T. M. Correlation among antioxidant, antimicrobial, hemolytic, and antiproliferative properties of *Leiosthrix spiralis* leaves extract. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 9260-9277, 2012.
- ARAÚJO, M. G. F.; PACÍFICO, M.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C.; ICELY, P. A.; MIRÓ, M. S.; SCARPA, M. V. C.; BAUAB, T. M.; SOTOMAYOR, C. E. Evaluation of *Syngonanthus nitens* (Bong.) Ruhl. extract as antifungal and in treatment of vulvovaginal candidiasis. **Medical Mycology**, v. 51, p. 673-682, 2013.
- ARDREY, R. E. **Liquid chromatography-mass spectrometry: an introduction**. San Francisco: John Wiley & Sons, 2003. 289 p.
- BEN-EFRAIM, D. A.; GREEN, B. S. The use of mid-points or average NMR chemical shifts in stereochemical assignments. **Tetrahedron**, v. 30, p. 2357-2364, 1974.
- BOSQUEIRO, A. L. D. **Estudo fitoquímico e implicações taxonômicas de *Paepalanthus Mart. (Eriocaulaceae)***. 2000. 94 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2000.

BRAGA, F. C. Pesquisa fitoquímica. In: LEITE, J. P. V. **Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas**. São Paulo: Atheneu, 2009. p. 99-118.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

CABRERA, G. M. Mass spectrometry in the structural elucidation of natural products: glycosides. In: IMPERATO, F. (Ed.) **Phytochemistry: advance in research**. Trivandrum: Research Signpost, 2006. p. 1-22.

CÁLGARO-HELENA, A. F.; DEVIENNE, K. F.; RODRIGUES, T.; DORTA, D. J.; RADDI, M. S. G.; VILEGAS, W.; UYEMURA, S. A.; SANTOS, A. C.; CURTI, C. Effects of isocoumarins isolated from *Paepalanthus bromelioides* on mitochondria: uncoupling, and induction/inhibition of mitochondrial permeability transition. **Chemico-Biological Interactions**, v. 161, p. 155-164, 2006.

CANNELL, R. J. P. **Natural products isolation**. New Jersey: Humana Press, 1998. 473 p.

CARVALHO, A. **Mapa da Serra do Espinhaço**. Belo Horizonte. Disponível em: <<http://www.serradoespinhaco.com.br/mapa>>. Acesso em: 11 fev. 2016.

CHEN, P.; WANG, Y.; CHEN, L.; JIANG, W.; NIU, Y.; SHAO, Q.; GAO, L.; ZHAO, Q.; YAN, L.; WANG, S. Comparison of the anti-inflammatory active constituents and hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids in two *Senecio* plants and their preparations by LC–UV and LC–MS. **Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis**, v. 115, p. 260-271, 2015.

CHI, Y. M.; NAKAMURA, M.; ZHAO, X.-Y.; YOSHIZAWA, T.; YAN, W.-M.; HASHIMOTO, F.; KINJO, J.; NOHARA, T.; SAKURADA, S. Anti-inflammatory activities of alpha-truxillic acid derivatives and their monomer components. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, p. 489-493, 2006.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **M7-A6**: methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standards. 6th ed., Wayne, 2006.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **M27-A3**: reference methods for broth dilution antifungal susceptibility tests for yeasts; approved standards. 3rd ed. Wayne, 2008.

COSTA, F. N. **Recircunscrição de *Actinocephalus* (Körn.) Sano - Eriocaulaceae**. 2005. 137 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

COSTA, F. N.; SANO, P. T. New circumscription of the endemic brazilian genus *Actinocephalus* (Eriocaulaceae). **Novon: A Journal for Botanical Nomenclature**, v. 22, n. 3, p. 281-287, 2013.

COSTA, F. N.; TROVÓ, M.; SANO, P. T. Eriocaulaceae na Cadeia do Espinhaço: riqueza, endemismo e ameaças. **Megadiversidade**, v. 4, p. 117-125, 2008.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.

CUYKENS, F.; CLAYES, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 39, n. 1, p. 1-15, 2004.

DEVIIENNE, K. F.; CÁLGARO-HELENA, A. F.; DORTA, D. J.; PRADO, I. M. R.; RADDI, M. S. G.; VILEGAS, W.; UYEMURA, S. A.; SANTOS, A. C.; CURTI, C. Antioxidant activity of isocoumarins isolated from *Paepalanthus bromelioides* on mitochondria. **Phytochemistry**, v. 68, p. 1075-1080, 2007.

DOKKEDAL, A. L.; SANTOS, L. C.; SANTO, P. T.; VILEGAS, W. Chemistry in Eriocaulaceae. **Zeitschrift Fur Naturforschung C: Journal of Biosciences**, v. 63, n. 3/4, p. 169-175, 2008.

DUNN, W. B.; BROADHURST, D. I.; ATHERTON, H. J.; GOODACREAB, R.; GRIFFIN, J. L. Systems level studies of mammalian metabolomes: the roles of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Chemical Society Reviews**, v. 40, n. 1, p. 387-426, 2011.

ECHTERNACHT, L.; SANO, P. T.; TROVÓ, M.; DUBUISSON, J. Phylogenetic analysis of the Brazilian microendemic *Paepalanthus* subgenus *Xeractis* (Eriocaulaceae) inferred from morphology. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 167, p. 137-152, 2011.

EL-ANSARI, M. A.; NAWWAR, M. A.; SALEH, N. A. M. Stachysetin, a diapigenine-7-glucoside-p-p- dihydroxy- truxinate from *Stachys aegyptica*. **Phytochemistry**, v. 40, p. 1543-1548, 1995.

ELIX, J. A. Vioxanthin from a lichen source. **Australasian Lichenology**, v. 55, p. 14-15, 2004.

ESPADA, A.; RODRIGUEZ, J.; VILLAVERDE, M. C.; RIGUERA, R. Hypoglucaemic triterpenoid saponins from *Boussingaultia baselloides*. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 68, n. 11, p. 2039-2044, 1990.

ESPADA, A.; RODRIGUEZ, J.; VILLAVERDE, M. C.; RIGUERA, R. Uboussingoside D1, a new triterpenoid saponin from *Boussingaultia baselloides*. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 1991, n. 3, p. 291-293, 1991.

FORZZA, R. C.; BAUMGRATZ, J. F. A.; BICUDO, C. E. M.; CARVALHO JÚNIOR, A. A.; COSTA, A.; COSTA, D. P.; HOPKINS, M.; LEITMAN, P. M.; LOHMANN, L. G.; MAIA, L. C.; MARTINELLI, G.; MENEZES, M.; MORIM, M. P.; COELHO, M. A. N.; PEIXOTO, A. L.; PIRANI, J. R.; PRADO, J.; QUEIROZ, L. P.; SOUZA, V. C.; STEHMANN, J. R.; SYLVESTRE, L. S.; WALTER, B. M. T.; ZAPPI, D. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Rio de Janeiro: JBRJ, 2010. v. 1, 875 p.

- FUKUSHIMA, R. S.; WEIMER, P. J.; KUNZ, D. A. Use of photocatalytic reduction to hasten preparation of culture media for saccharolytic *Clostridium* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 22-26, 2003.
- GABRIELSON, J.; HART, M.; JARELÖV, A.; KUHN, I.; MCKENZIE, D.; MÖLLBY, R. Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates. **Journal of Microbiological Methods**, v. 50, p. 63-73, 2002.
- GHASEMZADEH, A.; JAAFAR, H. Z.; RAHMAT, A. Antioxidant activities, total phenolics and flavonoids content in two varieties of malaysia young ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). **Molecules**, v. 15, n. 6, p. 4324-4333, 2010.
- GIULIETTI, A. M.; SCATENA, V. L.; SANO, P. T.; PARRA, L. R.; QUEIROZ, L. P.; HARLEY, R. M.; MENEZES, N. L.; YSEPPON, A. M. B.; SALATINO, A.; SALATINO, M. L.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C.; RICCI, C. V.; BONFIM, M. C. P.; MIRANDA, E. B. Multidisciplinary studies on neotropical Eriocaulaceae. In: WILSON, K. L.; MORRISON, D. A. (Ed.). **Monocots II: systematics and evolution**. Collingwood: CSIRO Publishing, 2000. p. 580-589.
- GIULIETTI, A. M.; ANDRADE, M. J. G.; SCATENA, V. L.; TROVÓ, M.; COAN, A. I.; SANO, P. T.; SANTOS, F. A. R.; BORGES, R. L. B.; VAN DEN BERG, C. Molecular phylogeny, morphology and their implications for the taxonomy of Eriocaulaceae. **Rodriguésia**, v. 63, n. 1, p. 1-19, 2012.
- GUDIÑA, E. J.; ROCHA, V.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from *Lactobacillus paracasei* ssp. Paracasei A20. **Letters in Applied Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 419-424, 2010.
- GUILLARME, D.; NGUYEN, D. T. T.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J. L. Method transfer for fast liquid chromatography in pharmaceutical analysis: application to short columns packed with small particle. Part I: isocratic separation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 66, p. 475-482, 2007.
- GUILLARME, D.; NGUYEN, D. T. T.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J. L. Method transfer for fast liquid chromatography in pharmaceutical analysis: application to short columns packed with small particle. Part II: gradient experiments. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 68, p. 430-440, 2008.
- HAMED, A. I.; MASULLO, M.; SHEDED, M. G.; MAHALEL, U. A.; TAWFIK, M. M.; PERRONE, A.; PIACENTE, S. Triterpene saponins from *Salsola imbricata*. **Phytochemistry Letters**, v. 4, n. 3, p. 353-356, 2011.
- HARBORNE, J. B. **The flavonoids: advances in research since 1986**. New York: Chapman and Hall, 1996. 676 p.
- HARVEY, A. Strategies for the discovering drugs from previously unexplored natural products. **Drug Discovery Today**, v. 5, p. 294-300, 2000.

HEILMANN, J.; MÜLLER, E.; MERFORT, I. Flavonoid glucosides and dicaffeoylquinic acids from flowerheads of *Buphthalmum salicifolium*. **Phytochemistry**, v. 51, n. 5, p. 713-718, 1999.

HENSOLD, N. The Andean *Paepalanthus pilosus* complex (Eriocaulaceae): a revision with three new taxa. **PhytoKeys**, v. 64, p. 1-57, 2016.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

HORIE, T.; TSUKAYAMA, M.; KOURAI, H.; YOKOYAMA, C.; FURUKAWA, M.; YOSHIMOTO, T.; YAMAMOTO, S.; WATANABE-KOHNO, S.; OHATAF, K. Syntheses of 5,6,7- and 5,7,8-trioxygenated 3',4'-dihydroxyflavones having alkoxy groups and their inhibitory activities against arachidonate 5-lipoxygenase. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 29, p. 2256-2262, 1986.

HÖRNER, M.; GIGLIO, V. F.; SANTOS, A. J. R. W. A.; WESTPHALEN, A. B.; INGLESIAS, B. A.; MARTINS, P. R.; AMARAL, C. H.; MICHELOT, T.M.; REETZ, L. G. B.; BERTONCHELI, C. M.; PARAGINSKI, G. L.; HORNER, R. Triazenos e atividade antibacteriana. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 3, p. 441-449, 2008.

HOSTETTMANN, K.; MARSTON, A. **Chemistry and pharmacology of natural products**: Saponin. New York: Cambridge University Press, 1995. 588 p.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, 2005.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION. **Validation of analytical procedures**: text and methodology Q2 (R1). Geneva, 2005. ICH Harmonized tripartite guideline. Disponível em: <http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf>. Acesso em: 20 maio 2016.

ISAZA, J. H.; ITO, H.; YOSHIDA, T. A flavonol glycoside-lignan ester and accompanying acylated glucosides from *Monochaetum multiflorum*. **Phytochemistry**, v. 58, p. 321-327, 2001.

ITOKAWA, H.; MORITA, M.; MIHASHI, S. Phenolic compounds from the rhizomes of *Alpinia speciosa*. **Phytochemistry**, v. 20, n. 11, p. 2503-2506, 1981.

JOVANOVIC, S. V.; STEENKEN, S.; TOSIC, M.; MARJANOVIC, B.; SIMIC, M. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of American Chemical Society**, v. 116, n. 1, p. 4846-4851, 1994.

JUSTESEN, U. Collision-induced fragmentation of deprotonated methoxylated flavonoids, obtained by electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 36, n. 2, p. 169-178, 2001.

KACHLICKI, P.; EINHORN, J.; MUTH, D.; KERHOAS, L.; STOBIECKI, M. Evaluation of glycosylation and malonylation patterns in flavonoid glycosides during LC/MS/MS metabolite profiling. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 43, n. 5, p. 572-586, 2008.

KÄHKÖNEN, M. P.; HOPIA, A. I.; VUORELA, H. J.; RAUHA, J.; PIHLAJA, K.; KUJALA, T. S.; HEINONEN, M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 1, p. 3954-3962, 1999.

KATZ, L.; BALTZ, R. H. Natural product discovery: past, present, and future. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 43, n. 2/3, p. 155-176, 2016.

KAWAMURA, N.; WATANABE, H.; OSHIO, H. Saponins from roots of *Momordica cochinchinensis*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 11, p. 3585-3591, 1988.

LENORE, S.; CLESCERI, A.; GREENBERG, E.; ANDREW, D. E. **Standard methods for examination of water and wastewater**. 21st. ed. Washington: American Public Association, 2005. 1496 p.

LI, Y. J.; WEI, H. L.; QI, L. W.; CHEN, J.; REN, M. T.; LI, P. Characterization and identification of saponins in *Achyranthes bidentata* by rapid-resolution liquid chromatography with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 24, n. 20, p. 2975-2985, 2010.

MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. The ultraviolet spectra of flavones and flavonols. In: _____. **The systematic identification of flavonoids**. Berlin: Springer Verlag, 1970. p. 41-164.

MADL, T.; STERK, H.; MITTELBACH, M.; RECHBERGER, G. N. Tandem mass spectrometric analysis of a complex triterpene saponin mixture of *Chenopodium quinoa*. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 17, n. 6, p. 795-806, 2006.

MAJORS, R. E. The role of the column in preparative HPLC. **LC-GC**, v. 7, n. 3, p. 8-16, 2004.

MARI, A.; MONTORO, P.; D'URSO, G.; MACCHIA, M.; PIZZA, C.; PIACENTE, S. Metabolic profiling of *Vitex agnus castus* leaves, fruits and sprouts: analysis by LC/ESI/(QqQ) MS and (HR) LC/ESI/(Orbitrap)/MSⁿ. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 102, p. 215-221, 2015.

MARKHAM, K. R. **Techniques of flavonoid identification**. London: Academic Press, 1982. 113 p.

McCHESNEY, J. D.; VENKATARAMAN, S. K.; HENRI, J. T. Plant natural products: Back to the future or into extinction? **Phytochemistry**, v. 68, n. 14, p. 2015-2022, 2007.

- MERKEN, H. M.; BEECHER, G. R. Measurement of food flavonoids by high performance liquid chromatography: a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 3, p. 577-599, 2000.
- MISHRA, K.; OJHA, H.; CHAUDHURY, N. K. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: a critical review and results. **Food Chemistry**, v. 130, n. 4, p. 1036-1043, 2012.
- MISHRA, K. P.; GANJU, L.; SAIRAM, M.; BANERJEE, P. K.; SAWHNEY, R. C. A review of high throughput technology for the screening of natural products. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 62, n. 2, p. 94-98, 2008.
- MONTAUDO, G.; CACCAMESE, S. Structure and conformation of chalcone photodimers and related compounds. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 38, p. 710-716, 1973.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1/2, p. 55-63, 1983.
- NAKAMURA, S.; CHEN, G.; NAKASHIMA, S.; MATSUDA, H.; PEI, Y.; YOSHIKAWA, M. Brazilian natural medicines. IV. New noroleanane-type triterpene and ecdysterone-type sterol glycosides and melanogenesis inhibitors from the roots of *Pfaffia glomerata*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 58, n. 5, p. 690-695, 2010.
- NEGRI, G.; TABACH, R. Saponins, tannins and flavonols found in hydroethanolic extract from *Periandra dulcis* roots. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 6, p. 851-860, 2013.
- NG, A. S.; JUST, G.; BLANK, F. Metabolites of pathogenic fungi. VII. Structure and stereochemistry of xanthomegnin, vioxanthin and viopurpurin, pigments from *Trichophyton violaceum*. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 47, p. 1223-1227, 1969.
- O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 17, p. 5421-5426, 2000.
- ORIANI, A.; SCATENA, V. L.; SANO, P. T. Morphological architecture of *Actinocephalus* (Körn.) Sano (Eriocaulaceae-Poales). **Flora**, v. 203, n. 4, p. 341-349, 2008.
- PACÍFICO, M.; NAPOLITANO, A.; HILARIO, F.; PIZZA, C.; PIACENTE, S.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C. Metabolite fingerprint of "capim dourado" (*Syngonanthus nitens*), a basis of Brazilian handcrafts. **Industrial Crops and Products**, v. 33, p. 488-496, 2011.

PALOMINO, J. C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2720-2722, 2002.

PANDEY, A.; TRIPATHI, S. Concept of standardization, extraction and pre phytochemical screening strategies for herbal drug. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 2, n. 5, p. 115-119, 2014.

PAULETTI, P. M.; CASTRO-GAMBOA, I.; SILVA, D. H. S.; YOUNG, M. C. M.; TOMAZELA, D. M.; EBERLIN, M. N.; BOLZANI, V. S. New antioxidant C-glucosylxanthone from the stems of *Arrabidaea samyoides*. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 10, p. 1348-1387, 2003.

PAWAN, K. A. NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. **Phytochemistry**, v. 31, n. 10, p. 3307-3330, 1992.

PÖLLMANN, K.; SCHALLER, K.; SCHWEIZER, U.; ELGAMAL, M. H. A.; SHAKER, K. H.; SEIFERT, K. Triterpenoid saponins from *Zygophyllum decumbens*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 5, p. 875-880, 1998.

PROVOST, I.; GARCIA, M. First report on the isolation of vioxanthin from a plant source: occurrence in *Paepalanthus* species. **Planta Medica**, v. 56, n. 6, p. 647, 1990.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validation for chromatographic and electrophoretic methods. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C.; VILLAR, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. **Journal of ethnopharmacology**, v. 23, n. 2, p. 127-149, 1988.

RODRIGUES, C. M.; RINALDO, D.; SANNOMIYA, M.; SANTOS, L. C.; MONTORO, P.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; VILEGAS, W. High-performance liquid chromatographic separation and identification of polyphenolic compounds from the infusion of *Davilla elliptica* St. Hill. **Phytochemical Analysis**, v. 19, p. 17-24, 2008.

RODRIGUES, J. **Uso sustentável da biodiversidade brasileira: prospecção químico-farmacológica em plantas superiores: metodologia para estabelecimento de perfis quali e quantitativos para extratos vegetais**. 2011. 140 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.

RODRIGUEZ-ALLER, M.; GURNY, R.; VEUTHEY, J. L.; GUILLARME, D. Coupling ultra high-pressure liquid chromatography with mass spectrometry: constraints and possible applications. **Journal of chromatography A**, v. 1292, p. 2-18, 2013.

SAHOO, N.; MANCHIKANTI, P.; DEY, S. Herbal drugs: standards and regulation. **Fitoterapia**, v. 81, n. 6, p. 462-471, Feb. 2010.

SANO, P. T. *Actinocephalus* (Körn.) Sano (*Paepalanthus* sect. *Actinocephalus*), a new genus of Eriocaulaceae, and other taxonomic and nomenclatural changes involving *Paepalanthus* Mart. **Taxon**, v. 53, n. 1, p. 99-107, 2004.

SANTOS, D. Y. A. C.; SALATINO, M. L. F. Foliar flavonoids of Annonaceae from Brazil: taxonomic significance. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 567-573, 2000.

SANTOS, L. C. **Estudo químico de *Paepalanthus hilairei* (Körn.) – Eriocaulaceae**. 1997. 115 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1997.

SANTOS, L. C. **Investigação química de plantas da família Eriocaulaceae**. 2001. 188 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2001.

SANTOS, L. C.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; ALBERT, K.; DACHTLER, M.; VILEGAS, W. Planifolin, a new naphthopyranone dimer and flavonoids from *Paepalanthus planifolius*. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 1, p. 122-124, 2001.

SANTOS, L. C.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; TORO, R.; SANO, P. T.; VILEGAS, W. 6-methoxyquercetin-3-O-(6"-E-feruloyl)-D-glucopyranoside from *Paepalanthus polyanthus* (Eriocaulaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, p. 451-456, 2002.

SCATENA, V. L.; MORAES, A. R. S. Anatomia de raízes, folhas e escapos de *Paepalanthus* subgênero *Platycaulon* (Eriocaulaceae) da Serra do Cipó - M.G. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 39, n. 4, p. 1021-1035, 1996.

SCUDAMORE, K. A.; CLARKE, J. H.; HETMANSKI, M. T. Isolation of *Penicillium* strains producing ochratoxin A, citrinin, xanthomegnin, viomellein and vioxanthin from stored cereal grains. **Letters in Applied Microbiology**, v. 17, p. 82-87, 1993.

SILVA, A. C. Z.; RODRIGUES, C. M.; VILEGAS, W. Predição estrutural de flavonoides baseada em dados de HPLC-PAD. In: ENCONTRO REGIONAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 17., 2009, Araraquara. **Resumos...** São Paulo: Ed. Unesp, 2009.

SILVA, M. A. **Estudo químico e biológico de plantas da família Eriocaulaceae**. 2008. 155 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

SILVA, M. A.; OLIVEIRA, A. P. S.; SANNOMIYA, M.; SANO, P. T.; VARANDA, E. A., VILEGAS, W.; SANTOS, L. C. Flavonoids and a naphthopyranone from *Eriocaulon ligulatum* and their mutagenic activity. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 55, n. 11, p. 1635-1639, 2007.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. S. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, n. 1, p. 152-178, 1999.

TAN, N.; ZHOU, J.; ZHAO, S. Advances in structural elucidation of glucuronide oleanane-type triterpene carboxylic acid 3, 28-O-bisdesmosides (1962–1997). **Phytochemistry**, v. 52, n. 2, p. 153-192, 1999.

TROVÓ, M.; SANO, P. T. Taxonomic survey of *Paepalanthus* section *Diphyomene* (Eriocaulaceae). **Phytotaxa**, v. 14, p. 49-55, 2010.

TROVÓ, M.; COSTA, F. N.; ECHTERNACHT, L. *Actinocephalus pachyphyllus*: re-establishment, redefinition, and a new combination in Eriocaulaceae from Brazil. **Kew Bulletin**, v. 67, n. 1, p. 25-31, 2012.

VAN SETTEN, D. C.; TEN HOVE, G. J.; WIERTZ, E. J.; KAMERLING, J. P.; WERKEN, G. Multiple-stage tandem mass spectrometry for structural characterization of saponins. **Analytical Chemistry**, v. 70, n. 20, p. 4401-4409, 1998.

VARANDA, E. A.; RADDI, M. S. G.; DIAS, F. de L.; ARAÚJO, M. C. P.; GIBRAN, S. C. A.; TAKAHASHI, C. S.; VILEGAS, W. Mutagenic and cytotoxic activity of an isocoumarin (paepalantine) isolated from *Paepalanthus vellozioides*. **Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis**, v. 17, n. 2, p. 85-95, 1997.

VIDAL-OLLIVIER, E.; BALANSARD, G.; FAURE, R.; BABADJAMIAN, A. Revised structures of triterpenoid saponins from the flowers of *Calendula officinalis*. **Journal of Natural Products**, v. 52, n. 5, p. 1156-1159, 1989.

VILEGAS, W.; DOKKEDAL, A. L.; RASTRELLI, L.; PIACENTE, S.; PIZZA, C. New naphthopyranone glycosides from *Paepalanthus vellozioides* and *P. latipes*. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 5, p. 746-749, 1999a.

VILEGAS, W.; NEHME, C. J.; DOKKEDDAL, A. L.; PIACENTE, S.; RASTRELLI, L.; PIZZA, C. Quercetagenin 7-methyl ether glycosides from *Paepalanthus vellozioides* and *Paepalanthus latipes*. **Phytochemistry**, v. 51, n. 3, p. 403-409, 1999b.

VUKICS, V.; GUTTMAN, A. Structural characterization of flavonoid glycosides by multi-stage mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 29, n. 1, p. 1-16, 2010.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E. M. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. Berlin: Springer, 1984. 384 p.

WOLFENDER, J.-L.; MARTI, G.; THOMAS, A.; BERTRAND, S. Current approaches and challenges for the metabolite profiling of complex natural extracts. **Journal of Chromatography A**, v. 1382, p. 136-164, 2015.

XIA, B.; BAI, L.; LI, X.; XIONG, J.; XU, P.; XUE, M. Structural analysis of metabolites of asiatic acid and its analogue madecassic acid in zebrafish using LC/IT-MSⁿ. **Molecules**, v. 20, n. 2, p. 3001-3019, 2015.

YULIANA, N. D.; JAHANGIR, M.; VERPOORTE, R.; CHOI, Y. H. I. Metabolomics for the rapid dereplication of bioactive compounds from natural sources.

Phytochemistry Reviews, v. 12, n. 2, p. 293-304, 2013.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. (Org.) **Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal**. Chapecó: Argos, 2001. 523 p.

ZANUTTO, F. V. **Estudo químico e atividades mutagênica e antiradicalar de *Paepalanthus chiquitensis* Herzog (Eriocaulaceae)**. 2013. 175 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.

ZANUTTO, F. V.; BOLDRIN, P. K.; VARANDA, E. A.; SOUZA, S. F. D.; SANO, P. T.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C. Characterization of flavonoids and naphthopyranones in methanol extracts of *Paepalanthus chiquitensis* Herzog by HPLC-ESI-IT-MSⁿ and their mutagenic activity. **Molecules**, v. 18, n. 1, p. 244-262, 2013.

ZEECK, A.; RUSS, P.; LAATSCH, H.; LOEFFLER, W.; WEHRLE, H.; ZAEHNER, H.; HOLST, H. Isolation of the antibiotic semi-vioxanthin from *Penicillium citreo-viride* and synthesis of xanthomegnin. **Chemische Berichte**, v. 112, p. 957-978, 1979.