

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 17/08/2018.

FELIPE GREGÓRIO IGNÁCIO

Estudo Químico e Biológico do extrato metanólico dos capítulos de
Paepalanthus acanthophyllus Ruhland (Eriocaulaceae)

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

Orientadora: Profa. Dra. Lourdes Campaner dos Santos

Araraquara – SP
2016

FICHA CATALOGRÁFICA

I24e	<p>Ignácio, Felipe Gregório</p> <p>Estudo químico e biológico do extrato metanólico dos capítulos de <i>Paepalanthus acanthophyllus</i> (Eriocaulaceae) / Felipe Gregório Ignácio. – Araraquara : [s.n.], 2016 79 f. : il.</p> <p>Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química Orientador: Lourdes Campaner dos Santos</p> <p>1. Flavonóides. 2. Citotoxicidade. 3. Cromatografia líquida de alta eficiência. 4. Eriocaulaceae. 5. Atividade antifúngica. I. Título.</p>
------	---

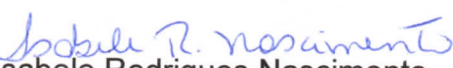
FELIPE GREGÓRIO IGNACIO


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

Araraquara, 17 de agosto de 2016.

BANCA EXAMINADORA


Prof^a. Dr^a. Lourdes Campaner dos Santos
Instituto de Química - UNESP – Araraquara - SP


Prof^a. Dr^a. Isabele Rodrigues Nascimento
Instituto de Química – UNESP, Araraquara - SP


Prof. Dr. Marcelo Aparecido da Silva
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNIFAL, Alfenas - MG

SÚMULA CURRICULAR

Dados pessoais:

Nascimento: 02/03/1987

Filiação: Ednilson Ignácio e Maria do Carmo Gregório Ignácio

Naturalidade: Araraquara - SP

Endereço residencial: Rua Arlindo Rodrigues da Costa, 110, Parque São Paulo, Araraquara - SP

Telefone: (16) 3337-9670

E-mail: fgregorio@yahoo.com

Formação Acadêmica:

Graduação: Licenciatura em Química.

Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP,

Instituto de Química

Local: Araraquara - SP

Período: 2007-2013

Trabalhos apresentados em congressos:

IGNACIO, F. G.; AMORIM, M. R.; SANTOS, L. C. Isolation and identification of substances from *Paepalanthus acantophyllus* capitula. In: "5th Brazilian Conference on Natural Products - BCNP and XXXI Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology - RESEM, realizado no período de 26 a 29 de outubro de 2015 , Atibaia - SP.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Prof^a. Dr^a Lourdes Campaner dos Santos, por toda a sua excelente orientação e pela preocupação, dedicação, paciência e cuidado que foram essenciais para minha formação.

Ao Dr. Nivaldo Borallo, pelas análises de Ressonância Magnética Nuclear.

Aos funcionários da biblioteca, principalmente à Valéria Novelli, e às funcionárias da seção de pós-graduação pela ajuda e orientações prestadas.

Ao Marcelo (2^o orientador), amigo desde os tempos de graduação pelos ensinamentos, zoeiras e amizade.

Ao meu grande amigo Weslei (Alo Pedrinho), uma grata surpresa em conhecê-lo e desfrutar de sua companhia, risadas e de seus conhecimentos durante todo este tempo.

A Aninha, amiga desde os tempos de graduação por toda a sua ajuda, preocupação, dedicação e amizade.

Ao Felipe Hilário, por sempre me ajudar em tudo.

Ao amigos Daylin e Alexander, pela preocupação, conselhos e convivência agradável.

Agradecimento também a Talitinha, Thais, Daryne, Carlos, Francisco e Leonice.

As professoras Isabele Nascimento e Juliana Rodrigues e ao Prof. Marcelo Aparecido da Silva pelas valiosas sugestões para a finalização deste trabalho.

Aos meus pais e aos meus irmãos, pelo incentivo, esforços, preocupação e honestidade e contribuíram para o término este trabalho.

A CAPES pela bolsa concedida.

RESUMO

Paepalanthus é um dos gêneros mais representativos da família Eriocaulaceae e consta na literatura que já foram isoladas naftopiranonas e flavonoides, substâncias com comprovadas atividades como antirradicalar, antiúlcera e mutagênica. Apesar dos estudos realizados até o momento com espécies de Eriocaulaceae, é importante destacar que ainda existe um grande número de espécies que não foi estudado química e biologicamente. Portanto, neste trabalho descrevemos o estudo químico e biológico do extrato metanólico dos capítulos de *Paepalanthus acanthophyllus*. A estratégia de fracionamento por HPLC-PDA em escala semipreparativa do extrato metanólico permitiu isolar as substâncias 6-metoxicanferol-3-O-(6"-*p*-cumaroil)- β -D-glucopiranosil-7-O- β -D-glucopiranosídeo, **Pa2**, 6-metoxicanferol-3-7-di-O- β -D-glucopiranosídeo, **Pa1**, 6-metoxicanferol-3-O- β -D-glucopiranosídeo, **Pa3**, paepalantina-9-O- β -D-glucopiranosídeo, **Pa4** e a paepalantina, **Pa5**. A padronização do extrato metanólico foi realizada por meio da quantificação dos derivados do canferol glicosilados (**Pa1**, **Pa2** e **Pa3**) e do derivado da paepalantina glicosilada (**Pa4**) por HPLC-PDA. A metodologia permitiu avaliar os parâmetros de linearidade e limites de detecção e quantificação. Os limites de detecção ($12,22 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e quantificação ($30,03 \mu\text{g.mL}^{-1}$) foram satisfatórios para as condições analisadas para os derivados do canferol. Para o derivado da paepalantina glicosilada observou-se os valores de limite de detecção $25,54 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e de quantificação $77,39 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Os teores das substâncias encontrados no extrato metanólico dos capítulos foram de 2,39 % (**Pa1**), 1,22 % (**Pa2**), 2,52 % (**Pa3**) e 8,38 % (**Pa4**). O teor de fenóis totais encontrados foi de $126,41 \text{ mg.g}^{-1}$ de extrato para os capítulos enquanto que o teor de flavonoides totais no extrato metanólico foi de $122,15 \text{ mg.g}^{-1}$. Paralelamente foram avaliadas as atividades antimicrobiana do extrato metanólico dos capítulos de *P. acanthophyllus* frente a bactérias Gram-Positiva e Gram-negativa, sendo encontrados valores $>1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para todas as cepas avaliadas. Os valores para a avaliação da citotoxicidade utilizando o método do MTT para o extrato metanólico dos capítulos foi de $\text{IC}_{50} = 34,81 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para a linhagem MCF7 (cancro da mama humana), sendo considerado um valor promissor.

Palavras-chave: Flavonoides, Citotoxicidade, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, Eriocaulaceae, Atividade Antifúngica

ABSTRACT

Paepalanthus is one of the most representative genus of the Eriocaulaceae family and it is known in literature that naphthopyranones and flavonoids were isolated. These substances are proven to have antiradical, antiulcer and mutagenic biological activities. Despite available studies of the Eriocaulaceae species, it is important to emphasize that there is still a large number of species that have not been studied chemically and biologically. Therefore, in this work we describe the chemical and biological study of the methanol extract of the capitula from *Paepalanthus acanthophyllus*. The fractionation strategy by HPLC-PDA semipreparative scale of the methanolic extract allowed us to isolate substances 6-methoxykaempferol-3-O-(6"-*p*-coumaroyl)- β -D-glucopyranosyl-7-O- β -D-glucopyranoside, **Pa2**, 6-methoxykaempferol-3-7-di-O- β -D-glucopyranoside, **Pa1**, 6-methoxykaempferol-3-O- β -D-glucopyranoside, **Pa3**, paepalantina-9-O- β -D-glucopyranoside, **Pa4** and paepalantine **Pa5**. The standardization of the methanol extract was performed by quantification of glycosides kaempferol derivatives and paepalantina glycosylated by HPLC-PDA. The methodology allowed us to evaluate the parameters: linearity, limits of detection and quantification. The detection limits ($12.22 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and quantitation ($30.03 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) were satisfactory for the conditions tested for the kaempferol derivatives. For the derivative of the glycosylated paepalantina, the detection limit ($25.54 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and quantization limit ($77.39 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) were observed. The content of substances found in the methanolic extract of the capitula were 2.39 % (**Pa1**), 1.22 % (**Pa2**), 2.52 % (**Pa3**) and 8.38 % (**Pa4**). The total phenols content obtained was $126.41 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ in the extract of the capitulae and the content of the total flavonoid founded were $122.15 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$. At the same time we evaluated the antimicrobial activities of the methanolic extract of *P. acanthophyllus* against bacteria *Gram*-positive and *Gram*-negative, and observed the values $> 1000 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ for all tested strains. The values for the assessment of cytotoxicity using MTT method for the methanolic extract of capitula was $\text{IC}_{50} = 34.81 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ strain against MCF7 (human breast cancer). It is considered a promising value.

Keywords: Flavonoids, Citotoxicity, High Performance Liquid Chromatography, Eriocaulaceae, Antifungal Activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa de distribuição da família Eriocaulaceae. Fonte: ICMBio, 2016.	15
Figura 2 - Cladograma simplificado de Eriocaulaceae	16
Figura 3 - Esquema dos capítulos, escapos e folhas em Eriocaulaceae.	18
Figura 4 - SEMPRE-VIVAS. Comércio e economia (<i>Syngonanthus nitens</i>)....	19
Figura 5 - Capítulos, escapos e folhas de <i>P. acanthophyllus</i>	21
Figura 6 - Cromatograma HPLC-PDA analítico do extrato MeOH dos capítulos de <i>P. acanthophyllus</i>	34
Figura 7 - Fluxograma de fracionamento do extrato metanólico dos capítulos de <i>P. acanthophyllus</i>	35
Figura 8 - Análise por CCDC das frações obtidas após separação em Sephadex LH-20 do extrato metanólico dos capítulos de <i>P. acanthophyllus</i> ...	36
Figura 9 - Análise por CCDC das frações obtidas após separação em Sephadex LH-20 do extrato metanólico dos capítulos de <i>P. acanthophyllus</i> ...	36
Figura 10 - Cromatograma HPLC-PDA da fração 1 (j+l+f2).....	37
Figura 11 - Cromatograma HPLC-PDA da fração 2 (g2+h2).	38
Figura 12 - Cromatograma HPL-PDA da fração 3 (g+h+e2).....	38
Figura 13 - Cromatograma HPLC-PDA da fração 4 (f+d2).	39
Figura 14 - Otimização do cromatograma HPLC-PDA da fração 2 (g+h+e2)..	40
Figura 15 - HPLC-PDA (analítico das substâncias isoladas por HPLC-PDA semi-preparativo.	41
Figura 16 - Espectros de absorção no UV ($\lambda = 270\text{nm.}$) da substância Pa2 ...	42
Figura 17 - Espectro de RMN ^1H de Pa2 (em DMSO-d6, 11,7 T) com expansão na região ($\delta 6,7-8,0$).....	45
Figura 18 - Espectro RMN ^{13}C de Pa2 (11,7 T, DMSO-d6).....	45
Figura 19 - Espectro gHSQC de Pa2 (11,7 T, DMSO-d6).	46
Figura 20 - Espectro gHMBC de Pa2 (11,7 T, DMSO-d6).	46
Figura 21 - Experimento TOCSY 1D irradiado em $\delta 5,11$, da substância Pa2 (11,7 T, DMSO-d6).....	47
Figura 22 - Experimento TOCSY 1D irradiado em $\delta 5,46$, da substância Pa2 (11,7 T, DMSO-d6).....	47
Figura 23 - Espectro de ESI-MS (modo negativo) registrado para o íon de m/z 785,1 da substância Pa2	48
Figura 24 - Espectros de ESI-MS ² (modo negativo) registrado para o íon de m/z 785,1 da substância Pa2	48

Figura 25 - Estrutura de Pa2 (6-metoxicanferol-3-O-(6"-p-cumaroil)- β -D-glucopiranosil-7-O- β -D-glucopiranosídeo).....	48
Figura 26 - Espectro de RMN ^1H de Pa3 (em DMSO- $_{d6}$, 11,7 T).	50
Figura 27 - Experimento TOCSY 1D irradiado em δ 5,46 da substância Pa3 (11,7 T, DMSO- $_{d6}$).	50
Figura 28 - Espectro gHSQC Pa3 (em DMSO- $_{d6}$, 11,7 T).	51
Figura 29 - Espectro gHMBC Pa3 (em DMSO- $_{d6}$, 11,7 T).	51
Figura 30 - Estrutura de Pa3 . (6-metoxicanferol-3-O- β -D-glucopiranosídeo)..	52
Figura 31 - Espectro de RMN ^1H de Pa1 (em DMSO- $_{d6}$, 11,7 T).	53
Figura 32 - Espectro ESI-MS, modo negativo de Pa1	53
Figura 33 - Estrutura de Pa1 . (6-metoxicanferol-3,7-di-O- β -D-glucopiranosídeo).	53
Figura 34 - Espectro no UV de Pa4	55
Figura 35 - Espectro de RMN ^1H de Pa4 (em DMSO- $_{d6}$, 11,7 T).	56
Figura 36 - Espectro de RMN ^{13}C de Pa4 (em DMSO- $_{d6}$, 11,7 T).	57
Figura 37 - Espectro TOCSY 1D de Pa4 (11,7 T, DMSO- $_{d6}$) com irradiação em δ 5,07.	57
Figura 38 - Espectro gHMBC de Pa4 (11,7 T, DMSO- $_{d6}$).	58
Figura 39 - Estrutura de Pa4 (Paepalantina-9-O- β -D-glucopiranosídeo).	58
Figura 40 - Espectros de RMN de ^1H da Pa5 – (11,7 T, CDCl $_{3-d6}$).	59
Figura 41 - Estrutura de Pa5 (Paepalantina).	59
Figura 42 - Curva de calibração utilizando o ácido gálico como padrão.	62
Figura 43 - Curva de calibração utilizando a quercetina como padrão.	63
Figura 44 - Cromatograma representativo da separação por HPLC-PDA analítico para quantificação de Pa1 , Pa2 , Pa3 e Pa4 do extrato metanólico dos capítulos <i>P. acanthophyllus</i>	64
Figura 45 - Curva analítica utilizada para a quantificação a) dos flavonoides Pa1 , Pa2 e Pa3 ; b) da naftopirano Pa4	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição das massas das frações após separação por permeação em gel em Sephadex LH-20 e agrupamentos por CCDC.	37
Tabela 2 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C ($\text{DMSO-}d_6$, 11,7 T) de Pa2 . Deslocamentos químicos (δ) em ppm e constantes de acoplamento (J) em Hz.	44
Tabela 3 - Dados RMN ^1H e ^{13}C (11,7 T, $\text{DMSO-}d_6$) dos flavonoides (Pa1 e Pa3).	54
Tabela 4 - Dados de RMN ^1H e de ^{13}C (11,7 T, $\text{DMSO-}d_6$) de Pa4 e Pa5 . Deslocamentos químicos (δ) em ppm e constantes de acoplamento (J) em Hz.	60
Tabela 5 - Teor de Fenóis Totais expressos em mg.g^{-1} de extrato metanólico.	62
Tabela 6 - Teor de Flavonóides Totais expressos em mg.g^{-1} de extrato metanólico.	63
Tabela 7 - Dados obtidos a partir da regressão linear da curva analítica usando canferol e a naftopiranona (Pa4) isolada como padrões externo.	65
Tabela 8 - Concentração das substâncias e teor no extrato metanólico dos capítulos de <i>P. acanthophyllus</i>	67
Tabela 9 - Atividade antibacteriana e antifúngica do extrato metanólico <i>P. acanthophyllus</i>	69
Tabela 10 - Valores de citotoxicidade para o extrato metanólico dos capítulos de <i>P. acanthophyllus</i> em comparação com a cisplatina.	71

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

CBM	Concentração bactericida mínima
CCDC	Cromatografia em camada delgada comparativa
CIM	Concentração inibitória mínima
COSY	Gradient correlate spectroscopy
<i>d</i>	Dupleto
<i>dd</i>	Duplo dupleto
<i>ddd</i>	Duplo duplo dupleto
d.i.	Diâmetro interno
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
<i>g</i> HMBC	<i>Gradient</i> heteronuclear multiple bond correlations
<i>g</i> HSQC	<i>Gradient</i> heteronuclear through single quantun coherence
HPLC-PDA	High performance liquid chromatography-photo diode array detector
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
MeOH	Metanol
RMN de ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN de ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13.
RP18	Reverse phase 18
<i>s</i>	Singleto
SPE	Solid phase extraction

TFA	Ácido trifluoracético
TOCSY 1D	Total correlation spectroscopy
t_r	Tempo de retenção
UV	Ultravioleta
δ	Deslocamento químico
λ	Comprimento de onda

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Gênero <i>Paepalanthus</i>	19
2 OBJETIVOS.....	22
3.1. Coleta e identificação da espécie vegetal	23
3.2. Preparação do extrato metanólico dos capítulos de <i>P. acanthophyllus</i>	23
3.3. Fracionamento em Sephadex® LH-20.....	24
3.4. Clean-up dos extratos.....	24
3.5. Análises por HPLC-PDA de extratos	24
3.6. Fracionamento por HPLC-PDA semi-preparativo	25
3.7. Análise de frações por CCD	25
3.8. Análise por Espectrometria de Massas.....	25
3.9. Análise por RMN	26
3.10. Avaliação do teor de fenóis e flavonoides totais dos extratos metanólicos de capítulos de <i>P. acanthophyllus</i>	26
3.10.1. Determinação do teor de fenóis totais	26
3.10.2. . Determinação do teor de flavonoides totais.....	27
4 ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	28
4.1. Determinação da atividade antimicrobiana	28
4.1.1. Cepas microbianas	28
4.1.2. Padronização dos inóculos bacterianos	28
4.1.3. Padronização do inóculo fúngico.....	28
4.1.4. Determinação da CIM para as cepas bacterianas	29
4.1.5. Determinação da CIM para a cepa fúngica	29
4.1.6. Leituras espectrofotométricas	30
4.1.7. Leituras com revelador	30
4.2 Avaliação da atividade citotóxica pela técnica de MTT	31
4.2.1. Ajuste das concentrações das suspensões das células tumorais... ..	31
4.2.2. Ajuste das amostras avaliadas.....	31
4.2.3. Ensaio de viabilidade celular de células tumorais LM3 e LP07.....	32
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
5.1. Identificação das substâncias	41
5.2 Determinação do teor de fenóis totais	62
5.3 Determinação do teor de flavonoides totais	63

5.4	Quantificação das substâncias Pa1, Pa2, Pa3 e Pa4 no extrato metanólico dos capítulos de <i>P. acanthophyllus</i>	64
5.4.1.	Linearidade, limite de detecção e limite de quantificação	65
5.4.2.	Construção das curvas analíticas e quantificação	66
5.5	ATIVIDADES BIOLÓGICAS	69
5.5.1	Atividade antimicrobiana do extrato metanólico de <i>P. acanthophyllus</i>	69
5.5.2.	Atividade antitumoral do extrato metanólico dos capítulos de <i>P. acanthophyllus</i>	70
6	CONCLUSÕES	72
	REFERÊNCIAS	73

1 INTRODUÇÃO

A família Eriocaulaceae é composta por 1200 espécies e está dividida em 10 gêneros (ANDRADE *et al.*, 2011; GIULIETTI *et al.* 2012).

A última revisão da família Eriocaulaceae foi publicada há mais de 100 anos, e até recentemente, as relações genéricas e infra-genéricas ainda eram pouco resolvidas. Entretanto, tem havido nos últimos 30 anos, um grande esforço por parte de pesquisadores brasileiros para preencher as lacunas existentes, utilizando caracteres morfológicos e anatômicos, complementados por dados adicionais de diferentes fontes, como palinologia, química, embriologia, genética de populações, citologia e, mais recentemente, estudos de filogenia molecular (GIULIETTI *et al.*, 2012).

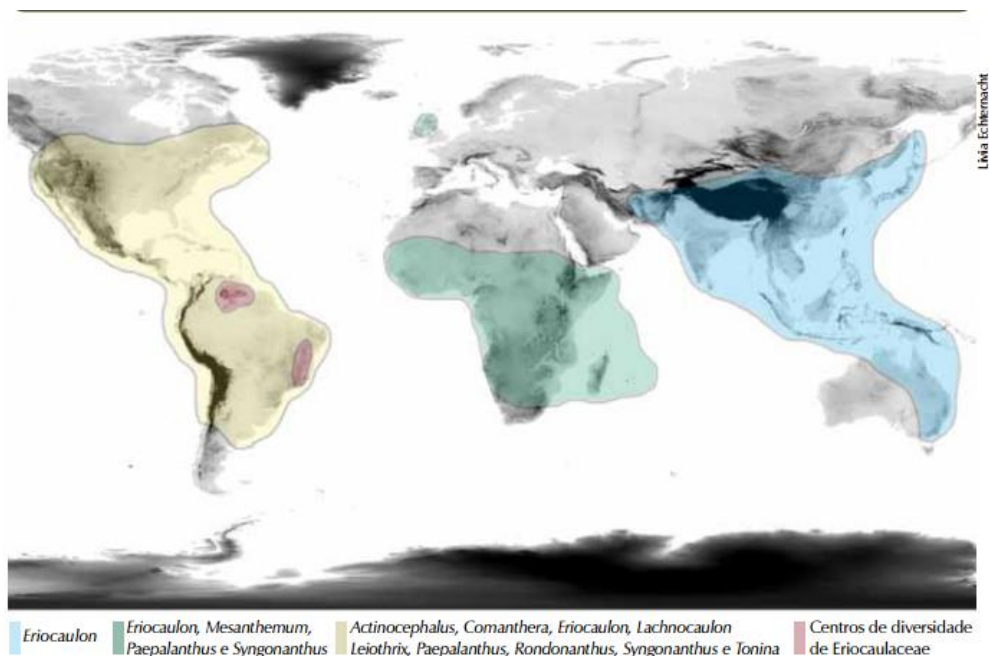
Na literatura (COSTA, *et al.*, 2008, ANDRADE *et al.*, 2011; GIULIETTI *et al.* 2012) ainda existem dados informando que esta família possui uma complicada taxonomia, sendo as espécies divididas em gênero, subgênero, seção e subseção.

A classificação aceita até os dias atuais é de que a família Eriocaulaceae divide-se ainda em duas subfamílias conhecidas por *Paepalanthoideae* e *Eriocauloideae*. A subfamília *Paepalanthoideae* compreende 8 gêneros e 900 espécies, sendo definida por possuir flores isostêmones (que possui tanto os estames como as pétalas em número igual) e pétalas sem glândulas. Dos 10 gêneros que eram encontrados na subfamília *Paepalanthoideae*: *Tonina*, *Blastocaulon*, *Comanthera*, *Lachnocaulon*, *Leiothrix*, *Paepalanthus*, *Philodice*, *Rondonanthus*, *Syngonanthus* e *Actinocephalus* (GIULIETTI *et al.*, 2000, GIULIETTI *et al.*, 1990; SANO *et al.*, 2004; TROVÓ, 2010), hoje devido especialmente aos estudos morfológicos e moleculares, uma nova reclassificação reagrupou as espécies em apenas 8 gêneros, sendo que *Blastocaulon* foi sinonimizado em *Paepalanthus* (ANDRADE *et al.*, 2011) e *Philodice* foi sinonimizado em *Syngonanthus* (GIULIETTI *et al.*, 2012).

A distribuição geográfica das espécies de Eriocaulaceae por países, foi apresentada por Moldenke (1971 *apud* GIULIETTI *et al.*, 1990). Com relação à ocorrência das Eriocaulaceae no Brasil, as principais espécies podem ser destacadas como as pertencentes aos gêneros *Actinocephalus*, *Comanthera*, *Eriocaulon*, *Lachnocaulon*, *Leiothrix*, *Paepalanthus*, *Rondonanthus*, *Syngonanthus*, e *Tonina*, ou seja, dos 10 gêneros presentes na família, 9 deles ocorrem no Brasil,

sendo alguns deles endêmicos à Serra do Cipó, Minas Gerais (GIULIETTI et al., 1990, SANO et al., 2015). A Figura 1, apresenta o mapa de distribuição dos gêneros de Eriocaulaceae no mundo, onde destaca-se os que dos 10 gêneros presentes na família, 8 deles ocorrem no Brasil (INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE, 2016).

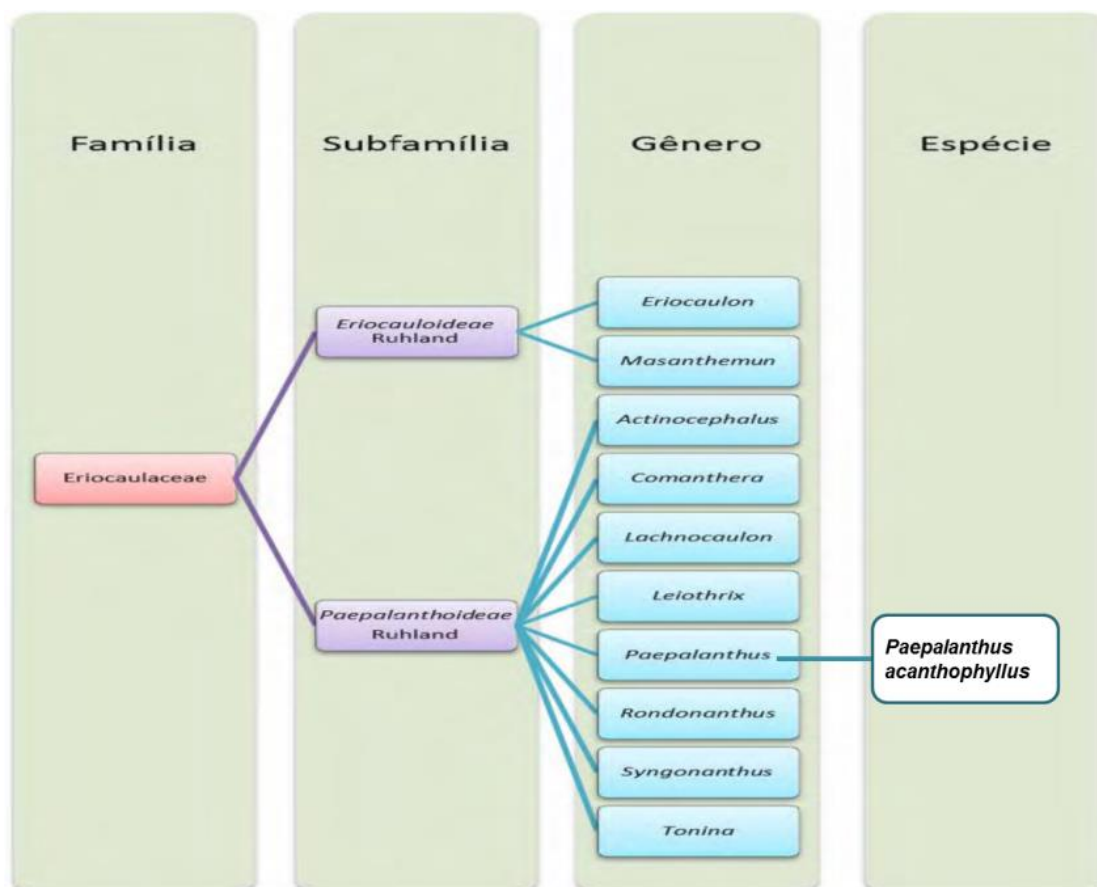
Figura 1 - Mapa de distribuição da família Eriocaulaceae.



Fonte: INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE, (2016).

A Figura 2 apresenta o cladograma simplificado e adaptado, representando os principais gêneros de Eriocaulaceae no Brasil. Um dos principais gêneros é *Paepalanthus* e neste trabalho, com destaque à *Paepalanthus acanthophyllus*, a espécie que está sendo estudada.

Figura 2 - Cladograma simplificado de Eriocaulaceae



Fonte: Adaptado de ANDRADE et al. (2011); GIULIETTI et al. (2012).

A Serra do Espinhaço no Sudeste do Brasil é o centro de diversidade do gênero, que também é bastante diversificado no escudo da Guiana e, em menor grau, na Central do Brasil e no domínio da Mata Atlântica. Piauí, no nordeste do Brasil, é particularmente pobre em *Paepalanthus*, com apenas quatro espécies reconhecidas (SANO et al., 2014).

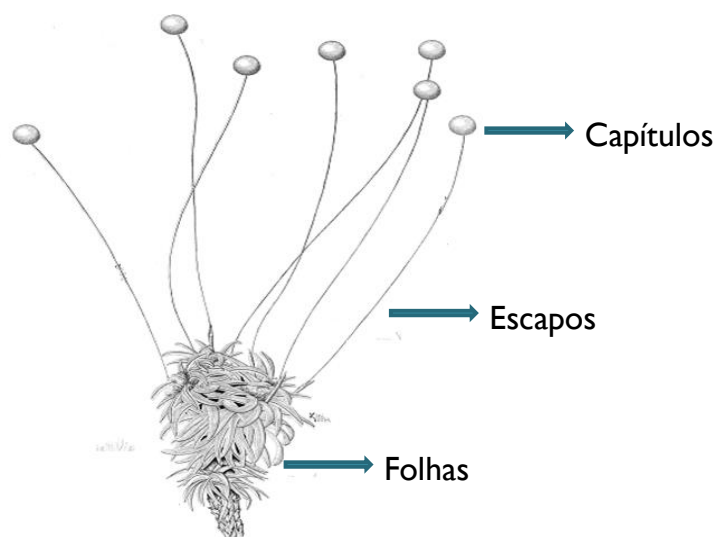
O ambiente onde sobrevivem estas espécies são constituídos, principalmente por afloramentos de arenito, quartzíticos, com altitudes superiores a 1.000 m de altitudes, onde as espécies precisam se adaptar com pouca água e muito calor durante o dia (ANDRADE et al., 2011, GIULIETTI, 2012, SANO et al., 2014).

Sob a denominação de “sempre-vivas” podem também ser encontradas espécies de outras famílias de plantas (Xyridaceae, Cyperaceae, Rapataceae e Compositae). No entanto, o nome tem sido aplicado popularmente à maioria das espécies de Eriocaulaceae, que são as sempre vivas mais coletadas, comercializadas e utilizadas no artesanato e na ornamentação (COSTA, et al., 2008,

GIULIETTI et al., 2012, SANO et al., 2015, INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE, 2016).

Eriocaulaceae são facilmente reconhecidas por serem ervas que possuem, na base, uma roseta de folhas (também chamada de “sapata”) geralmente dispostas em espiral. Dessa roseta, partem os escapos, ou hastes, que portam, em seu ápice, as inflorescências. As inflorescências constituem a característica mais marcante da família: são capítulos, às vezes esféricos, às vezes achatados, o que geralmente confere os nomes populares às espécies: “botão-bolinha”, “botão-branco”, “margarida” e “mini-saia”. Em outros casos, são as hastes que possuem características usadas dando o nome popular à espécie: o “capim-dourado” e a “sempre-viva-pé-de-ouro” são dois exemplos, entre vários outros. As flores são muito reduzidas, atingindo somente um ou dois milímetros de comprimento, havendo de algumas dezenas a centenas delas por inflorescência, sendo polinizadas principalmente por insetos. As sementes, por sua vez, são menores ainda e são produzidas, em média, duas ou três por fruto. (GIULIETTI, et al., 1990, COSTA, et al., 2008, SANO, et al., 2015, INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE, 2016). A Figura 3 mostra o esquema geral de das partes aéreas de Eriocaulaceae.

Figura 3 - Esquema dos capítulos, escapos e folhas em Eriocaulaceae.



Fonte: Adaptado de SANO, et al. (2015).

A coleta indiscriminada das espécies, principalmente aquela praticada com a coleta prematura das inflorescências, antes da produção ou da completa maturação das sementes ou a retirada de muitas plantas inteiras no momento da coleta dos escapos e outros fatores como o uso frequente do fogo como estimulador da floração, são fatores que contribuem para a redução das populações dessas espécies em seus locais de ocorrência (COSTA, et al., 2008, INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE, 2014, INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE, 2016).

Estes fatores contribuem para que muitas das espécies de Eriocaulaceae façam parte da lista vermelha de espécies em extinção (SANO et al., 2014).

Com a finalidade de preservar as espécies do cerrado, o Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), com base na Portaria MMA/ICMBio nº 316/2009, coordena uma estratégia para a conservação de Eriocaulaceae, uma das famílias de plantas com grande número de espécies ameaçadas. Este projeto faz parte do Plano de Ação Nacional para Conservação de Eriocaulaceae – PAN Sempre-vivas. (COSTA, et al., 2008, INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE, 2014).

Ainda nos dias atuais, vale ressaltar que a coleta dessas plantas para exportação é responsável pelo sustento de inúmeras famílias da região. Em muitos locais como Tocantins e Minas Gerais, famílias inteiras sobrevivem da coleta,

armazenamento e do artesanato dos capítulos e escapos das sempre-vivas. A comercialização deste produto teve início nas décadas de 1930 e 1940, e seu auge ocorreu entre os anos de 1970 e 1980, com o aumento da demanda neste período influenciado pelo interesse na exportação para os Estados Unidos, Japão e alguns países da Europa (Giulietti et al., 1988). (COSTA, et al., 2008, SANO, et al., 2015).

A figura Figura 4, mostra a foto de alguns trabalhos de artesanato realizados com escapos de *Syngonanthus nitens*, uma espécie do gênero *Syngonanthus*, conhecida popularmente por capim-dourado.

Figura 4 – SEMPRE-VIVAS. Comércio e economia - (*Syngonanthus nitens*).



Fonte: Disponível em: <<http://semprevivasufvjmlab4.blogspot.com.br/p/grupo-03.html>>. Acesso em: 18 ago. 2016.

Dentre os usos populares de espécies de Eriocaulaceae, está o de afugentar insetos. Tal característica faz com que sejam colocadas em armários e gavetas para repelir traças e baratas (MENEZES et al., 1986).

1.1 Gênero *Paepalanthus*

Paepalanthus 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). No Brasil existe cerca de 340 espécies, das quais 95% restritas ao país, com um elevado número espécies endêmicas (GIULIETTI et al., 2010; FORZZA, et al., 2010, SANO et al., 2015). Novas espécies são frequentemente descritas, especialmente para áreas mal amostradas (GIULIETTI et al.; 2009; TROVO, et al.; 2009; TROVO et al., 2011).

Muitas espécies pertencentes a este gênero já foram estudadas pelo nosso grupo de pesquisa durante estes últimos 20 anos. É importante destacar que o Prof. Wagner Vilegas iniciou os estudos com *Paepalanthus bomelioides* e uma

naftopiranona, denominada de paepalantina foi isolada (VILEGAS et al., 1990). Posteriormente, com esta mesma espécie e com outras estudadas como *Paepalanthus latipes*, *Paepalanthus planifolius*, *Paepalanthus microphyllus*, *Paepalanthus chiquitensis* e *Paepalanthus geniculatus*, os derivados glicosilados da paepalantina, contendo glicose, alose, rhaminose, foram também isolados (VILEGAS et al., 1997, SANTOS et al., 2001, PIACENTE et al., 2001, ZANUTTO et al., 2012 e AMARAL et al., 2012). Também um dímero da paepalantina simétrico (COELHO et al., 1999) e dímero assimétrico, contendo uma unidade da paepalantina e uma unidade da semivioxantina (SANTOS, et al., 2001) foram isolados de *P. bromeliodes* e *P. planifolius*, respectivamente.

Outra classe de substâncias isoladas de espécies de *Paepalanthus* foram os flavonoides. Especificamente flavonoides derivados da quercetina e do canferol, contendo unidade de glicose, galactose, rhaminose (VILEGAS et al., 1998, SANTOS, et al., 2001, DOKKEDAL et al., 2007; ZANUTTO et al., 2012, AMARAL, et al., 2012). Flavonoides acil glicosilados (ANDRADE et al., 1999, SANTOS et al., 2001), foram isolados especificamente de uma antiga seção de *Paepalanthus*, hoje elevada a gênero *Actinocephalus* (SANO et al., 2014).

Quanto as atividades biológicas, a paepalantina isolada de *P. bromeliodes* e outras espécies de *Paepalanthus* apresentam atividade antioxidante (PACIFICO et al., 2011), citotóxica (COELHO, et al., 2000, SANTOS et al., 2001, SILVA, 2007), mutagênica (VARANDA et al., 1997, ZANUTTO, 2012) antiulcera (MORAES, et al., 2010) e para o tratamento de doença de *Chron* (DI STASI et al., 2004).

Ensaio utilizando peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em macrófago peritoneal em camundongos, onde foram determinadas a ação imunomodulatória de extratos (etanólico e etanólico 70%) obtidos de quatro espécies (*Paepalanthus hilairei*, *Paepalanthus robustus*, *Paepalanthus vellozioides* e *Paepalanthus speciosus*) na concentração de 10 mg/mL mostraram-se com atividades promissoras (MOREIRA, et al., 2000).

Apesar de já existir um significativo número de espécies do gênero *Paepalanthus* já estudadas pelo nosso grupo de pesquisa, ainda existem muitas espécies que não possuem dados químicos e biológicos na literatura. Dentre as espécies não estudadas quimicamente e biologicamente, encontra-se *P. acanthophyllus* Rhuland.

Muitas espécies de *Paepalanthus* são também conhecidas popularmente por chuveirinho e são utilizadas no artesanato do Centro-Oeste. A espécie *P. acanthophyllus* também está ameaçada de extinção e não há um controle sobre o seu uso, que deveria estar fundamentado no extrativismo, de forma sustentável. Essa planta ocorre nos campos de altitude, possui distribuição desde o Estado de Minas Gerais, Bahia, Goiás, Distrito Federal e se desenvolve em solos arenosos e cobertos de gramíneas. Chega a atingir 90 cm de altura. (LEGIÃO DO CERRADO, 2016). A Figura 5 mostra o arranjo de capítulos, escapos e folhas de *P. acanthophyllus*.

Figura 5 - Capítulos, escapos e folhas de *P. acanthophyllus*.



Fonte: Foto de Marcelo Trovó Lopes de Oliveira

6 CONCLUSÕES

O fracionamento por sephadex LH-20 do extrato metanólico dos capítulos de *P. acanthophyllus* e posterior fracionamento por HPLC semi-preparativo, forneceu três flavonoides e duas naftopiranonas que foram identificados por UV, RMN mono e bi-dimensionais, sendo que um destes flavonoides é considerado inédito na literatura que é o 6-metoxicanferol-3-O-(6"-*p*-cumaroil)- β -D-glucopiranosil-7-O- β -D-glucopiranosídeo.

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

A quantificação dos derivados de canferol e paepalantina glicosilada (**Pa4**) foram realizadas no extrato metanólico dos capítulos de *P. acanthophyllus*. A concentração de derivados do canferol encontrada no extrato metanólico das capítulos foi de $(61,3 \pm 3,9 \text{ mg.g}^{-1} \text{ de extrato})$, enquanto, que a concentração de derivados da paepalantina glicosilada (**Pa4**) foi de $(83,8 \pm 14,4 \text{ mg.g}^{-1} \text{ de extrato})$.

Os teores de fenóis totais encontrados para os extratos metanólicos foi de $133,19 \text{ mg.g}^{-1}$ de extrato para os capítulos. O teor de flavonoides totais no extrato metanólico foi de $122,15 \text{ mg.g}^{-1}$.

Os extratos apresentaram fraca sensibilidade para a atividade antimicrobiana frente às cepas de bactérias *gram*-positiva e *gram*-negativa e levedura testadas.

A citotoxicidade dos extratos foi considerada promissora, quando comparado com o padrão de controle cisplatina, sendo o melhor resultado encontrado para o extrato metanólico dos capítulos ($\text{IC}_{50} = 34,81 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$) contra MCF7 (cancro da mama humana). Este resultado pode ser atribuído 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 dos capítulos de *P. acanthophyllus*, sendo os dados aqui obtidos relevantes pois poderão auxiliar na discussão taxonômica do gênero *Paepalanthus*.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003**. Determina a publicação do Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Brasília, 2003. 15 p. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33836/349509/Consolidado%2Bde%2Bnormas%2BCOBIO.pdf/3122249b-48cb-47aa-be78-76f3129a62ba>>. Acesso em: 25 ago. 2016
- AGRAWAL, P. K. **Carbon-13 NMR of flavonoids**. Amsterdam: Elsevier, 1989. 564 p.
- ALIGIANNIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINOU, J. B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 9, p. 4168-4167, 2001.
- AMARAL, F. P.; NAPOLITANO, A.; MASULLO, M.; SANTOS, L. C.; FESTA, M.; VILEGAS, W.; PIZZA, C.; PIACENTE, S. HPLC-ESIMSⁿ profiling, isolation, structural elucidation, and evaluation of the antioxidant potential of phenolics from *Paepalanthus geniculatus*. **Journal of 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. 9260-927, 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.
- CARDOSO, C. A. L.; ZANUTTO, F. V.; VARANDA, E. A.; SANO, P. T.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C. Quantification of flavonoids, naphthopyranones and xanthenes in Eriocaulaceae species by LC-PDA. **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 3, p. 138-146, 2012.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **M07-A6**: methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard. 6th ed. Wayne, 2006.

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

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

COSTA, F. N.; TROVÓ, M.; SANO, P. T. Eriocaulaceae na Cadeia do Espinhaço: riqueza, endemismo e ameaças. **Megadiversidade**. v. 4, n. 1, p. 89-97, 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.

DI STASI, L. C.; CAMUESCO, D.; NIETO, A.; VILEGAS, W.; ZARZUELO, A.; GÁLVEZ, J. Intestinal anti-inflammatory activity of Paepalantine, an isocoumarin isolated from the capitula of *Paepalanthus bromelioides*, in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. **Planta Medica**, v. 70, p. 315-320, 2004.

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

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

FERRAZ, A. B. F.; FARIA, D. H.; BENNETI, M. N.; ROCHA, A. B. da; SCHWARTSMANN, G.; HENRIQUES, A. T.; VON POSER, G. L. Screening for antiproliferative activity of six southern Brazilian species of *Hypericum*. **Phytomedicine**, v. 12, p.112-115, 2005.

FORZZA, R. C.; BAUMGRATZ, J. F. A.; BICUDO, C. E.; CARVALHO JUNIOR, 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.; NADRUZ COELHO, M. A.; 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. (Org.). **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. v. 1.

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.; HAWA, Z. E.; ASMAH, R. Antioxidant activities, total phenolics and flavonoids content in two varieties of Malaysia Young Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). **Molecules**, v. 15, p. 4324-4333, 2010.

GIULIETTI, A. M. **Os gêneros “*Eriocaulon* L.” e “*Leiothrix* Ruhl.” (Eriocaulaceae) na Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil.** 1978. 357 f. Tese (Doutorado em Botânica) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1978.

GIULIETTI, A. M., HENSOLD, N. Padrões de distribuição geográfica dos gêneros de Eriocaulaceae. **Acta Botânica Brasileira**, v. 4, n. 1, p. 133-158, 1990.

GIULIETTI, A. M.; MIRANDA, E. B. Five new taxa in Eriocaulaceae from the Chapada Diamantina of Bahia, Brazil. **Kew Bulletin**, v. 64, p. 525-536, 2009.

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.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C.; RICCI, C. W.; BONFIM, M. C. P.; MIRANDA, E. B. Multidisciplinary studies on neotropical Eriocaulaceae. In: WILSON, K. L.; MORRISON, D. A. (Ed.). **Monocots: systematics and evolution**. Melbourne: CSIRO, 2000. p. 580-592.

GIULIETTI, A. M.; SANO, P. T.; COSTA, F. N.; PARRA, L. R.; CHTERNACHT, L.; TISSOT-SQUALI, M. L.; TROVÓ, M.; WATANABE, M. T. C.; FREITAS, M. P.; HENSOLD, N. Eriocaulaceae. 2010. In: FORZZA, R. C.; BAUMGRATZ, J. F. A.; BICUDO, C. E.; CARVALHO JUNIOR, 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.; NADRUZ COELHO, M. A.; 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. (Org.). **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. v. 2, p. 938-958.

GIULIETTI, A. M.; HENSOLD, N.; PARRA, L. R.; ANDRADE, M. J. G.; VAN DEN BERG, C.; HARLEY, R. M. The synonymization of *Philodice* with *Syngonanthus* (Eriocaulaceae). **Phytotaxa**, v. 60, p. 50-56, 2012.

GOMES, J. P. M. **Pesquisa de atividade antitumoral e mutagênica in vitro de produtos naturais**. 2008. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

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.
HARBORNE, J. B. **The flavonoids: advances in research since 1986**. London: Chapman and Hall, 1986. 676 p.

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.

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.

INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE. **Sumário Executivo do Plano de Ação Nacional para Conservação das Sempre-Vivas**. Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/docs-plano-de-acao/pan-sempre-vivas/sempre_vivas.pdf>. Acesso em: 18 ago. 2016.

INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE. **Instrução Normativa no 03, de 01 de setembro de 2014**. Fixa normas para utilização do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBio, na forma das diretrizes e condições previstas nesta Instrução Normativa, e regulamenta a disponibilização, o acesso e o uso de dados e informações recebidos pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade por meio da SISBio. (Processo nº 02070.001067/2013-96). Disponível em: http://www.icmbio.gov.br/sisbio/images/stories/instrucoes_normativas/INSTRU%C3%87%C3%830_NORMATIVA_ICMBio_N%C2%BA_3_DE_2014__com_retifica%C3%A7%C3%A3o_do_DOU18062015.pdf. Acesso em 18 ago.2016.

JURD, L.; GEISSMAN, T. A. Absorption spectra of metal complexes of flavonoid compounds. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 21, p. 1395-1401, 1956.

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

LEGIÃO DO CERRADO. **Chuveirinho (Paepalanthus acanthophyllus)**. Disponível em: <https://web.facebook.com/permalink.php?story_fbid=137328553121119&id=100005319246292&_rdr>. Acesso em: 18 ago. 2016.

LEMKE, T. L.; WILLIAMS, D. A. (Ed.). **Foye's principles of medicinal chemistry**. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2008. 1377 p.

LIMA, A. P.; PEREIRA, F. C.; VILANOVA-COSTA, C. A. S. T.; RIBEIRO, A. S. B. B.; SILVEIRA-LACERDA, E. P. Avaliação da atividade antitumoral e citotóxica da planta *Siolmatra brasiliensis*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 10-12, 2006.

MABRY, T. J.; ULUBELEN, A. Chemistry and utilization of phenylpropanoids including flavonoids, coumarins, and lignans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 28, p. 188-196, 1980.

MENEZES, N. L.; GIULIETTI, A. M. Campos rupestres, paraíso botânico na Serra do Cipó. **Ciência Hoje**, v. 5, p. 38-44, 1986.

MERFORT, I.; WENDISCH, D. Flavonoidglycoside aus *Arnica montana* und *Arnica Chamissonis*. **Planta Medica**, p. 434-437, 1987.

MONKS, N. R.; BORDGON, S. A. L.; FERRAZ, A.; MACHADO, K. R.; FARIA, D. H.; LOPES, R. M.; MONDIM, C. A.; SOUZA, I. C. C. de, LIMA, M. F. S.; ROCHA, A. B. da; SCHARSTSMANN, G. Anti-tumor screening of Brazilian plants. **Pharmaceutical Biology**, v. 40, p. 603-616, 2002.

MORAES, T. M.; SILVA, M. A.; RODRIGUES, C. M.; SANTOS, L. C.; SANNOMIYA, M.; ROCHA, L. R. M.; BRITO, A. R. M. S.; BAUAB, T. M.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C. A. Antioxidant, antisecretory and gastroprotective activities from *Leiothrix flavescens*. In: GUPTA, I. V. K. (Ed.). **Efficacy, safety & clinical evaluation**. Houston: Studium Press, 2010. p. 265-279. (Comprehensive bioactive natural products, v. 2).

MOREIRA, R. R. D.; CARLOS, I. Z.; VILEGAS, W. Macrophage activation by *Paepalanthus* spp. extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 9/10, n. 1, p. 37-42, 2000.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1, p. 55-63, 1983.

MUKHERJEE, D.; NISSEN, S. E.; TOPOL, E. J. Risk of cardiovascular events associated with selective COX-2 inhibitors. **Journal of the American Medical Association**, v. 286, p. 954-959, 2001.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, v. 1/2, p. 95-111, 2014.

O'BRIEN, H. E.; PARRENT, J. L.; JACKSON, J. A.; MONCALVO, J.-M.; VILGALYS, R. Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 9, p. 5544-5550, 2005.

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.

PACIFICO, M.; NAPOLETANO, A.; HILARIO, F.; PIZZA, C.; PIACENTE, S.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C. Metabolite fingerprinting of capim dourado (*Syngonanthus nitens*), a basis of Brazilian handcrafts. **Industrial Crops and Products**, v. 33, n. 2, 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.
- PEIXOTO SOBRINHO, T. J. da S.; GOMES, T. de L. B.; CARDOSO, K. C. de M.; AMORIM, E. L. C. de. Otimização de metodologia analítica para o doseamento de flavonoides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) teudel. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 2, p. 288-291, 2010.
- PIACENTE, S.; SANTOS, L. C.; MAHMOOD, N.; ZAMPELLI, A.; PIZZA, C.; VILEGAS, W. New naphthopyranone glycosides from *Paepalanthus microphyllus*. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 5, p. 680-682, 2001.
- PRISTA, L. V. N. **Tecnologia farmacêutica**. 5. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1995. v. 1-2.
- RIBANI, M.; BOTOLLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
- ROBBINS, S. L.; CONTRAN, R. S.; KUMAR, V.; SCHOEN, F. J. **Patologia estrutural e funcional**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 1277 p.
- RUHLAND, W. Eriocaulaceae. **Das Pflanzenreich**, v. 13, p. 1- 294, 1903.
- SANO, P. T. *Actinocephalus* (Körn.) Sano (*Paepalanthus* sect. *Actinocephalus*), a new genus of Eriocaulaceae, and other taxonomic and nomenclatural changes involving *Paepalanthus* Mart. **Taxon**, v. 53, p. 99-107, 2004.
- SANO, P. T.; COSTA, F. N.; TROVO, M.; ECHTERNACHT, L. *Paepalanthus magistrae* (Eriocaulaceae), a remarkable new species in honor of a Ana Maria Giulietti-Harley. **Rodriguésia**, v. 66, n. 2, p. 299-303, 2015.
- SANTOS, L. C.; PIACENTE, S.; DE RICCARDIS, F.; ELETTO, A. M.; PIZZA, C.; VILEGAS, W. Xanthonés and flavonoids from *Leiothrix curvifolia* and *Leiothrix flavescens*. **Phytochemistry**, v. 56, n. 8, p. 853-856, 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). **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 39, n. 4, p. 1021-1035, 1966.
- SEMPRE-VIVAS. **Comércio e economia**. Disponível em: <<http://semprevivasufvjmlab4.blogspot.com.br/p/grupo-03.html>>. Acesso em: 18 ago. 2016.

- SILVA, A. C. Z. **Padronização dos extratos polares das partes aéreas de *Actinocephalus divaricatus* (Koern.) Sano (Eriocaulaceae) por HPLC-PDA.** 2016. 135 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, UNESP, 2016.
- 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 & Pharmaceutical Bulletin**, v. 55, n. 11, p. 1635-1639, 2007.
- TROVÓ, M.; SANO, P. T. Taxonomic survey of *Paepalanthus* section *Diphyomene* (Eriocaulaceae). **Phytotaxa**, v. 14, n. 1, p. 49-55, 2010.
- VARANDA, E. A.; RADDI, M. S. G.; DIAS, F. de L. P.; ARAUJO, M. C. S. 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.
- VILEGAS, W.; ROQUE, N. F.; SALATINO, A.; GIESBRECHT, A. M.; DAVINO, S. Isocoumarin from *Paepalanthus bromelioides*. **Phytochemistry**, v. 29, p. 2299-2301, 1990.
- VILEGAS, W.; SANTOS, L. C.; ALECIO, A. C.; PIZZA, C.; PIACENTE, S.; PAUW, E.; SANO, P. T. Naphthopyranone glycosides from *Paepalanthus bromelioides*. **Phytochemistry**, v. 49, p. 207-210, 1998.
- ZANUTTO, F. V. **Estudo químico e atividades mutagênica e antiradicalar de *Paepalanthus chiquitensis* Herzog (Eriocaulaceae).** 2013. 262 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.; 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, 2012.