

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 05/08/2018.

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

Silva, Ana Caroline Zanatta
S586p 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

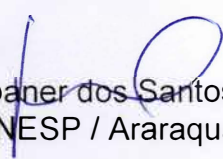
1. Metabólitos. 2. Saponinas. 3. Flavonóides.
4. Espectrometria de massa. 5. Citotoxicidade. I. Título.


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. Nascera 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 Boralle, 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 colobaração 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 antiradicalar 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 <i>m/z</i> 639.....	60
Figura 13 - Espectros ESI-MS/MS para os íons precursores <i>m/z</i> 609 e <i>m/z</i> 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 <i>m/z</i> 777 (composto 23).....	67
Figura 21 - Espectros ESI-MS/MS para saponinas com aglicona <i>m/z</i> 439.	68
Figura 22 - Espectros ESI-MS/MS para saponinas com aglicona <i>m/z</i> 455.	69
Figura 23 - Espectros ESI-MS/MS para saponinas com aglicona <i>m/z</i> 471.	69
Figura 24 - Fluxograma de isolamento dos compostos nos extratos metanólicos dos escapos e folhas	70
Figura 25 - Espectro RMN ¹ H de Ad1	72
Figura 26 - Estrutura do flavonoide Ad10.....	72
Figura 27 - Espectro RMN ¹ H 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 ¹ H 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 ¹ H 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 naftopiranas 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*.



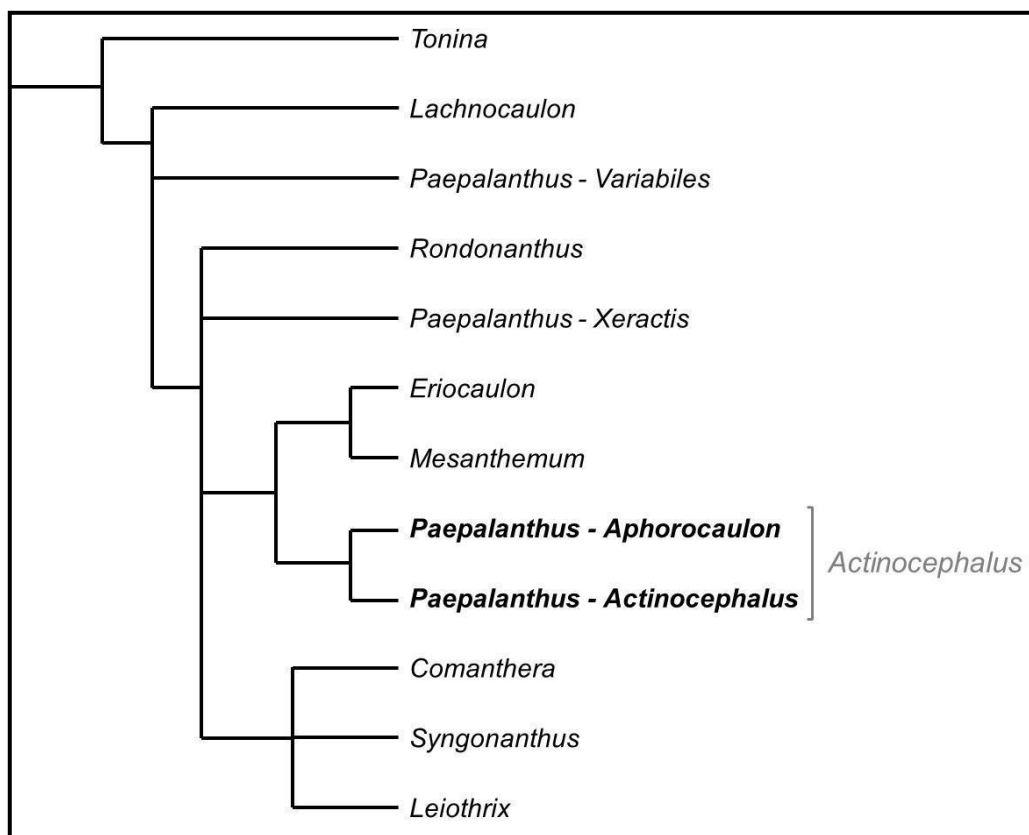
Espécie em estudo *A. divaricatus*.

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. *Aphorocaulon* (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).

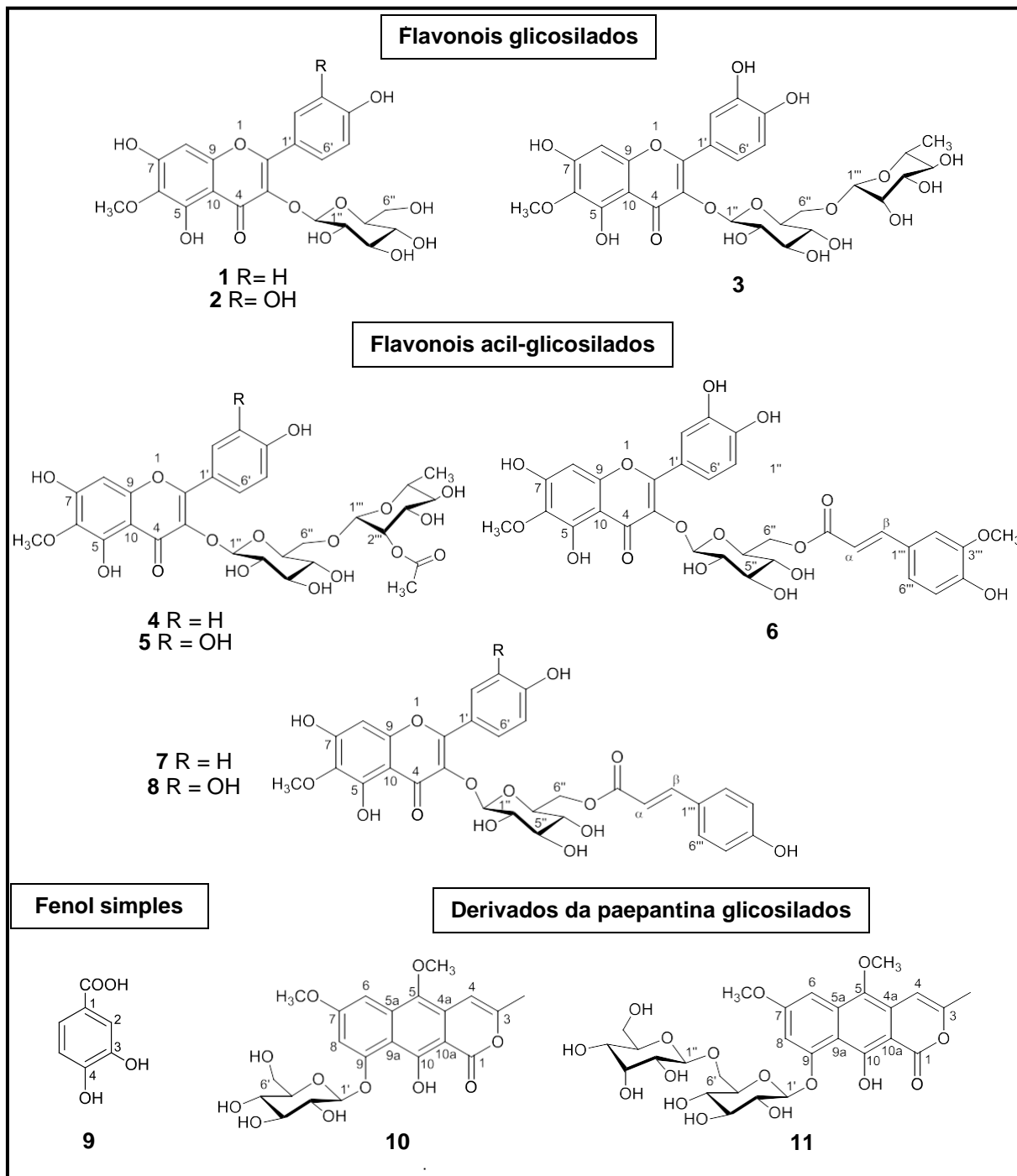
As espécies de *Paepalanthus* subsect. *Aphoro caulon* inseridas no gênero *Actinocephalus* também permitiram constatar não só um padrão morfológico estrutural, mas também uma homogeneidade nas classes de metabólitos secundários encontrados em ambos os taxa (*Paepalanthus* sect. *Actinocephalus* e *Paepalanthus* subsect *Aphoro caulon*). Estudos químicos prévios de algumas espécies pertencentes a subseção *Aphoro caulon*, 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.

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 *Leiothrix 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.

DEVIENNE, 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.

JOVANOVIĆ, S. V.; STEENKEN, S.; TOSIĆ, M.; MARJANOVIĆ, B.; SIMIĆ, 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.; MITTELBAACH, 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-bidesmosides (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 vellozoides*. **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 vellozoides* 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 vellozoides* 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.