

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

ESTUDO QUÍMICO E ATIVIDADES MUTAGÊNICA E ANTIRADICALAR DE
***Paepalanthus chiquitensis* Herzog (ERIOCAULACEAE)**

FABIANA VOLPE ZANUTTO

ARARAQUARA - SP
2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

ESTUDO QUÍMICO E ATIVIDADES MUTAGÊNICA E ANTIRADICALAR DE
***Paepalanthus chiquitensis* Herzog (ERIOCAULACEAE)**

FABIANA VOLPE ZANUTTO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

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

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eliana Aparecida Varanda

ARARAQUARA - SP
2013

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

Z27e Zanutto, Fabiana Volpe
 Estudo Químico e Atividades Mutagênica e Antiradicalar de
 Paepalanthus chiquitensis Herzog (ERIOCAULACEAE) / Fabiana Volpe
 Zanutto. – Araraquara, 2013
 175 f.

 Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de
 Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós
 Graduação em Ciências Farmacêuticas

 Orientador: Lourdes Campaner dos Santos

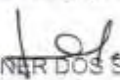
 Coorientador: Eliana Aparecida Varanda

 1. Eriocaulaceae. 2. *Paepalanthus chiquitensis*. 3. Mutagenicidade. 4.
 Antiradicalar. I. Santos, Lourdes Campaner dos, orient. II. Varanda, Eliana
 Aparecida, coorient. III. Título.

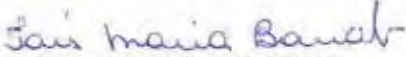
CAPES: 40300005

**ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE FABIANA VOLPE ZANUTTO,
DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, DO(A)
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.**

Aos 26 dias do mês de março do ano de 2013, às 09:00 horas, no(a) Sala 30 do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da UNESP, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Profa. Dra. LOURDES CAMPANER DOS SANTOS do(a) Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química do Campus de Araraquara da UNESP, Profa. Dra. CASSIA REGINA PRIMILA CARDOSO do(a) Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química do Campus de Araraquara da UNESP, Profa. Dra. TAIS MARIA BAUAB do(a) Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da UNESP, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de FABIANA VOLPE ZANUTTO, intitulada "ESTUDO QUÍMICO E ATIVIDADES MUTAGÊNICA E ANTIRADICALAR DE *Paepalanthus chiquitensis* Herzog (ERIOCAULACEAE)". Após a exposição, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: Aprovada. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Profa. Dra. LOURDES CAMPANER DOS SANTOS 


Profa. Dra. CASSIA REGINA PRIMILA CARDOSO


Profa. Dra. TAIS MARIA BAUAB

Súmula Curricular

1. Dados Pessoais

Nome: Fabiana Volpe Zanutto

Filiação: Odilmo Antônio Zanutto e Hilda Maria Volpe Zanutto

Naturalidade: Santo Anastácio – SP

e-mail: fabianavzanutto@gmail.com

2. Formação Acadêmica

Graduação

Instituição: Universidade do Oeste Paulista

Local: Presidente Prudente – SP

Curso: Farmácia e Bioquímica

Período: 02/2005 a 12/2008

Pós-Graduação:

Mestrado

Instituição: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos.

Título da Dissertação: Estudo Químico e Atividades Mutagênica e Antiradicalar de *Paepalanthus chiquitensis* Herzog (ERIOCAULACEAE)

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

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eliana Aparecida Varanda

Bolsista: CNPq (período: 03/2011 a 01/2013)

Local: Araraquara – SP

Período: 02/2011 a 03/2013

3. Atuação Profissional

- Professora das disciplinas de Farmacotécnica, Cosmetologia, Homeopatia e Farmacologia em curso técnico de farmácia, Grupo Holus de Ensino, Santo Anastácio – SP, 02/2008 a 12/2008;
- Farmacêutica Responsável, Drogeria Sinop, Sinop – MT, 01/2009 a 12/2009;

- Professora de Farmacologia em curso técnico de Enfermagem, Cientec (Centro de Integração do Ensino Técnico), Sinop – MT, 02/2009 a 12/2009;
- Farmacêutica Responsável, Farmácia Madeira, Sinop – MT, 01/2010 a 12/2010;
- Professora-Coordenadora em curso profissionalizante de farmácia, Instituto Nacional de Qualificação Profissional, Santo Anastácio – SP, 01/2011 a 02/2011;

4. Publicações

- 1) **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, p. 244-262, 2013.
- 2) CARDOSO, C. A. L.; **ZANUTTO, F. V.**; VARANDA, E. A.; SANO, P. T.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C. Quantification of Flavonoids, Naphthopyranones and Xanthonenes in Eriocaulaceae Species by LC-PDA. *American Journal of Analytical Chemistry*, v. 03, p. 138-146, 2012.
- 3) **ZANUTTO, F. V.**; VARANDA, E. A.; SANO, P. T.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C. Characterization of flavonoids and naphthopyranones in the extract of *Paepalanthus giganteus* by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry. *Planta Medica*, v. 78, p. 1027-1310, 2012.

5. Resumos Publicados em Anais de Congressos

- 1) **ZANUTTO, F. V.**; VARANDA, E. A.; SANO, P. T.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C. Characterization of flavonoids and naphthopyranones in the extract of *Paepalanthus giganteus* by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry.

In.: The International Congress on Natural Products Research. New York – NY – USA. *Planta Medica*, v. 78, p. 1027-1310, 2012.

- 2) BONAMIN, F.; KUSHIMA, H. ; ZANUTTO, F. V.; SANTOS, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. . *Syngonanthus nitens* and *Paepalanthus giganteus*: Sempre-Vivas with activity in gastric and duodenal ulcer.. In: Simpósio Internacional de Plantas Medicinais e Nutracêuticos, 2012, Aracajú - SE. Anais do Simpósio Internacional de Plantas Medicinais e Nutracêuticos, 2012.

6. Trabalhos Apresentados em Congressos

- 1) **ZANUTTO, F. V.**; BOLDRIN, P. K.; SANO, P. T.; VILEGAS, W. ; VARANDA, E. A.; SANTOS, L. C. Evaluation of the mutagenic activity in capitulae and scapes from *Paepalanthus giganteus* Sano (Eriocaulaceae). In.: VIII Brazilian Symposium on Pharmacognosy and I International Symposium on Pharmacognosy. 2012. Ilhéus – BA.
- 2) **ZANUTTO, F. V.**; VARANDA, E. A.; SANO, P. T.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C. Characterization of flavonoids and naphthopyranones in the extract of *Paepalanthus giganteus* by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry. In.: The International Congress on Natural Products Research. 2012. New York – NY – USA.
- 3) BONAMIN, F.; KUSHIMA, H.; **ZANUTTO, F. V.**; SANTOS, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. *Syngonanthus nitens* and *Paepalanthus giganteus*: ‘Sempre-Vivas’ with activity in gastric and duodenal ulcer. In.: Simpósio Internacional de Plantas Medicinais e Nutracêuticos, 2012. Aracaju - SE.
- 4) BRITO, C. C.; COQUEIRO, A.; **ZANUTTO, F. V.** ; TALA, V. R. S.; SANTOS, L. C.; VILEGAS, W. Total phenolic compounds, antiradicalar potencial and chemical study of *Solanum paniculatum* (Solanaceae) fruits. In.: I International Symposium on Pharmacognosy. 2012. Ilhéus – BA.

- 5) SOUZA, S. F.; **ZANUTTO, F. V.**; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C. Fingerprint do extrato metanólico e da fração acetate de etila dos escapos de *Paepalanthus giganteus* (Eriocaulaceae). In.: XXIV Congresso de Iniciação Científica da Unesp. 2012. Águas de São Pedro – SP.
- 6) **ZANUTTO, F. V.** ; SANO, P. T. ; VILEGAS, W. ; VARANDA, E. A. ; SANTOS, L. C. . Identificação dos metabólitos secundários no extrato metanólico de capítulos e escapos de *Paepalanthus giganteus* (Sano) por HPLC/ESI-MS. XX - Congresso Ítalo-Latino Americano de Etnomedicina. 2011. Fortaleza – CE.
- 7) **ZANUTTO, F. V.** ; SANO, P. T. ; VILEGAS, W. ; VARANDA, E. A. ; SANTOS, L. C. . ANTIRADICAL ACTIVITY AND CONTENT OF FLAVONOIDS AND TOTAL PHENOLS PRESENT IN *Paepalanthus giganteus* SANO (ERIOCAULACEAE). 3rd BCNP Brazilian Conference on Natural Products. 2011. Ouro Preto – MG.
- 8) LIMA NETO, J. S. ; **ZANUTTO, F. V.** ; ROCHA, C. Q. ; MELO, M. S. F. ; SANTOS, L. C. ; VILEGAS, W. . PHENOLICS COMPOUNDS IN STANDARDS EXTRACTS OF PLANTS OF GENUS *Byrsonima* (MALPIGHIACEAE). 3rd BCNP Brazilian Conference on Natural Products. 2011. Ouro Preto – MG.
- 9) CARDOSO, C. A. L. ; **ZANUTTO, F. V.** ; SANO, P. T. ; VILEGAS, W. ; SANTOS, L. C. High-Performance Liquid Chromatographic and Quantification of Flavonoids, naphthopyranones and xantones in the Eriocaulaceae species. 52nd Annual Meeting of American Society of Pharmacognosy. 2011. San Diego, California, U.S.A.
- 10) **ZANUTTO, F. V.** ; BONFIM, J. C.; MELO. DETERMINAÇÃO DE ÍONS METÁLICOS EM ÁLCOOL ETÍLICO COMBUSTÍVEL ATRAVÉS DE ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA. Enepe – Encontro de Ensino Pesquisa e Extensão da UNOESTE. 2008. Presidente Prudente – SP.
- 11) **ZANUTTO, F. V.** ; MELO ; MARIN . DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE CARBAMATO DE ETILA, URÉIA E COBRE EM CACHAÇAS

COMERCIALIZADAS EM PRESIDENTE PRUDENTE-SP. Enepe – Encontro de Ensino Pesquisa e Extensão da UNOESTE. 2008. Presidente Prudente – SP.

- 12) ZANUTTO, F. V. ; MARIN . AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO DE ÍONS METAÉLICOS EM ÁLCOOL ETÍLICO COMBUSTÍVEL ATRAVÉS DE ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA.** Enepe – Encontro de Ensino Pesquisa e Extensão da UNOESTE. 2008. Presidente Prudente – SP.

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito.”

Chico Xavier

Dedico este trabalho à minha filha Alice, que tornou minha vida muito mais feliz e que ainda pequenina me surpreende com tanta ternura e me mostra a cada dia o maior amor do mundo. Aos meus pais Odílmo e Hilda, que sempre me apoiaram nas horas boas e ruins, pelo amor, carinho e dedicação em todos os momentos da minha vida. E aos meus avós, por desde cedo transmitirem o valor do trabalho, a importância da dedicação e perfeição para a realização profissional e ainda por me ensinarem a seguir os melhores caminhos desde pequena.

Agradecimentos

À Deus, por existir e por estar aqui realizando esta importante etapa da minha vida.

Meus ex-patrões, Salete e Edilson, pelas longas conversas reflexivas e imenso incentivo para voltar a estudar.

À Prof^a. Dr^a Ana Júlia Pereira Santinho Gomes (UFSJ), pelo imenso incentivo para cursar o mestrado.

Ao Prof. Dr. Wagner Vilegas, por ter aceitado, inicialmente, minha orientação no Programa de Pós-Graduação, e por tudo que aprendi com ele, o que auxiliou muito à minha formação, tanto profissional quanto pessoal.

À minha querida orientadora, Prof^a. Dr^a Lourdes Campaner dos Santos, pela excelente orientação e, principalmente, pelo imenso aprendizado adquirido, os quais foram essenciais à minha formação, pela paciência, preocupação e disponibilidade para todas as dúvidas.

À minha co-orientadora, Prof^a. Dr^a Eliana Aparecida Varanda, por ter aberto as portas de seu laboratório e proporcionar-me a maravilhosa oportunidade de trabalhar com os testes de mutagenicidade, além das enriquecedoras discussões.

Ao Prof. Dr. Paulo Takeo Sano (IB - USP), pela disponibilidade em sanar todas as dúvidas e pelas coletas e identificação da matéria-prima vegetal.

Ao Prof. Dr. Marcelo Trovó (UFRJ), pela prontidão e rapidez com que sanava minhas dúvidas com relação aos dados botânicos da espécie e pelas informações decisivas e essenciais para a finalização do trabalho.

Aos professores Marcelo Aparecido da Silva e Taís Maria Bauab pela participação em banca de qualificação e pelas valiosas sugestões para a finalização deste trabalho.

Às professoras Cássia Regina Prímula Cardoso e Taís Maria Bauab, que gentilmente aceitaram o convite para compor a banca de defesa do mestrado.

À Prof^a Raquel Regina Duarte Moreira pela oportunidade na realização do estágio docência em Farmacognosia e pelos valiosos ensinamentos.

A todos os colegas do laboratório de fitoquímica: Cláudia, Aline, Fabiano, Leonardo, Luisa, Marcelo Tangerina, Cássia, Maria do Socorro, Lima Neto, Felipe, Samara, Carlos, Natália, Magela, Cíntia, Silvia, Thiago, Trina, Raíssa, Cate Nogueira, Laís, Luiz Leonardo, Marcelo Dias, Leonice, Maiara, Marcelo Amorim (pelo arzinho), Vinícius Ferreira, Mírian, Vinícius Garcia, Guilherme, Silmara, Nerilson e Luis Octavio (NuBBE) pela amizade, convivência e pelo imenso aprendizado ao longo destes dois anos. Foi maravilhoso ter vocês comigo!

Aos colegas do laboratório de mutagenicidade: Paula, Mariana, Flávia, Lívia, Márcio e Ana Paula, por me receberem de braços abertos no laboratório de mutagenicidade, pela amizade, aprendizado e imensa receptividade e prestatividade em todos os momentos.

Aos meus pais e à minha irmã Flávia, pela amizade, companheirismo, pela ajuda para cuidar da Alice e por me ajudarem a correr atrás dos últimos detalhes para a finalização deste trabalho, não é Pai?

À Aline Ferreira pela sincera e verdadeira amizade e também pelo companheirismo e por sempre poder contar com você.

À Cássia pela ajuda na correção ortográfica do texto e pelas preciosas dicas sobre os ensaios de mutagenicidade.

À Thaís Talarico e à Aline pela ajuda na correção dos termos em inglês.

Às técnicas do laboratório de microbiologia, Silvia Helena e Silvia da Silva, pela amizade, pelas conversas maravilhosas e por tudo que aprendi com vocês. Obrigada!

Ao Alberto e ao Ademir, do Laboratório de Espectrometria de Massas do Instituto de Química, pelas análises.

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

Aos funcionários da biblioteca e da seção de pós-graduação pela ajuda e orientações prestadas.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas pela acolhida e incentivo à vida acadêmica

À Capes, ao CNPq pela bolsa concedida e à FAPESP pelo suporte financeiro.

A todos que aqueles que de algum modo contribuíram para a realização deste trabalho, obrigada!

RESUMO

Este trabalho descreve o estudo fitoquímico, a avaliação das atividades mutagênica e antiradicalar e a determinação dos teores de flavonoides e fenóis totais dos extratos metanólicos e da fração acetato de etila de *Paepalanthus chiquitensis* Herzog, pertencente à família Eriocaulaceae. As análises por HPLC-UV-PDA permitiram inferir, qualitativamente, que o extrato metanólico de capítulos possui maior concentração de naftopiranonas, enquanto que os escapos possuem maior concentração de flavonoides. Os *fingerprints* por HPLC-ESI-IT-MSⁿ permitiram identificar dezenove flavonoides e seis naftopiranonas pela análise dos padrões de fragmentações por ESI-MSⁿ, modo negativo, além da comparação com dados existentes na literatura. No estudo fitoquímico, foram utilizadas técnicas cromatográficas usuais, principalmente para substâncias polares, como (Cromatografia de Permeação em gel, Sephadex LH-20, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Extração em Fase Sólida - SPE), que forneceram misturas de flavonoides identificados por métodos espectroscópicos (Espectrometria de Massas, Ultravioleta e Ressonância Magnética Nuclear). Foram, portanto, identificados dois flavonóides considerados inéditos na literatura (**PGC2B** e **PGC3**). A atividade antiradicalar dos extratos metanólicos e das frações acetato de etila foram avaliadas utilizando-se o ensaio DPPH (1,1-difenil-1-picril-hidrazila) e, como padrões, o ácido gálico e a quercetina. Este estudo revelou uma melhor atividade antiradicalar da fração acetato de etila ($IC_{50} = 1,82 \pm 0,0374 \mu\text{g mL}^{-1}$ para escapos, e $2,05 \pm 0,0133 \mu\text{g mL}^{-1}$, para capítulos) quando comparadas com os padrões de ácido gálico ($IC_{50} = 4,37 \pm 0,0377 \mu\text{g mL}^{-1}$) e quercetina ($IC_{50} = 5,12 \pm 0,0079 \mu\text{g mL}^{-1}$). Foi observada uma maior concentração de fenóis totais na fração acetato de etila de escapos (106,54 mg/g de fenóis totais por g de fração acetato de etila de escapos) e de capítulos (99,12 mg/g de fenóis totais por g de fração acetato de etila de capítulos) quando comparada com os demais extratos metanólicos (41,33 mg/g de fenóis totais por g extrato metanólico de escapos e 25,96 mg/g de fenóis totais por g de extrato metanólico de capítulos) quando comparadas com o padrão do ácido gálico. O maior teor de flavonoides totais foi encontrado na fração acetato de etila de escapos (48,14 mg de flavonoides por grama de fração) confirmando deste modo os resultados acima mencionados. Este maior teor pode ser atribuído ao efeito

sinérgico existente entre os flavonoides derivados da quercetina e flavanonóis presentes no extrato. Nos ensaios de mutagenicidade (teste de Ames), se observou que o extrato metanólico de capítulos de *P. chiquitensis* apresentou mutagenicidade positiva para a linhagem TA97a de *Salmonella thypimurium*. De acordo com os estudos fitoquímicos realizados, esta atividade pode ser atribuída à presença majoritária de naftopiranonas e derivados da quercetina.

Palavras chaves: Eriocaulaceae, *Paepalanthus chiquitensis*, mutagenicidade, antiradicalar.

ABSTRACT

This research describes the phytochemical study, the evaluation of the mutagenic and antiradicalar activities, and the determination of the total levels from flavonoids and phenols of the methanolic extract and ethyl acetate fraction of *Paepalanthus chiquitensis* Herzog, belonging to the Eriocaulaceae family. The analysis by HPLC-UV-PDA allowed inferring qualitatively that the methanolic extract of the capitulae has a higher concentration of naphthopyranones while scapes have a higher concentration of flavonoids. The fingerprints by HPLC-ESI-IT-MSⁿ allowed to identify nineteen flavonoids and six naphthopyranones by the analysis of the fragmentation patterns by ESI-MSⁿ in the negative mode for flavonoids and naphthopyranones, besides the comparison with the literature data. In the phytochemical study, usual chromatographic techniques were used, especially for polar compounds -such as Gel Permeation Chromatography, Sephadex LH-20, High Performance Liquid chromatography and Solid Phase Extraction- to provide mixtures of flavonoids which were identified by spectroscopic methods (Mass Spectrometry, Ultraviolet and Nuclear Magnetic Resonance). That allowed to identify two flavonoids unpublished in the literature (**PGC2** and **PGC3**). The antiradical activity of the methanolic extracts and ethyl acetate fractions were evaluated using DPPH assay, with gallic acid and quercetin as antiradical patterns. This study revealed a better antiradical activity of ethyl acetate fractions ($IC_{50} = 1.82 \pm 0.0374 \mu\text{g mL}^{-1}$, for scapes and $2.05 \pm 0.0133 \mu\text{g mL}^{-1}$ for capitulae), when compared to the standards gallic acid ($IC_{50} = 4.37 \pm 0.0377 \mu\text{g mL}^{-1}$) and quercetin patterns ($IC_{50} = 5.12 \pm 0.0079 \mu\text{g mL}^{-1}$). Was observed a higher content of total phenols in the ethyl acetate fractions of the scapes (106.54 mg/g of total phenols presents in the g ethyl acetate fraction of scapes) and the capitulae (99.12 mg/g of total phenols presents in the g ethyl acetate fraction of capitulae) when compared to other methanolic extracts (41.33 mg/g of total phenols/g of methanolic extract of scapes, 25.96 mg/g of total phenols/g of methanolic extract of capitulae) and ethyl acetate fraction of the capitulae (99.12 mg/g) from the analyzed *P. chiquitensis* and standard gallic acid. The ethyl acetate fractions (48.14 mg/g of total flavonoids present in the ethyl acetate fraction of the scapes) had the highest activity, suggesting a synergic effect, which can be attributed to the flavonoids quercetin derivatives and flavanones derivatives in the extract. In the mutagenicity assays (Ames test) it was observed

that the methanolic extracts of the capitulae and scapes of the *P. chiquitensis* present positive mutagenicity in bacteria strains TA97a of *Salmonella thypimurium*. According to the phytochemical studies made until now, this activity may be assigned to the predominance of naphthopyranones and quercetin derivatives in capitulate.

Key Words: Eriocaulaceae, *Paepalanthus chiquitensis*, Mutagenicity, Antiradical

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

λ	Comprimento de onda
μL	Microlitros
ACN	Acetonitrila
Ara	Arabinose
CCDC	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
$\text{CD}_3\text{O-d}_4$	Metanol deuterado
<i>d</i>	Duplete
<i>dd</i>	Duplo duplete
DMSO-d_6	Dimetilsulfóxido deuterado
DPPH	1,1-difenil-1-picril-hidrazila
i.d.	internal diameter (diâmetro Interno)
IC_{50}	Concentração que inibe 50%
ESI	Electrospray ionization (Ionização por electrospray)
EtOAc	Acetato de etila
EtOH	Etanol
Ex-MeOH	Extrato metanólico
FIA	Flow Injection Analysis (Análise por injeção em fluxo ou análise por inserção direta da amostra)
FIA-ESI-IT-MS	Flow Injection Analysis - Electrospray Ionization - Ion Trap – Mass Spectrometry (Espectrometria de Massas acoplada a um íon-trap com interface de Ionização por Electrospray e inserção direta da amostra)
Fr-EtOAc	Fração acetato de etila
g	Força centrífuga
Gal	Galactose
Gall	Galoil
Gli	Glicose
<i>g</i> COSY	Gradient correlate spectroscopy
<i>g</i> HMBC	Gradient heteronuclear multiple bond correlations
<i>g</i> HMQC	Gradient heteronuclear through multiple quantum coherence
<i>g</i> HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
Hex	Hexose
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)

HPLC-PDA	High Performance Liquid Chromatography - Photodiode Array Detector (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada com Detector de Arranjo de Fotodiodos)
IR	Infrared (Infravermelho)
IT	Ion Trap
<i>J</i>	Constante de acoplamento
<i>m</i>	Multiplete
<i>m/z</i>	Relação Massa/Carga
MeOH	Metanol
MS	Mass Spectrometry (Espectrometria de Massas)
NP/PEG	Natural Products/Polyethylene glycol reagent
PAD	Photodiode Array Detector (Detector com Arranjo de Fotodiodos)
PTFE	Politetrafluoroetileno (Teflon)
<i>Rs</i>	Resolução
RDA	Retro-Diels-Alder
<i>Rf</i>	Fator de Retenção
Rha	Rhamnose
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RP ₁₈	Reversed Fase octadecylsilan (Fase reversa octadecilsilano)
<i>s</i>	Singlete
SPE	Solid Fase Extraction (Extração em fase sólida)
T	Tesla
TFA	Ácido Trifluoracético
TMS	Tetrametilsilano
TOCSY-1D	Total correlation spectroscopy
<i>Tr</i>	Tempo de retenção
UV	Ultravioleta
δ	Deslocamento químico

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Distribuição geográfica de Eriocaulaceae (baseado em 29 Giulietti, 1978 e Silva, 2008)	
Figura 2	- Comunidades tradicionais que vivem do artesanato do 30 capim-dourado.	
Figura 3	- Artesanato de capim-dourado.	30
Figura 4	- Estruturas de naftopiranonas e xantonas comuns em 32 Eriocaulaceae	
Figura 5	- Cladograma simplificado de Eriocaulaceae (baseado em 35 ANDRADE <i>et al.</i> , 2011; GIULIETTI <i>et al.</i> , 2012).	
Figura 6	- Capítulos, escapos e folhas em <i>Paepalanthus ssp.</i> (TROVÓ, 37 2010).	
Figura 7	- Inflorescências de <i>Paepalanthus chiquitensis</i> Herzog 38 (Eriocaulaceae), (Mato Grosso do Sul, 2006). Foto de PAGOTTO e SOUZA, 2008.	
Figura 8	- <i>Paepalanthus chiquitensis</i> Herzog(Mato Grosso do Sul, 39 2006) Foto de PAGOTTO e SOUZA, 2008.	
Figura 9	- <i>Paepalanthus chiquitensis</i> Herzog(Minas Gerais, 2010) 39 (TROVÓ, M. <i>et al.</i> 2010).	
Figura 10	- Fluxograma de preparo e fracionamento do extrato 43 metanólico dos capítulos de <i>P. chiquitensis</i> .	
Figura 11	- Esquema de procedimento padrão para o Teste de Ames. 50	
Figura 12	- Reação de redução de DPPH. Adaptado de JOVANOVIĆ <i>et al.</i> 52 <i>al.</i> 1994; HALLIWELL, <i>et al.</i> 1995.	
Figura 13	- Reação do ácido gálico com molibdênio, componente 54 reagente de <i>Folin-Ciocalteu</i> (SINGLETON, <i>et al.</i> 1999).	
Figura 14	- Formação do complexo Flavonoide-Al, em solução 56 metanólica de cloreto de alumínio (Reproduzido de Markham, 1982).	
Figura 15	- Perfil cromatográfico por HPLC-UV-PDA do extrato 58 metanólicos de 1) capítulos e 2) escapos de <i>P. chiquitensis</i> . (eluato Metanol/Água 95:5 v/v obtido após clean-up em SPE de 5 mg do extrato). A) e C) Espectro no UV flavonoides, B) Espectro no UV naftopiranona. Gradiente exploratório, 60 minutos, 5 a 100% de MeOH. Coluna Phenomenex Luna RP 18 (250 x 4.6 mm i.d. 5 micron) fluxo 0.8 mL min ⁻¹ .	
Figura 16	- Cromatograma HPLC-ESI-IT-MS, modo negativo, do extrato 61 metanólico dos escapos de <i>P. chiquitensis</i> . Coluna Phenomenex Luna RP 18 (250 x 4.6 mm i.d. 5 micron) fluxo 0.8 mL min ⁻¹ , λ = 360 nm.	
Figura 17	- Cromatograma HPLC-ESI-IT-MS, modo negativo, do extrato 61	

metanólico dos capítulos de *P. chiquitensis*. Coluna Phenomenex Luna RP 18 (250 x 4.6 mm i.d. 5 micron) fluxo 0.8 mL min⁻¹, λ= 360 nm

Figura 18	- Espectros de ESI-MS, modo negativo <i>full scan</i> e MS ⁿ referentes à <i>m/z</i> 831.	68
Figura 19	- Espectros de ESI-MS, modo negativo <i>full scan</i> e MS ⁿ referentes à <i>m/z</i> 433.	68
Figura 20	- Espectros de ESI-MS, modo negativo <i>full scan</i> e MS ⁿ referentes à <i>m/z</i> 595.	69
Figura 21	- Espectros de ESI-MS, modo negativo <i>full scan</i> e MS ⁿ referentes à <i>m/z</i> 625.	69
Figura 22	- Espectros de ESI-MS, modo negativo <i>full scan</i> referente à <i>m/z</i> 958.	69
Figura 23	- Espectros de ESI-MS, modo negativo <i>full scan</i> e MS ⁿ referentes à <i>m/z</i> 577.	70
Figura 24	- Espectros de ESI-MS, modo negativo <i>full scan</i> e MS ⁿ referentes à <i>m/z</i> 669.	70
Figura 25	- Espectros de ESI-MS, modo negativo <i>full scan</i> e MS ⁿ referentes à <i>m/z</i> 655.	70
Figura 26	- Espectros de ESI-MS, modo negativo <i>full scan</i> e MS ⁿ referentes à <i>m/z</i> 641.	71
Figura 27	- Espectros de ESI-MS, modo negativo <i>full scan</i> e MS ⁿ referentes à <i>m/z</i> 493.	71
Figura 28	- Espectros de ESI-MS, modo negativo <i>full scan</i> e MS ⁿ referentes à <i>m/z</i> 477.	71
Figura 29	- Espectros de ESI-MS, modo negativo <i>full scan</i> e MS ⁿ referentes à <i>m/z</i> 653.	72
Figura 30	- Espectros de ESI-MS, modo negativo <i>full scan</i> e MS ⁿ referentes à <i>m/z</i> 623.	73
Figura 31	- Espectros de ESI-MS, modo negativo <i>full scan</i> e MS ⁿ referentes à <i>m/z</i> 639.	73
Figura 32	- Espectros de ESI-MS, modo negativo <i>full scan</i> e MS ⁿ referentes à <i>m/z</i> 507.	74
Figura 33	- Espectro de ESI-MS, modo negativo <i>full scan</i> referente à <i>m/z</i> 685.	75
Figura 34	- Espectro de ESI-MS, modo negativo <i>full scan</i> referente à <i>m/z</i> 627.	75
Figura 35	- Espectros de ESI-MS, modo negativo <i>full scan</i> e MS ⁿ referentes à <i>m/z</i> 361.	75
Figura 36	- Espectros de ESI-MS e APCI, modo negativo <i>full scan</i> e MS ⁿ referentes à <i>m/z</i> 463.	76

Figura 37	- Estruturas das substâncias identificadas nos capítulos e escapos de <i>P. chiquitensis</i> .	77
Figura 38	- Fluxograma de fracionamento do extrato metanólico e de frações de capítulos de <i>P. chiquitensis</i> .	80
Figura 39	- Cromatograma por HPLC-UV-PDA de PGC 1 . Coluna Synergi Hidro Phenomenex, volume de injeção: 15µL, fase móvel: água/metanol, gradiente exploratório de 5 a 100% de MeOH por de 120 minutos.	82
Figura 40	- Espectro no UV - referente ao pico 2 substância PGC 1 .	83
Figura 41	- Espectro de ESI-MS de primeira ordem em <i>Full-scan</i> modo negativo de PGC 1 .	83
Figura 42	- Espectro de RMN de ¹ H de PGC1 (em CD ₃ OD-d ₄ , 11,7 T).	85
Figura 43	- Estrutura de PGC 1 .	86
Figura 44	- Cromatograma por HPLC-UV-PDA de PGC 2 . Coluna Synergi Hidro Phenomenex, volume de injeção: 15µL, fase móvel: água/metanol, gradiente exploratório de 5 a 100% de MeOH por de 120 minutos.	87
Figura 45	- Espectro no UV de PGC 2 .	88
Figura 46	- Estrutura da mistura de flavonoides de PGC 2 .	90
Figura 47	- Estrutura de PGC 2C – <i>m/z</i> 639.	92
Figura 48	- Espectro de RMN de ¹ H de PGC 2 (em DMSO-d ₆ , 11,7 T).	94
Figura 49	- Espectros de <i>g</i> HSQC de PGC 2 , (11,7 T, DMSO-d ₆ , TMS, δ).	95
Figura 50	- Figura 50 - Espectros de <i>g</i> HSQC de PGC 2 , (região ampliada δ 95 a 145) (11,7 T, DMSO-d ₆ , TMS, δ)	96
Figura 51	- Figura 51 - Espectros de <i>g</i> HSQC de PGC 2 , (região ampliada δ 78 a 56) (11,7 T, DMSO-d ₆ , TMS, δ).	97
Figura 52	- Espectros de <i>g</i> HMBC de PGC 2 , (11,7 T, DMSO-d ₆ , TMS, δ).	98
Figura 53	- Espectros de <i>g</i> HMBC de PGC 2 (região ampliada δ 66 a 80) (11,7 T, DMSO-d ₆ TMS, δ).	99
Figura 54	- Espectros de <i>g</i> HMBC de PGC 2 , (região ampliada δ 126 a 154) (11,7 T, DMSO-d ₆ , TMS, δ).	100
Figura 55	- Espectros de <i>g</i> HMBC de PGC 2 , (região ampliada δ 144 a 168) (11,7 T, DMSO-d ₆ , TMS, δ).	101
Figura 56	- Espectros de <i>g</i> HMBC de PGC 2 , (região ampliada δ 105 a 135) (11,7 T, DMSO-d ₆ , TMS, δ).	102
Figura 57	- Espectros de <i>g</i> COSY de PGC 2 , (11,7 T, DMSO-d ₆ , TMS, δ).	103
Figura 58	- Espectros de <i>g</i> COSY de PGC 2 , (região ampliada δ 6,0 a 8,0) (11,7 T, DMSO-d ₆ , TMS, δ).	104
Figura 59	- Espectros de TOCSY-1D de PGC 2 , (11,7 T, DMSO-d ₆ ,	105

	TMS, δ).	
Figura 60	- Estrutura de PGC 3 .	107
Figura 61	- Espectro de RMN de ^1H de PGC3 (11,7 T, DMSO- d_6 , TMS, δ).	109
Figura 62	- Espectro de <i>g</i> HMQC de PGC 3 , (11,7 T, DMSO- d_6 , TMS, δ).	110
Figura 63	- Espectro de <i>g</i> HMQC de PGC 3 (região ampliada δ 78 a 60) (11,7 T, DMSO- d_6 , TMS, δ).	111
Figura 64	- Espectro de <i>g</i> HMBC de PGC 3 , (11,7 T, DMSO- d_6 , TMS, δ).	112
Figura 65	- Espectro de <i>g</i> HMBC de PGC 3 (região ampliada δ 130 a 95) (11,7 T, DMSO- d_6 , TMS, δ).	113
Figura 66	- Espectro de <i>g</i> COSY de PGC 3 , (11,7 T, DMSO- d_6 , TMS, δ).	114
Figura 67	- Espectros de TOCSY-1D irradiado em δ 5,11 de PGC 3 , (11,7 T, DMSO- d_6 , TMS, δ).	115
Figura 68	- Espectros de TOCSY-1D irradiado em δ 5,16 de PGC 3 , (11,7 T, DMSO- d_6 , TMS, δ).	116
Figura 69	- Espectros de TOCSY-1D irradiado em δ 5,34 de PGC 3 , (11,7 T, DMSO- d_6 , TMS, δ).	117
Figura 70	- Estrutura de PGC 4 .	118
Figura 71	- Espectro de RMN de ^1H de PGC 4 (em DMSO- d_6 , 11,7 T).	120
Figura 72	- Espectro de <i>g</i> HMQC de PGC 4 , (11,7 T, DMSO- d_6 , TMS, δ).	121
Figura 73	- Espectro de <i>g</i> HMBC de PGC 4 , (11,7 T, DMSO- d_6 , TMS, δ).	122
Figura 74	- Espectro de <i>g</i> COSY de PGC 4 , (11,7 T, DMSO- d_6 , TMS, δ).	123
Figura 75	- Principais características para a captura de radicais livres.	125
Figura 76	- Anel do flavonóide entra em ressonância para a estabilização do radical livre. (Adaptado de JOVANOVIĆ <i>et al.</i> 1994; HALLIWELL, <i>et al.</i> 1995).	125
Figura 77	- Porcentagem de inibição de DPPH dos extratos metanólicos, frações acetato de etila de capítulos e escapos e da substância PGC 1 de <i>P. chiquitensis</i> e dos padrões quercetina e ácido gálico.	126
Figura 78	- Teor de Fenóis Totais expressos em mg/g de extrato metanólico ou g de fração acetato de etila.	127
Figura 79	- Teor de Flavonoides Totais expressos em mg/g de extrato metanólico ou mg/g de fração acetato de etila.	128
Figura 80	- Estrutura básica das naftopiranonas.	130
Figura 81	- Estruturas de flavonoides e naftopiranona.	137

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Massas e rendimentos obtidos dos extratos metanólicos de capítulos e escapos de <i>P. chiquitensis</i> .	57
Tabela 2	- Teor de quercetina e naftopiranonas em µg para cada 100 mg [µg/100mg] de extrato metanólico de capítulos e escapos (média ± desvio padrão).	59
Tabela 3	- ESI-MS e ESI-MS ⁿ das substâncias existentes no extrato metanólico de capítulos de <i>P. chiquitensis</i> .	78
Tabela 4	- ESI-MS e ESI-MS ⁿ das substâncias existentes no extrato metanólico de escapos de <i>P. chiquitensis</i> .	79
Tabela 5	- Origem e metodologia das frações provenientes do extrato MeOH dos capítulos de <i>P. chiquitensis</i> .	81
Tabela 6	- Deslocamentos químicos de RMN de ¹ H de PGC 1 (CD ₃ OD-d ₄ , 11,7).	86
Tabela 7	- Deslocamentos químicos de RMN ¹ H e ¹³ C de PGC 2 (A e B) (DMSO-d ₆ , 11,7 T).	91
Tabela 8	- Dados de RMN de ¹ H e de ¹³ C de PGC 2 C (DMSO-d ₆ , 11,7 T).	93
Tabela 9	- Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C de PGC 3 (DMSO-d ₆ , 11,7 T).	108
Tabela 10	- Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C de PGC 4 (DMSO-d ₆ , 11,7 T).	119
Tabela 11	- Atividade mutagênica expressa pelo número médio de revertentes/placa e razão de mutagenicidade (RM) do extrato metanólico de capítulos e escapos de <i>P. chiquitensis</i> em linhagens TA98, TA97, TA100 e TA102 de <i>S. typhimurium</i> em ausência (-S9) e em presença de metabolização (+S9).	132
Tabela 12	- Teor de quercetina e naftopiranonas em µg para cada 1,875 mg* [µg/1,875 mg] de extrato metanólico de capítulos e escapos.	135

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	27
1.1. Eriocaulaceae	28
1.2. Gênero <i>Paepalanthus</i>	33
1.3. Seção <i>Diphyomene</i>	36
1.4. <i>Paepalanthus chiquitensis</i> Herzog (<i>Paepalanthus giganteus</i> Sano)	37
2. OBJETIVO GERAL	41
2.1. Objetivos Específicos	41
3. MATERIAIS E MÉTODOS	42
3.1. Coleta e identificação do material vegetal	42
3.2. Etapa Farmacognóstica	42
3.2.1. Secagem	42
3.2.2. Moagem	42
3.2.3. Padronização do tamanho de partícula do pó das espécies	42
3.3. Etapa Química	42
3.3.1. Preparo do Extrato	42
3.3.2. Fracionamento do extrato Metanólico dos capítulos de <i>P. chiquitensis</i> em coluna de permeação em gel – Sephadex LH-20	43
3.3.3. Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC)	44
3.3.4. <i>Clean-up</i> dos extratos metanólicos de capítulos e escapos de <i>P. chiquitensis</i> por SPE	44
3.3.5. <i>Fingerprint</i> dos extratos metanólicos de capítulos e escapos de <i>P. chiquitensis</i> por HPLC-UV-PDA	44
3.3.6. Fracionamento das substâncias por HPLC-IR	45
3.3.7. Identificação das substâncias por Ressonância Magnética Nuclear	45
3.3.8. Balança	45
3.3.9. Reagentes	45
3.3.10. Reveladores para cromatografia em camada delgada comparativa	46
3.3.11. Preparo das amostras para análises por HPLC-ESI-IT-MS ⁿ	46
3.3.12. Análises dos extratos metanólicos de capítulos e escapos de <i>P. chiquitensis</i> por HPLC-ESI-IT-MS ⁿ	46
3.3.13. Análise por APCI-IT-MS	47
4. ATIVIDADE BIOLÓGICA	48
Mutagenicidade	48
4.1. Avaliação da atividade mutagênica (Teste de Ames)	48
4.1.1. Linhagens utilizadas	48

4.1.2. Manutenção e estoque das cepas, verificação das características genéticas.....	48
4.1.3. Preparo dos inóculos de <i>S. typhimurium</i> utilizados no ensaio.....	48
4.1.4. Meios de cultura.....	48
4.1.5. Preparo da mistura S9.....	49
4.1.6. Controles.....	49
4.1.7. Ensaio de mutagenicidade.....	49
4.1.8. Teste de Ames.....	50
4.1.9. Análise Estatística.....	50
5. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIRADICALAR, FENÓIS TOTAIS E FLAVONÓIDES TOTAIS DOS EXTRATOS METANÓLICOS E FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE CAPÍTULOS E ESCAPOS DE <i>P. chiquitensis</i>.....	51
5.1. Avaliação do Potencial Antiradicalar.....	51
5.2. Determinação do Teor de Fenóis Totais.....	53
5.3. Determinação do Teor de Flavonóides Totais.....	55
6. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	57
6.1. Identificação dos metabólitos secundários nos extratos metanólicos de capítulos e escapos de <i>Paepalanthus chiquitensis</i> por HPLC-ESI-IT-MS ⁿ	60
6.2. Identificação das substâncias fracionadas por Sephadex LH-20, HPLC-IR, HPLC-UV-PDA e SPE.....	80
6.3. Avaliação da Atividade Antiradicalar.....	124
6.4. Determinação de Fenóis Totais.....	127
6.5. Determinação de Flavonóides Totais.....	128
6.6. Avaliação da Atividade Mutagênica (Teste de Ames).....	129
7. CONCLUSÕES.....	138
REFERÊNCIAS.....	140
ARTIGOS.....	149

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, a descoberta de novos fármacos passou a ser um grande desafio para a indústria farmacêutica. Altíssimos investimentos em pesquisa e desenvolvimento estão em contraste com o número de novos medicamentos que tem chegado ao mercado (FERREIRA, *et al.*, 2011; MUNOS, 2009). No Brasil a diversidade dos biomas ainda é muito pouco explorada como fonte de novas substâncias de interesse farmacêutico. Apesar destas considerações, pesquisas para descoberta de protótipos de fármacos e também de fitofármacos, propiciaram além do avanço da pesquisa, o desenvolvimento tecnológico do país (BARREIRO & BOLZANI, 2009).

A utilização de produtos de origem vegetal é crescente em todo o mundo, principalmente devido aos problemas que são atribuídos aos produtos sintéticos que ocasionam danos tanto para a saúde quanto para o meio ambiente (BANDONI & CZEPAK, 2008; MACHADO & FERNANDES JÚNIOR, 2011).

Grande parte dos fitoterápicos utilizados atualmente por automedicação ou por prescrição médica não tem o seu perfil tóxico bem elucidado (CAPASSO *et al.*, 2000; VEIGA-JUNIOR, 2008). De acordo com a Organização Mundial de Saúde 65 a 80% da população mundial, principalmente em países em desenvolvimento, confiam nos produtos a base de plantas medicinais para o tratamento de doenças, ou utiliza a medicina tradicional (alternativa) na atenção primária à saúde (RAHMAN & SINGHAL, 2002). No Brasil o uso de plantas medicinais está em acensão crescente pela crise econômica que afeta o país, aliada ao acesso difícil da população à assistência médica e farmacêutica e ao custo dos medicamentos industrializados (SIMÕES *et al.*, 1998). Com esses dados fica inegável, no entanto, que a maioria da população de baixa renda recorre às plantas medicinais como único lenitivo para seus males.

Torna-se, portanto, muito importante um estudo direcionado de plantas usadas pela população, pois a maioria das plantas consumidas, não possui ainda informações científicas e detalhadas sobre sua composição química, sua atividade farmacológica e toxicológica detalhadas. Dentro deste contexto, nosso grupo de

pesquisa já realizou estudos com mais de uma dezena de espécies de Eriocaulaceae, à procura de moléculas biologicamente ativas.

1.1. Eriocaulaceae

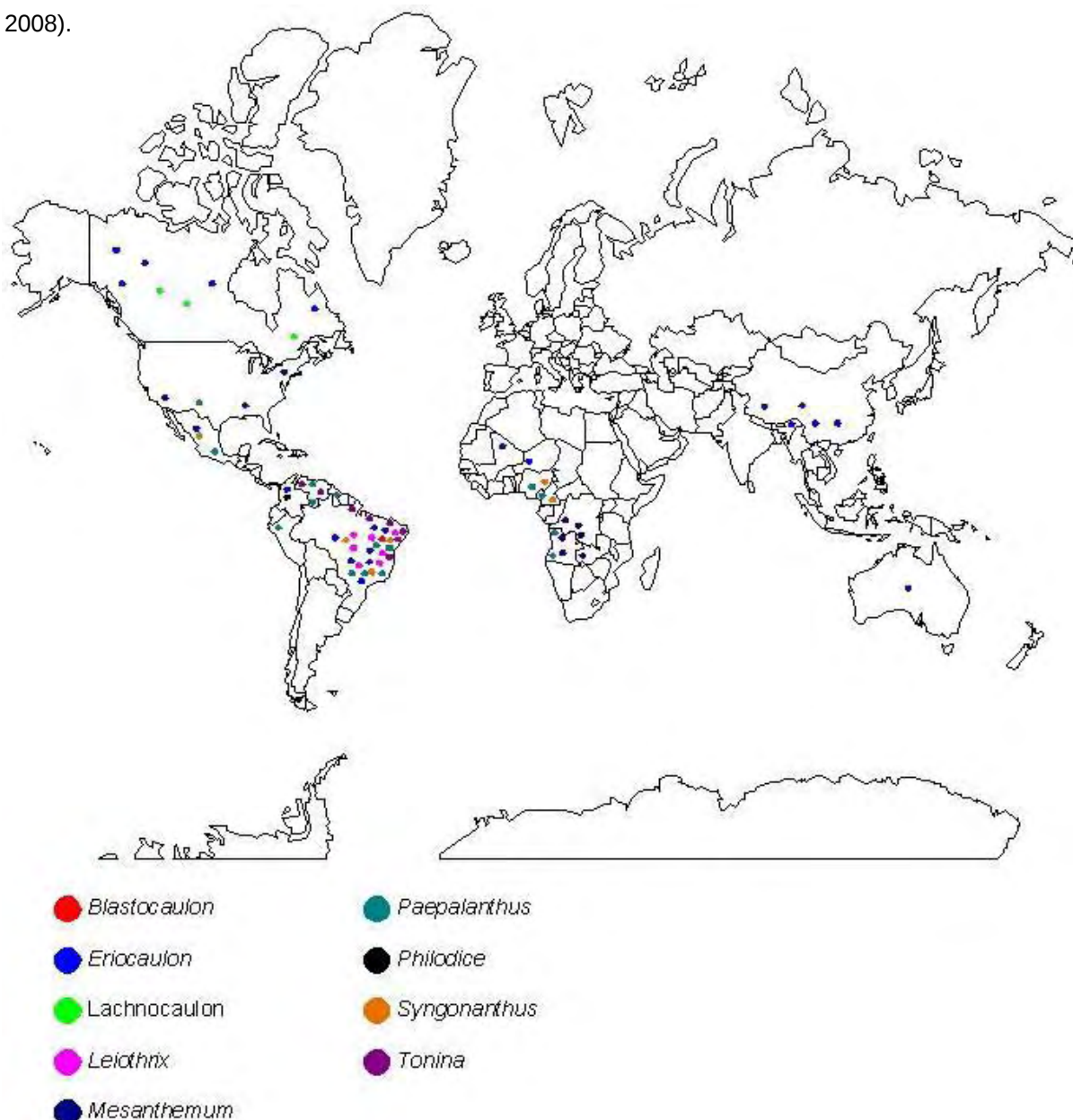
A família Eriocaulaceae é composta por 1200 espécies e está dividida em 10 gêneros, sendo uma das famílias mais citadas nas listas vermelhas de espécies em extinção (ANDRADE *et al.*, 2011; GIULIETTI *et al.* 2012). As Eriocaulaceae se destacam como uma das famílias mais representativas dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço - MG, não só pela grande riqueza específica, mas também pelo elevado número de táxons endêmicos desta formação geológica (COSTA *et al.*, 2008). A família se divide em duas subfamílias: *Eriocauloidae* Ruhland e *Paepalanthoideae* Ruhland.

A subfamília *Eriocauloidae* compreende dois gêneros que são *Eriocaulon* e *Masanthemum*.

A subfamília *Paepalanthoideae* compreende 8 gêneros e 900 espécies, sendo definida por possuir flores isostêmones e pétalas sem glândulas (RUHLAND, 1903; ANDRADE *et al.*, 2011; GIULIETTI *et al.* 2012). Dos 10 gêneros eram encontrados na subfamília *Paepalanthoideae*: *Tonina*, *Blastocaulon*, *Comanthera*, *Lachnocaulon*, *Leiothrix*, *Paepalanthus*, *Philodice*, *Rondonanthus*, *Syngonanthus* e *Actinocephalus* (GIULIETTI *et al.*, 2000; SANO *et al.*, 2004; TROVÓ, 2010), no momento são encontrados apenas 8 gêneros. Pois, atualmente estão ocorrendo várias mudanças taxonômicas com as Eriocaulaceae devido especialmente aos estudos morfológicos e moleculares. Assim, atualmente são 10 gêneros de Eriocaulaceae, pois *Blastocaulon* foi sinonimizado em *Paepalanthus* (ANDRADE *et al.*, 2011) e *Philodice* foi sinonimizado em *Syngonanthus* (GIULIETTI *et al.*, 2012).

Com relação à distribuição geográfica de Eriocaulaceae no mundo, espécies desta família ocorrem em sua maioria em regiões pantropicais, como podemos verificar na figura 1.

Figura 1. Distribuição geográfica de Eriocaulaceae (baseado em Giulietti, 1978 e Silva, 2008).



Com relação à ocorrência no Brasil, podemos citar espécies dos gêneros *Eriocaulon*, *Paepalanthus*, *Syngonanthus*, *Leiothrix*, *Tonina*, *Comanthera* e *Actinocephalus*, ou seja, dos 10 gêneros presentes na família, 8 deles ocorrem por aqui, sendo alguns deles endêmicos a uma determinada região do território nacional (SILVA, 2008).

A essa família botânica pertencem às muitas espécies usadas como “sempre-vivas”, importante fonte de divisas de exportação para o Brasil, utilizadas no mercado externo como ornamentais. A comercialização de “sempre-vivas” pela

população que vive na Cadeia do Espinhaço (Minas Gerais e Bahia) desenvolveu-se principalmente nas três últimas décadas e, certamente é decorrente do declínio da atividade mineradora nestas áreas que conheceram grandes riquezas durante os ciclos do ouro e do diamante (GIULIETTI *et al.*, 1996). A coleta dessas plantas para exportação é responsável pelo sustento de inúmeras famílias da região, que, no entanto, praticam uma atividade, extremamente predatória, desconhecendo completamente os riscos de extinção das mesmas (Figuras 2 e 3).

Figura 2. Comunidades tradicionais que vivem do artesanato do capim-dourado (Eriocaulaceae). Disponível em: < www.ispn.org.br >. Acesso em: 23 ago. 2012.



Figura 3. Artesanato de capim-dourado. Disponível em: < www.ispn.org.br >. Acesso em: 23 ago. 2012.



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 & GIULIETTI, 1986).

Dos gêneros citados, os que já foram realizados estudos químicos e biológicos foram: *Paepalanthus*, *Syngonanthus*, *Leiothrix*, *Eriocaulon* (SANTOS, 2000; SILVA, 2008; OLIVEIRA, 2010; PACÍFICO, 2011; ARAÚJO *et al.*, 2012).

O interesse em realizar ensaios biológicos de extratos e ou substâncias isoladas de plantas da família Eriocaulaceae se iniciou com o isolamento de um metabólito não-usual em plantas, e freqüente em microorganismos dos gêneros *Penicillium* spp e *Fusarium* spp (HILL, 1986), a paepalantina (classificada como naftopiranona) (Figura 4), isolada dos capítulos de *Paepalanthus bromelioides* (VILEGAS *et al.*, 1990). Ensaios biológicos *in vitro* indicaram intensa atividade antibiótica contra *Bacillus cereus* (7,5 µg/ml), *Staphylococcus aureus* (7,5 µg/ml), *S. epidermidis* (15 µg/ml) e *Escherichia coli* (250 7,5 µg/ml) (VARANDA *et al.*, 1997; TAVARES *et al.*, 1999).

Outro metabólito isolado também de *P. bromelioides* testado biologicamente e que possui grande potencial citotóxico foi o dímero da paepalantina unido pelas posições C-8/C-8', com IC₅₀ de 55.9 µM isolado por Coelho *et al.* (2000).

A paepalantina 9-O-β-D-glucopiranosil-(6→1)-O-β-D-arabinopiranosídeo isolada dos capítulos de *Paepalanthus microphyllus* apresentou modesta atividade anti-HIV com EC₅₀ 18 µg/mL e índice de seletividade de 8,9 (SANTOS, 2001).

Devienne *et al.* (2005) e Varanda *et al.* (2004) avaliaram a toxicidade, mutagenicidade e a atividade antimicrobiana da paepalantina e seus derivados. Nesses estudos, as autoras compararam também a relação estrutura-atividade da paepalantina e seus derivados, demonstrando que a substituição das hidroxilas livres nas posições 9 e/ou 10 da paepalantina resulta em compostos significativamente menos tóxicos e com menor atividade antimicrobiana para alguns micro-organismos. Concluíram também que a ausência de mutagenicidade pode estar relacionada com a configuração espacial da molécula, que proporciona impedimento estérico para sua interação com o DNA.

Em experimentos realizados por Santos *et al.* (2003 e 2005), a planifolina, substância isolada de *Paepalanthus planifolius*, apresentou atividade citotóxica *in vitro* em linhagens celulares tumorais de mama e de pulmão.

Conforme estudos realizados por Santos *et al.* (2003), as xantonas (Figura 4) isoladas do gênero *Leiothrix* apresentaram atividade antioxidante, e recentemente,

alguns extratos das plantas já ensaiados por nosso grupo de pesquisas, apresentando também atividade antiulcerogênica (MORAES *et al.*, 2010).

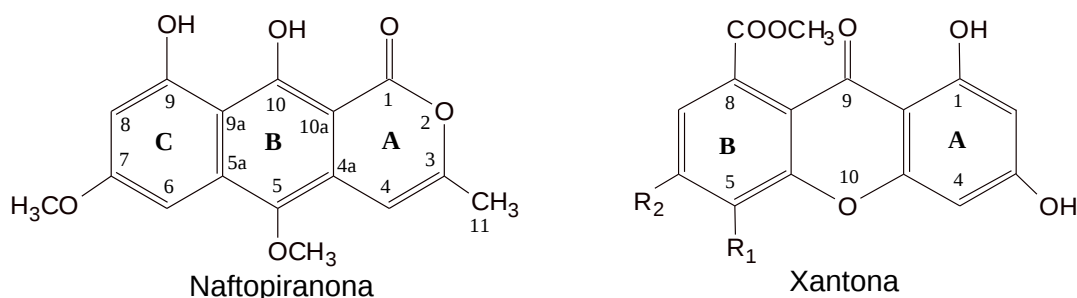
Silva *et al.* (2007), estudando *Eriocaulon ligulatum*, pertencente ao gênero *Eriocaulon*, isolou e identificou um novo dímero da paepalantina denominado eriocaulina. Este dímero apresentou atividade mutagênica frente a algumas linhagens de *Salmonella* TA100, TA97a, TA102 e TA98. Esse trabalho auxiliou também a aproximar os gêneros *Eriocaulon* e *Paepalanthus* devido à presença das naftopiranonas.

Recentemente, Pacifico *et al.* (2011), estudando *Syngonanthus nitens*, conhecida por capim dourado, isolou e identificou várias flavonas, flavanonas e xantonas inéditas, que auxiliaram também na delimitação do gênero *Syngonanthus*.

Apesar de não serem plantas de uso medicinal, mas artesanal, espécies desta família possuem uma grande diversidade química, sendo deste modo, fonte de novas moléculas biologicamente ativas, que podem servir como protótipos para síntese de novos medicamentos, como pode-se verificar em estudos realizados por Devienne *et al.* (2005), Varanda *et al.* (2004), Santos *et al.* (2003 e 2005), Oliveira (2010). Nestes estudos realizados com substâncias consideradas inéditas isoladas das espécies da família, obteve-se resultados significativamente satisfatórios, e tais resultados impulsionam cada vez mais a busca por estas moléculas em plantas da família Eriocaulaceae.

O interesse em estudar espécies de Eriocaulaceae é também devido ao fato desta família possuir uma complicada taxonomia. Alguns desses gêneros são ainda divididos em várias categorias inferiores, tais como subgêneros, seções, subseções, séries até chegar às espécies. Esta subdivisão tem sido aceita por quase todos os pesquisadores e é baseada exclusivamente em caracteres anatômicos e morfológicos das flores (DOKKEDAL *et al.*, 2007).

Figura 4. Estruturas de naftopiranonas e xantonas comuns em Eriocaulaceae.



1.2. Gênero *Paepalanthus*

Eriocaulaceae se destaca como uma das famílias mais representativas dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço - MG, não só pela grande riqueza específica, mas também pelo elevado número de táxons endêmicos desta formação geológica (COSTA *et al.*, 2008). A família se divide em duas subfamílias: *Eriocauloidae* Ruhland e *Paepalanthoideae* Ruhland. A subfamília *Paepalanthoideae* compreende 10 gêneros e 900 espécies, sendo definida por possuir flores isostêmones e pétalas sem glândulas (RUHLAND, 1903) (Figura 5).

Paepalanthus Mart., pertencente à subfamília *Paepalanthoideae*, é o maior gênero da família Eriocaulaceae, composto por cerca de 400 espécies (TROVÓ, 2010). Este gênero possui como principal característica a sua grande variabilidade morfológica (SCATENA & MORAES, 1996). Tal variabilidade torna sua classificação morfológica complicada.

Salatino *et al.* (1990), realizou a determinação do teor de fenóis totais em diversos membros da família Eriocaulaceae, indicando que o subgênero *Platycalon*, do gênero *Paepalanthus*, apresentou alto conteúdo desses compostos. De acordo com Salatino *et al.* (2000) grupos supostamente primitivos de Eriocaulaceae (*Paepalanthus*, por exemplo) apresentam perfis flavonoídicos mais complexos, caracterizados por flavonas e flavonóis, sendo que estes últimos apresentam, frequentemente, hidroxilação e metoxilação no carbono 6. Alguns grupos mais avançados da mesma família (*Leiothrix* e *Syngonanthus*) aparentemente possuem apenas flavonas, com uma tendência ao maior acúmulo de C-glicosilflavonas nas espécies de menor porte. Outra informação importante existente sobre o gênero *Paepalanthus*, estudada por nosso grupo de pesquisa, é que as naftopiranonas são majoritariamente existentes nesse gênero (DOKKEDAL *et al.*, 2007).

Di Stasi *et al.* (2004) estudou os efeitos da paepalantina sobre a colite, demonstrando um importante efeito preventivo da enfermidade nos estágios agudo e crônico induzidos por ácido trinitrobenzenosulfônico. Foi comprovado o efeito da paepalantina no tratamento das recidivas da inflamação intestinal em ratos agindo por mecanismos que reduzem o estresse oxidativo, aumentando os níveis colônicos de glutathiona e reduzindo a atividade das enzimas óxido nítrico sintase, fosfatase alcalina e mieloperoxidase, sendo que em doses cinco vezes menores, a

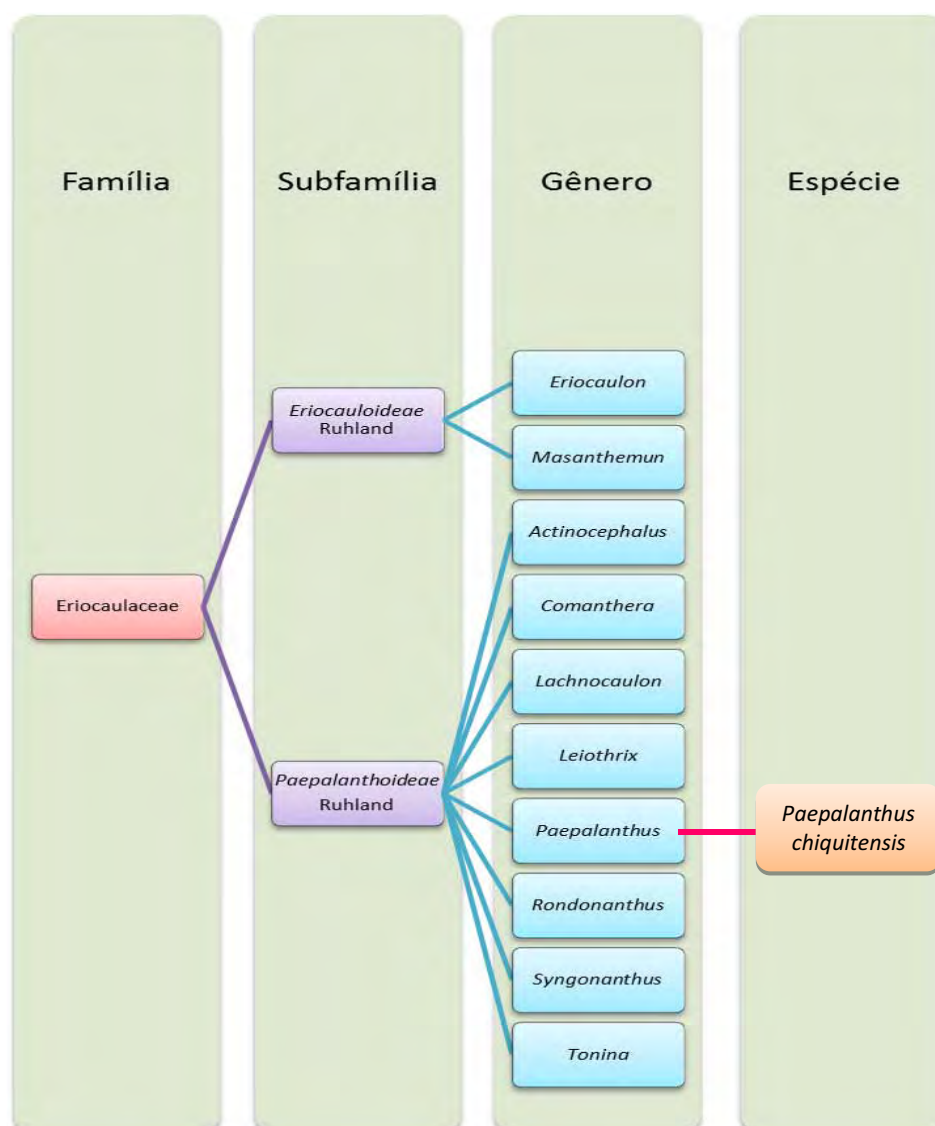
paepalantina protegeu os animais da inflamação intestinal de forma similar ao tratamento com sulfassalazina.

Estudos realizados por Silva *et al.* (2001), avaliaram a atividade inseticida de plantas do cerrado, visando ao combate do *Aedes aegypti*. Dentre as 30 espécies de plantas estudadas, apenas 3 apresentaram potencialidade larvívora, e uma delas foi a *Paepalanthus speciosus*.

Estudos realizados por Moreira *et al.* (2000) com extrato etanólico de capítulos de *Paepalanthus hilairei*, *Paepalanthus robustus*, *Paepalanthus vellozioides* e *Paepalanthus speciosus* demonstraram que estas espécies apresentaram maior liberação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) do que os extratos etanólicos de outros gêneros das demais espécies estudadas. É bem estabelecido que o peróxido de hidrogênio está envolvido em inúmeras funções dos processos fisiológicos, como por exemplo, neurotransmissão, relaxamento da musculatura lisa e regulação imune (MOREIRA *et al.*, 2000).

Apesar do grande número de espécies existentes no gênero *Paepalanthus*, ainda existem muitas espécies que não possuem dados químicos e biológicos na literatura. Dentre as espécies não estudadas química e biologicamente, encontra-se *Paepalanthus chiquitensis*.

Figura 5: Cladograma simplificado de Eriocaulaceae (baseado em ANDRADE *et al.*, 2011; GIULIETTI *et al.*, 2012).



1.3. Seção *Diphyomene*

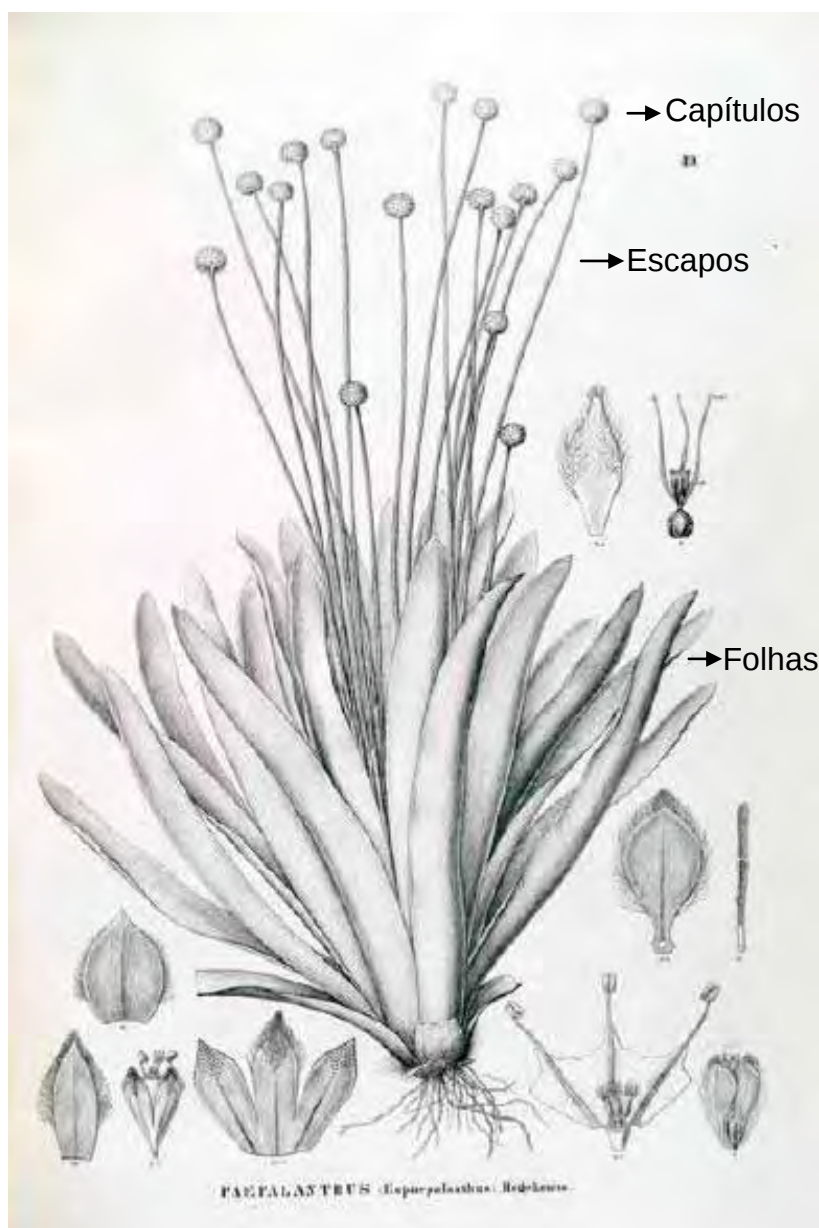
Populações de espécies pertencentes à seção *Diphyomene* ocorrem principalmente em formações savânicas do Brasil, Bolívia, Colômbia e Venezuela. Porém, algumas populações ocorrem também em campos rupestres da Cadeia do Espinhaço e campinas amazônicas sendo que a maioria das espécies possuem distribuição restrita muitas vezes confinada a apenas uma localidade (TROVÓ, 2010).

As espécies desta seção são caracterizadas por possuir inflorescência organizadas em umbelas e mostra-se mais complexa sendo composta por diversas subunidades. Deste modo, são divididas em 2 grupos: a) composto por *P. erectifolius*, *P. chiquitensis* (*P. giganteus*) e *P. polycladus* e estas espécies se diferenciam do grupo “b” por apresentar ciclo de vida e características anatômicas similares às espécies de *Actinocephalus* e também pelo fato da inflorescência possuir um tribótrio com dibótrio terminal e ferófilos envolvendo os dibótrios; já o grupo b) é representado por *P. flaccidus* que é diferenciada do grupo “a” por apresentar morfologia e anatomia da inflorescência similares a muitos grupos de Eriocaulaceae e também pelo fato da inflorescência ser um pleibótrio com subunidade terminal e ferófilos ausentes (TROVÓ, 2010).

1.4. *Paepalanthus chiquitensis* Herzog (*Paepalanthus giganteus* Sano)

A família Eriocaulaceae de um modo geral é caracterizada morfologicamente pelas folhas em forma de roseta e destes surgem os escapos e posteriormente surgem as inflorescências na forma de capítulos onde estes são envolvidos por brácteas. (Figura 6) (MONTEIRO *et al.*, 1976). A figura 6 demonstra o perfil anatômico de capítulos, escapos e folhas em espécies de *Paepalanthus*.

Figura 6 - Capítulos, escapos e folhas em *Paepalanthus* ssp. (TROVÓ, 2010).



Paepalanthus chiquitensis Herzog é uma espécie pertencente à família Eriocaulaceae, gênero *Paepalanthus*, seção *Diphyomene* (TROVÓ, 2010). Florescem no período de fevereiro a setembro (SATO, 2007). Possuem hábito herbáceo, forma de vida hemicriptófita e habitat típico do cerrado ou campos cerrados (TANNUS, 2007; INTERTECHNE, 2009). Porém, SATO (2007) em seu trabalho na Serra do Cipó, Minas Gerais, observou a ocorrência da mesma em diferentes tipos de solo: em campos rupestres, em borda de matas ciliares, solos arenosos e até em solo areno-pedregosos.

Ao contrário das demais espécies da família Eriocaulaceae que habitam locais com altitude elevada, *P. chiquitensis* também ocorre em regiões mais baixas (SATO, 2007).

Sua distribuição geográfica é ampla, podendo ocorrer desde o Amazonas até São Paulo, já que esta espécie se adapta a uma boa variabilidade de solos. Esta característica resulta em uma enorme variabilidade morfológica desta espécie, principalmente no que se refere ao tamanho e forma de suas folhas (SATO, 2007). Em *P. chiquitensis* a inflorescência é um tibótrio com dibótrio terminal, unidade básica terminal e ferofilos envolvendo os dibótrios (TROVÓ, 2010).

Figura 7. Inflorescências de *Paepalanthus chiquitensis* Herzog (Eriocaulaceae), (Mato Grosso do Sul, 2006). Foto de PAGOTTO e SOUZA, 2008.



Figura 8. *Paepalanthus chiquitensis* Herzog (Mato Grosso do Sul, 2006). Foto de PAGOTTO e SOUZA, 2008



Figura 9. *Paepalanthus chiquitensis* Herzog (Minas Gerais, 2010) (TROVÓ et al., 2010).



Importante analisar as diferenças morfológicas presentes na espécie de *P. chiquitensis* encontradas no estado de Mato Grosso do Sul (Figuras 7 e 8) que possuem capítulos maiores, folhas com maior delimitação e menor quantidade de inflorescências por arbusto. E àquelas fotografadas no estado de Minas Gerais (Figura 9) que possuem maior quantidade de folhas e estas com menor delimitação, capítulos menores e maior quantidade de inflorescências por forma arbustiva. Tais

imagens mostram a variabilidade morfológica existente na espécie, em diferentes regiões do Brasil.

Importante ressaltar que Trovó (2010) concluiu que *P. chiquitensis* possui ciclo de vida e características anatômicas similares às espécies de *Actinocephalus*. Filogenias moleculares também apontaram para a estreita relação entre estas espécies, sendo que, no entanto, a estrutura da inflorescência e a sequência de desenvolvimento das flores são diferentes.

Em trabalho realizado por Trovó & Sano (2010), os autores verificaram que a espécie *Paepalanthus giganteus* Sano, passa a ser denominada *Paepalanthus chiquitensis* Herzog. Sendo a segunda denominação apresentada pelos autores considerada oficial, e *P. giganteus*, a sinonímia.

Outro fator de extrema relevância que justifica a continuidade dos estudos químicos e biológicos com extratos e substâncias provenientes de espécies da família Eriocaulaceae, são os resultados promissores que demonstraram potencial atividade antifúngica (ARAÚJO *et al.*, 2012), estrogênica (OLIVEIRA, 2010), anti-ulcerogênica (MORAES *et. al.*, 2010), antimicrobiana (TAVARES *et al.*, 1999) e citotóxica (COELHO *et. al.*, 2010).

Portanto, justifica-se continuar os estudos químicos para auxiliar na delimitação dos gêneros, já que ainda existem problemas na classificação destas espécies. Diante também dos resultados com extratos e ou moléculas isoladas das espécies da família Eriocaulaceae, faz-se necessário continuar os estudos biológicos, com o intuito de se obterem maiores informações sobre as atividades biológicas destas espécies com potencial farmacológico.

2. OBJETIVO GERAL

Contribuir com o perfil químico e estudos biológicos de Eriocaulaceae.

2.1. Objetivos Específicos

- ✓ Estudar a composição química dos extratos metanólicos de capítulos e escapos de *P. chiquitensis*;
- ✓ Avaliar a atividade mutagênica dos extratos metanólicos de capítulos e escapos de *P. chiquitensis*;
- ✓ Avaliar a atividade antiradicalar por DPPH dos extratos metanólicos e da fração acetato de etila de capítulos e escapos de *P. chiquitensis*;
- ✓ Determinar o teor de flavonoides e fenóis totais dos extratos metanólicos e da fração acetato de etila de capítulos e escapos de *P. chiquitensis*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta e identificação do material vegetal: A espécie em estudo foi coletada em Abril de 2011, BRASIL. Minas Gerais. Diamantina. Estrada Gouveia - Diamantina, 30 km antes da entrada de Diamantina, margem esquerda da estrada, base de grandes afloramentos rochosos e identificada pelo Prof. Dr. Paulo Takeo Sano do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Uma excisata da espécie identificada foi depositada no herbário do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, em São Paulo, com o número de registro 3736 SPF.

3.2. Etapa Farmacognóstica

3.2.1. Secagem: Os capítulos e escapos de *P. chiquitensis* previamente separados, dispostos em camadas finas, foram submetidos à secagem em estufa de ar circulante a 45°C durante 7 dias.

3.2.2. Moagem: Após secagem o material foi triturado em moinho de facas.

3.2.3. Padronização do tamanho de partícula do pó das espécies: Após trituração os pós obtidos (capítulos e escapos separadamente), foram submetidos à técnica de granulometria por tamisação, na qual foi utilizado tamis (nº 40), com aberturas de malhas de 0,42mm e coletor (FARMACOPÉIA, 5ª ed., 2010). A operação de tamisação foi realizada durante 35 minutos à 90 vibrações por minutos, em movimentos horizontais rotativos e movimentos verticais, providos de tampas e recipiente para a coleta do pó.

3.3. Etapa Química

3.3.1. Preparo do Extrato: Os pós (256,0 g de capítulos e 176,7 g de escapos) de *P. chiquitensis* obtidos na etapa farmacognóstica foram extraídos com metanol, por maceração, em um período de 30 dias (FARMACOPÉIA, 5ª ed., 2010).

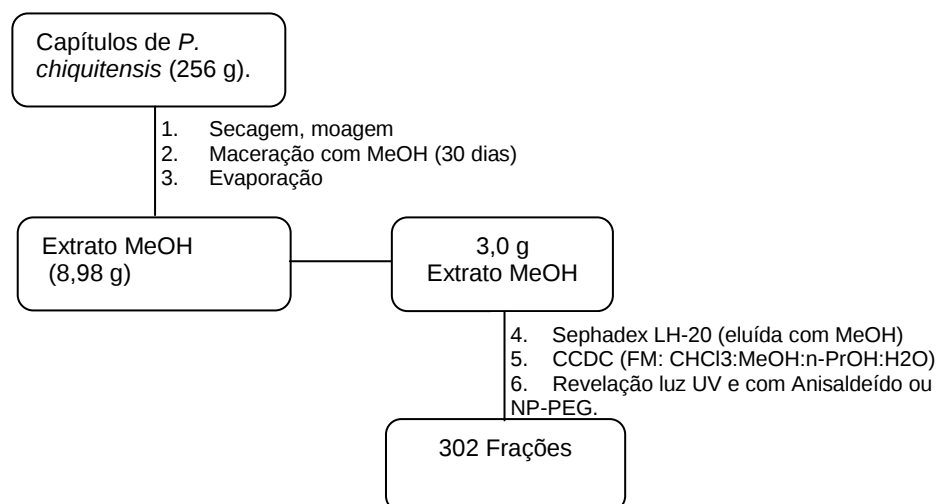
Após a extração, os solventes foram evaporados sob pressão reduzida, em evaporador rotativo modelo Laborota 4001 – efficient marca Heidolph, equipado com bomba a vácuo modelo Rotavac Valve Control, marca Heidolph, em temperatura menor que 50 °C. Os extratos foram transferidos para vidros tarados e foram

deixados em capela até completa eliminação do solvente. A tabela 1 (item 6) resume as massas e os rendimentos dos extratos obtidos.

Cada extrato foi submetido a uma triagem cromatográfica (WAGNER & BLADT, 1995) com a finalidade de se determinar as classes de compostos presentes e, conseqüentemente, estabelecer uma estratégia para a separação das substâncias.

3.3.2. Fracionamento do extrato Metanólico dos capítulos de *P. chiquitensis* em coluna de permeação em gel – Sephadex LH-20: O extrato metanólico de capítulos de *Paepalanthus chiquitensis* foi fracionado em coluna de vidro com 85 cm de altura por 2,5 cm de diâmetro interno, empacotada com Sephadex[®] LH-20 (Pharmacia). Para o fracionamento, o extrato (3,0 g) foi solubilizado em MeOH (20,0 mL), utilizando-se banho ultra-som por 10 minutos, em seguida centrifugado por 15 minutos, em uma centrífuga (CELM[®], COMBATE, a 1.578,28 g), separando-se o precipitado do sobrenadante. O sobrenadante foi filtrado com algodão e aplicado na coluna de sephadex LH-20, eluída com MeOH. Foram obtidas 302 frações de aproximadamente 7 mL cada, as quais foram submetidas a triagem química por CCDC (item 3.3.3.). As frações que apresentaram mesmos valores de R_fs foram reunidas. O fluxograma da Figura 10 apresenta o esquema de preparo do extrato e fracionamento das substâncias do extrato metanólico dos capítulos de *P. chiquitensis*.

Figura 10. Fluxograma de preparo e fracionamento do extrato metanólico dos capítulos de *P. chiquitensis*.



3.3.3. Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC): Para a análise dos extratos e frações obtidas do fracionamento por sephadex LH-20, foram utilizadas placas de sílica gel, UV 254, marca Sorbent Technologies, base de alumínio 200µm. Cada fração obtida do extrato MeOH da Sephadex LH-20 foi aplicada em uma placa de sílica de 20x5cm. As placas foram eluídas com BAW (*n*-butanol: ácido acético glacial: água, 4:1:5 v/v/v) e reveladas primeiro com a luz UV. Em seguida, foi borrifada uma solução de anisaldeído/H₂SO₄. A placa foi posteriormente levada a uma estufa a 130 C°. Para identificação dos flavonoides, foi utilizado o revelador NP-PEG. Após revelação das cromatoplas, as frações que apresentaram mesmos R_fs (fatores de retenção) e coloração, foram reunidas e transferidas para o mesmo frasco.

3.3.4. *Clean-up* dos extratos metanólicos de capítulos e escapos de *P. chiquitensis* por SPE: Na etapa de *clean-up* dos extratos, uma pequena massa (1 mg da amostra para cada 10 mg da fase de RP₁₈ foi aplicada nos cartuchos SPE). Os cartuchos foram previamente ativados com MeOH (4 mL) e depois ambientado com H₂O (5 mL). O material a ser aplicado no suporte de SPE foi previamente solubilizado em aproximadamente 0,5 mL de MeOH com auxílio de ultrassom, sendo posteriormente adicionados 2 mL de H₂O ou da própria solução usada na dessorção dos analitos. A eluição nos suportes de RP₁₈ obedeceu à seguinte ordem geral (MeOH/H₂O 2:8 v/v, MeOH/H₂O 1:1 v/v e MeOH).

3.3.5. *Fingerprint* dos extratos metanólicos de capítulos e escapos de *P. chiquitensis* por HPLC-UV-PDA: Para registrar os *fingerprints* dos extratos metanólicos de capítulos e escapos utilizou-se cromatógrafo líquido de alta eficiência (analítico, gradiente quaternário) modelo PU-2089 (Jasco®), acoplado a detector de arranjo de foto diodos com faixa de varredura de 195-650 nm e intervalo mínimo de 1 nm, modelo MD-2010 (Jasco®). Os softwares Star Chromatography Workstation versão 5.31 (Varian®) e EZChrom Elite Client/Server versão 3.1.7 (Chromatec®) foram utilizados durante a aquisição e processamentos dos dados cromatográficos. No modo analítico foram usadas colunas de fase reversa RP₁₈, modelos Luna 2 (Phenomenex®) de 250 x 4,6 mm i.d., apresentando partículas com tamanho médio de 5 µm; Synergi Hydro , (Phenomenex®) de (250 x 4,6

mmi.d.; 5 μ m,) com coluna de guarda (Phenomenex®) de (2,5 cm x 3 mm x 5 mm x 5 μ m).

3.3.6. Fracionamento das substâncias por HPLC-IR: a fração 24 (10 mg) proveniente do fracionamento por sephadex LH-20, foi analisada por RMN mono e bi-dimensionais, sendo identificadas uma mistura de flavonoides denominadas de **PGC 2 (A, B C)** (10 mg).

As frações 47-54 (161 mg) do sephadex LH 20 foram purificadas por HPLC – (semipreparativo isocrático), marca Knauer®, acoplado a um detector de índice de refração modelo D-14163 (Knauer®), acoplado a um registrador modelo L250E (Knauer®) e a uma bomba e injetor com loop de 100 μ L (Knauer®). Para a separação das substâncias utilizou-se uma coluna Phenomenex Synergi Hydro RP 18 (250 x 10 i.d., 4 μ m). O volume injetado foi de 40 μ L, e o fluxo foi de 2.0 mL.min⁻¹. A fase móvel utilizada consistiu de água 95% (eluente A) e metanol 5% (Eluente B) contendo 0,1% de ácido acético, modo isocrático que forneceu uma mistura de flavonoides, sendo a substância majoritária denominada de **PGC 3** (4 mg).

3.3.7. Identificação das substâncias por Ressonância Magnética Nuclear: As análises de RMN de 1D: ¹H e 2D: *g*COSY, *g*HMQC, *g*HMBC e TOCSY foram realizadas em espectrofotômetros de Ressonância Magnética Nuclear de 11.7 Tesla (Varian® Inova). As substâncias foram dissolvidas em dimetilsulfoxido deuterado (DMSO-d₆ (Aldrich) ou metanol deuterado (CD₃OD-d₄), sendo empregado TMS como padrão interno.

3.3.8. Balança: Foi utilizada balança (Marte®, AL 200) com capacidade para 200g e precisão de 0,001 g, para pesagem das frações e uma balança (Quimis®, BG 4000) com capacidade para 4,040g e precisão de 0,01g para pesagem dos extratos.

3.3.9. Reagentes

- ✓ Solventes PA: acetato de etila, *n*-butanol, etanol, clorofórmio, hexano, metanol, *n*-propanol (Sunthlab).
- ✓ Solventes deuterados: DMSO- d₆ (Aldrich), CD₃OD-d₄(Aldrich).

3.3.10. Reveladores para cromatografia em camada delgada comparativa

- ✓ Luz UV 254-366nm(Chromatovue)
- ✓ Anisaldeído/H₂SO₄ (WAGNER & BLADT, 1995)
- ✓ NP/PEG (WAGNER& BLADT, 1995)

3.3.11. Preparo das amostras para análises por HPLC-ESI-IT-MSⁿ: Para as análises por HPLC-ESI-IT-MSⁿ, os extratos metanólicos de capítulos e escapos de *P.chiquitensis*(5 mg cada) separadamente, foram dissolvidos em metanol (3 mL), filtrada primeiramente em cartucho sepak RP-18 e, posteriormente, filtrados novamente em um disco de membrana de Nylon da (Flow Supply) com 22,25 mm de diâmetro e 0,22 µm de tamanho de poro.

3.3.12. Análises dos extratos metanólicos de capítulos e escapos de *P.chiquitensis* por HPLC-ESI-IT-MSⁿ: Os extratos metanólicos de *P.chiquitensis* (capítulos e escapos) foram analisados separadamente, on-line por HPLC–ESI-IT-MSⁿ em um espectrômetro de massas LCQ Fleet, Thermo Scientific. As separações por HPLC foram realizadas utilizando uma coluna Phenomenex Luna RP 18 (250 x 4.6 mm i.d. 5 µm) em um fluxo de 0.8 mL min⁻¹. A fase móvel consistiu em água (A) e metanol (B), acrescentadas de 0.1% de ácido acético, em gradiente exploratório, iniciando com 5% (B) aumentando em 80 minutos até 100% (B) e mantida em 100% (B) por 10 min. O efluente da coluna foi dividido por meio de uma junção “T”, onde eram analisados “on-line”, ambos por ESI/MS e UV-PDA, sendo 80% do efluente enviado ao detector UV –PDA e 20% do efluente analisado por ESI/MS no modo negativo.

Os espectros de massas foram obtidos no mesmo espectrômetro de massas LCQ Fleet da Thermo Scientific, equipado com um dispositivo de inserção direta da amostra via análise por injeção em fluxo contínuo (FIA). A amostra foi ionizada por *electrospray* (ESI) e as fragmentações em múltiplos estágios (MS², MS³) foram realizadas em uma interface do tipo *íon-trap* (IT). O modo negativo foi escolhido para a geração e análise dos espectros de massas em primeira-ordem (MS), bem como para os demais experimentos em múltiplos estágios (MSⁿ), sob as seguintes condições: voltagem do capilar –4 V, voltagem do spray –5 kV, temperatura do

capilar 280 °C, gás de arraste (N₂) fluxo 60 (unidades arbitrárias). A faixa de aquisição foi m/z 50-1000, com dois ou mais eventos de varredura realizados simultaneamente no espectrômetro de massas LCQ. O primeiro evento foi uma varredura completa (*full-scan*) do espectro de massas para adquirir os dados dos íons na faixa m/z estabelecida. Os demais eventos foram experimentos MSⁿ realizados a partir dos dados da primeira varredura para íons precursores pré-selecionados com energia de colisão entre 25 e 30% da energia total do instrumento. O software Xcalibur versão 1.0 (Thermo Scientific®) foi utilizado durante a aquisição e processamento dos dados espectrométricos.

3.3.13. Análise por APCI-IT-MS

Alguns espectros de massas foram obtidos através do experimento de APCI-IT-MS: foram realizados no mesmo espectrômetro de massas LCQ Fleet da Thermo Scientific. A amostra foi analisada no modo de Ionização Química a Pressão Atmosférica (APCI). O modo negativo foi escolhido para a geração análise dos espectros de massas em primeira-ordem (MS), sob as seguintes condições: voltagem do capilar -20 V, voltagem do spray -5 kV, temperatura do capilar 275 °C, gás de arraste (N₂) fluxo 100 u (unidades arbitrárias), Vaporizador 350° C, gás auxiliar 5u, gás de varredura 5u, lente do tubo -100v, volume injetado de 20 µL. A faixa de aquisição foi m/z 100-400, com dois ou mais eventos de varredura realizados simultaneamente no espectrômetro de massas LCQ. O primeiro evento foi uma varredura completa (*full-scan*) do espectro de massas para adquirir os dados dos íons na faixa m/z estabelecida. O software Xcalibu versão 1.0 (Thermo Scientific®) foi utilizado durante a aquisição e processamento dos dados espectrométricos.

4. ATIVIDADE BIOLÓGICA

Mutagenicidade: O ensaio biológico para avaliação da atividade mutagênica foi desenvolvido na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Departamento de Ciências Biológicas, Laboratório de Mutagênese, sob supervisão da co-orientadora Prof^a Dr^a Eliana Aparecida Varanda.

4.1. Avaliação da atividade mutagênica (Teste de Ames)

4.1.1. Linhagens utilizadas: Foram utilizadas as linhagens TA98, TA97a, TA100 e TA102 de *Salmonella typhimurium*, cedidas pelo Dr. Bruce Ames, da Universidade Berkeley, Califórnia, USA. A cepa TA98 apresenta mutação no gene D (hisD3052), e detecta compostos mutagênicos que deslocam o quadro de leitura do DNA. A cepa TA100 apresenta mutação his G46, e detecta agentes que causam substituições, principalmente em pares G-C. A cepa TA102 contém a mutação no gene hisG, detectando agentes químicos e radiações, além de agentes cross-link, como a mitomicina C. A cepa TA97a também detecta mutágenos do tipo *frameshift*, apresentando mutação no gene hisD6610 (MARON & AMES, 1983).

4.1.2. Manutenção e estoque das cepas, verificação das características genéticas: As cepas foram estocadas em tubos para congelamento (1,5mL a – 70°C), para serem mantidas as características genéticas. Para cada 0,9mL de cultura, foram acrescidos 0,1mL de DMSO, substância crio protetora.

As características genéticas das cepas foram verificadas antes da estocagem, de acordo com as metodologias de Maron& Ames, (1983).

4.1.3. Preparo dos inóculos de *S. typhimurium* utilizados no ensaio: Com alça de inoculação, pequena quantidade de cultura estoque foi semeada em 30 mL de caldo nutriente (Oxoid nº2), incubado a 37°C por 12-16hs, com agitação a 17,77 g, de modo a obter densidade de $1-2 \times 10^9$ bactérias/mL, que foram comparadas pela escala McFarland.

4.1.4. Meios de cultura: Os meios foram preparados de acordo com Maron& Ames (1983). Para este, foi utilizado ágar mínimo glicosado (7,5 g de Bacto-ágar, 465 mL de água destilada), acrescido de 25mL de glicose 40% (TA98, TA100 e TA102) ou 25mL de glicose 8% (TA97a) acrescido de 10 mL meio Vogel Bonner

(VB) “E” 50x concentrado (10g de sulfato de Mg, 100g de ácido cítrico, 175g de fosfato de sódio e amônio, 500g de fosfato de potássio dibásico, 980mL de água destilada), na proporção de 980/20 mL, respectivamente.

O ágar de superfície foi composto de 0,5g de cloreto de sódio, 0,6g de Bacto-agar e 100 mL de água destilada, acrescido de 10mL de solução de L-histidina 0,096g/mL (Sigma) e D-biotina 0,123mg/mL (Sigma).

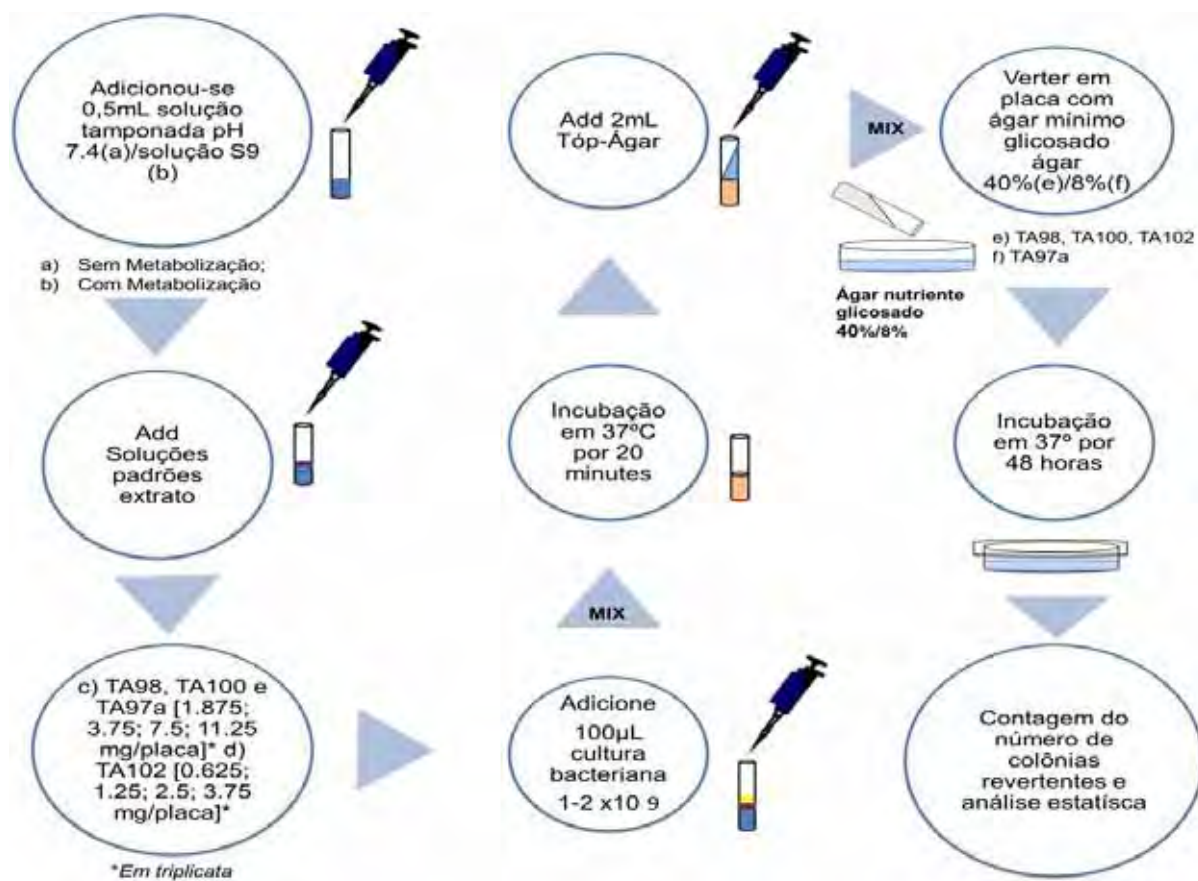
Os meios foram preparados e esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos.

4.1.5. Preparo da mistura S9: Utilizou-se a fração microssomal S9 de fígado de ratos induzidos com arocloror 1254, um indutor de enzimas (MOLTOX, USA). Esta fração revela se o agente em teste necessita ser metabolizado para se tornar mutagênico. À fração liofilizada, foram acrescidas soluções de cloreto de magnésio 0,4M, cloreto de potássio 1,65M, glicose-6-fosfato 1M, NADP 0,1M, tampão fosfato 0,2M e água milli-Q estéril (previamente autoclavada), todas mantidas em gelo durante o experimento.

4.1.6. Controles: O controle negativo foi feito com solvente utilizado para solubilizar os extratos vegetais (DMSO). Os controles positivos, para confirmação da reversão, foram 4-nitrofenilenodiamina (NPD) para TA98 e TA97a, azida sódica para TA100 e Mitomicina C para TA102. Nos ensaios com ativação metabólica, foram usados 2-antramine para TA98, TA97a e TA100; e 2-aminofluoreno para TA102.

4.1.7. Ensaios de mutagenicidade: De acordo com a metodologia de pré-incubação, desenvolvida por Maron & Ames (1983), diferentes concentrações dos extratos vegetais foram misturadas a 0,1mL de cultura de bactérias e 0,5 mL de tampão fosfato pH 7,4 (ou 0,5 mL da mistura S9 em ensaios com ativação metabólica) e incubadas por 20-30 minutos a 37° C. Após esse tempo, adicionou-se 2mL de agar superfície (“top-ágar”) suplementado com traços de histidina e biotina homogeneizou-se levemente e verteu-se em meio mínimo glicosado. Após solidificação do “top-ágar”, as placas foram incubadas por 48 horas, a 37 °C. Após esse período, foi realizada a contagem do número de colônias revertentes por placa. O ensaio foi realizado em triplicata.

Figura 11. Esquema de procedimento padrão para o Teste de Ames.



4.1.8. Teste de Ames: Os dados foram analisados com o programa estatístico SALANAL. Este programa permite avaliar o efeito dose-resposta pelo cálculo da variância (ANOVA – Test F) entre as médias do controle negativo e os testes, seguindo uma regressão linear. Foram também calculadas as razões de mutagenicidade (RM), que é a média do número de revertentes do teste (espontâneos + induzidos) dividida pela média de revertentes do controle negativo. O teste foi considerado positivo quando a RM foi maior ou igual a 2 em pelo menos duas concentrações e houver um efeito dose-resposta significativo. O teste foi negativo quando não induziu aumento significativo de revertentes e suas RM forem menores que 2.

4.1.9. Análise Estatística

A avaliação estatística dos resultados foi realizada utilizando-se o programa estatístico SALANAL (U.S.Environmental Protection Agency, Monitoring Systems Laboratory, Las Vegas, NV, versão 1.0, do Research Triangle Institute, RTP, Carolina do Norte, EUA). O modelo adotado para a análise foi o de Bernstein et al.

(1982). Os dados de revertentes/placa foram analisados através da ANOVA (análise de variância), seguido de regressão linear.

5. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIRADICALAR, FENÓIS TOTAIS E FLAVONOIDES TOTAIS DOS EXTRATOS METANÓLICOS E FRAÇÕES ACETATO DE ETILA DE CAPÍTULOS E ESCAPOS DE *P. chiquitensis*

Os extratos metanólicos e as frações acetato de etila de capítulos e escapos de *P. chiquitensis* foram analisadas quanto ao teor de fenóis totais, flavonoides totais e a capacidade de captura do radical livre por DPPH.

Para determinação do teor de fenóis totais, flavonoides totais e DPPH realizou-se uma partição líquido-líquido água/acetato de etila 1:1 v/v para todos os extratos acima mencionados. Para tal procedimento pesou-se 50mg de extrato metanólico os quais foram dissolvidos em 25 mL de água e posteriormente adicionou-se mais 25 mL de acetato de etila em funil de separação com capacidade para 100 mL, agitou-se, obtendo deste modo um sistema bifásico, onde a fase inferior é constituída pela fração aquosa e a fase superior, pela fração acetato de etila.

Portanto, além dos extratos metanólicos, a fração acetato de etila, foi avaliada quanto a determinação do teor de fenóis e flavonoides totais e também quanto ao potencial antiradicalar, conforme metodologia abaixo descrita.

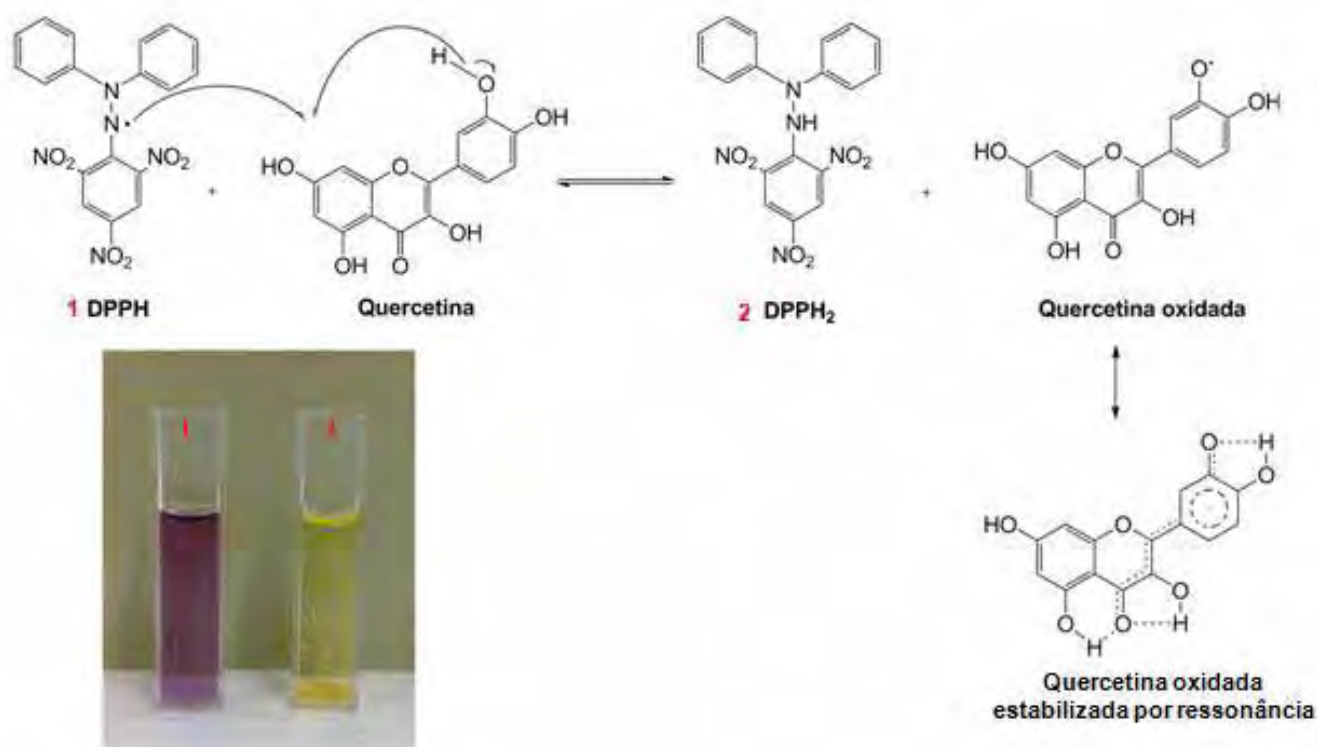
5.1. Avaliação do Potencial Antiradicalar

O potencial antiradicalar foi avaliado por meio de um ensaio espectrofotométrico, de acordo com metodologia descrita por Pauletti *et al.* (2003) e Brand-Williams *et al.* (1995) utilizando-se uma solução de DPPH 0,004 % em metanol, o que foi misturado à solução da amostra em análise. Soluções estoque foram preparadas a partir de 1 mg da amostra teste em 1 mL de metanol. Em seguida foram realizadas diluições até as concentrações de 0,2; 0,1; 0,03; 0,02; 0,01; 0,008 e 0,005 mg/mL para extratos e para os padrões foram utilizadas

diluições específicas de modo a obter diluições na escala μM . A cada 100 μL da amostra foram adicionados 200 μL da solução de DPPH. Após 30 minutos de reação, as absorbâncias das soluções foram medidas a 517 nm. A solução referência foi constituída de 100 μL de metanol acrescido de 200 μL da solução de DPPH. Utilizamos padrões de quercetina e ácido gálico os quais foram submetidos ao mesmo procedimento experimental.

Este teste avalia a capacidade que uma substância tem de seqüestrar o radical livre estável DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e está baseado na redução da solução de DPPH (cor violeta) quando ocorre a adição de substâncias que podem ceder uma espécie radicalar (hidrogênio radicalar), formando um complexo de coloração amarela (Figura 12) (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995).

Figura 12. Reação de redução de DPPH. Adaptado de JOVANOVIĆ *et al.* 1994; HALLIWELL, *et al.* 1995.



5.2. Determinação do Teor de Fenóis Totais

A concentração de fenóis totais foi determinada colorimetricamente conforme o procedimento padrão de *Folin-Ciocalteu* (KÄHKÖNEN *et al.*, 1999; GHASEMZADEH *et al.*, 2010). Para o mesmo, utilizou-se:

- 1mg da substância teste (dissolvidos em 10 mL de MeOH = [100µg/mL]);
- 10mL solução de *Folin-Ciocalteu* (9,333 mL água destilada + 0,667 mL *Folin Ciocalteu*);
- 5mL de solução de Na₂CO₃ saturada(200g/L);
- 2,5 mg de Ácido Gálico (Sigma), utilizado como padrão (solubilizados em 10 mL de MeOH = [250 µg/mL]).

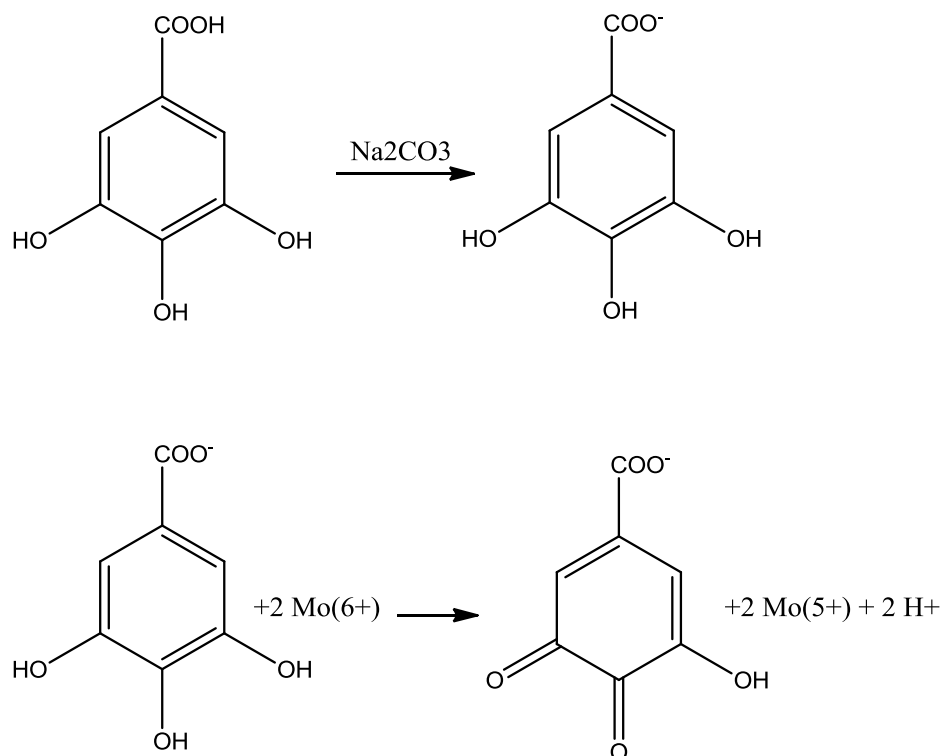
Procedimento:

- Primeiramente procedeu-se às diluições para a curva de calibração do ácido gálico nas concentrações de 6,25; 12,5; 25,0; 50,0; 100,0 e 200,0 µg/mL.
- Adicionou-se em placa de 96 poços, 150µL da solução de *Folin-Ciocalteu* e 50µL de amostra e diluições padrões;
- Aguardou-se 3 minutos;
- Adicionou-se 50µL de solução de Na₂CO₃ saturada;
- Aguardou-se 2 horas;
- Após isto, realizou-se leitura em espectrofotômetro UV/Visível (ELISA) a λ 750 nm.
- Todo o procedimento foi realizado em triplicata.

O princípio desta reação entre o reagente de *Folin-Ciocalteu* e fenóis, com subsequente oxidação dos fenóis e formação de um complexo azul (LENORE *et al.*, 2005).

Na primeira etapa de reação, ocorre desprotonação dos compostos fenólicos (no exemplo, o padrão ácido gálico) em meio básico, gerando os ânions fenolatos.

Figura 13. Reação do ácido gálico com molibdênio, componente reagente de *Folin-Ciocalteu* (SINGLETON *et al.*, 1999).



Em seguida, ocorre uma reação de oxirredução entre o ânion fenolato e o reagente de Folin, na qual, o molibdênio, componente do reagente de Folin, sofre redução e o meio reacional muda de coloração amarela para azul (SINGLETON *et al.*, 1999).

5.3. Determinação do Teor de Flavonoides Totais

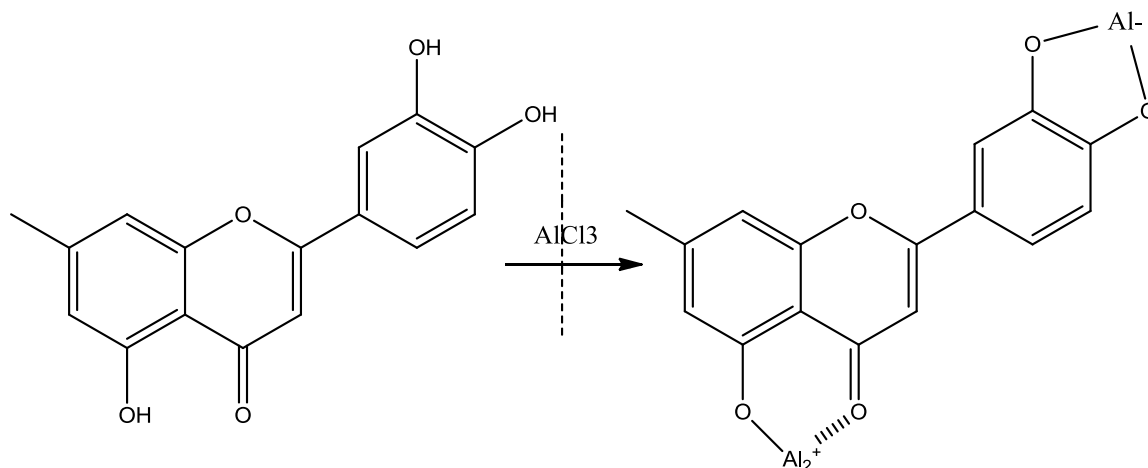
Foi realizada a partir do método colorimétrico no qual ocorre a complexação dos flavonoides com cloreto de alumínio de acordo com metodologia padrão de Peixoto Sobrinho *et al.* (2008) e Jurd & Geissman (1956) modificado, onde a quercetina foi utilizada como padrão, em solução de cloreto de alumínio. Para este experimento preparou-se:

- 1mg da substância teste (dissolvidos em 10 mL de MeOH = [100µg/mL]);
- 2,5 mg de quercetina (Sigma) (solubilizados em 10 mL de MeOH = [250 µg/mL]);
- 200mg de $AlCl_3$ solubilizados em 10mL de MeOH:H₂O (8:2) -obtendo solução de cloreto de alumínio ($AlCl_3$) a 2%.

Procedimento:

- Primeiramente procedeu-se às diluições para a curva de calibração da quercetina nas concentrações de 6,25; 12,5; 25,0; 50,0; 100,0 e 200,0 µg/mL;
- Adicionou-se em placa de 96 poços 100µL de solução de $AlCl_3$ 2%;
- Em seguida, adicionou-se 100µL da amostra ou diluições da solução padrão de quercetina;
- Aguardou-se 1 hora;
- Após isto, realizou-se leitura em espectrofotômetro UV/Visível (ELISA) a λ = 415 nm.

Figura 14. Formação do complexo Flavonoide-Al, em solução metanólica de cloreto de alumínio (Reproduzido de Markham, 1982).



O cátion alumínio forma complexos estáveis com os flavonoides em metanol, ocorrendo na análise espectrofotométrica um desvio para maiores comprimentos de onda e uma intensificação da absorção. Deste modo, é possível determinar a quantidade de flavonoides, evitando-se a interferência de outras substâncias fenólicas.

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Para preparo dos extratos de capítulos e escapos de *P. chiquitensis* utilizou-se a maceração e como solvente extrator o metanol, pois em todos os trabalhos anteriores realizados com espécies de Eriocaulaceae para extração dos compostos polares, seguiu-se essa metodologia de extração. Porém, os resultados com a maceração apresentaram rendimentos inferiores aos da percolação (PACIFICO *et al.*, 2011). A Tabela 1 comprova que os melhores rendimentos foram obtidos com os escapos, já que os capítulos são constituídos por inflorescências muito pequenas quando comparados aos escapos. E esta é uma das dificuldades no estudo de Eriocaulaceae, obter massa suficiente para o fracionamento, purificação e identificação das substâncias.

Tabela 1 – Massas e rendimentos obtidos dos extratos metanólicos de capítulos e escapos de *P. chiquitensis*.

Parte da planta (extrato)	Massa dos extratos (g)	Material vegetal seco (g)	Rendimento (%) em relação à massa total de extratos obtidos
Capítulos(MeOH)	8,98	256,00	3,50
Escapos (MeOH)	7,60	176,70	4,30

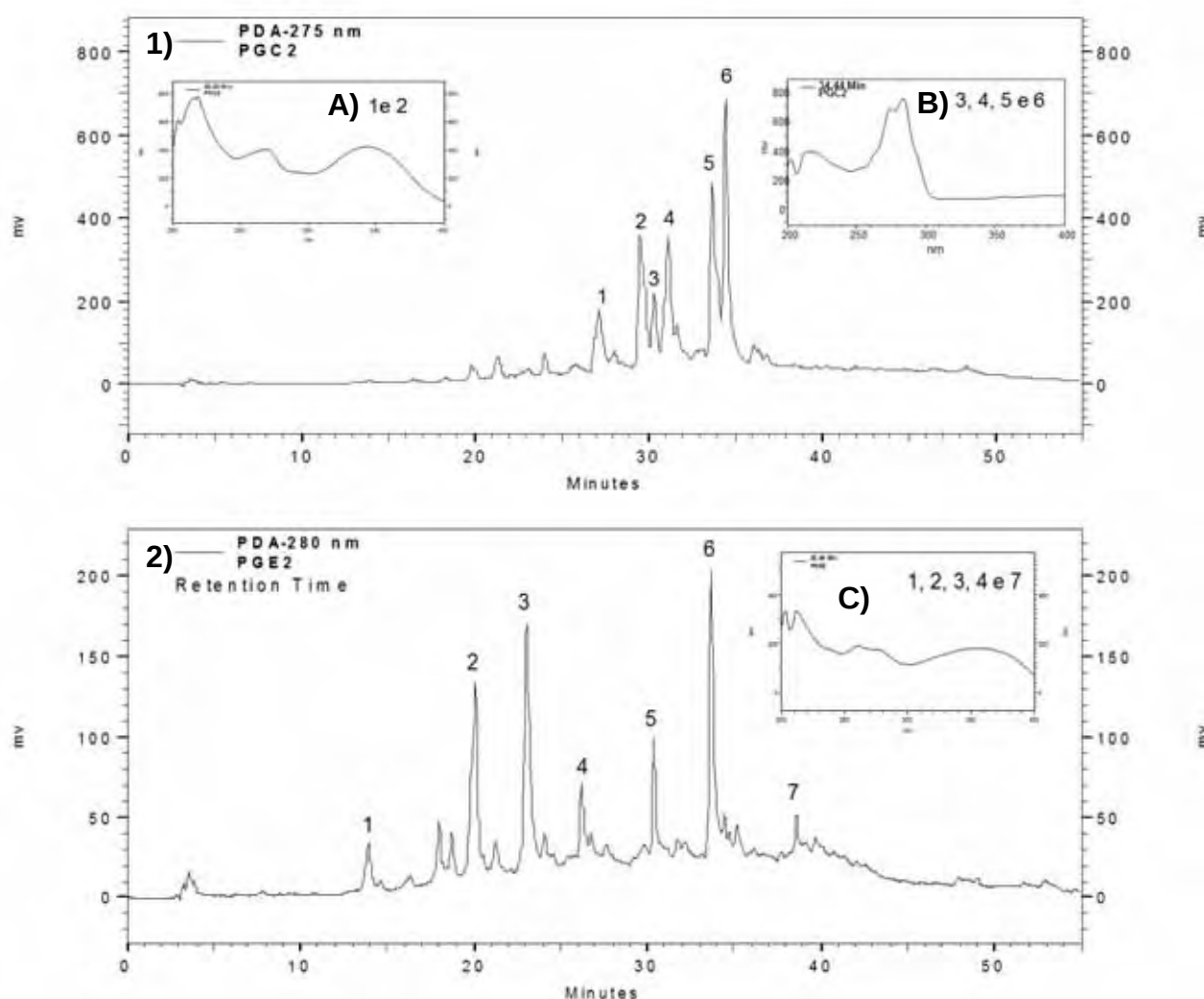
Portanto, análises por técnicas acopladas como HPLC-UV-PDA e HPLC-ESI-IT-MSⁿ têm se tornado relevantes nos estudos de extratos polares de Eriocaulaceae (SANTOS *et al.*, 2001; PACIFICO *et al.*, 2011).

Por isso, com o objetivo de realizar uma triagem fitoquímica rápida, realizou-se um "*Fingerprint*" por HPLC-UV-PDA para a determinação dos compostos majoritários dos extratos metanólicos de capítulos e escapos de *P. chiquitensis* e delimitar estratégias para o isolamento de substâncias de interesse químico e farmacológico.

A figura 15 mostra o cromatograma por HPLC-UV-PDA do eluato Metanol/Água 95:5 v/v, proveniente do extrato metanólico dos capítulos. Percebe-se através da análise dos espectros no UV (Figuras 15, picos 3, 4, 5 e 6) uma maior

quantidade de naftopiranonas. Esta afirmação pode ser confirmada, pois as naftopiranonas apresentam no espectro no UV bandas bipartidas características em 270-273 nm (VILEGAS *et al.*, 1999, PACIFICO *et al.*, 2011). Os picos 1 e 2 foram caracterizados como sendo de flavonoides devido às bandas de absorção em 250-270 nm (banda II) e 300-370 nm (Banda I) (MARKHAM, 1982).

Figura 15 - Perfil cromatográfico por HPLC-UV-PDA do extrato metanólicos de 1) capítulos e 2) escapos de *P.chiquitensis*. (eluato Metanol/Água 95:5 v/v obtido após *clean-up* em SPE de 5 mg do extrato). A) e C) Espectro no UV flavonoides, B) Espectro no UV naftopiranona. Gradiente exploratório, 60 minutos, 5 a 100% de MeOH. Coluna Phenomenex Luna RP 18 (250 x 4.6 mm i.d. 5 micron) fluxo 0.8 mL min⁻¹.



A figura 15, cromatograma “2” mostra o perfil por HPLC-UV-PDA do eluato Metanol/Água 95:5 v/v proveniente do *clean-up* do extrato metanólico dos escapos. Neste cromatograma percebe-se uma melhor separação dos picos e uma maior quantidade de flavonoides presentes. Este fato pode ser comprovado devido à

presença no espectro no UV dos picos 1, 2, 3, 4 e 7, enquanto que as naftopiranonas apresentaram-se em menor quantidade neste extrato, fato este comprovado pela presença no espectro no UV dos picos 5 e 6.

Diante das evidências apresentadas nos perfis cromatográficos por HPLC-UV-PDA da existência de naftopiranonas e flavonoides nos extratos metanólicos de *P.chiquitensis* e de que estas substâncias já foram identificadas na maioria das espécies de *Paepalanthus* estudadas, decidimos realizar o "fingerprint" por HPLC-ESI-IT-MSⁿ na tentativa de identificar as substâncias já conhecidas em espécies de *Paepalanthus*, as quais já foram anteriormente estudadas.

De acordo com o trabalho de quantificação de Cardoso *et al.*, (2012) os capítulos de *P. chiquitensis* possuem 335µg de quercetina a cada 100mg de extrato metanólico, enquanto que os escapos possuem um maior teor deste com 391µg de quercetina/100mg de extrato MeOH. Com relação às naftopiranonas, há uma maior quantidade destas em capítulos sendo 455µg de naftopiranonas a cada 100mg de extrato metanólico; já em escapos há um menor teor desta classe de compostos com 431µg de naftopiranonas/100mg extrato metanólico.

Tabela 2. Teor de quercetina e naftopiranonas em µg para cada 100 mg [µg/100mg] de extrato metanólico de capítulos e escapos (média ± desvio padrão).

Amostras	Capítulos	Escapos
<i>Quercetina</i>	335± 2.4	391 ± 3.1
<i>Naftopiranonas</i>	455 ± 2.1	431 ± 1.4

Adaptado de CARDOSO *et al.*, 2012.

6.1. Identificação dos metabólitos secundários nos extratos metanólicos de capítulos e escapos de *Paepalanthus chiquitensis* por HPLC-ESI-IT-MSⁿ

A espectrometria de massas acoplada a um sistema de HPLC tem se destacado nos últimos anos como uma valiosa ferramenta para a análise de diversos compostos presentes na natureza. Aplica-se esta técnica para se obter a fragmentação de substâncias em análise existentes em matrizes complexas. Ao acoplar a um sistema de separação como o HPLC (sistema de separação de escolha) e o espectrômetro de massas, se obtém a seletividade e a sensibilidade ideais para obtermos informações estruturais de uma matriz biológica complexa, como por exemplo, um extrato vegetal (ARDREY, 2003; RODRIGUES, C. M. 2007).

Com a utilização da técnica de HPLC-ESI-IT-MSⁿ foi possível identificar diversos compostos tanto em capítulos quanto em escapos (Figura 37, Tabelas 3 e 4). A maioria dos compostos determinados foram flavonoides e naftopiranonas. Para conhecimento da identidade dos constituintes químicos existentes nos cromatogramas por HPLC-ESI-MS, procedeu-se a análise por ESI-MSⁿ. Para as substâncias conhecidas, utilizou-se comparação de seus dados de fragmentação com os já existentes na literatura. Para os padrões de fragmentações desconhecidos, procedeu-se o isolamento e a identificação das substâncias (descritos no Item 6.2.).

As análises por HPLC-ESI-IT-MSⁿ dos extratos metanólicos de escapos de *P. chiquitensis* confirmaram os resultados obtidos nas análises por HPLC-UV-PDA, onde também foram identificados flavonóis e flavanonóis (Figura 16) enquanto que no extrato metanólico dos capítulos (Figura 17) além destas substâncias foi possível verificar a existência majoritária de naftopiranonas.

Figura 16 - Cromatograma HPLC-ESI-IT-MS, modo negativo, do extrato metanólico dos escapos de *P. chiquitensis*. Coluna Phenomenex Luna RP 18 (250 x 4.6 mm i.d. 5 micron) fluxo 0.8 mL min⁻¹, λ = 360 nm. (Para condições vide Parte Experimental 3.3.10 e 3.3.11)

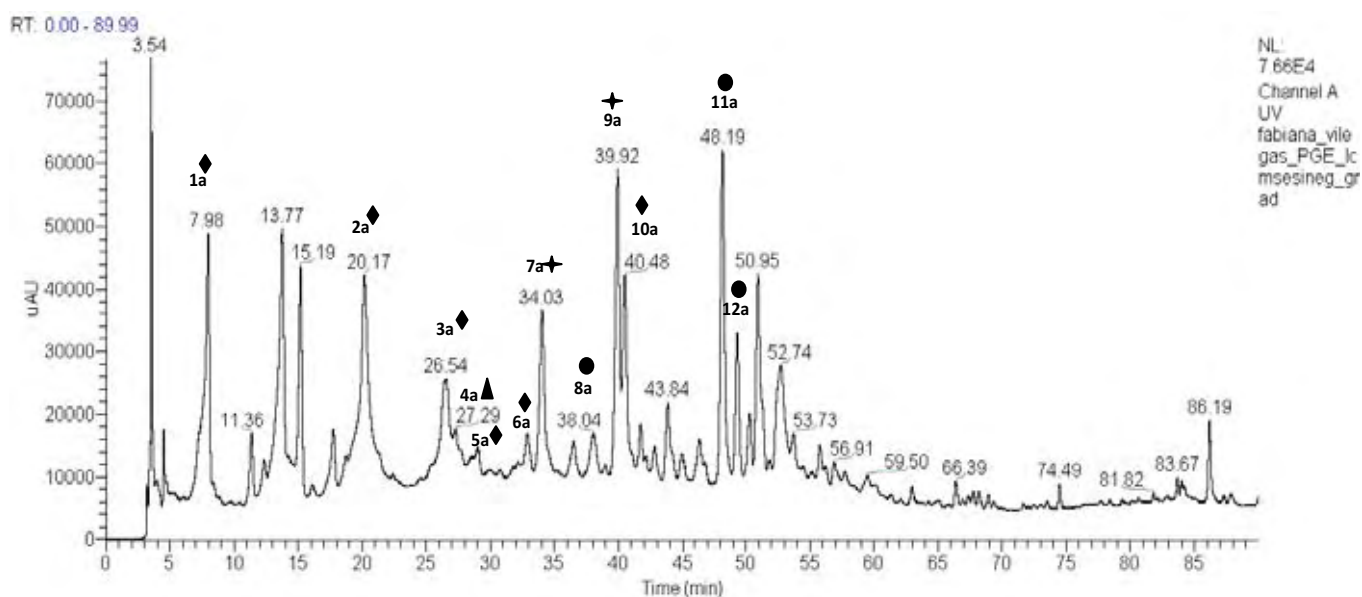
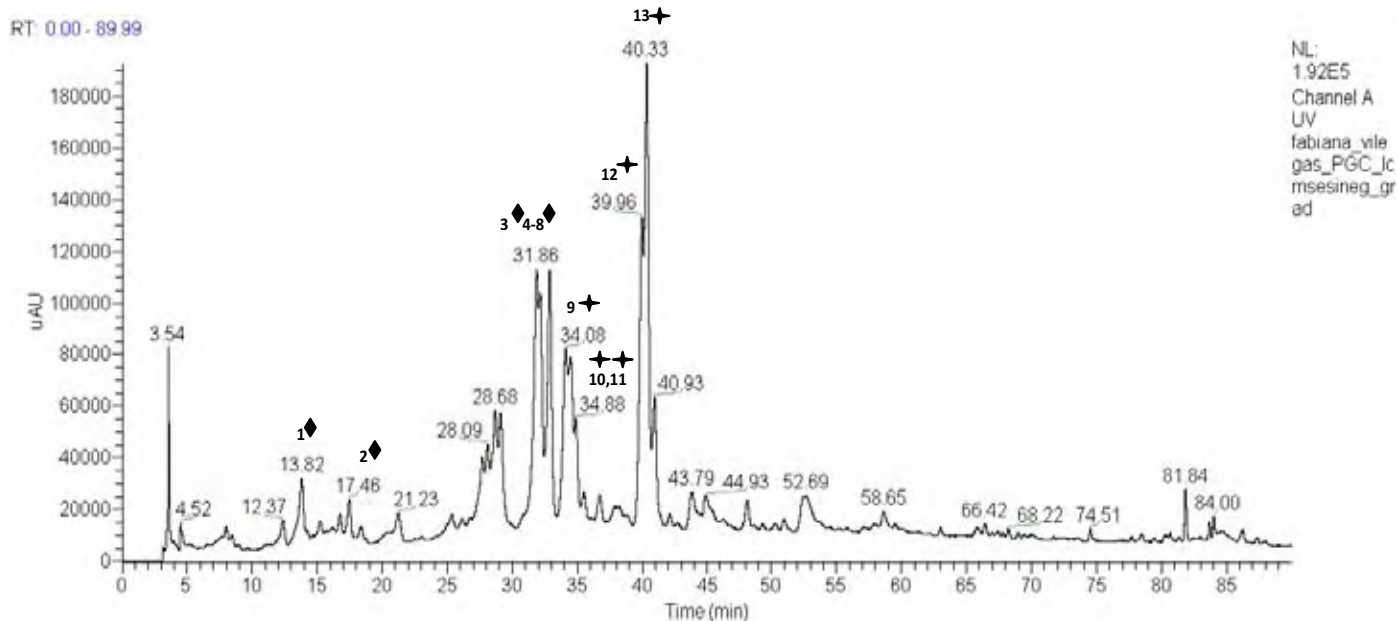


Figura 17: Cromatograma HPLC-ESI-IT-MS, modo negativo, do extrato metanólico dos capítulos de *P. chiquitensis*. Coluna Phenomenex Luna RP 18 (250 x 4.6 mm i.d. 5 micron) fluxo 0.8 mL min⁻¹, λ = 360 nm (Para condições vide Parte Experimental 3.3.10 e 3.3.11)



● Flavanonol; ◆ Flavonol; ▲ Flavona; + Naftopiranona

O espectro *full scan*, modo negativo, da substância **4a** (Figura 18), evidenciou o íon precursor em m/z 831 $[M - H]^-$. Espectros de segunda ordem do íon precursor forneceu o íon produto em m/z 269 que foi atribuído à perda consecutiva de três

unidades de açúcares e uma unidade galoil (Tabela 4). Espectros de RMN mono e bi-dimensionais da molécula isolada (discutido no item 6.2.), confirmou que esta molécula é a 4'-metoxiapigenina-7-O-(3"-galoil)- α -D-arabinopiranosil-(2''' $\rightarrow$ 1''')-apiofuranosil-(3'''' $\rightarrow$ 1''''')- α -L-arabinopiranosídeo.

As substâncias **9**, **10**, **12** e **13** (capítulos) e **7a** e **9a** (escapos) (Tabelas 3 e 4) de *P. chiquitensis* são conhecidas por naftopiranonas e são comuns em espécies de *Paepalanthus*. Estas substâncias foram identificadas em maior quantidade nos extratos metanólicos de capítulos nos T_r (34,08; 34,48; 39,96 e 40,33 min) e de escapos nos T_r (34,03 e 39,92 min.). A identificação destas substâncias também foi baseada nas comparações dos seus respectivos espectros no UV com os existentes na literatura (VILEGAS *et al.*, 1998 e 1999, SANTOS *et al.*, 2001 e 2005), como realizado anteriormente nas análises por HPLC-UV-PDA discutidas anteriormente.

As substâncias **12** e **9a** (λ_{max} = 272, 280, 381 nm) apresentaram íons precursores em m/z 433, [M – H][–], (Figura 19, Tabelas 3 e 4) evidenciando serem derivados da paepalantina (SANTOS *et al.*, 2001). Nos experimentos de MS² foram verificadas perdas de uma hexose em m/z 271 [M – H – 162][–] enquanto que nos espectros de MS³ foram verificadas as perdas de hexose e grupo metila [M – H – 162 – 15][–] em m/z 256.

As informações existentes no espectro de UV e as fragmentações características das naftopiranonas levou-nos a confirmar que esta substância é a 10-hidroxi-7-metoxi-3-metil-1-H-nafto[2,3c]piran-1-ona-9-O- β -D-glicopiranosídeo (SANTOS *et al.*, 2001, SANTOS *et al.*, 2009).

As substâncias **9** e **7a** (λ_{max} = 270, 279, 346 nm) (Figura 20, Tabelas 3 e 4) mostraram o íon precursor em m/z 595 [M – H][–]. Experimentos de MS² evidenciaram a perda de ramnose [M – H – 146][–] em m/z 449. A segunda geração de espectros de íons, produtos do íon precursor a m/z 449 forneceu íon produto em m/z 287 que foram atribuídos às perdas de duas unidades de açúcares, provavelmente uma glicose e uma ramnose [M – H – 146 – 162][–]. Baseados nos padrões de fragmentações MS/MS e nos seus respectivos espectros no UV estas moléculas foram identificadas como sendo 5-10-di-hidroxi-7-metoxi-3-metil-1-H-nafto[2,3c]piran-1-ona-9-O- β -D-raminopiranosíl-(1 $\rightarrow$ 6)-glicopiranosídeo (SANTOS, 2001; AMARAL *et al.*, 2012).

Outra substância derivada da paepalantina comum em espécies de *Paepalanthus* é a Paepalantina-9-O- β -D-glicopiranosíl-(6 $\rightarrow$ 1)-O- β -D-glicopiranosídeo, (**10**) (SANTOS, 2001; AMARAL *et al.*, 2012). Esta substância foi identificada com T_r 34,48 minutos, apresentando bandas no espectro no UV em 273, 283, 362nm. O íon precursor desta molécula foi identificado em m/z 625 $[M - H]^-$ (Figura 21, Tabelas 3 e 4). Os espectros MS^n evidenciaram fragmentações características em m/z 593 $[M - H - 31]^-$, 463 $[M - H - 162]^-$ e 301 $[M - H - (2 \times 162)]^-$ respectivamente, sugerindo a perda de duas hexoses e de dois grupos metoxílicos. Esta substância foi identificada somente nos capítulos de *P. chiquitensis*.

No cromatograma HPLC-ESI-IT-MS do extrato metanólico de capítulos de *P. chiquitensis* com T_r 40,33 min (**13**), foi identificado o íon em m/z 463 (Figura 36, Tabela 3). O espectro APCI- MS^2 apresentou o íon produto em m/z 301 que foi atribuído à perda de uma hexose $[M - 162 - H]^-$ e o íon em m/z 286 foi atribuído à perda de uma metila $[M - 162 - 15 - H]^-$. Deste modo, esta substância foi identificada 10-hidroxi-5,7-dimetoxi-3-metil-1H-nafto[2,3c]piran-1-ona-9-O- β -D-glicopiranosídeo, devido seu padrão de fragmentação e seu espectro UV característico de naftopiranonas, contendo uma banda bipartida em 270-273 nm (VILEGAS *et al.*, 1999, PACIFICO *et al.*, 2011).

A substância **2a** identificada nos escapos com T_r 20.17 min apresentou o íon precursor em m/z 958 (Figura 22, Tabela 4), sugerindo ser o dímero de um flavonoide possuindo duas unidades de 6-hidroxiquercetina-hexose. Porém, agliconas de flavonoides podem dimerizar na fonte de electrospray (ESI), podendo ser um artefato. Podemos confirmar a presença de um dímero pelo seu espectro de ultravioleta, que apresentou bandas em 260, 274 e 348 nm. Mas para assegurar que esta molécula é ou não um dímero, é necessário o seu isolamento e o registro dos respectivos espectros de RMN mono e bidimenisonais.

Os derivados do kaempferol contendo uma pentose (**3a**) também foram identificados no extrato metanólico dos escapos com T_r 26.54 min. A confirmação da unidade de uma pentose foi confirmada no espectro de ESI-MS pela perda de 132 Da. O íon da molécula precursora foi identificado em m/z 577 $[M - H]^-$ (Figura 23, Tabela 4). Os espectros de MS^2 e MS^3 evidenciaram as perdas de uma ramnose

e de uma pentose, devido às perdas consecutivas de 146 e 132, $[M - H - 146 - 132]^-$, resultando no íon produto em m/z 299.

O íon precursor em m/z 669 (**2**) (Figura 24, Tabela 3) sugere um flavonoide derivado da quercetina (SANTOS *et al.*, 2009). A sequência dos fragmentos apresentados nos espectros de MS^n evidenciaram que esta substância é uma hidroxiquercetina com duas hexoses. Particularmente, o padrão de fragmentação apresentado pela substância **2** foi coerente com a 6-3'-dimetoxiquercetina, ligadas a duas hexoses. No espectro MS^2 foi observado o íon produto em m/z 345, atribuído à eliminação de duas unidades de açúcares $[M - H - 162 - 162]^-$, e outro íon em m/z 330, atribuído à perda de um grupo metila da 6-metoxiquercetina. Dados de RMN mono e bi-dimensionais da molécula isolada (discutidos no item 7), confirmaram a estrutura da 6-3'-dimetoxiquercetina-3-O- β -D-glicopiranosil-(6 $\rightarrow$ 1)-O- β -D-glicopiranosideo (SANTOS, *et al.*, 2002).

Derivados da metoxiquercetina foram também identificados no extrato metanólico dos capítulos com T_r 13,82 min. O espectro de MS de **1** mostrou o íon da molécula precursora em m/z 655 (Figura 25, Tabela 3). MS^2 evidenciou um fragmento representativo em m/z 493 atribuído à perda de uma glicose $[M - H - 162]^-$, enquanto que experimentos de MS^3 mostraram o pico do íon produto em m/z 331 $[M - H - 162 - 162]$, evidenciando a perda consecutiva de duas hexoses $[M - H - 162 - 162]^-$ (SANTOS *et al.*, 2009).

Para a molécula com T_r em 7,98 min (**1a**, escapos), foi observado o íon precursor em m/z 641 (Figura 26, Tabela 4). O espectro de MS^2 mostrou fragmentos em m/z 479 $[M - 162 - H]^-$, atribuídos à aglicona do flavonol, originado pela perda de uma hexose do íon precursor e o íon em m/z 317, que foi atribuído às perdas consecutivas de duas hexoses da 6-hidroxiquercetina $[M - 162 - 162 - H]^-$.

Outro derivado da metoxiquercetina foi identificado no TIC (Total Ion Current) com T_r 27,29 (**5a**, escapos). O espectro MS exibiu pico em m/z 493 (Figura 27) e o experimento de MS^2 (Tabela 4) mostrou fragmento em m/z 331, atribuído à aglicona do flavonoide, originados pela perda de uma hexose do íon precursor. Portanto, para esta substância, sugerimos a estrutura da 6-metoxiquercetina-7-O-glicosídeo (PARK *et al.*, 2000).

Outros derivados da metoxiquercetina foram identificados no cromatograma HPLC-MS do extrato metanólico dos capítulos com T_r 31,86 min (**3**). O espectro *full*

scan ESI-MS, modo negativo, mostrou em m/z 477 (Figura 28, Tabela 3), o íon precursor $[M - H]^-$. O espectro MS^2 evidenciou íon em m/z 315 $[M - H - 162]^-$, referente à perda de uma hexose.

Os flavonoides acil glicosilados são comuns nas espécies de *Paepalanthus*. Estas substâncias foram identificadas no cromatograma HPLC-MS do extrato metanólico de *P. chiquitensis* nos Tr 32,14 e 32,88 min (**7**, capítulos e **6a**, escapos), respectivamente.

O espectro ESI-MS mostrou o íon precursor em m/z 653 $[M - H]^-$ (Figura 29, Tabelas 3 e 4). Espectro de MS^2 apresentou íon produto em m/z 345 que foi atribuído a perda de uma unidade de *p*-cumaroil e uma hexose $[M - 146 - 162 - H]^-$, e o íon em m/z 330 foi atribuído à perda de uma metila $[M - H - 146 - 162 - 15]^-$. Experimentos MS^2 do íon precursor a m/z 653 forneceram o íon produto em m/z 287 que foi atribuído à perda de outro grupo metila e CO $[M-H-146-162-(2 \times 15)-28]^-$. Experimentos de RMN mono e bidimensionais das substâncias **7** e **6a** isoladas (discutidos no item 6.2.) confirmaram a estrutura da nova 6,3'-dimetoxiquercetina-3-O-6''-(*p*-cumaroil)- β -D-glicopiranosídeo.

Outro derivado acil glicosilado identificado nos extrato metanólico de capítulos de *P. chiquitensis* é o 6-metoxikaempferol-3-O- β -D-6'''-(*E-p*-cumaroil)-glicopiranosídeo (**5**) (ANDRADE *et al.*, 1999, AMARAL *et al.*, 2012). Esta substância foi confirmada no cromatograma HPLC-IT-ESI-MSⁿ com T_r 32,14 min. O íon precursor desta substância foi identificado em m/z 623 (Figura 30). O espectro MS^2 (Tabela 3) evidenciou a perda da unidade *p*-cumaroil em m/z 477 $[M - H - 146]^-$. No espectro MS^3 o íon fragmento em m/z 300 foi atribuído ao íon da aglicona desprotonada $[M - H - 146 - 162 - 15]^-$ devido à perda da unidade *p*-cumaroil, uma glicose e um grupo metila, evidenciando que esta molécula é um derivado do kaempferol.

Outra substância que co-eluiu no mesmo Tr 32,14 min. apresentou no espectro ESI-MS, modo negativo, *full scan*, o íon precursor em m/z 639 (Figura 31). MS^2 do íon precursor em m/z 639 forneceu o íon produto em m/z 493 proveniente da perda de uma raminose $[M - 146 - H]^-$. MS^3 do íon precursor evidenciou m/z 639 mostrou a perda de 162 Da., provavelmente devido à perda de uma glicose, evidenciando o íon produto em m/z 331 $[M - 146 - 162 - H]^-$. Dados da literatura

sugerem que esta substância é a 6-metoxiquercetina-3-O- β -D-glicopiranosil-(6 $\rightarrow$ 1)-O- α -L-raminopiranosídeo. Esta substância já foi identificada em *P. ramosus*, *P. speciosus*, *P. latipes* (VILEGAS *et al.*, 1998, SANTOS, 2001).

A substância com Tr 32,31 min. apresentou no espectro ESI-MS, *full scan*, modo negativo (Figura 32), o íon precursor em m/z 507 (**8**). MS² do íon precursor em m/z 507 gerou o íon produto em m/z 477 que foi atribuído a perda de dois grupos metilas, sugerindo que esta molécula possui dois grupos metoxilas [M – (2 x 15) – H]⁻. Ainda se pode observar no espectro de segunda ordem do íon precursor outro íon produto em m/z 315, que foi atribuído a perda de uma hexose [M – (2 x 15) – 162 – H]⁻ que, provavelmente, deve ser uma glicose. Espectros de RMN mono e bidimensionais (discutidos no item 6.2., **PGC 4**), comprovaram que a substância (**8**) é a 6,3'-dimetoxiquercetina-3-O- β -D-glicopiranosídeo.

Nos escapos, com Tr 49,31 min. (**12a**), foi também identificado o íon da molécula desprotonada com m/z 507 (Figura 32). Porém, devido a diferença do Tr de (**8**) e (**12 a**) e também devido ao padrão de fragmentação diferentes apresentado nos espectros de ESI-MS, comprova-se que **12a** não é um derivado da quercetina. O experimento MS² apresentou o íon produto em m/z 345 correspondente a perda de 162 Da., sugerindo que esta molécula também possui uma glicose [M – 162 – H]⁻. O experimento MS² do íon m/z 345 resultou no íon da molécula produto em m/z 286 que foi atribuído a perda 59 Da, provavelmente devido à perda de duas metilas e COH [M – 59 – H]⁻. Considerando estes dados e a possibilidade da existência de flavononóis em *Paepalanthus*, os dados de fragmentações apresentados, juntamente com os dados apresentados no espectro de UV (250, 283, 326 nm), sugerimos para esta molécula a estrutura da 7,3',4'-trimetoxiflavanonol-3-O-hexose. Porém, para confirmação da estrutura é necessário proceder ao isolamento e identificação por RMN.

Os flavononóis não são comuns em Eriocaulaceae, porém, na literatura, existe um único relato do isolamento de extrato metanólico das folhas de *Paepalanthus argenteus* var. *argenteus* (Bongard) de um flavanonol caracterizado como xeractinol. Este di-hidroflavanonol foi considerado como marcador taxonômico de *Paepalanthus* subg. *Xeractis* (DOKKEDAL, 2007).

Outros flavanonóis também foram identificados nos extratos metanólicos de *P. chiquitensis* (**4**, **8a**, **11a**). Análises dos espectros no UV destas substâncias e os padrões de fragmentações corroboram com esta hipótese.

Espectros de MS (*full scan*), modo negativo de **4** apresentou o íon precursor em m/z 685 (Figura 33). Fragmentações de segunda ordem identificaram os íons produtos em m/z 623 e 315, que foram atribuídos às perdas consecutivas de 62 Da e 308 Da., respectivamente $[M - (2 \times 31) - H]^-$, $[M - 59 - 308 - H]^-$, provavelmente à perda de dois grupos metoxilas e de duas hexoses (glicose e raminose). Os fragmentos observados sugerem para esta molécula a estrutura da 6-Hidroxi-7,3',4'-trimetoxiflavanonol-di-O-hexose.

No Tr 38,04 (**8a**) observa-se também outro provável derivado de um flavanonol contendo duas hexoses. O espectro ESI-MS, *full scan* apresentou o íon da molécula precursora em m/z 627 $[M - H]^-$, (Figura 34). Espectros de segunda ordem forneceram os íons produtos em m/z 465 e 303, que foram atribuídos às perdas consecutivas de duas hexoses $[M - 162 - H]^-$, $[M - 162 - 162 - H]^-$, respectivamente. Portanto, para esta substância, sugerimos a estrutura de um Flavanonol-di-O-hexose.

Finalmente, no cromatograma HPLC-ESI-IT-MS do extrato metanólico dos escapos de *P. chiquitensis* com T_r 48,19 min. (**11a**), foi identificado o íon em m/z 361 (Figura 35, Tabela 3), que segundo padrões de fragmentações e seus respectivos espectros no UV, são característicos de flavononóis-6-hidroxilados com três grupos metoxilas. Estes flavonoides foram somente identificados em espécies de *Paepalanthus* sub-gênero *Platycaulon*. Portanto, a identificação deste flavanonol em *P. chiquitensis* poderá contribuir também para uma correlação entre as seções *Platycaulon*, *Xeractis* e *Diphyomene*.

Com os dados obtidos, foi possível descrever, neste trabalho, como a técnica HPLC-ESI-IT-MS possibilitou identificar os constituintes químicos majoritários dos extratos metanólicos de capítulos e escapos de *P. chiquitensis*. Foi possível identificar, sem necessidade de isolamento, 19 flavonoides e 6 naftopiranonas diferentes, considerando seus padrões de fragmentações e espectros no UV e comparando-os com os dados existentes na literatura.

Os resultados deste trabalho evidenciaram que a técnica HPLC-ESI-IT-MS proporciona ganho em tempo e diminuição de gastos de solventes com etapas de

isolamentos desnecessários de flavonoides e naftopiranonas já conhecidos em espécies de *Paepalanthus*.

Este trabalho também reforça que o "*fingerprint*" cromatográfico pode auxiliar na discussão taxonômica com espécies do gênero *Paepalanthus*. Portanto, o presente trabalho pode ainda corroborar com discussões elaboradas anteriormente por Dokkedal (2007) de que a presença das naftopiranonas no gênero *Paepalanthus* pode ser considerada marcadora taxonômica deste gênero.

Figura 18. Espectros de ESI-MS, modo negativo *full scan* e MSⁿ referentes à *m/z* 831.

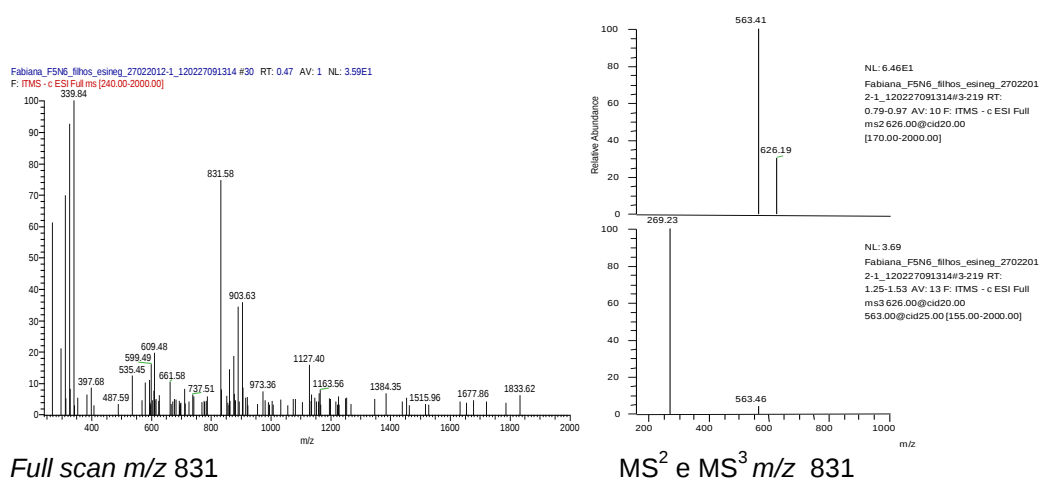


Figura 19. Espectros de ESI-MS, modo negativo *full scan* e MSⁿ referentes à *m/z* 433.

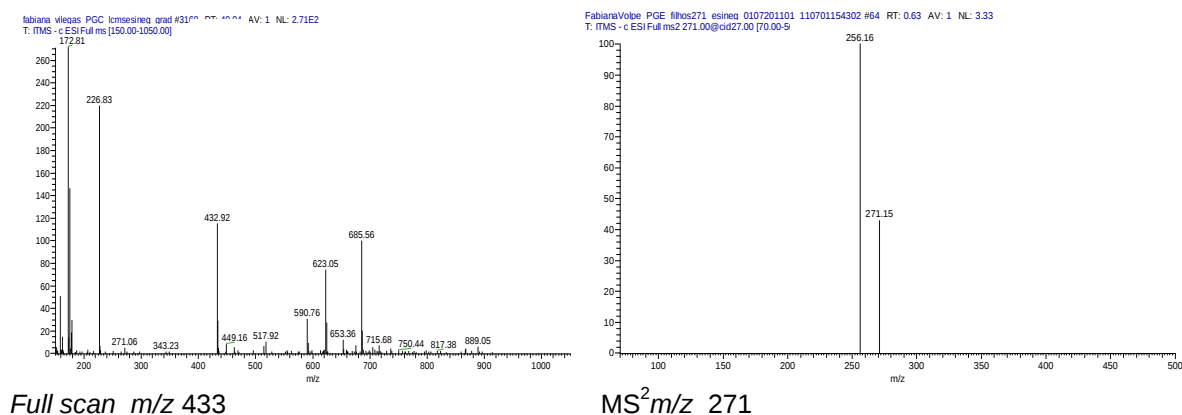


Figura 20. Espectros de ESI-MS, modo negativo *full scan* e MS^n referentes à m/z 595.

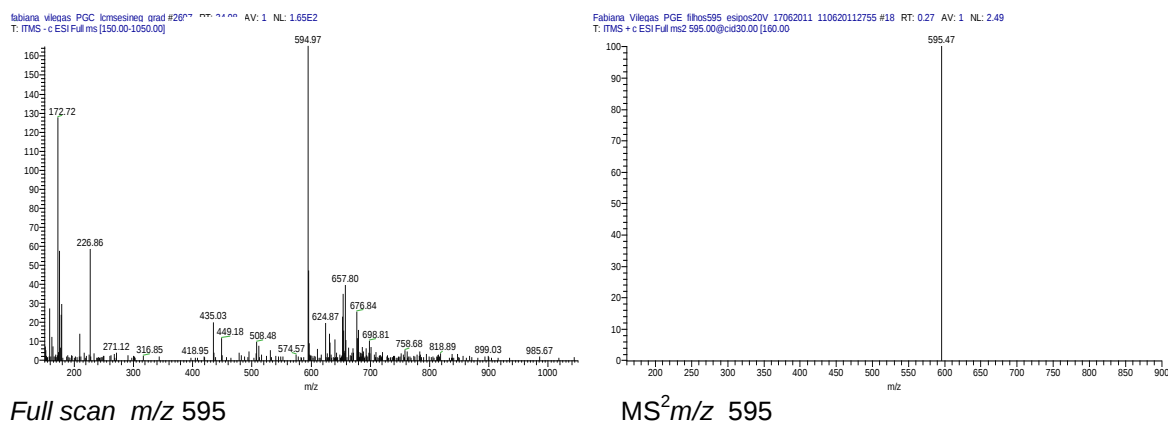


Figura 21. Espectros de ESI-MS, modo negativo *full scan* e MS^n referentes à m/z 625.

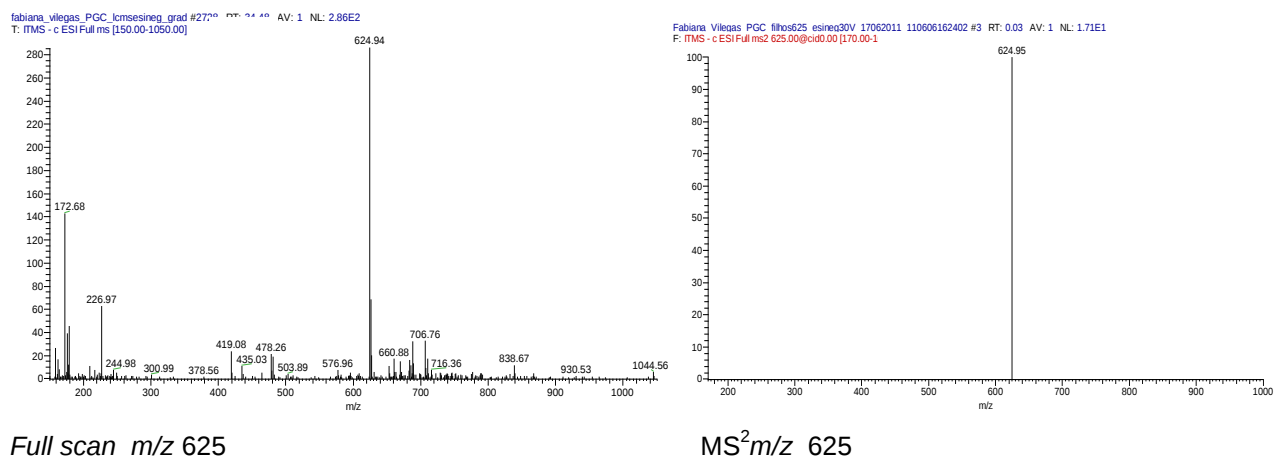


Figura 22 - Espectros de ESI-MS, modo negativo *full scan* referente à m/z 958.

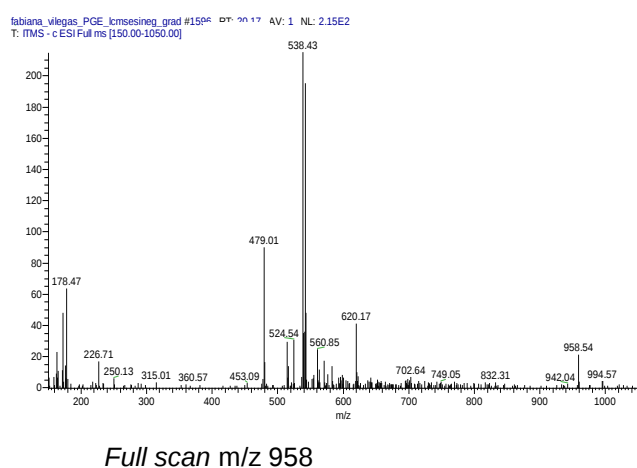


Figura 23 - Espectros de ESI-MS, modo negativo *full scan* e MS^n referentes à m/z 577.

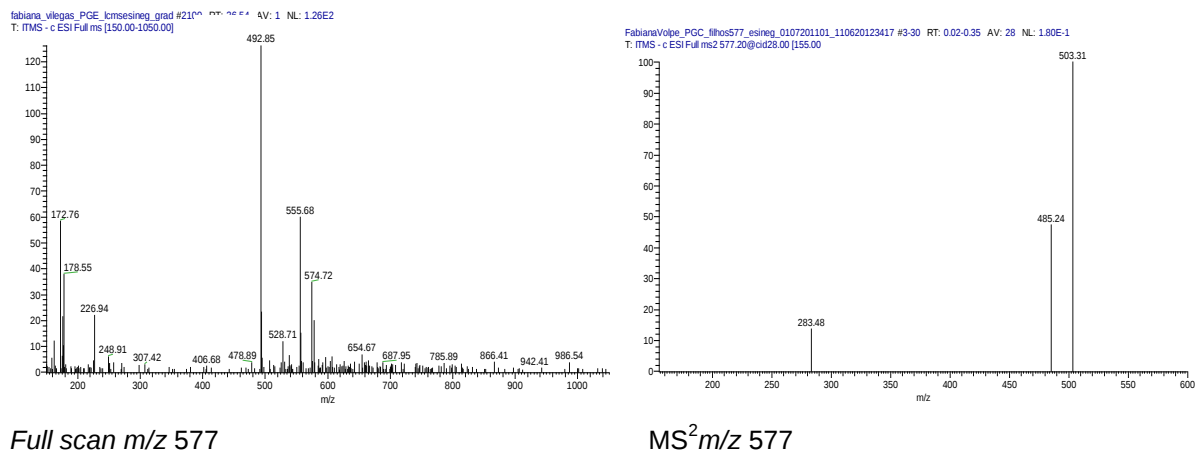


Figura 24. Espectros de ESI-MS, modo negativo *full scan* e MS^n referentes à m/z 669.

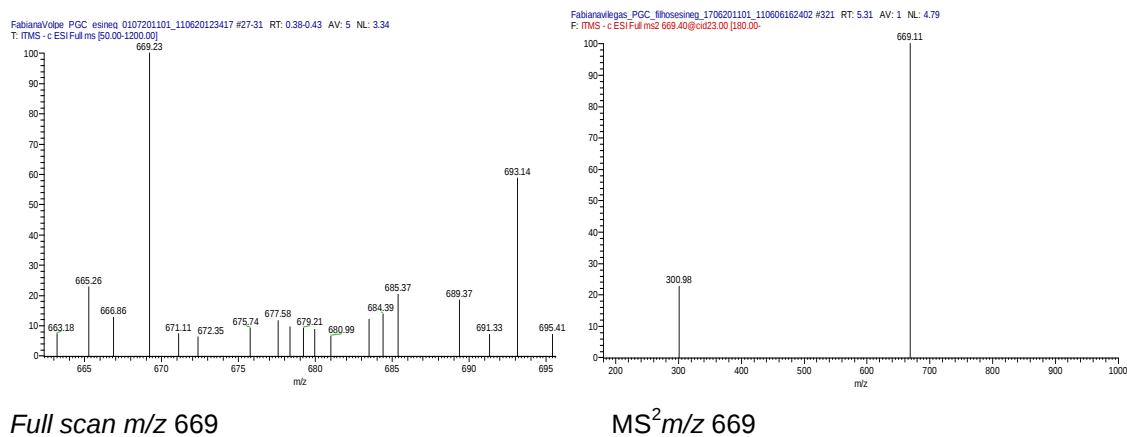


Figura 25. Espectros de ESI-MS, modo negativo *full scan* e MS^n referentes à m/z 655.

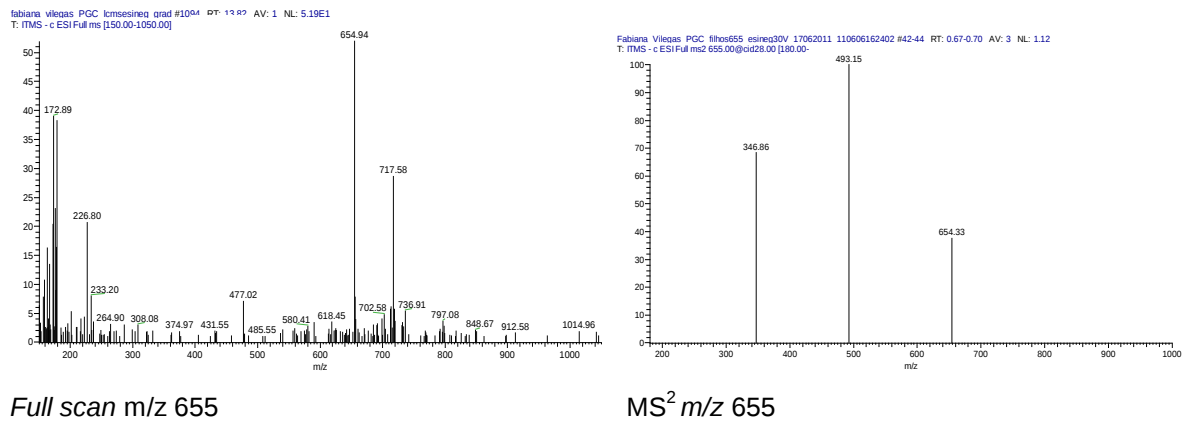


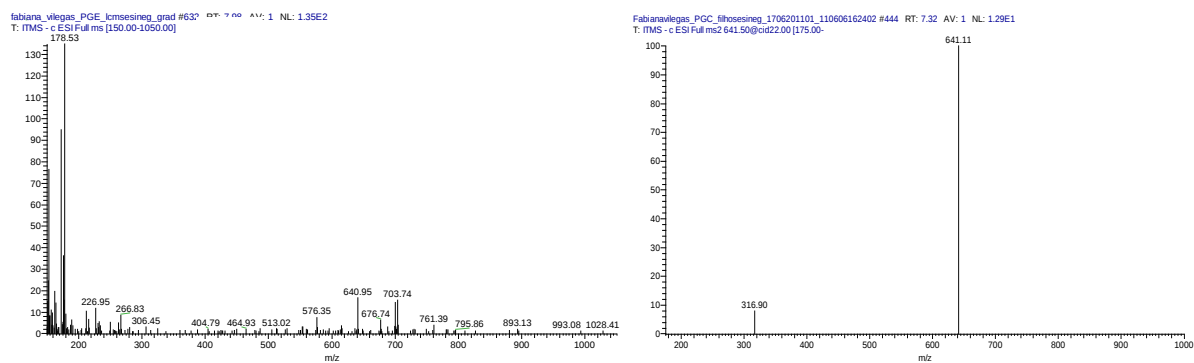
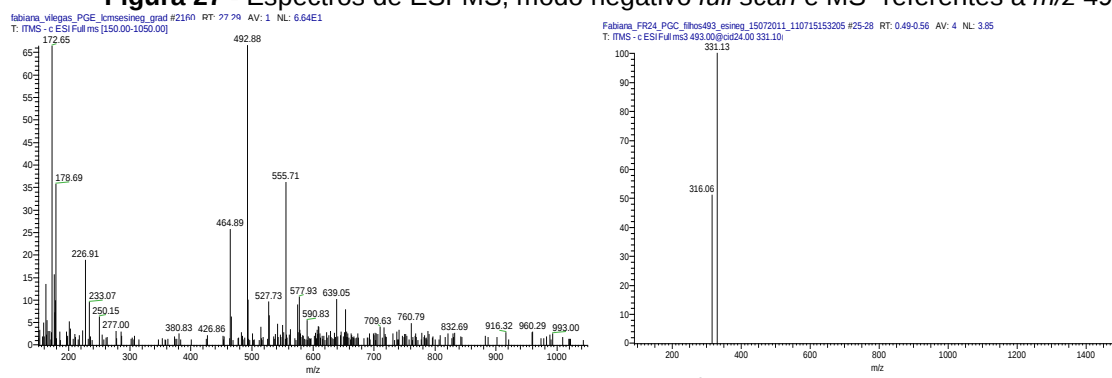
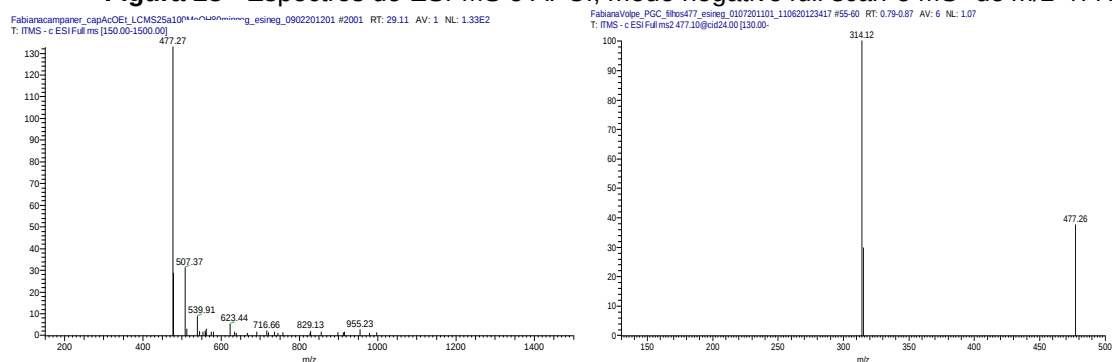
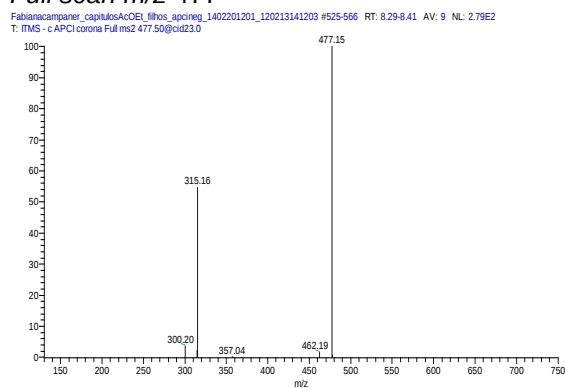
Figura 26. Espectros de ESI-MS, modo negativo *full scan* e MSⁿ referentes à *m/z* 641.Full scan *m/z* 641MS² *m/z* 641**Figura 27 -** Espectros de ESI-MS, modo negativo *full scan* e MSⁿ referentes à *m/z* 493.Full scan *m/z* 493MS² *m/z* 493**Figura 28 -** Espectros de ESI-MS e APCI, modo negativo *full scan* e MSⁿ de *m/z* 477.Full scan *m/z* 477MS² *m/z* 477MS² *m/z* 477 – APCI

Figura 29 - Espectros de ESI-MS e APCI, modo negativo *full scan* e MS^n referentes à m/z 653.

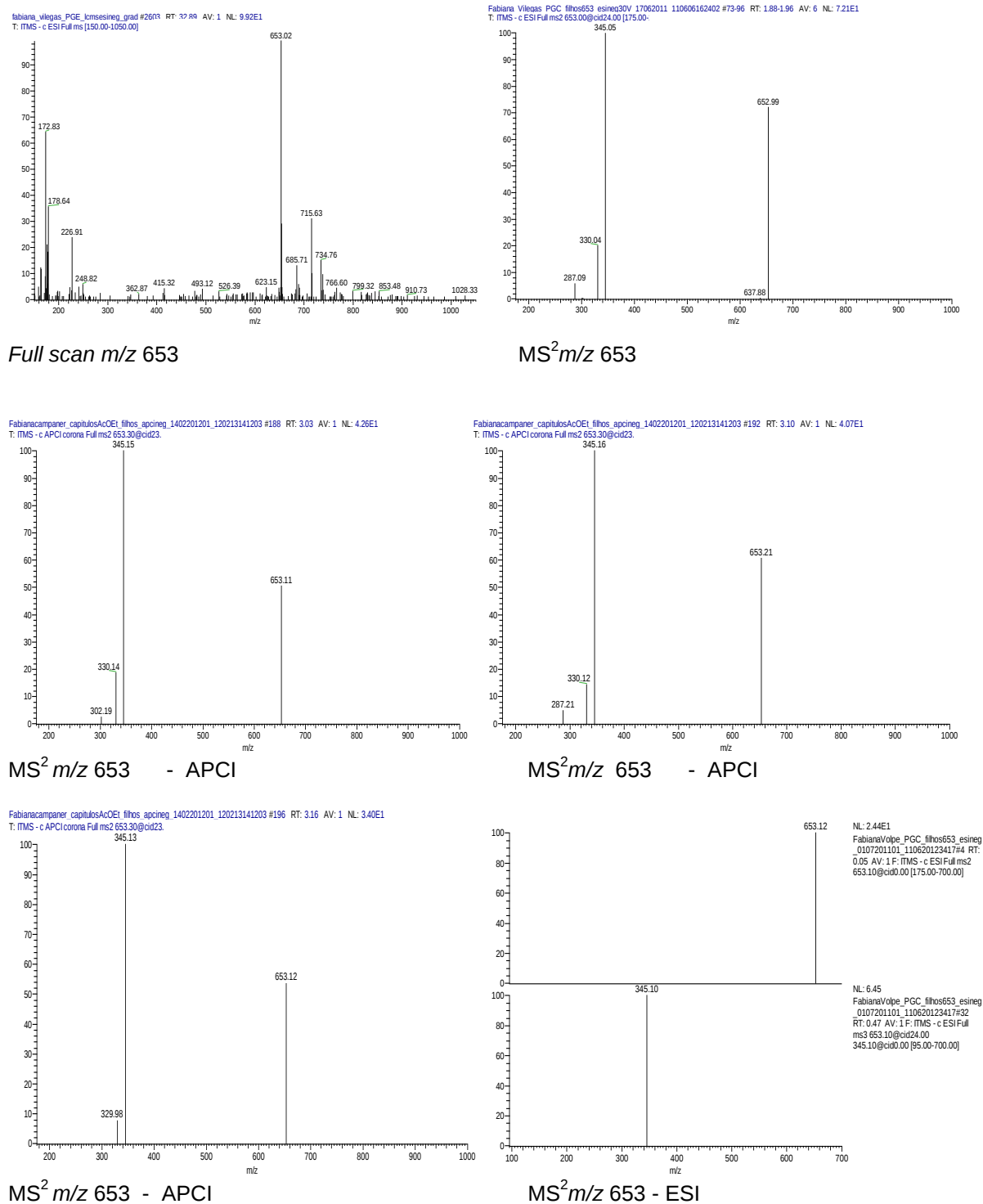


Figura 30 - Espectros de ESI-MS, modo negativo *full scan* e MS^n referentes à m/z 623.

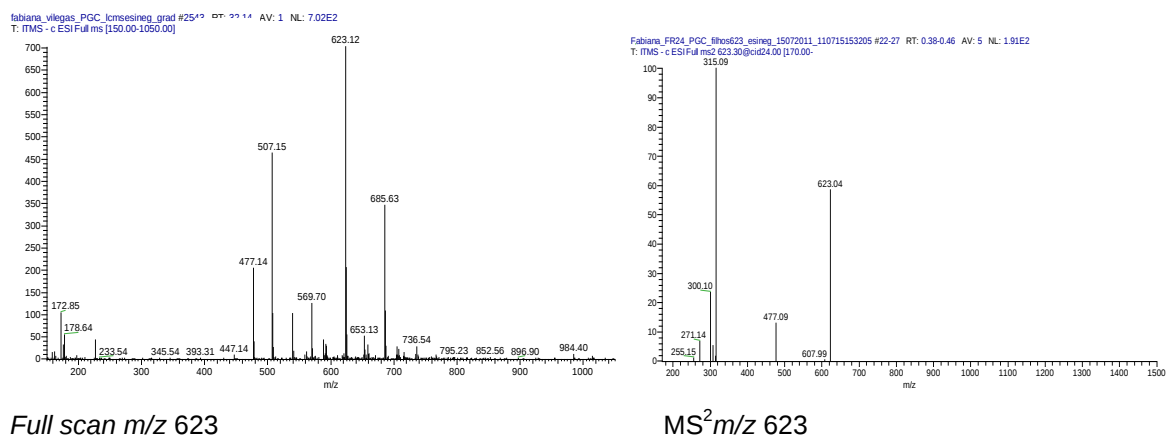


Figura 31 - Espectros de ESI-MS, modo negativo *full scan* e MS^n referentes à m/z 639.

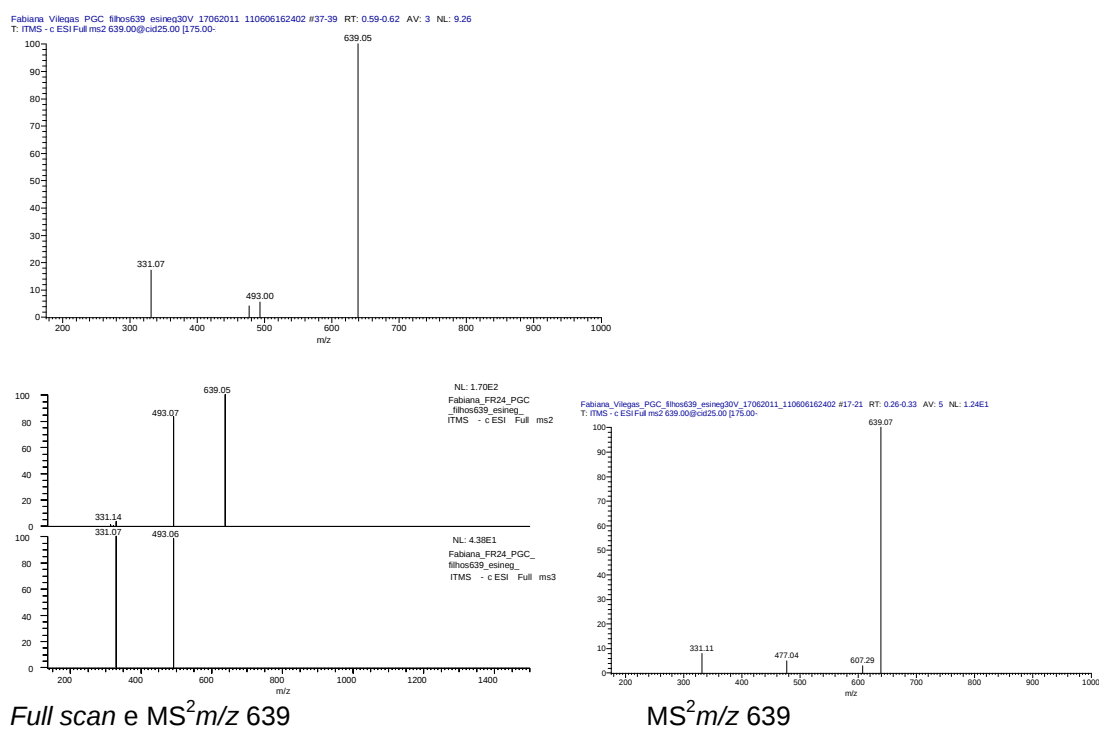


Figura 32 - Espectros de ESI-MS, modo negativo *full scan* e MS^n referentes à m/z 507.

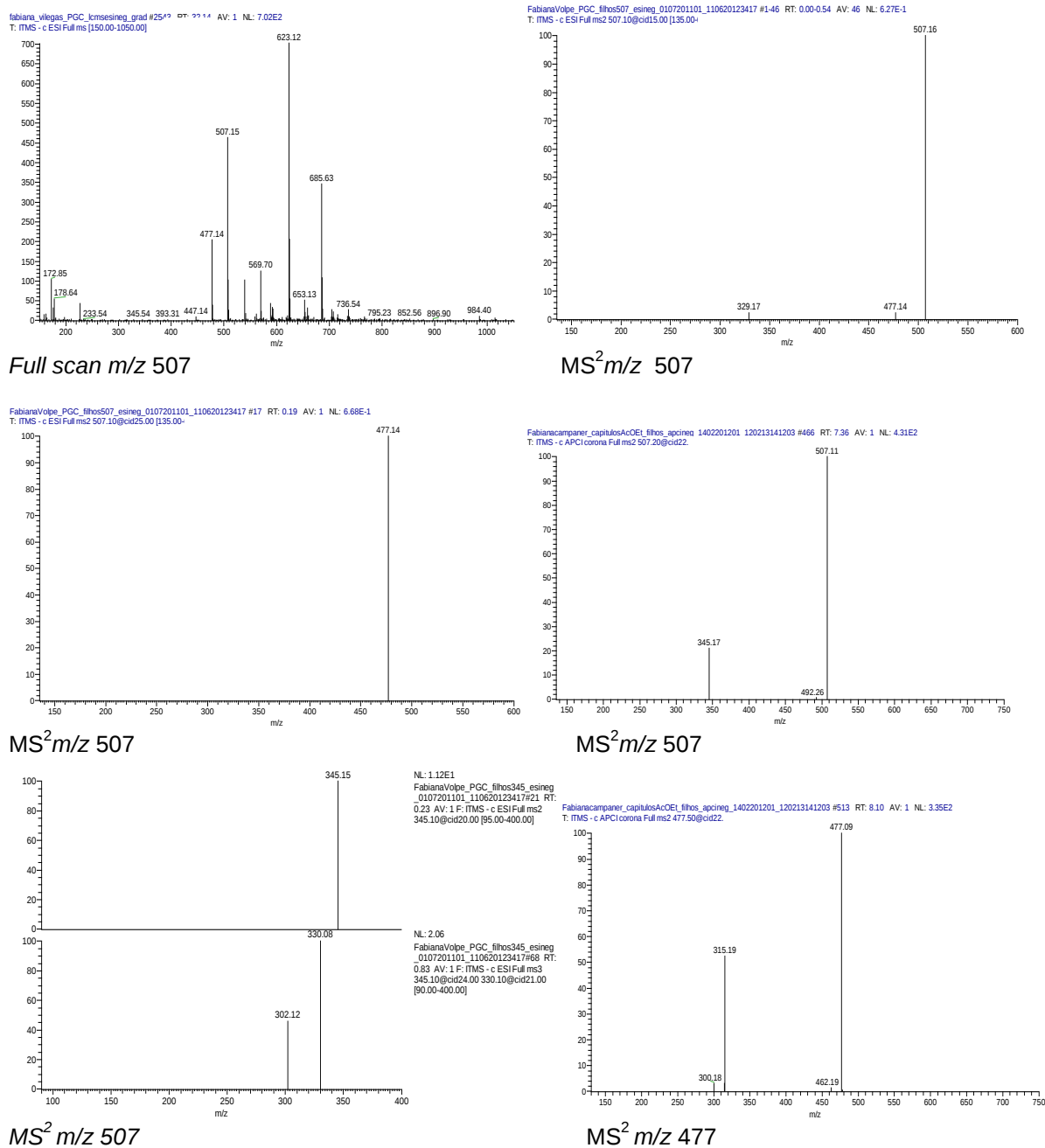
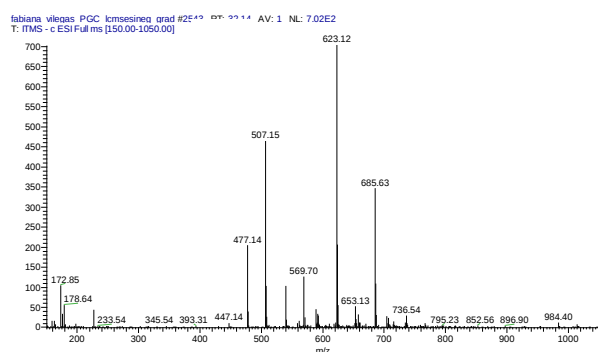
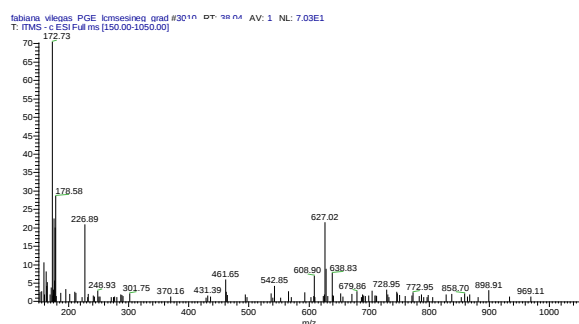


Figura 33 - Espectros de ESI-MS, modo negativo *full scan* referentes à m/z 685.



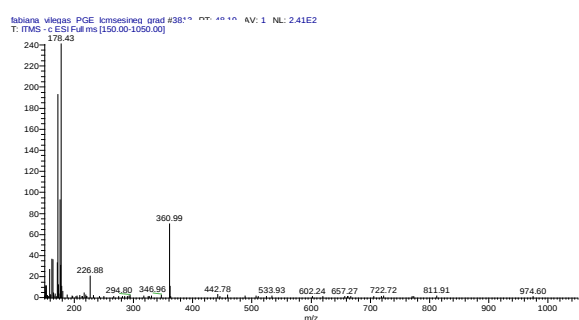
Full scan de m/z 685

Figura 34 - Espectros de ESI-MS, modo negativo *full scan* e MS^n referentes à m/z 627.

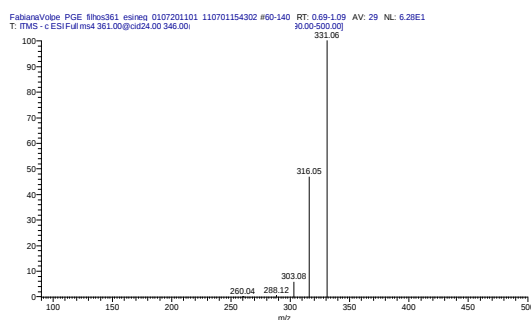


Full scan de m/z 627

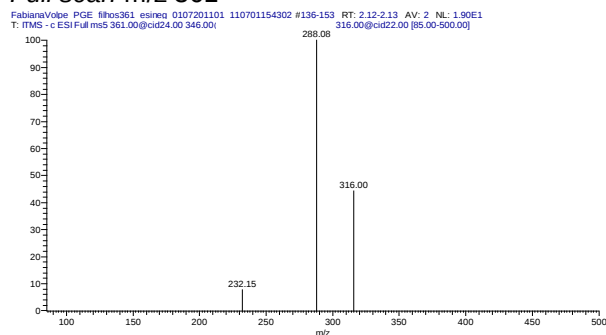
Figura 35 - Espectros de ESI-MS, modo negativo *full scan* e MS^n referentes à m/z 361.



Full scan m/z 361



$MS^2 m/z$ 361

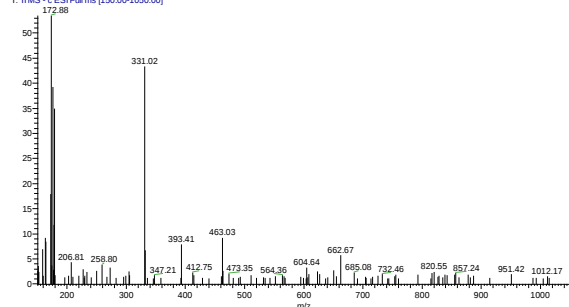


$MS^5 m/z$ 361

Figura 36 - Espectros de ESI-MS e APCI, modo negativo *full scan* e MSⁿ referentes à *m/z*

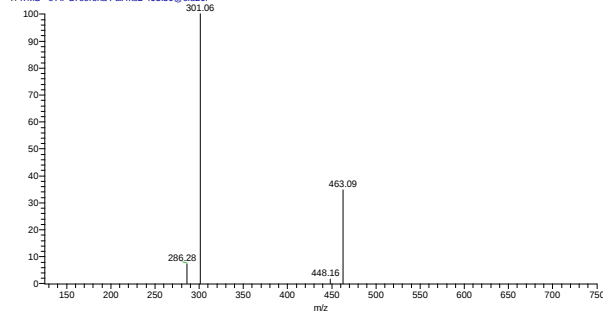
463.

Fabiana Vilgas - PGE Ionesineq. grad #3209 DT: 41.48 AV: 1 NL: 5.34E1
T: ITMS - e ESI/Full ms [150.00-1050.00]



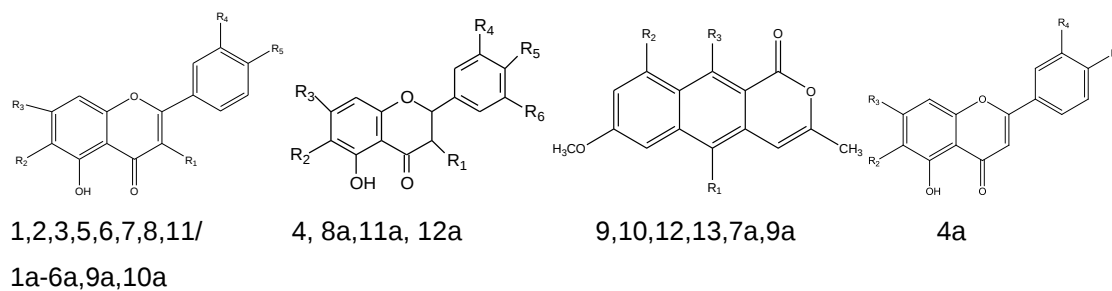
Full scan m/z 463

Fabianacampaner_capitulosAcOE1_fibros_apcinea_1402201201_120213141203 #642 RT: 10.12 AV: 1 NL: 4.59E2
T: ITMS - e APCI/corona Full ms2 463.30@cd20



MS² m/z 463

Figura 37 - Estruturas das substâncias identificadas nos capítulos e escapos de *P. chiquitensis*.



Pico	T _R	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
Capítulos							
1	13,82	OH	OCH ₃	O-glc-glc	OH	OH	
2	17,46	OH	OCH ₃	O-glc-glc	OCH ₃	OH	
3	31,86	O-hex	H	OCH ₃	OH	OH	
4	32,14	O-hex-hex	OH	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H
5	32,14	<i>p</i> -cum-O-glc	OCH ₃	OH	H	OH	
6	32,14	O-glc-ram	OCH ₃	OH	OH	OH	
7	32,14	<i>p</i> -cum-O-glc	OCH ₃	OH	OCH ₃	OH	
8	32,31	O-glc	OCH ₃	OH	OCH ₃	OH	
9	34,08	OH	O-glc-ram	OH			
10	34,48	OCH ₃	O-glc-alo	OH			
11	34,88	O-hex-hex	H	OH	OH	OH	
12	39,96	H	O-glc	OH			
13	40,33	OCH ₃	O-glc	OH			
Escapos							
1 a	7,98	O-hex-hex	OH	OH	OH	OH	
2 a	20,17	O-hex-	OH	OH	OH	OH	
		O-hex	OH	OH	OH	OH	
3 a	26,54	O-hex-xil	OCH ₃	OH	H	OH	
4 a	26,94	H	H	(3'''-gal)-α-D-ara-(2'''→1''')- api(3''''→1''''')-α-D-ara	H	OCH ₃	
5 a	27,29	OH	OCH ₃	O-glc	OH	OH	
6 a	32,89	<i>p</i> -cum-O-glc	OCH ₃	OH	OCH ₃	OH	
7 a	34,03	OH	O-glc-ram	OH			
8 a	38,04	O-hex-hex	OH	OH	OH	OH	H
9 a	39,92	H	O-glc	OH			
10 a	40,48	O-xil	OH	OCH ₃	OH	OH	
11 a	48,19	OH	OH	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H
12 a	49,31	O-hex	H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	

Tabela 3 - ESI-MS e ESI-MSⁿ das substâncias existentes no extrato metanólico de capítulos de *P. chiquitensis*

Substâncias	Picos	T _r	Espectro no UV λ_{max} (nm)	[M-H] ⁺	Fragmentos representativos MS ² and MS ³
6-metoxiquercetina-7-O- β -D-glicopiranosil-(6 $\rightarrow$ 1)- β -D-glicopiranosídeo	1	13,82	235, 345	655	493, 347
6,3'-dimetoxiquercetina-7-O- β -D-glicopiranosil-(6 $\rightarrow$ 1)- β -D-glicopiranosídeo	2	17,46	235, 345	669	507, 345, 330, 302, 287
7-Metoxiquercetina-O- hexose	3	31,86	268, 342	477	315, 301, 273
6-Hidroxi-7,3',4'-trimetoxiflavanonol-di-O-hexose	4	32,14	259, 349	685	623, 315
6-metoxikaempferol-3-O- β -D-6-(p-cumaroil)-O- β -D-glicopiranosídeo	5	32,14	270, 315	623	608, 477, 300
6-metoxiquercetina-3-O- β -D-glicopiranosil-(6 $\rightarrow$ 1)-O- α -L-ramipiranosídeo	6	32,14	235, 345	639	493, 331
6,3'-dimetoxiquercetina-3-O- β -D-6''-(p-cumaroil) glicopiranosídeo	7	32,14	262,358	653	345 , 330, 287
6-3'-dimetoxiquercetina-3-O- β -D-glicopiranosídeo	8	32,31	257, 350	507	477, 315
5-10-di-hidroxi-7-metoxi-3-metil-1-H-nafto[2,3c]piran-1-ona-9-O- β -D-glicopiranosil (6 $\rightarrow$ 1)-O- α -L-raminopiranosídeo	9	34,08	271, 280sh, 383	595	449, 287
10-hidroxi-5,7-dimetoxi-3-metil-1H-nafto[2,3c]piran-1-ona-9-O- β -D-glicopiranosil- (6 $\rightarrow$ 1)- alopiranosídeo	10	34,48	273, 283sh, 362	625	593, 463, 301
Quercetina-3-O-di-hexose	11	34,88	252 281sh, 362	625	609, 447, 285
10-hidroxi-7-metoxi-3-metil-1H-nafto[2,3c]piran-1-ona-9-O- β -D-glicopiranosídeo	12	39,96	272,280sh381	433	271, 256
10-hidroxi-5,7-dimetoxi-3-metil-1H-nafto[2,3c]piran-1-ona-9-O- β -D-glicopiranosídeo	13	40,33	273, 286, 362	463	301, 256

Tabela4 - ESI-MS e ESI-MSⁿ das substâncias existentes no extrato metanólico de escapos de *P. chiquitensis*.

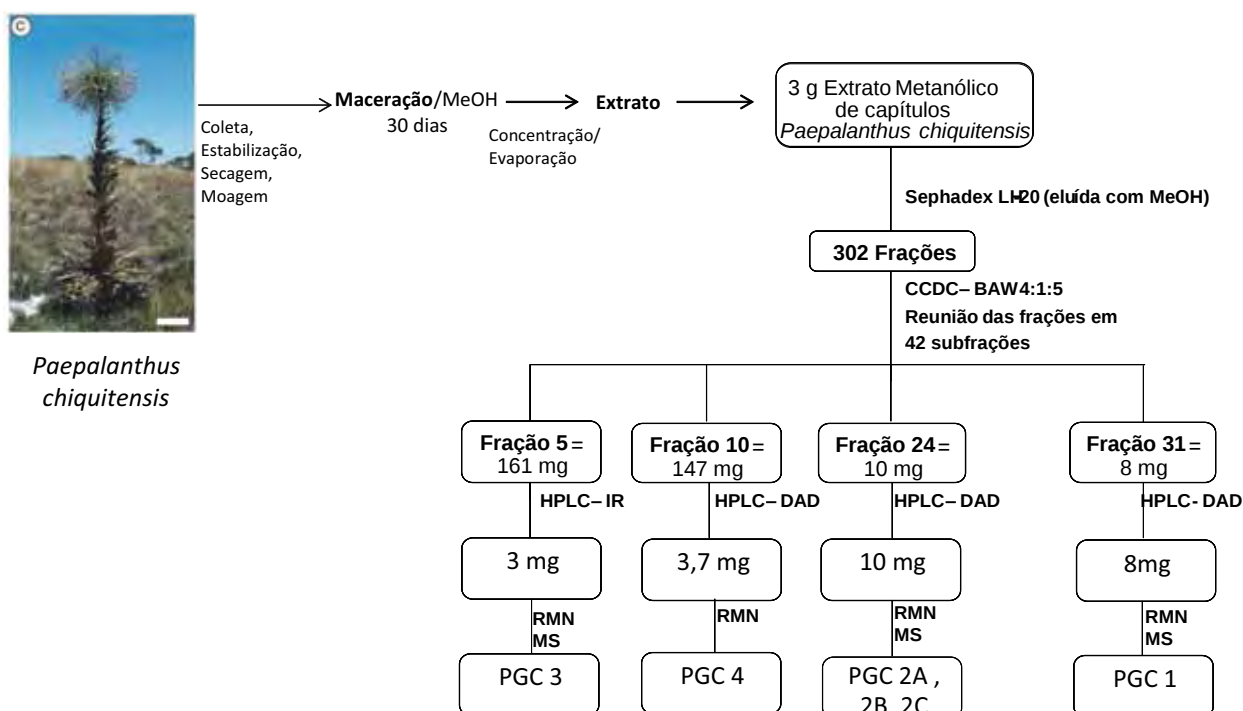
Substâncias	Picos	Tr	Espectro no UV λmax (nm)	[M-H]-	Fragmentos representativos MS2 and MS3
6-Hidroxiquercetina-3-O-di-hexose	1 ^a	7,98	260,295sh, 340	641	479, 317
Dimero da 6-Hidroxiquercetina-3-O-hexose	2 ^a	20,17	260,274sh, 348	958	479, 463
6-Metoxikaempferol-3-O-hexose-O-pentose	3 ^a	26,54	267, 337	577	431, 299
4'-metoxiapiigenina-7-O-(3''-galoil)-α-D-arabinopiranosil-(2'''→1''')- apiofuranosil-(3'''→1''''')-α-D-arabinopiranosideo	4 ^a	26,94	267,337	831	563, 269
6-metoxiquercetina-7-O-glicosideo	5 ^a	27,29	253sh, 345	493	331, 316
6,3'-dimetoxiquercetina-3-O-6''-(p-cumaroil)-β-D-glicopiranosideo	6 ^a	32,89	262sh,358	653	345 , 330, 287
5-10-di-hidroxi-7-metoxi-3-metil-1-H-nafto[2,3c]piran-1-ona-9-O-β-D- glicopiranosil 6→1)-O-α-L-raminopiranosídeo	7 ^a	34,03	268,279sh,349	595	449, 287
Flavanonol-di-O-hexose	8 ^a	38,04	242,279sh,325	627	465, 303
10-hidroxi-7-metoxi-3-metil-1H-nafto[2,3c]piran-1-ona-9-O-β-D- glicopiranosideo	9 ^a	39,92	270,279sh, 387	433	271, 256
6-Hidroxi-7-metoxiquercetina-3-O-pentose	10 ^a	40,48	250,283sh, 326	463	433, 331
6-Hidroxi-7,3',4'-trimetoxiflavanonol	11 ^a	48,19	242,261sh, 324	361	346, 331, 316
7,3',4'-trimetoxiflavanonol-3-O-hexose	12 ^a	49,31	250,283sh, 326	507	345, 286

6.2. Identificação das substâncias fracionadas por Sephadex LH-20, HPLC-IR, HPLC-UV-PDA e SPE

Com a finalidade de se confirmar a estrutura de algumas substâncias identificadas por HPLC-UV-PDA e HPLC-ESI-IT-MS, o extrato metanólico dos capítulos de *P. chiquitensis* foi fracionado, utilizando-se coluna de permeação em gel Sephadex LH-20, conforme metodologia descrita no item 3.3.3.5.

As frações 5 (161 mg), 10 (147 mg), 24 (10 mg) e 31 (8 mg), foram submetidas a cromatografia por HPLC-IR (conforme descritos no item 3.3.5.) e as frações foram analisadas por CCDC, HPLC-UV-PDA e, posteriormente, submetidas à análise de RMN mono e bi-dimensionais e espectrometria de massas (ESI-MS) conforme itens 3.3.6, 3.3.10 e 3.3.11.

Figura 38. Fluxograma de fracionamento do extrato metanólico e de frações de capítulos de *P. chiquitensis*.



A Tabela 5 resume a origem da fração de cada substância analisada pelos métodos acima mencionados e à qual metodologia a mesma foi submetida.

Tabela 5 – Origem e metodologia das frações provenientes do extrato MeOH dos capítulos de *P.chiquitensis*.

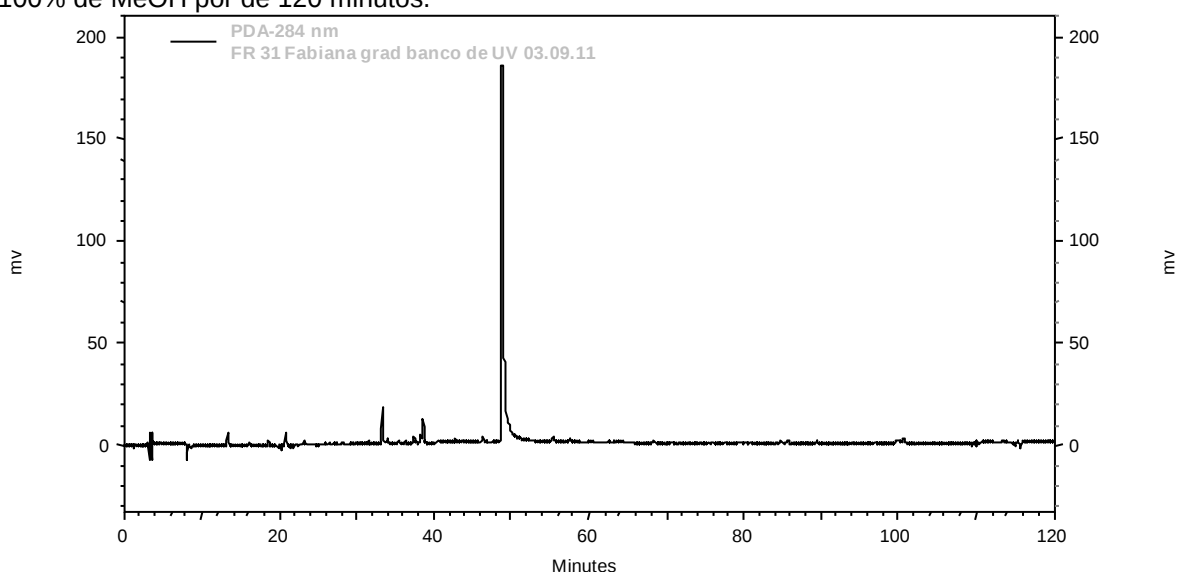
Código	Substância	Origem	Metodologia de purificação	Massa
PGC 1		Fr 31	Sephadex LH 20	8mg
PGC 2		Fr 24	Sephadex LH 20	10mg
PGC 3		Fr 5 n.6	Sephadex LH 20 e HPLC-IR	3 mg
PGC 4		Fr 10 n.18	Sephadex LH 20 e HPLC-UV-PDA	3,7mg

Determinação estrutural de PGC 1

A substância **PGC 1** foi obtida através do fracionamento do extrato bruto dos capítulos de *P. chiquitensis* por Sephadex LH-20, equivalente à 0,4822% de rendimento em relação ao extrato. A análise desta fração por CCDC sugeriu a existência de uma mistura de substâncias nesta fração, que foi confirmada pela existência de uma mancha amarela com $R_f = 0,83$ cm, quando eluída no sistema de solventes clorofórmio/metanol/água 43:37:20 (fase orgânica) e revelada com anisaldeído/ácido sulfúrico.

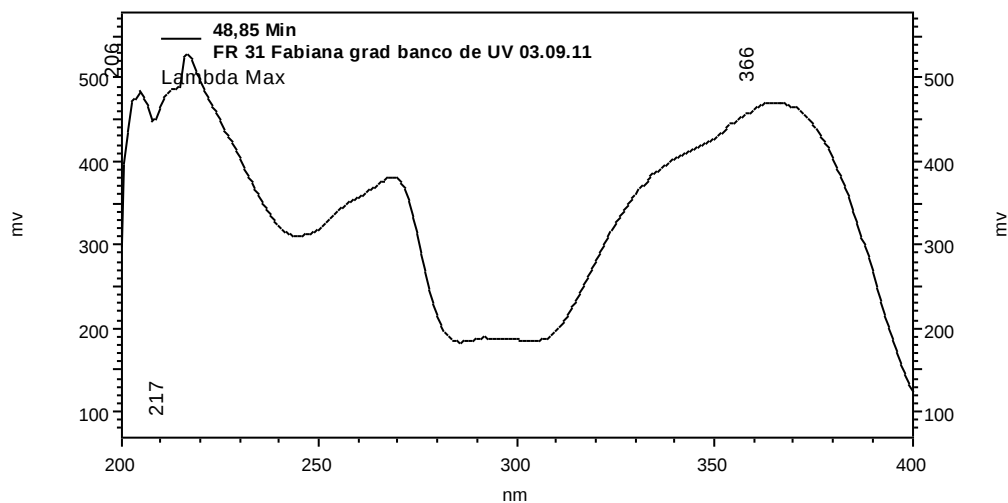
Análise desta substância por HPLC-UV-PDA (Figura 39), também evidenciou o pico de uma substância majoritária com T_r em 48,8 minutos e outros picos minoritários, evidenciando tratar-se de uma mistura de substâncias, onde a substância majoritária possui menor polaridade.

Figura 39 – Cromatograma por HPLC-UV-PDA de **PGC 1**. Coluna Synergi Hidro Phenomenex, volume de injeção: 15µL, fase móvel: água/metanol, gradiente exploratório de 5 a 100% de MeOH por de 120 minutos.



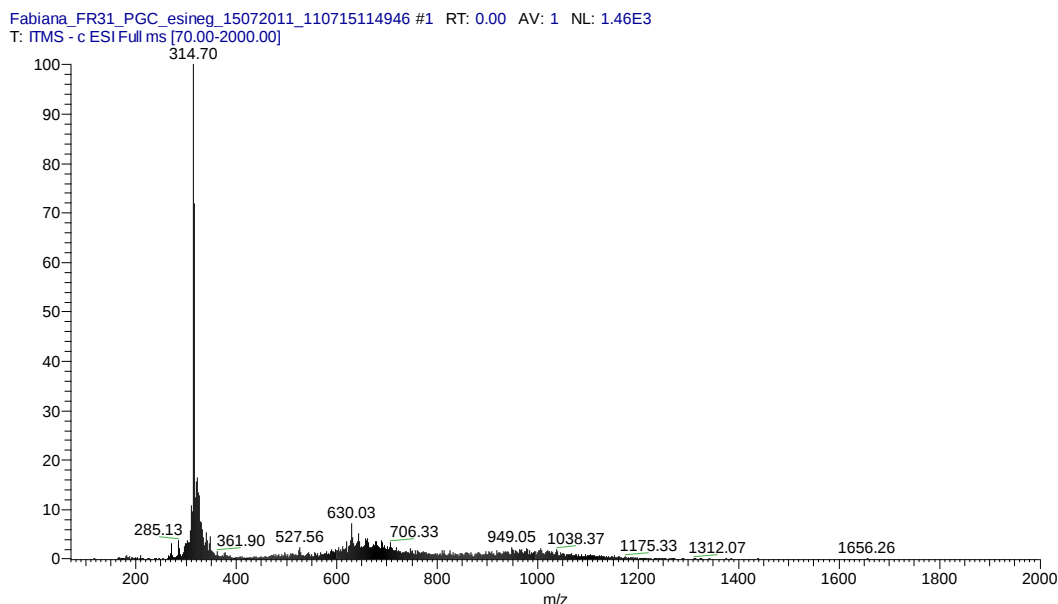
O espectro no UV (Figura 40) da substância **PGC1** (T_r 48,4 min.), apresentou bandas de absorção em 261 e 366 nm que, comparado com dados da literatura, evidenciou tratar-se de um derivado do kaempferol (MABRY *et al.*, 1980).

Figura 40 – Espectro no UV - referente ao pico 2 substância **PGC 1**.



No espectro de primeira ordem ESI-MS *full-scan*, modo negativo (Figura 41), de **PGC 1** com Tr 48,8 min., verifica-se claramente a presença do pico em m/z 315 referente a $[M - H]^-$ e, ainda, um outro pico com m/z 285 $[M - 15 - H]^-$, sugerindo que esta substância é um derivado do kaempferol, com uma metoxila (SANTOS *et al.*, 2001).

Figura 41 – Espectro de ESI-MS de primeira ordem em *Full-scan* modo negativo de **PGC 1**.

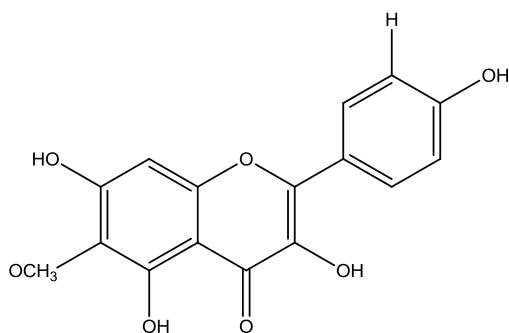


O espectro de RMN de ^1H de **PGC 1** (Figura 42, Tabela 6), evidenciou sinais de deslocamentos químicos na região de hidrogênios aromáticos, sendo: dois dupletos de hidrogênios acoplados em *orto* ($J = 9,0$ Hz), em δ 7,99 e δ 6,81, que foram atribuídos ao H2'/H6' anel B. Apresentou, ainda, um singlete em δ 6,40, que foi atribuído ao H-8 do anel A. A ausência do duplete em *meta*, na região de 6,3-6,7 ($J = 2,0$ Hz), revela que o carbono na posição C-6 do flavonoide está oxigenado. A confirmação de que este flavonoide é um flavonol e não uma flavona é justificada pela ausência do singlete em δ 6,52 referente ao H-3 da flavona. A presença de um singlete em δ 3,74 (3H) evidencia a presença de uma metoxila. O deslocamento químico de H-8 em δ 6,45 (mais desblindado) sugere que a posição C-7 do flavonóide esteja hidroxilada e, conseqüentemente, que a metoxila esteja ligada na posição C-6 do flavonoide. Portanto, esta substância foi identificada como 6-metoxikaempferol (Figura 43).

Tabela 6. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H de **PGC 1** ($\text{CD}_3\text{OD}-d_4$, 11,7).

PGC 1	
Posição	^1H (J em Hz)
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	6,49 (s)
9	
10	
1'	
2'	7,99 (dd) [8,0. 2,0]
3'	6,81 (dd) [8,0 2,0]
4'	
5'	6,81 (dd) [8,0 2,0]
6'	7,99 (dd) [8,0; 2,0]
6-OCH ₃	3,87 (s)

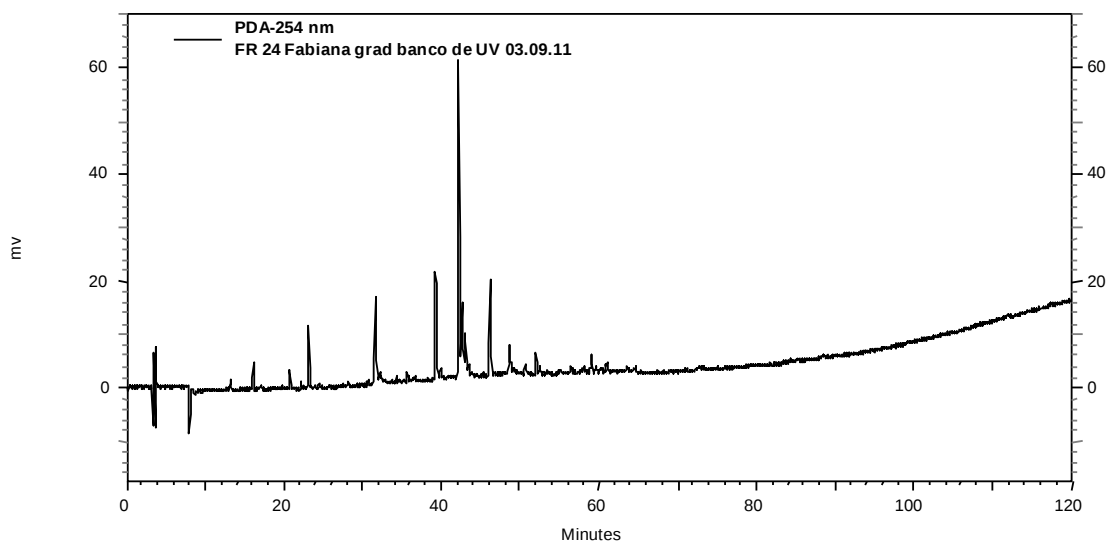
Figura 43 – Estrutura de **PGC 1**.



Identificação Estrutural PGC 2

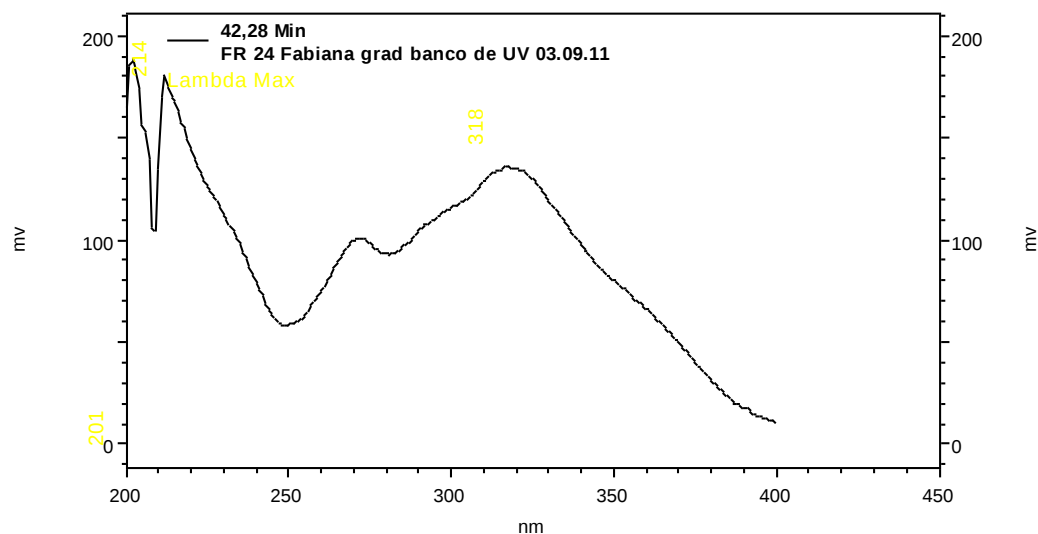
Esta substância foi obtida diretamente através do fracionamento por Sephadex LH-20. Análise de CCDC demonstrou a existência de uma mistura de flavonoides. O experimento HPLC-UV-PDA, (Figura 44) desta fração evidenciou tratar-se de uma mistura de flavonoides, tendo como substância majoritária a substância com $T_r = 42,5$ min.

Figura 44 - Cromatograma por HPLC-UV-PDA de **PGC 2**. Coluna Synergi Hidro Phenomenex, volume de injeção: 15 μ L, fase móvel: água/metanol, gradiente exploratório de 5 a 100% de MeOH por de 120 minutos.



O espectro na região do UV (Figura 45) do pico referente ao $T_r = 42,2$ minutos apresentou bandas típicas de um flavonoide derivado do kaempferol com $\lambda_{\text{máx}}$. 256 e 325 nm (MABRY *et al.*, 1970).

Figura 45 – Espectro no UV de **PGC 2**.



Identificação Estrutural PGC 2 A

O espectro de massas *full scan*, modo negativo, mostrou um pico a m/z 623 correspondente a $[M - H]^-$, sugerindo a fórmula molecular $C_{31}H_{28}O_{14}$. Estudo de fragmentações foram apresentados no item 6 (Tabela 3).

O espectro de RMN 1H (Figura 48, Tabela 7) indicou a presença de um grupo OH δ 12,7, devido à ligação de hidrogênio do H-5 com a carbonila em C-4. Apresentou, ainda, dois sinais de hidrogênios em região de alta frequência, um em δ 7,93 (2H, *d*, $J = 9,0$ Hz), e outro δ 6,76 (2H, *d*, $J = 9,0$ Hz), que foram atribuídos aos hidrogênios 2''/6'' e 3''/5'', respectivamente, do anel B. O singlete em δ 6,49 foi atribuído ao H-8 (MABRY & ULUBELEN, 1980). O experimento *gHSQC* apresentou todas as correlações à 1J de hidrogênios com seus respectivos carbonos (Figuras 49-51).

Observaram-se, ainda, outros sinais de hidrogênios na região de alta frequência em δ 7,34 (2H, $J = 8,5$ Hz) e em δ 6,85 (2H, *d*, $J = 8,5$), típicos de H-2'''/6''' e H-3'''/5''' de uma unidade *p*-cumaroil, respectivamente. Os sinais de hidrogênios com configuração *trans* ($J = 16,0$ Hz) a δ 6,10 e δ 7,31 foram atribuídos ao H- α e H- β da unidade *p*-coumaroil (HARBORNE, 1996). O sinal δ 5,41 ($J = 7,5$ Hz) foi atribuído a uma unidade de D-glicose com configuração- β . O sinal de

hidrogênio em região de frequência baixa a δ 3,70 (3H, s) indica a presença de um grupo metoxila. O deslocamento químico dos sinais de H_a e H_b (δ 4,28 e δ 4,16) sugere a localização da unidade *p*-cumaroil no C-6 da glicose. Esta evidência foi confirmada com o experimento *g*HMBC (Figuras 52-56), que mostrou correlação entre os sinais dos hidrogênios δ 4,28 e δ 4,16 com o carbono em δ 169,0, atribuídos ao grupo carbonila da unidade *p*-cumaroil. O espectro HMBC mostrou, ainda, correlação entre o sinal protônico em δ 5,41 com o carbono em δ 135,0 (C-3), evidenciando assim a localização do açúcar na posição C-3 da aglicona. O experimento COSY (Figuras 57 e 58), juntamente com o TOCSY (Figura 59), confirmou a sequência dos hidrogênios.

O espectro *g*HMBC (Figura 52), evidencia a importante correlação entre os sinais dos hidrogênios da metoxila em δ 3,70 com o carbono em δ 131,8, confirmando a localização desta metoxila na posição C-6 da aglicona do flavonoide.

Ho e Chen, (2002) identificaram em *Eriocaulon buergerianum*, um flavonoide acil glicosilado, porém derivado da apigenina, conhecido por hispidulina 7-(6-*E-p*-cumaroil- β -D-glicopiranosídeo). Os dados de RMN desta substância foram comparados com os da substância PGC 2, isolados de *P. chiquitensis* (Tabela 7). Encontramos diferenças nos deslocamentos químicos dos carbonos do anel A, evidenciando que a substância PGC 2 é um derivado do kaempferol. Andrade *et al.*, (1999), identificou nos extratos de *Paepalanthus* um flavonoide acil glicosilado (Tabela 7), que posteriormente foi também identificado por HPLC-RMN nos extratos de *P. polyanthus* por Santos *et al.* (2002), e de *P. geniculatus* por Amaral *et al.*, 2012. Portanto, com base nessas evidências, esta substância foi determinada como sendo 6-metoxikaempferol-3-*O*- β -D-(6'''-*E-p*-cumaroil)-glicopiranosídeo (Figura 30).

Identificação Estrutural PGC 2 B

Outra substância em mistura, apresentada nesta fração, apresentou diferenças de sinais no espectro de RMN de ^1H na região de hidrogênios aromáticos (Tabela 7, Figura 48) em δ 7,55 (1H, dd, 2,0 e 8,0 Hz), que foi atribuído a H-2'; em δ 7,51 (1 H, dd, 2,0 e 8,0 Hz), atribuído a H-6' e em δ 6,76 (1 H, d, 8,5), atribuído ao H-

5' do anel B do flavonoide, evidenciando tratar-se de um derivado da quercetina. O espectro *g*HSQC (Figuras 49 a 51), mostrou diferenças significativas também no deslocamento químico de ^{13}C , quando comparada ao flavonoide acima descrito em mistura. O carbono referente à posição 2', apresentou deslocamento químico em $\delta 116,4$; C-3' em $\delta 147$ e o C-6' em $\delta 121,6$ (menos blindados), típicos do anel B da quercetina. Outra diferença verificada foi quanto ao deslocamento químico de H-3' e do H-4' do anel B desta substância em $\delta 147,0$ e $149,0$ respectivamente, (mais blindados) quando comparados ao da substância em mistura $\delta 115,7$ e $160,0$, respectivamente. O singlete em $\delta 3,82$, que apresenta no espectro *g*HMBC (Figuras 52-56) correlação com o carbono em $\delta 56,7$, evidencia que o derivado da quercetina apresenta uma metoxila na posição C-3'. Os demais deslocamentos químicos foram semelhantes ao derivado do kaempferol, sugerindo que esta substância também apresenta uma unidade *p*-coumaroil. Esta informação foi comprovada pela análise do espectro de massas *full scan*, modo negativo, que mostrou um pico a m/z 653 comprovando que esta substância possui a fórmula molécula $\text{C}_{32}\text{H}_{30}\text{O}_{15}$. Estudos de fragmentações desta substância foram apresentados no item 6 (Tabelas 3 e 4).

Portanto os dados desta substância e os existentes na literatura comprovam que a mesma é 6-3'-dimetoxiquercetina-3-*O*- β -D-6''(*p*-cumaroil)-glicopiranosídeo. Santos *et al.* (2002) identificaram um flavonoide derivado da quercetina acil glicosilado, porém não possuía a metoxila na posição C-3'. Sendo assim, esta substância está sendo descrita pela primeira vez na literatura (Figura 46).

Figura 46 – Estrutura da mistura de flavonoides de **PGC 2**.

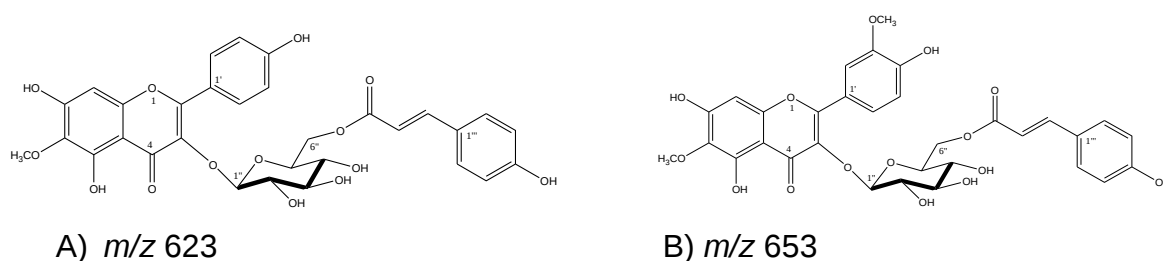


Tabela 7 – Deslocamentos químicos de RMN ^1H e ^{13}C de **PGC 2 (A e B)** (DMSO- d_6 , 11,7 T).

POSIÇÃO	^1H	$^{13}\text{C}^*$	^1H	$^{13}\text{C}^*$	^1H	$^{13}\text{C}^*$
	Substância PGC 2 (A e B)		Ho e Chen, 2002		Andrade <i>et al.</i> , 1999 e Santos <i>et al.</i> , 2002	
2	-	156,4		164,5	-	156,9
3	-	132,6	3,90 s	102,7	-	132,8
4	-	**		182,4	-	177,8
5	-	152,5		152,7	-	151,8
6	-	131,6		132,6	-	131,5
7	-	157,4		156,3	-	157,9
8	6,49 (s)	94,6	7,08 s	94,4	6,49 s	94,2
9	-	152,2		152,2	-	152,4
10	-	104,8		106,0	-	104,3
1'	-	121,0		121,2	-	121,0
		121,1***				
2'	7,96 d (9,0)	131,0	8,02 d (8,4)	126,6	7,98 d (8,0)	131,0
	7,55 dd (8,5, 2,0)***	116,4***				
3'	6,85 d (9,0)	115,4	7,00 d (8,4)	115,9	6,85 d (8,0)	115,3
	-	147,0***				
4'	-	160,0	-	161,5	-	160,2
	-	149,0***				
5'	6,85 d (9,0)	115,4	7,00 d (8,4)	115,9	6,85 d (8,0)	115,3
	6,76 d (8,5)***					
6'	7,96 d (9,0)	131,0	8,02 d (8,4)	126,6	7,98 d (8,0)	131,0
	7,51 dd (8,5, 2,0)***	121,6***				
glicose	-				-	
1"	5,43 d (7,5)		5,30 d (8,4)	100,0	5,43 d (7,0)	101,2
2"	3,37 dd (9,0, 7,5)	73,4	3,50 m	73,2	3,2-3,9 sob	74,3
3"	3,48 dd (9,0; 9,0)	76,8	3,50 m	76,6	3,2-3,9 sob	76,3
4"	3,27 dd (9,0; 9,0)	69,8	3,39 m	70,4	3,2-3,9 sob	70,1
5"	3,29 m	75,6	3,96 t (8,4)	74,1	3,2-3,9 sob	74,3
6a"	4,24 dd (6,0; 10,0)	62,8	4,30 dd (1,2;	63,7	4,20 d (10,0)	63,1
6b"	4,02 dd (5,0; 12,0)		7,6)		4,00 m	
			4,57 d (11,2)			
OH-5	12,8 sL	-	13,05 sL	-	13,0	-
OCH3-6	3,70 s	60,0		60,6	3,70 s	60,1
OCH3-3'	3,82***	56,7***				
p-cumaroil						
1'''	-	125,0	-	125,0	-	125,0
2'''/6'''	7,36 d (8,5)	130,0		130,0	7,37 d (8,0)	130,6
3'''/5'''	6,78 d (8,5)	116,2	6,66 d (8,4)	116,2	6,78 d (8,0)	116,0
4'''	-	159,4	-	159,8	-	159,9
α	6,10 d (16,0)	114,5	7,54 d (15,6)	113,7	6,14 d (16,0)	113,8
β	7,31 d (16,0)	144,4	6,36 (15,6)	145,2	7,35 d (16,0)	144,8
9 (C=O)		166,2		166,7		166,0

*Sinais atribuídos segundo experimento gHSQC e gHMBC/ ** Sinais não observados/***sinais de deslocamentos químicos diferenciados de PGC 2 B

Identificação Estrutural PGC 2 (C) m/z 639

A outra substância em mistura presente na Fração 24 (**PGC 2**) apresentou no espectro ESI-MS, modo negativo, *full scan*, o íon precursor em m/z 639 (Figura 31). A discussão do padrão de fragmentação desta substância está no item 6, Tabela 3, Figura 31. Os espectros de RMN mono e bidimensionais (Figuras 48 a 59) apresentaram todas as correlações que possibilitaram propor a estrutura de um flavonoide derivado da quercetina (Tabela 8).

Esta substância já foi isolada de outras espécies e *Paepalanthus* e sua estrutura foi determinada como sendo 6-metoxiquercetina-3-*O*- β -D-glicopiranosil-(6 $\rightarrow$ 1)- α -L-ramipiranosídeo (Figura 47). A tabela 8 apresenta os sinais de deslocamentos químicos de RMN de ^1H e de ^{13}C e seus dados foram comparados com os da literatura (SANTOS *et al.*, 2001).

Figura 47 – Estrutura de **PGC 2 C**– m/z 639.

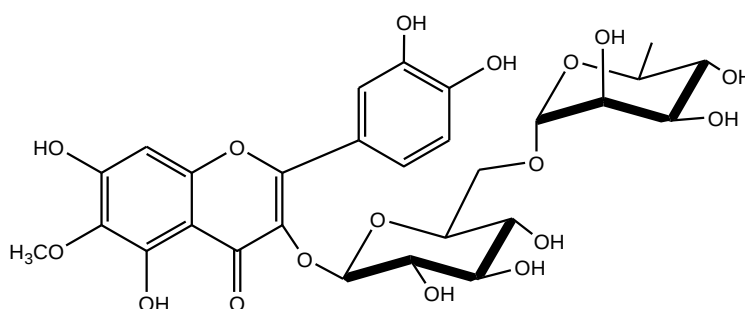


Tabela 8 – Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C de **PGC 2 C** (DMSO-d_6 , 11,7 T).

POSIÇÃO	SANTOS <i>et al.</i> , 2001 (CD_3OD)		PGC 2 C	
	RMN ^{13}C	RMN ^1H	RMN ^1H	RMN ^{13}C
2	158,8			158,0
3	135,0			134,7
4	179,7			179,4
5	153,8			153,5
6	132,6			132,3
7	159,7			159,2
8	95,0	6,55 s	6,49 s	95,0
9	154,2			154,0
10	106,1			106,0
1'	123,0			123,2
2'	117,4	7,70 d (1,4)	7,70 d (2,0)	117,0
3'	146,5			146,1
4'	149,2			149,0
5'	115,4	6,90 d (7,5)	6,85 d (8,5)	115,1
6'	123,3	7,64 dd (1,4; 7,5)	7,55 dd (2,0; 8,5)	123,1
	60,0			
Glicose				
1''	104,1	5,44 d (7,5)	5,30 d (7,5)	104,0
2''	75,4	3,50 dd (7,5; 9,5)	3,50 dd (7,5; 9,5)	75,2
3''	77,8	3,43 dd (9,0; 9,0)	3,40 dd (9,0; 9,0)	77,6
4''	70,9	3,28 dd (9,0; 9,0)	3,20 dd (9,0; 9,0)	70,6
5''	76,8	3,35 ddd (2,5; 5,0; 9,0)	3,32 ddd (2,5; 5,0; 9,0)	76,6
6a''	68,1	3,42 dd (12,5; 5,0)	3,40 dd (12,5; 5,0)	68,0
6b''		3,84 dd (12,5; 2,5)	3,80 dd (12,5; 2,5)	
Ramnose				
1'''	101,9	4,56 d (1,5)	4,52 d (1,5)	101,2
2'''	71,7	3,65 dd (1,5; 2,5)	3,60 dd (1,5; 2,5)	71,5
3'''	71,8	3,56 dd (2,5; 8,6)	3,54 dd (2,5; 8,6)	71,6
4'''	73,5	3,31 t (8,4)	3,30 t (8,4)	73,0
5'''	69,2	3,44 m	3,43 m	69,0
6'''	18,2	1,22 d (6,5)	1,21 d (6,5)	17,7

Figura 48 – Espectro de RMN de ^1H de PGC2 (em $\text{DMSO}-d_6$, 11,7 T).

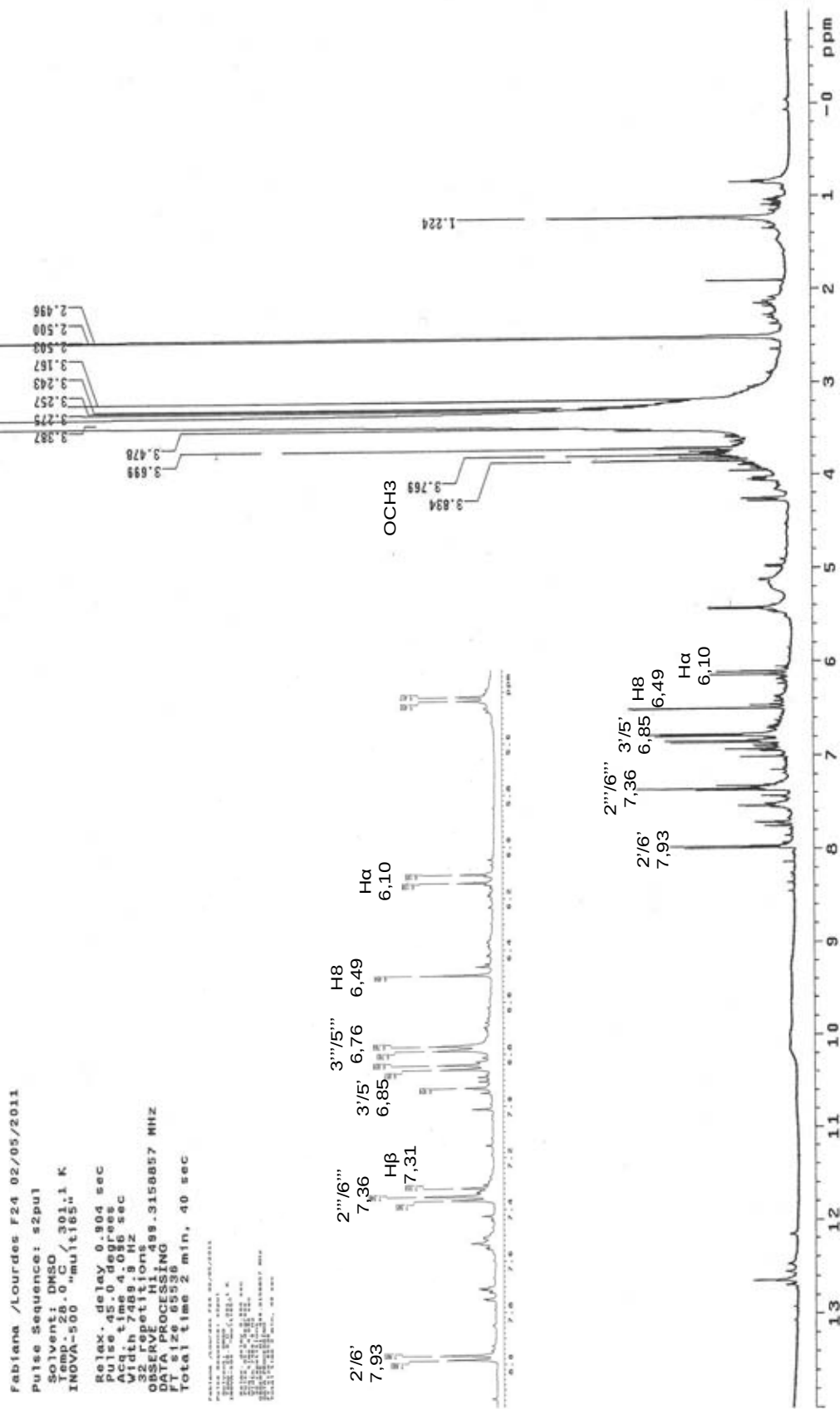


Figura 49 - Espectros de gHSQC de **PGC 2**, (11,7 T, DMSO-d₆, TMS, δ).

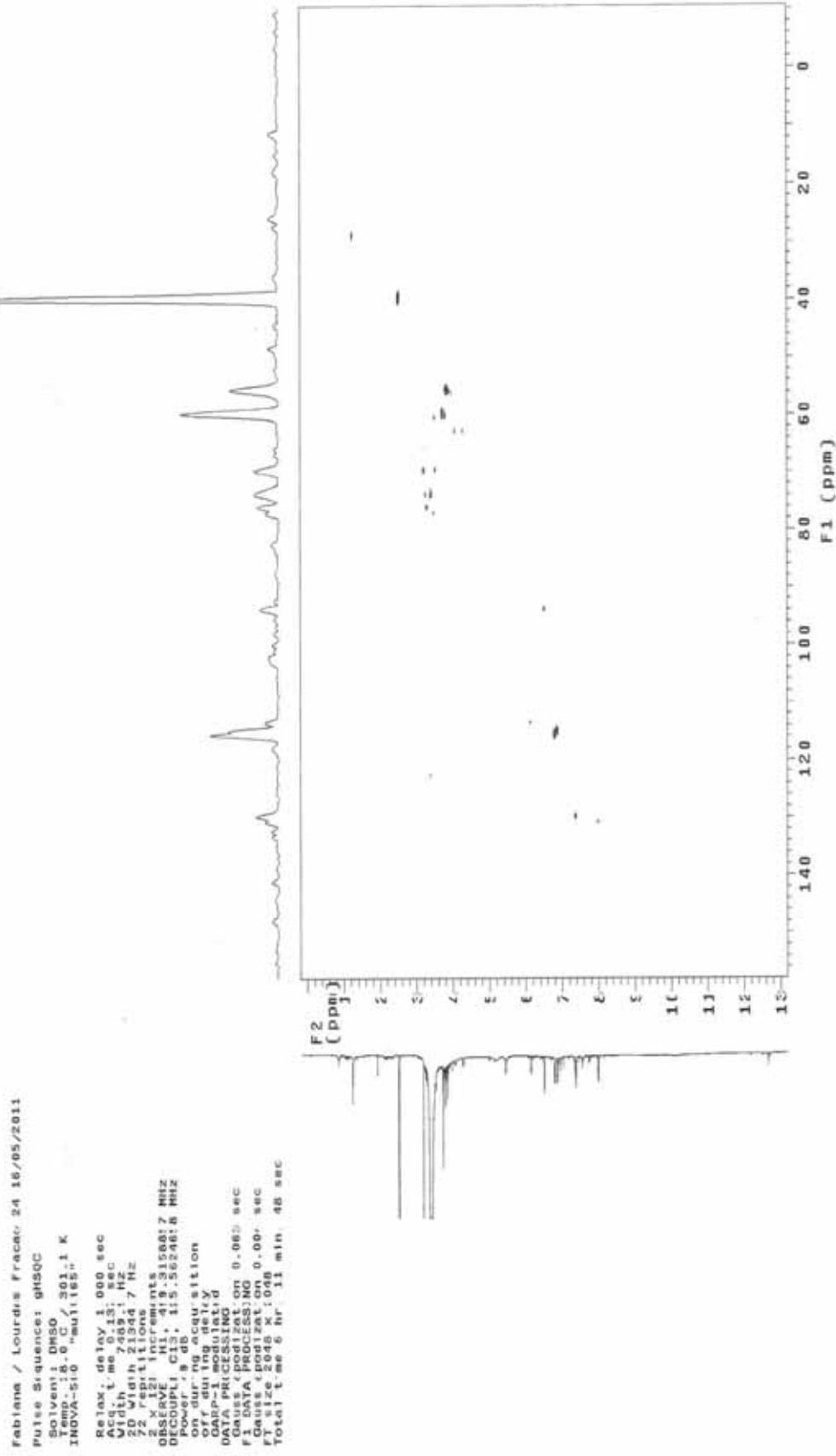


Figura 50 - Espectros de gHSQC de **PGC 2**, (região ampliada δ 95 a 145) (11,7 T, DMSO- d_6 , TMS, δ).

Fabiana / Lourdes Fracal: 24/10/05/2011

Pulse Sequence: gHSQC

Solvent: DMSO

Temp.: 18.0 C / 361.1 K

INNOVA-500 "nu:165"

Relax. delay: 1.000 sec

Acq. time: 0.13 sec

Width: 2199.7 Hz

2 x 121 increments

OBSERVE: H1, 419.3158817 MHz

DECOUPLE: C13, 115.5624619 MHz

Acquire during delay

off during delay

GARP-1 modulation

DATA PROCESSING

Gauss: 1.000000000

Phase: 0.000000000

Gauss: 1.000000000

FT size: 2048 x 1048

Total time: 5 hr 11 min 48 sec

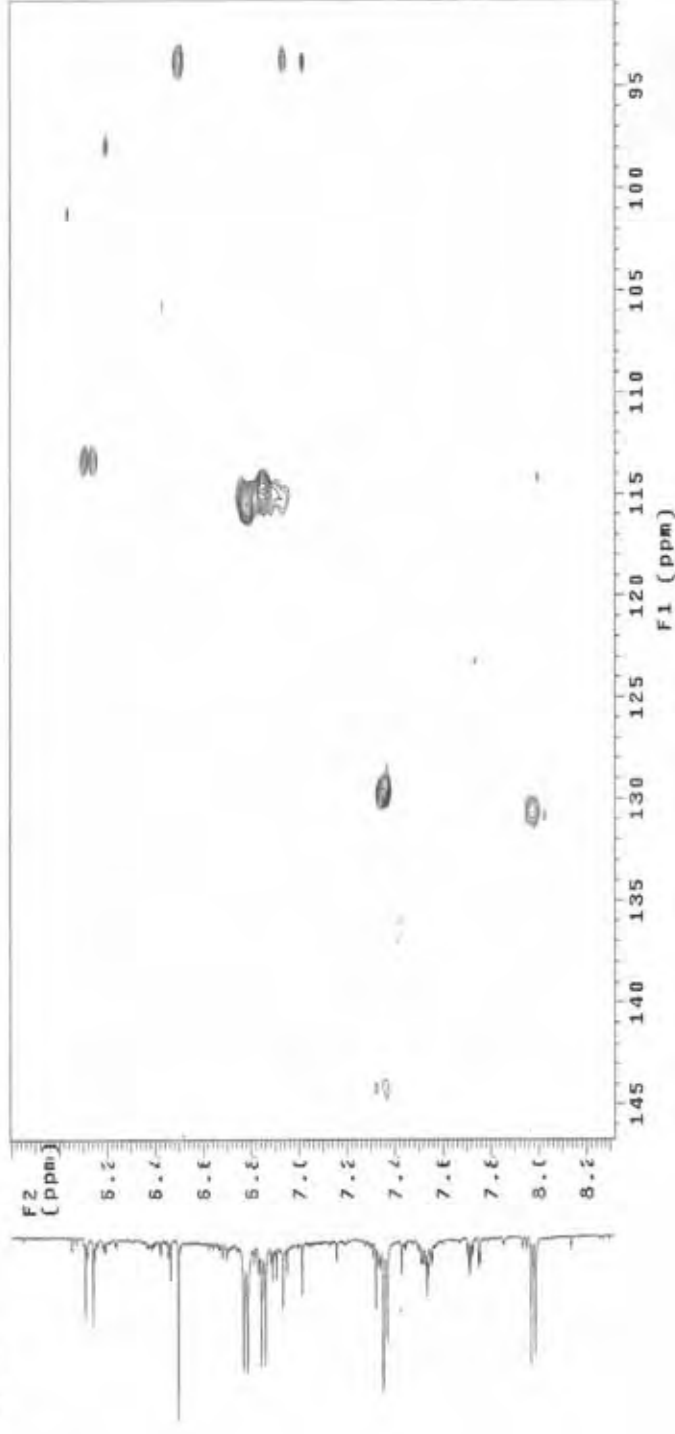


Figura 51 - Espectros de gHSQC de **PGC 2**, (região ampliada δ_{78} a 56) (11,7 T, DMSO- d_6 , TMS, δ).

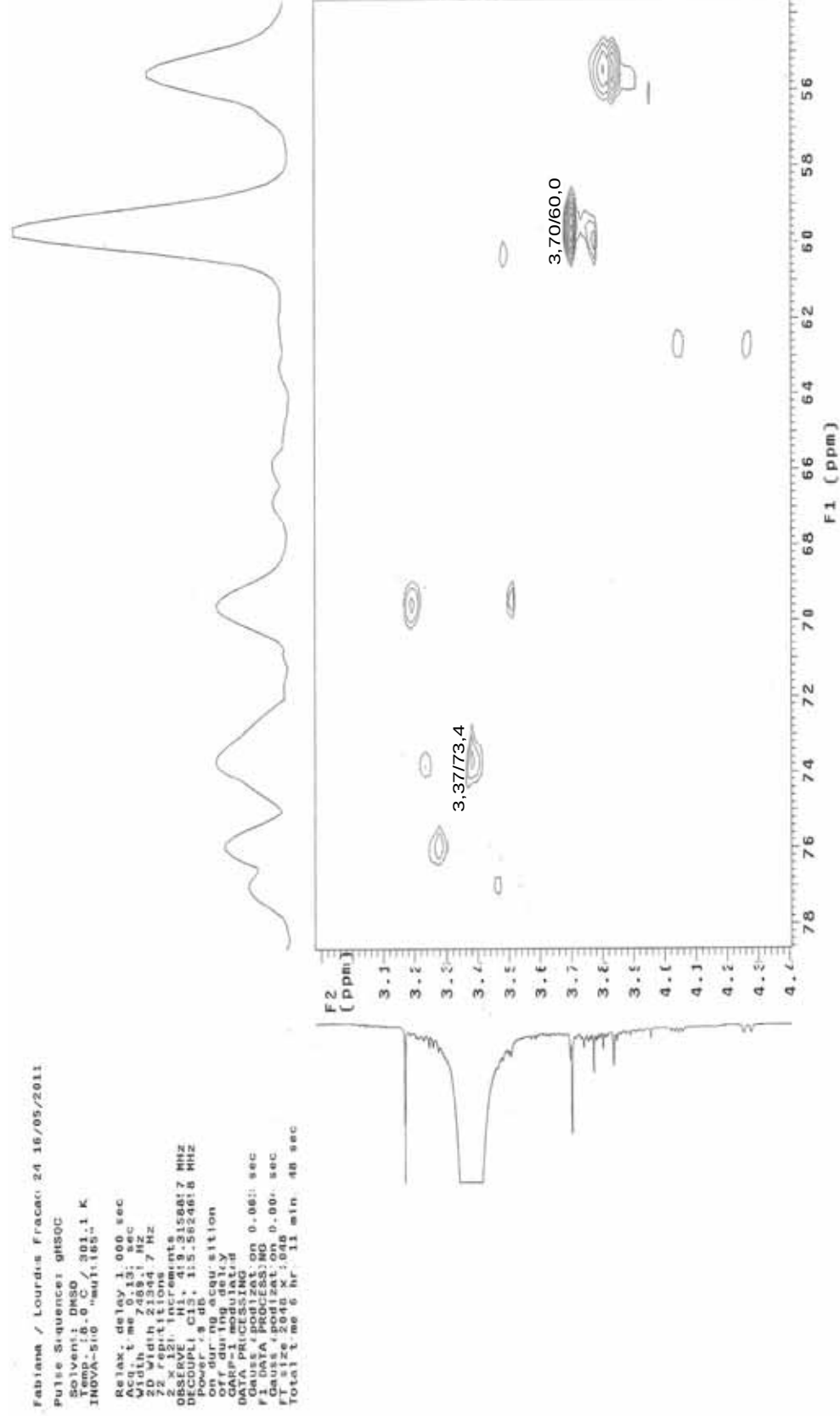
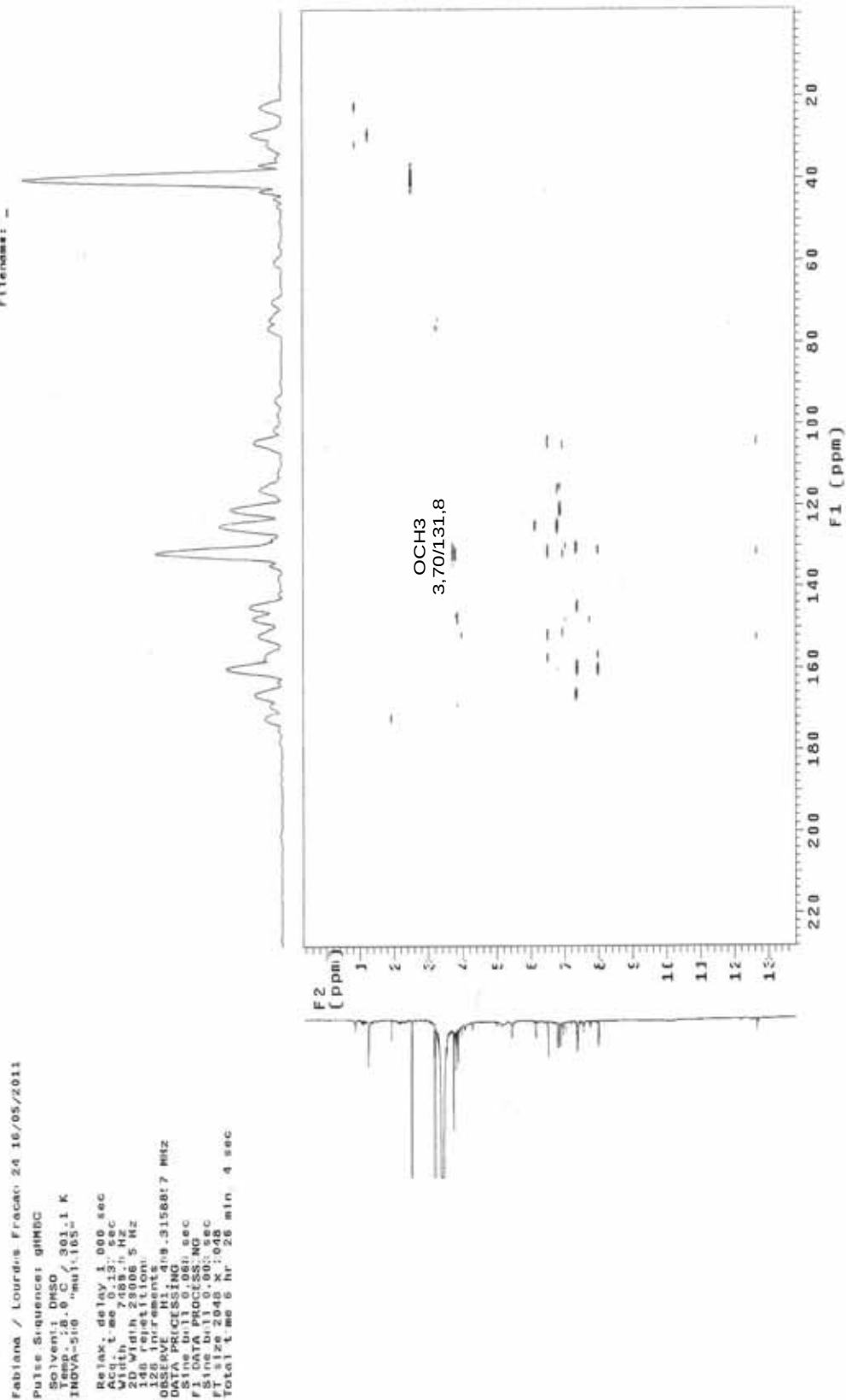


Figura 52- Espectros de gHMBC de PGC 2, (11,7 T, DMSO-d₆, TMS, δ).



Fabiana Volpe Zanutto – Dissertação de Mestrado

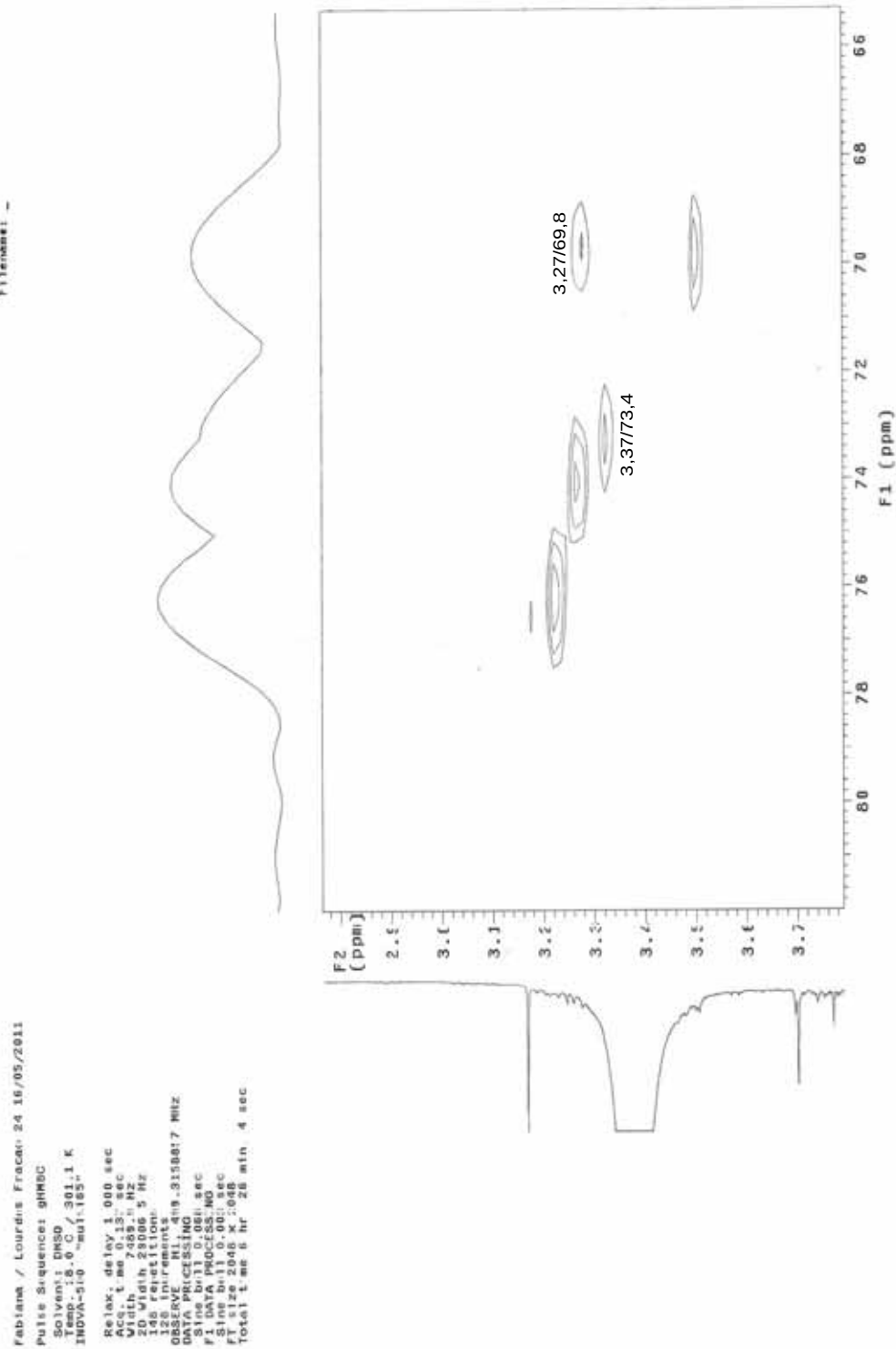


Figura 54 - Espectros de gHMBC de PGC 2, (região ampliada δ 126 a 154) (11.7 T, DMSO- d_6 , TMS, δ).

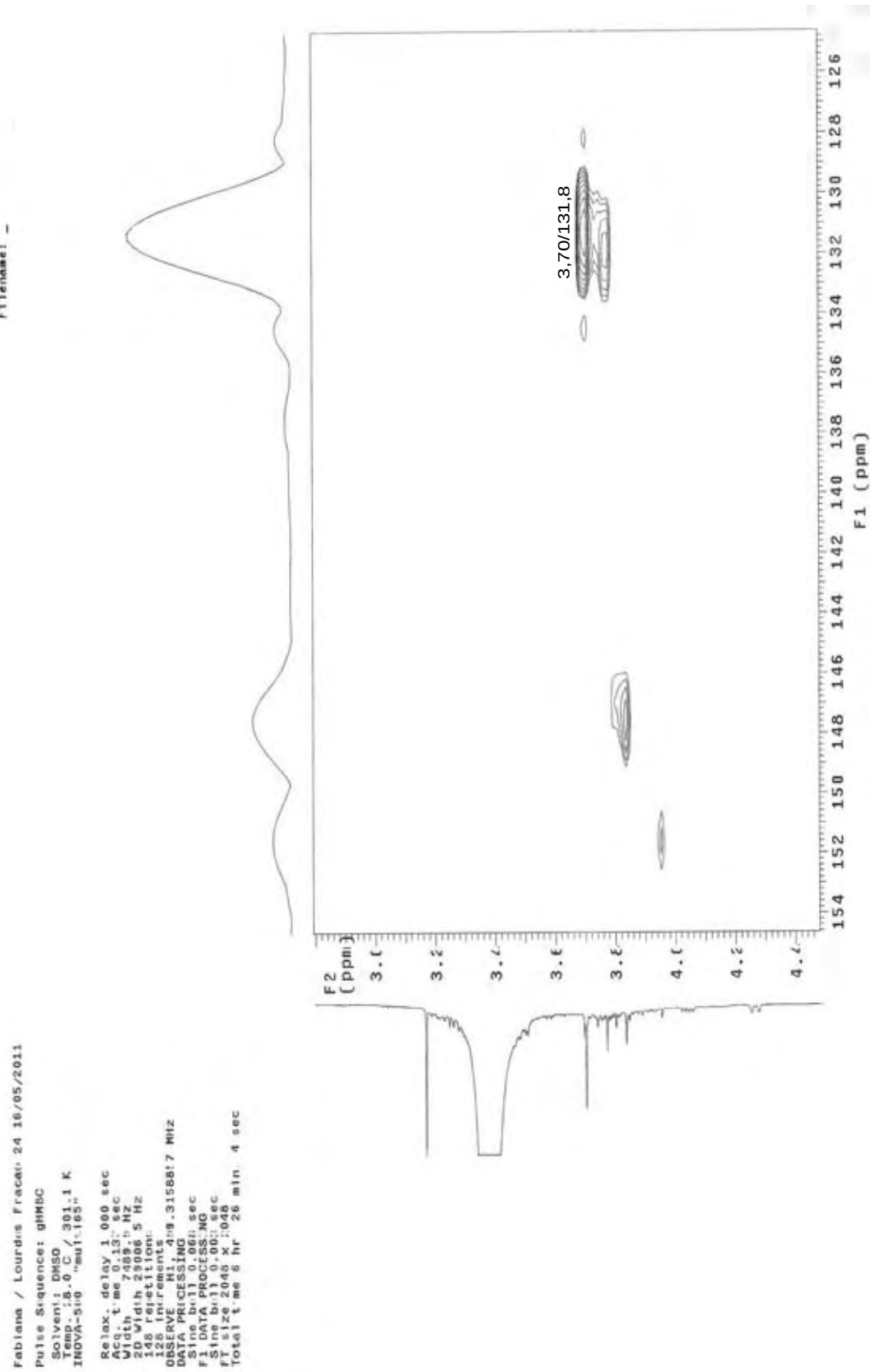


Figura 56 - Espectros de gHMBC de **PGC 2**, (região ampliada δ 105 a 135) (11,7 T, DMSO- d_6 , TMS, δ).

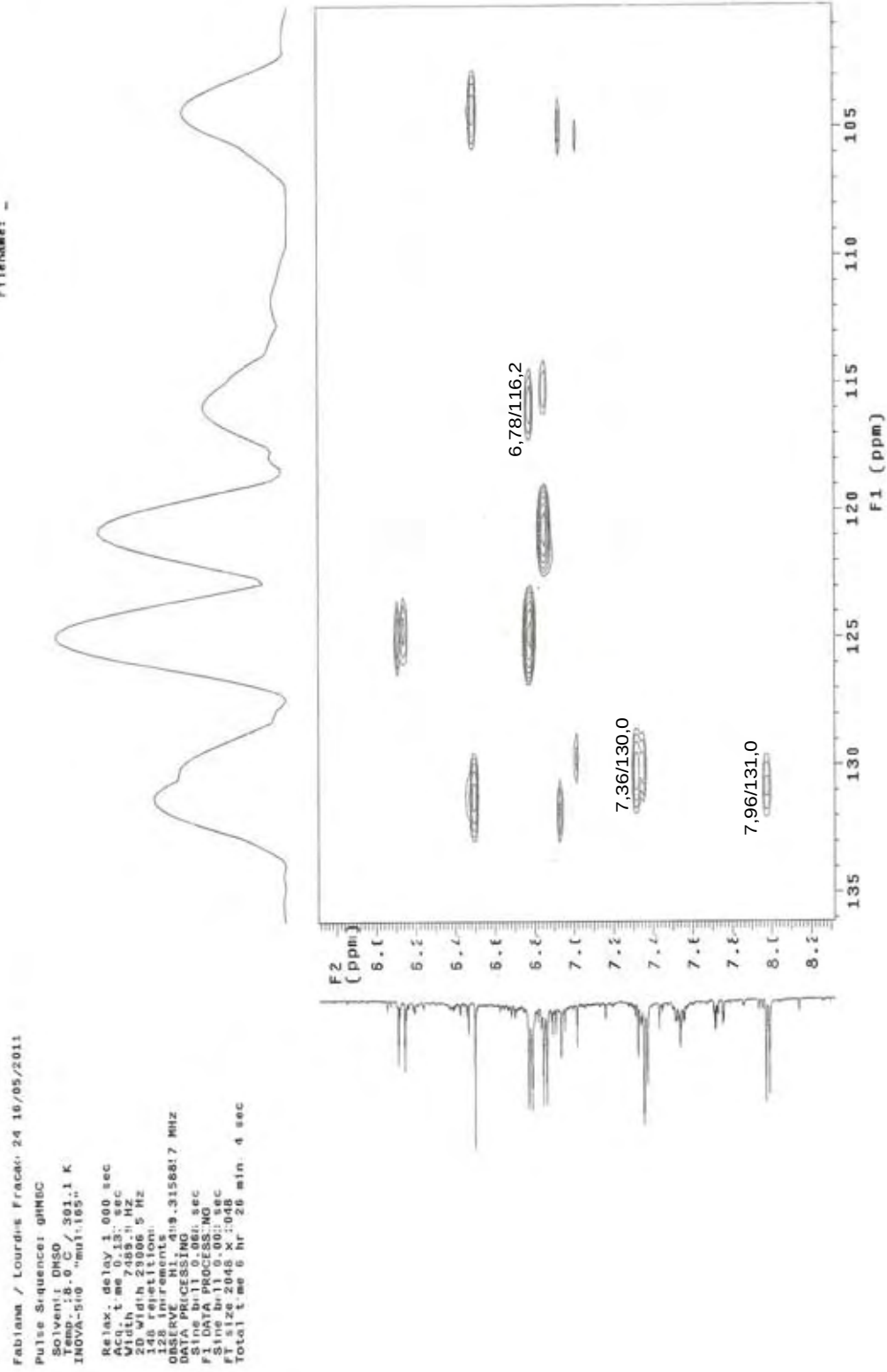
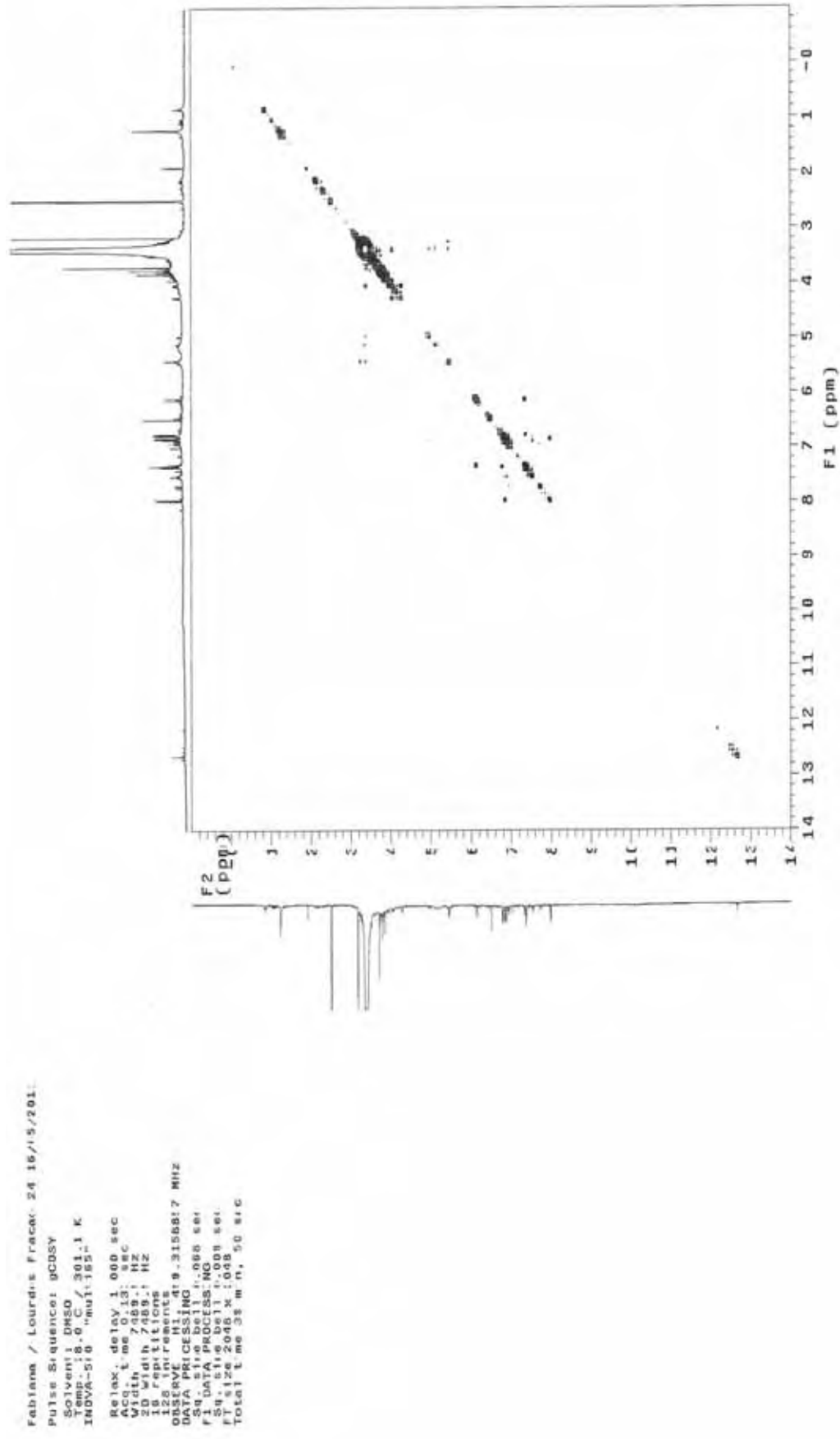
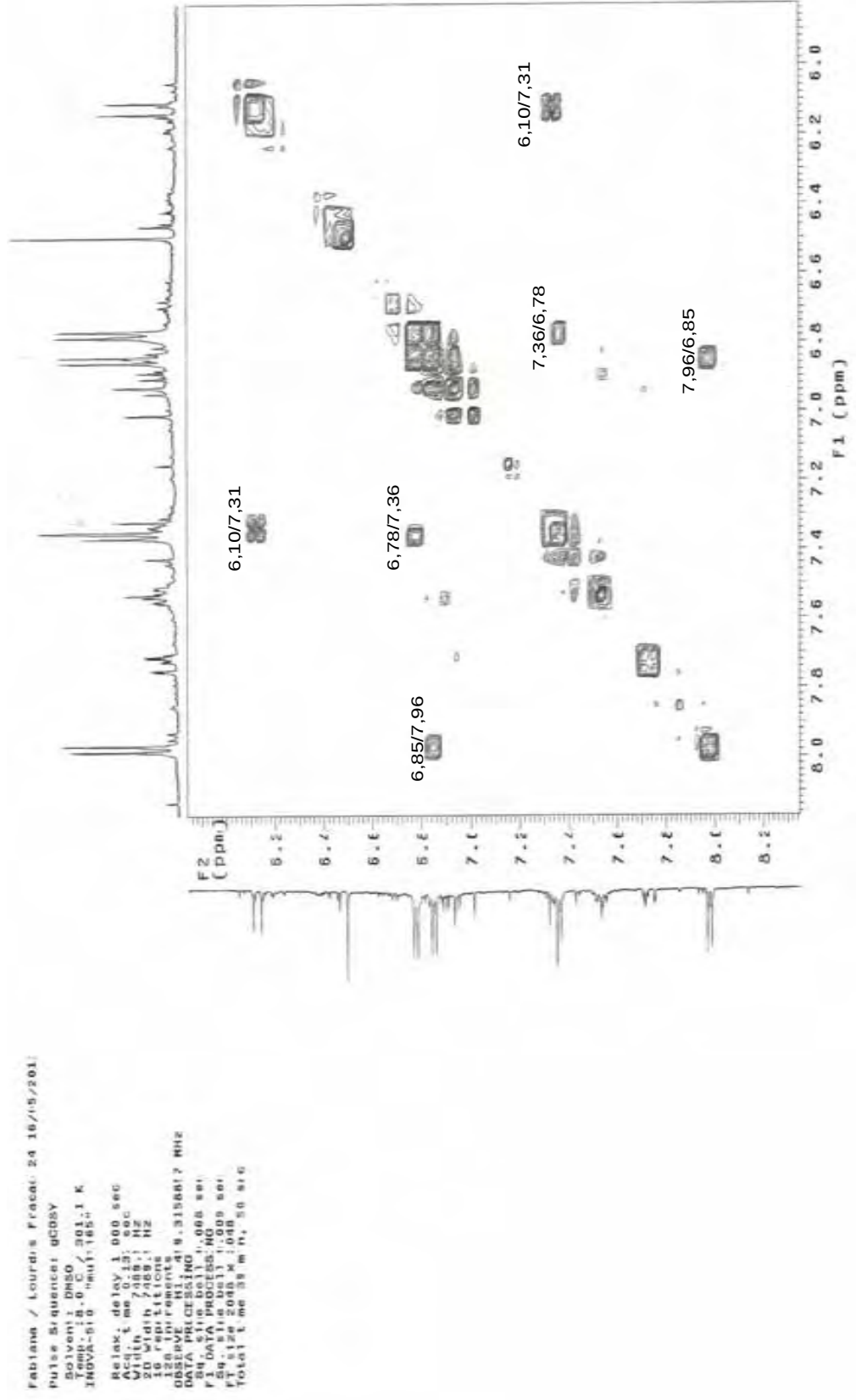


Figura 57 - Espectros de gCOSY de **PGC 2**, (11,7 T, DMSO-d₆, TMS, δ).



Fabiana Volpe Zanutto – Dissertação de Mestrado

Figura 58 - Espectros de gCOSY de **PGC 2**, (região ampliada δ 6,0 a 8,0) (11,7 T, DMSO- d_6 , TMS, δ).



Fabiana Volpe Zanutto – Dissertação de Mestrado

Figura 59- Espectros de TOCSY-1D de **PGC 2**, (11,7 T, DMSO-d₆, TMS, δ)



Identificação Estrutural PGC 3 (Fração 5n6) m/z 831

Um derivado da apigenina contendo uma unidade de galoil triglicosilado foi identificado no cromatograma HPLC/MS ($T_r = 26,94$ min) e está discutido no item 6, Tabela 4, Figura 18.

No espectro de RMN de ^1H da substância **PGC 3** (Figura 61), os sinais em δ 7,96 (2H, d , $J = 8,0$ Hz) e em δ 6,95 (2H, d , $J = 8,0$ Hz) foram atribuídos aos hidrogênios 2'/6' e 3'/5' do anel B, respectivamente, típico de sistema aromático dissustituído. Os hidrogênios com deslocamentos químicos em 6,42 (1H, d , $J = 2,0$ Hz) e 6,85 (1H, d , $J = 2,0$ Hz) foram atribuídos aos H-6 e H-8 respectivamente do anel A. Observaram-se também sinais de hidrogênios em δ 6,79 e (2H, s_L). Este sinal apresentou correlações no mapa de contorno $g\text{HMBC}$ (Figuras 62 e 63) e com os carbonos (δ 112,5; 147,0; 121,2; 149,6 e 165,0), confirmando a presença de uma unidade de galoil. A localização de um grupo metoxila também foi confirmada pelo experimento $g\text{HMBC}$, pois o sinal em δ 3,74 (3H, s) apresentou correlação com o carbono em δ 161,0 ($\text{C4}'$).

A análise do espectro de RMN de ^1H (Figura 61, Tabela 9) na região dos açúcares, evidenciou sinais de hidrogênios anoméricos em δ 5,11 (1H, d , $J = 8,0$) 5,34 (1H, d , $J = 1,0$) e 5,16 (1H, d , $J = 7,0$). Os sinais no experimento TOCSY (Figura 67), possibilitaram sugerir duas unidades de arabinose com configurações α . O deslocamento químico (desblindado) do carbono anomérico em δ 108,0 sugeriu que uma das unidades de açúcares poderia ser uma apiose (Figura 69). No experimento TOCSY (Figura 67), foram confirmados os sistemas de spins de cada unidade de açúcar, pois o sinal irradiado em δ 5,11 mostrou transferência de coerência com os sinais em (δ 3,82; 3,70; 3,64; 3,38). Irradiação no sinal do hidrogênio em δ 5,34 (Figura 69) mostrou correlação com os sinais dos hidrogênios em (δ 3,74 e 3,38) e, finalmente, irradiação do hidrogênio em 5,16 mostrou sinal com os sinais dos hidrogênios em (δ 3,50; 3,46; 3,38 e 3,20). A sequência dos hidrogênios em cada sistema foi confirmada com o experimento COSY (Figura 66). Correlações a 1J com o experimento $g\text{HMQC}$ (Figuras 62 a 65) possibilitou atribuir os respectivos carbonos (Tabela 9). A desblindagem de C-7 (δ 164,0) sugere que este carbono esteja substituído. No espectro $g\text{HMBC}$ foram observadas as

correlações do hidrogênio anomérico da arabinose em δ 5,11 com o carbono da posição C-3" do galoil (δ 149,6). Este experimento também mostrou que a hidroxila em C2''' (δ 72,8) da arabinose estava substituída. Esta confirmação foi feita observando-se a correlação do hidrogênio da apiose em δ 5,34 com o carbono C2''' (72,8) da arabinose. Finalmente o experimento *g*HMBC mostrou a correlação do hidrogênio anomérico da arabinose δ 5,16 com o carbono da apiose em δ 79,0. Dessa forma, com os dados apresentados, esta substância foi identificada como 4'-metoxiapigenina-7-O-(3"-galoil)- α -D-arabinopiranosil-(2''' $\rightarrow$ 1''')-apiofuranosil (3''' $\rightarrow$ 1''')- α -D-arabinopiranosídeo (Figura 60). Esta substância está sendo identificada pela primeira vez na literatura.

Figura 60 – Estrutura de PGC 3.

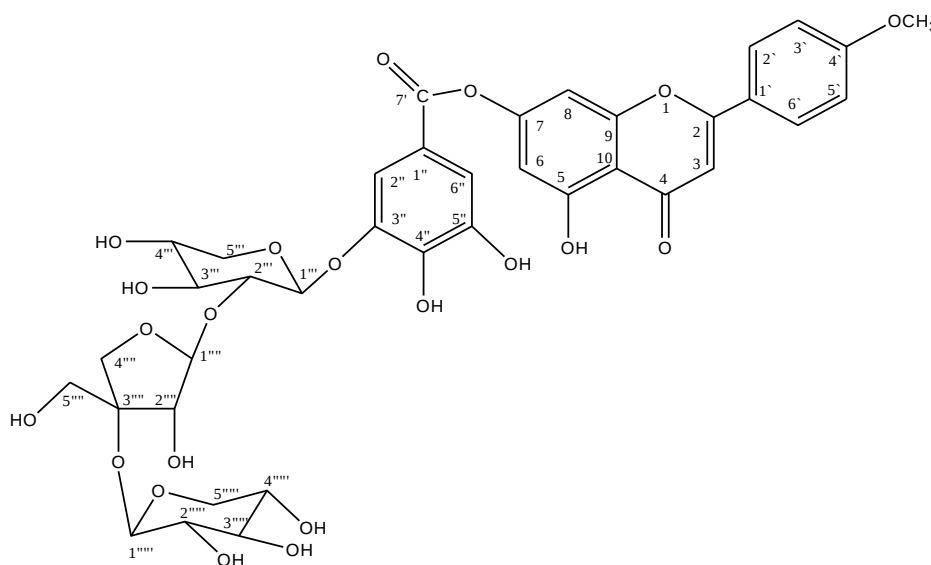


Tabela 9 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **PGC 3** (DMSO- d_6 , 11,7 T).

POSIÇÃO	^1H	$^{13}\text{C}^*$	$g\text{HMBC}$
2		164,1	
3	6,85 s	103,9	164,1; 121,2
4		180,0	
5		161,8	
6	6,42 d (2,0)	99,0	95,0; 164,2; 161,8
7		162,6	
8	6,85 d (2,0)	95,0	164,2; 99,0;
9		157,0	
10		105,0	
1'		121,0	
2'	7,96 d (8,0)	129,3	129,3; 116,5; 161,0
3'	6,95 d (8,0)	116,5	
4'		161,0	
5'	6,95 d (8,0)	116,5	
6'	7,96 d (8,0)	129,3	129,3; 116,5; 161,0
OCH3-4'	3,74 s	56,0	
Galoil			
1"		121,2	
2"	6,79 sL	112,0	112,5; 147,0; 121,2; 149,6; 165,0
3"		149,6	
4"		139,0	
5"		147,0	
6"	6,79 sL	112,5	112,5; 147,0; 121,2; 149,6; 165,0
7' (C=O)		165,0	
Ara (1''')			
1'''	5,11 d (8,0)	98,0	149,6
2''' (1''' Api)	3,82 dd (8,5; 8,5)	72,8	
3'''	3,70	76,7	
4'''	3,64 m	74,6	
5'''	3,38	72,8	
	3,00		
Api			
1'''	5,34 d (1,0)	108,0	74,6
2'''	3,74 d	76,7	
3''' (1Ara)	-	79,0	
4'''	3,64 dd	70,4	
	3,38 dd		
5'''	3,32 dd	64,9	
	3,73 dd		
Ara			
1''''	5,16 d (7,0)	97,0	
2''''	3,46 dd	72,8	
3''''	3,50 dd (9,0; 7,5)	69,4	
4''''	3,20 m	71,6	
5''''	3,38 dd	62,5	
	2,99 dd		

- Atribuições baseadas nas correlações $g\text{HSQC}$ e $g\text{HMBC}$

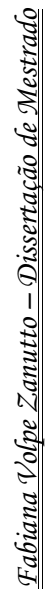


Figura 62 - Espectro de gHMQC de **PGC 3**, (11,7 T, DMSO- d_6 , TMS, δ).

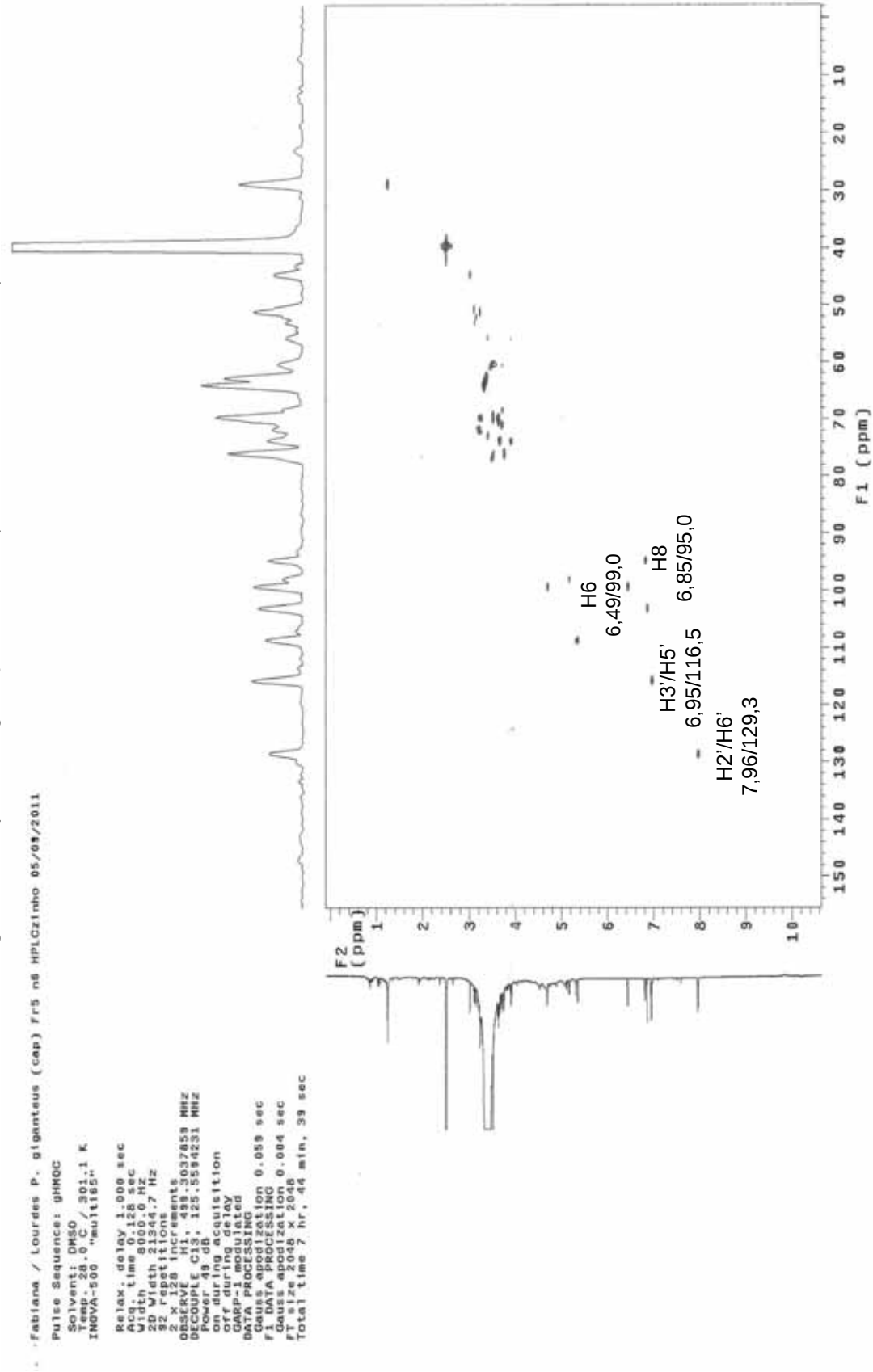


Figura 63 - Espectro de gHMQC de PGC 3 (região ampliada δ 78 a 60) (11,7 T, DMSO- d_6 , TMS, δ).

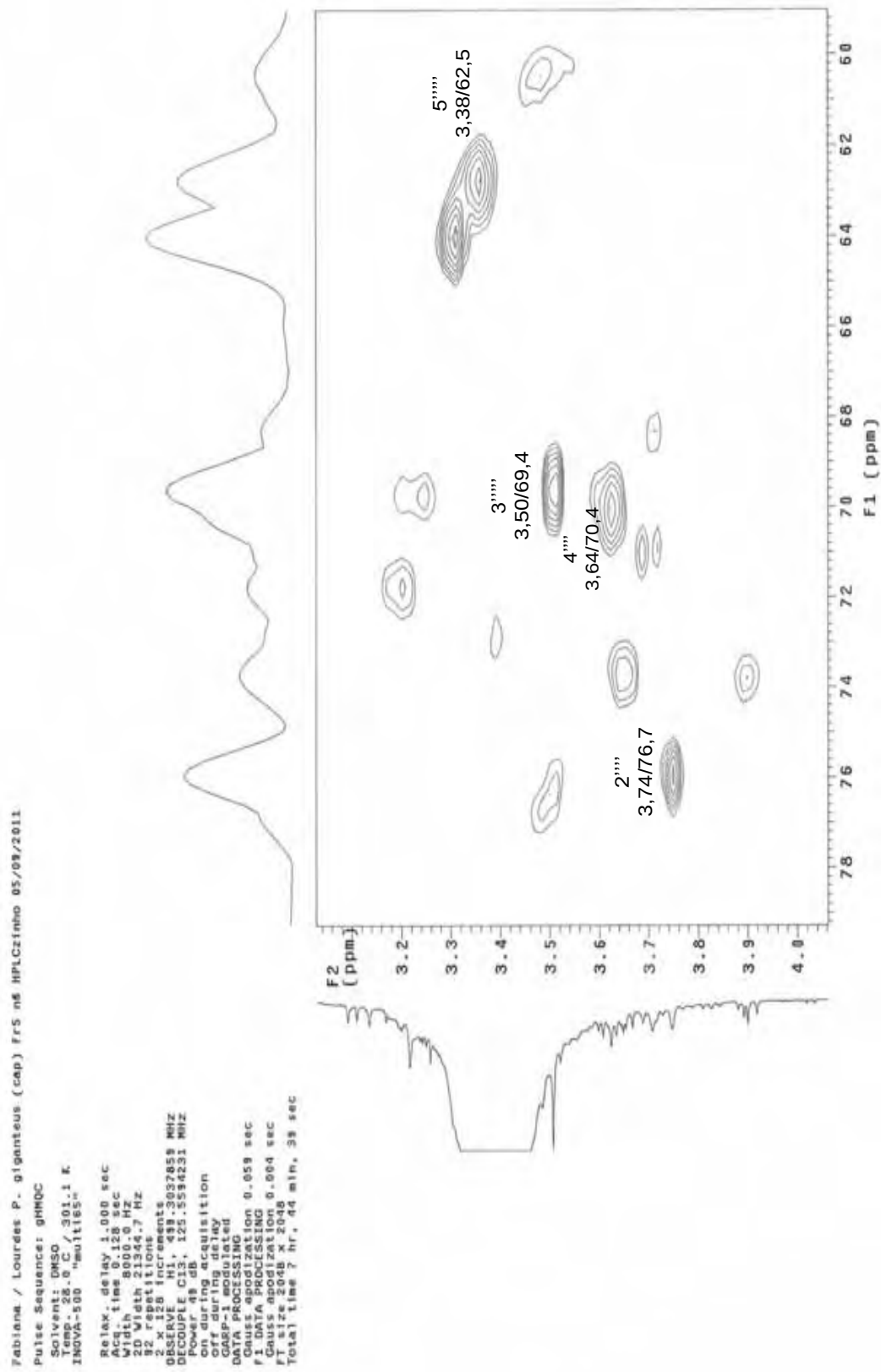


Figura 64 - Espectro de gHMBC de PGC 3 (11.7 T, DMSO-d₆, TMS, δ).

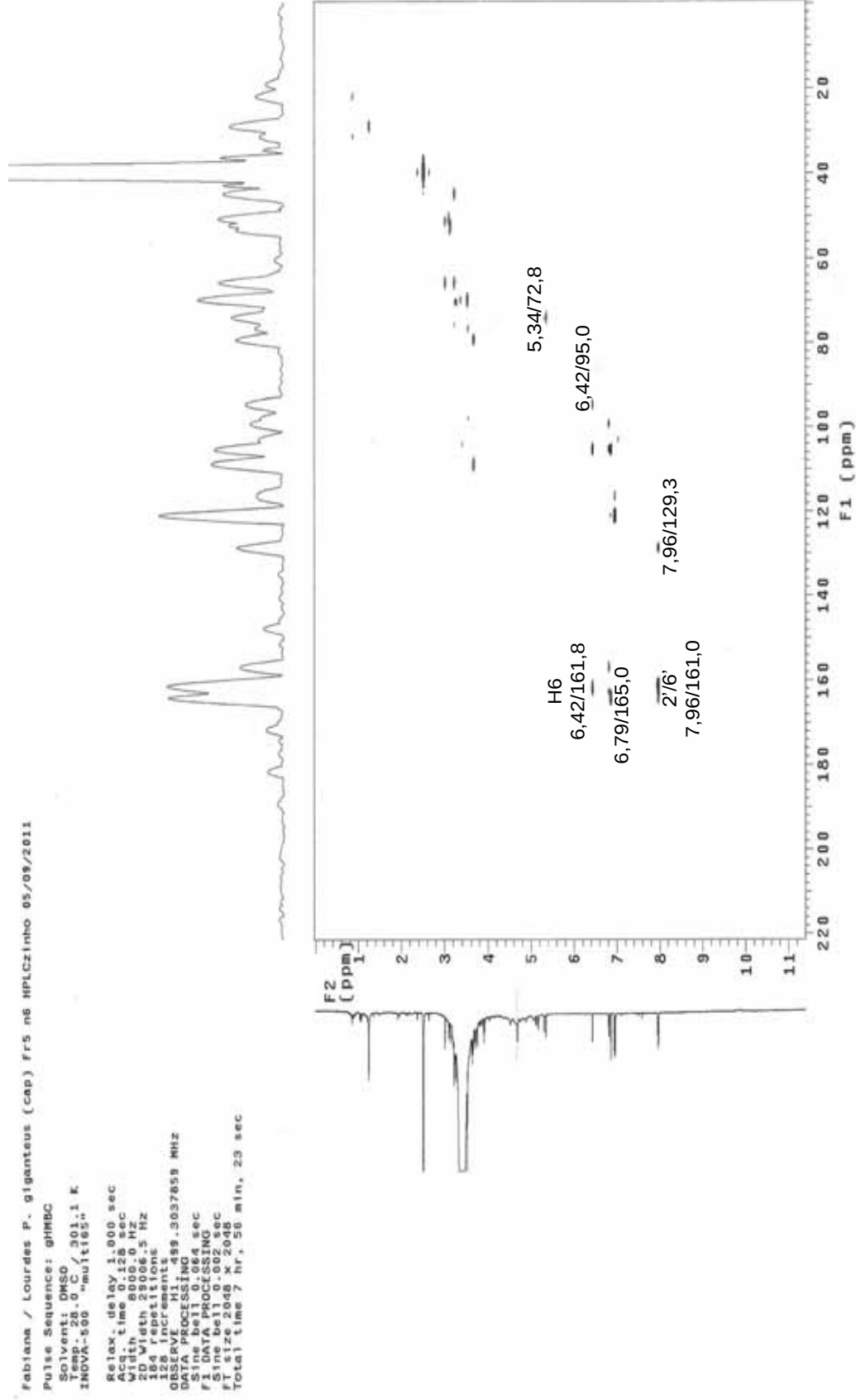


Figura 65 - Espectro de gHMBC de **PGC 3** (região ampliada δ 130 a 95) (11,7 T, DMSO- d_6 , TMS, δ).

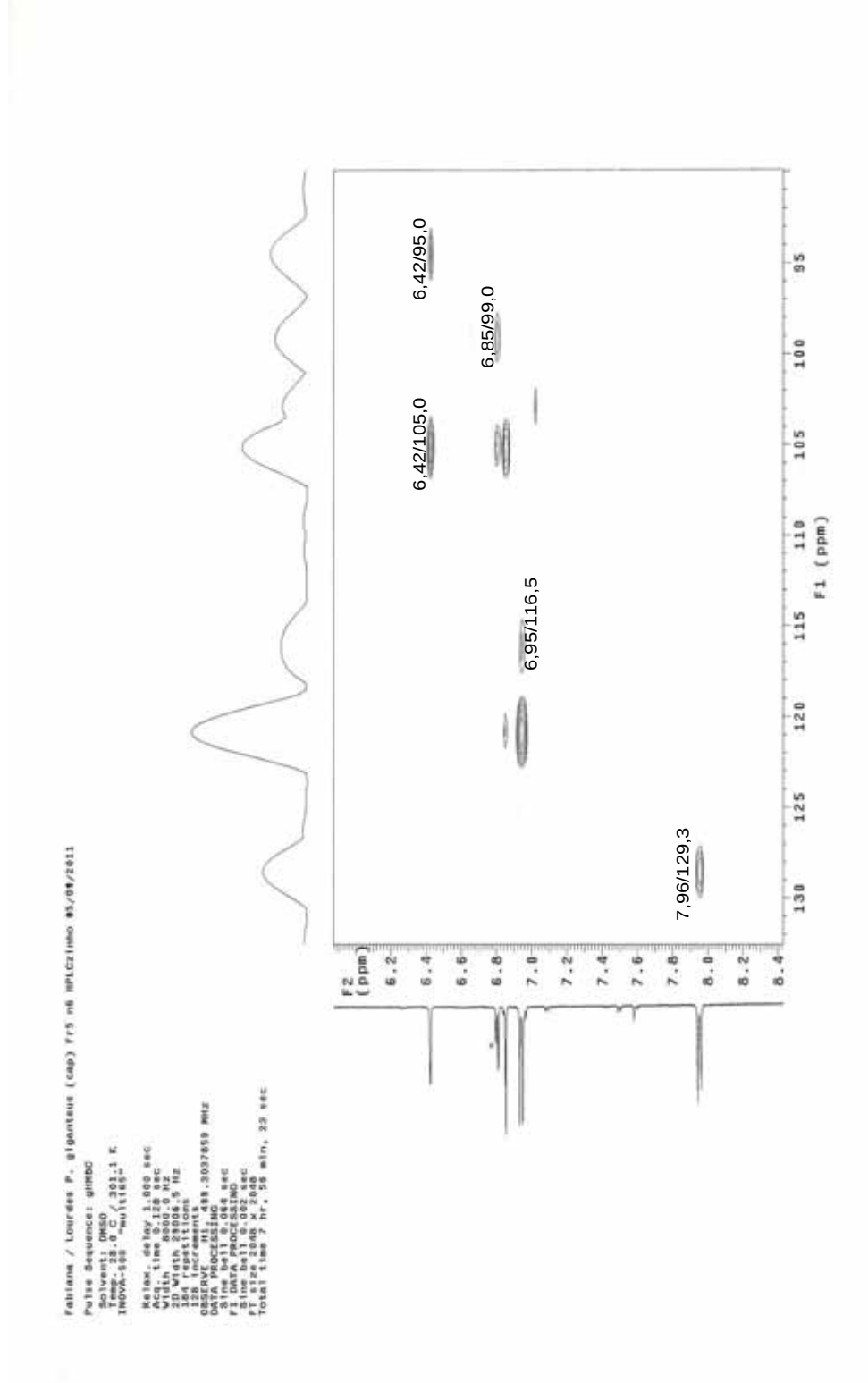


Figura 66 - Espectro de gCOSY de **PGC 3** (11,7 T, DMSO-d₆, TMS, δ).

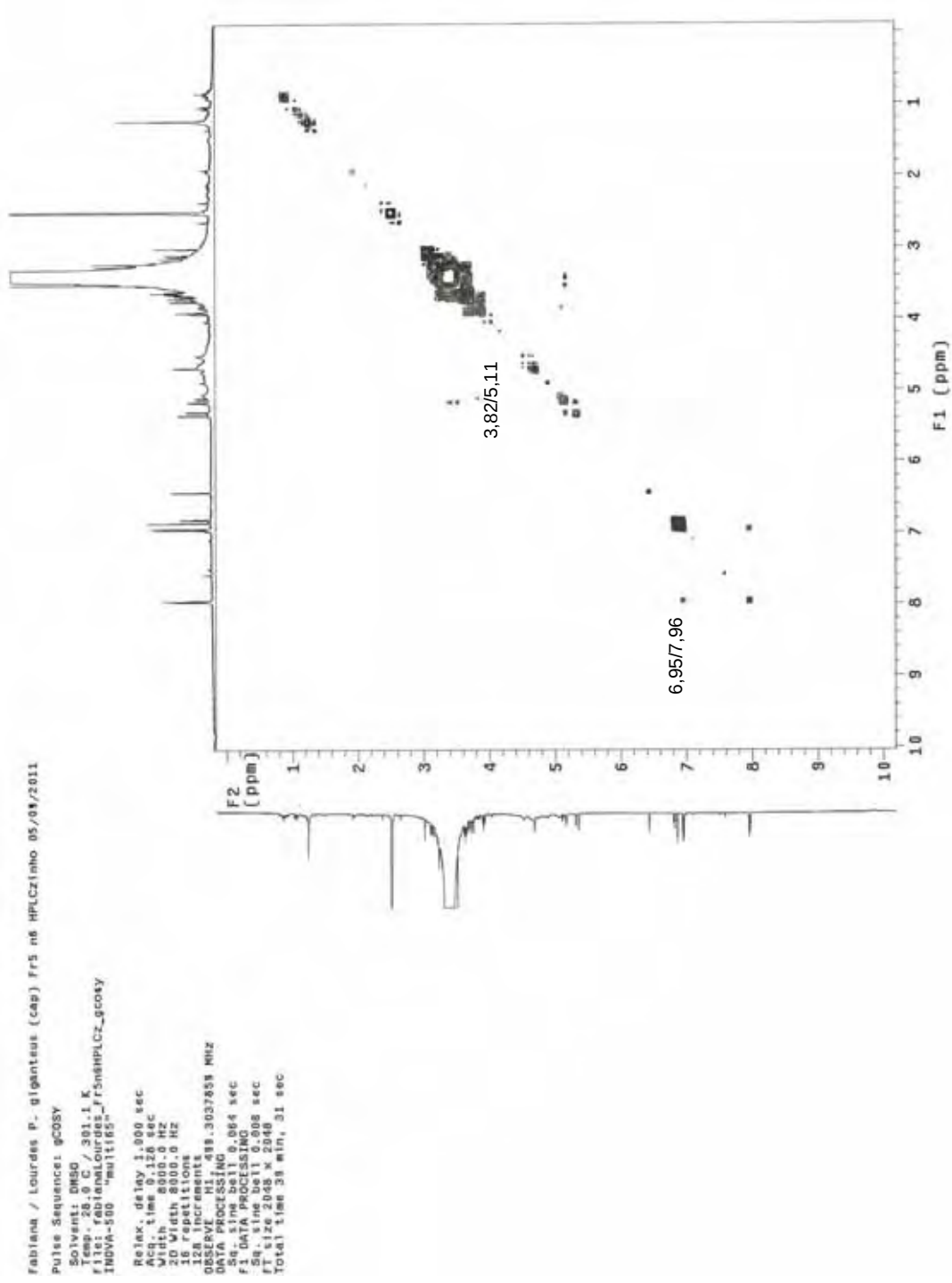


Figura 67 - Espectros de TOCSY-1D irradiado em δ 5,11 de **PGC 3** (11,7 T, DMSO- d_6 , TMS, δ).

Fabiana / Lourdes P. giganteus (cap) Fr5 n6 HPLCZinho 05/03/2011
Pulse Sequence: TOCSY1D

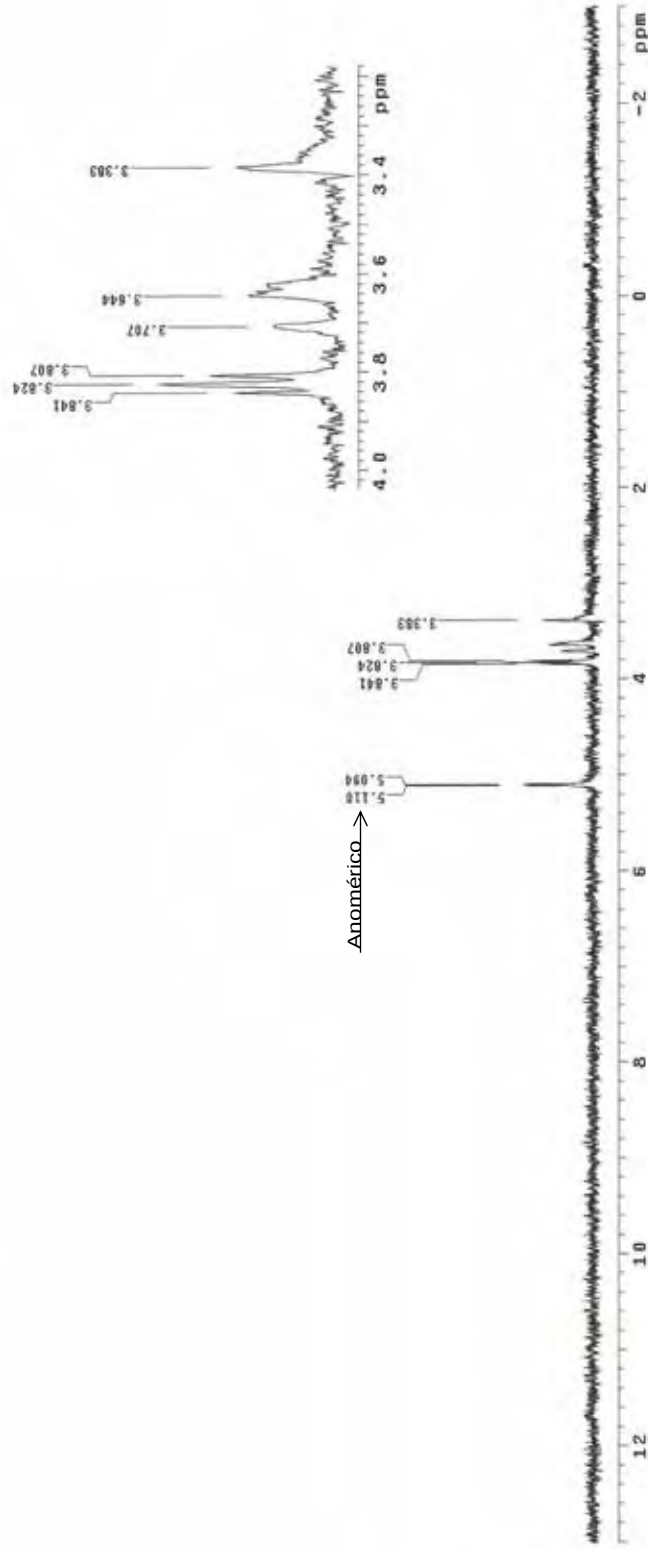


Figura 68 - Espectros de TOCSY-1D irradiado em δ 5,16 de **PGC 3** (11,7 T, DMSO- d_6 , TMS, δ).

Fabiana / Lourdes P. giganteus (cap) Frs nã HPLCzinho 05/09/2011
Pulse Sequence: TOCSY1D

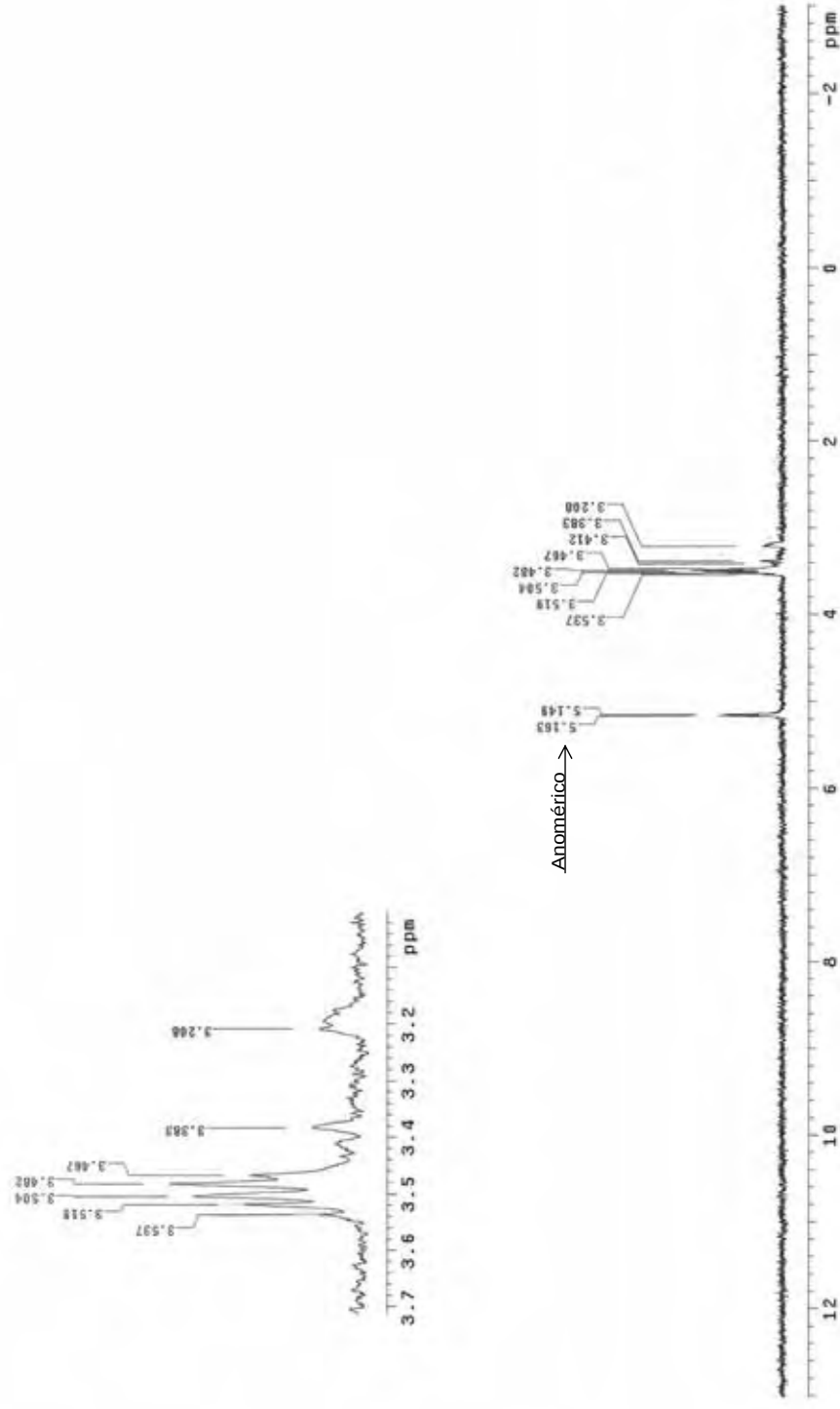
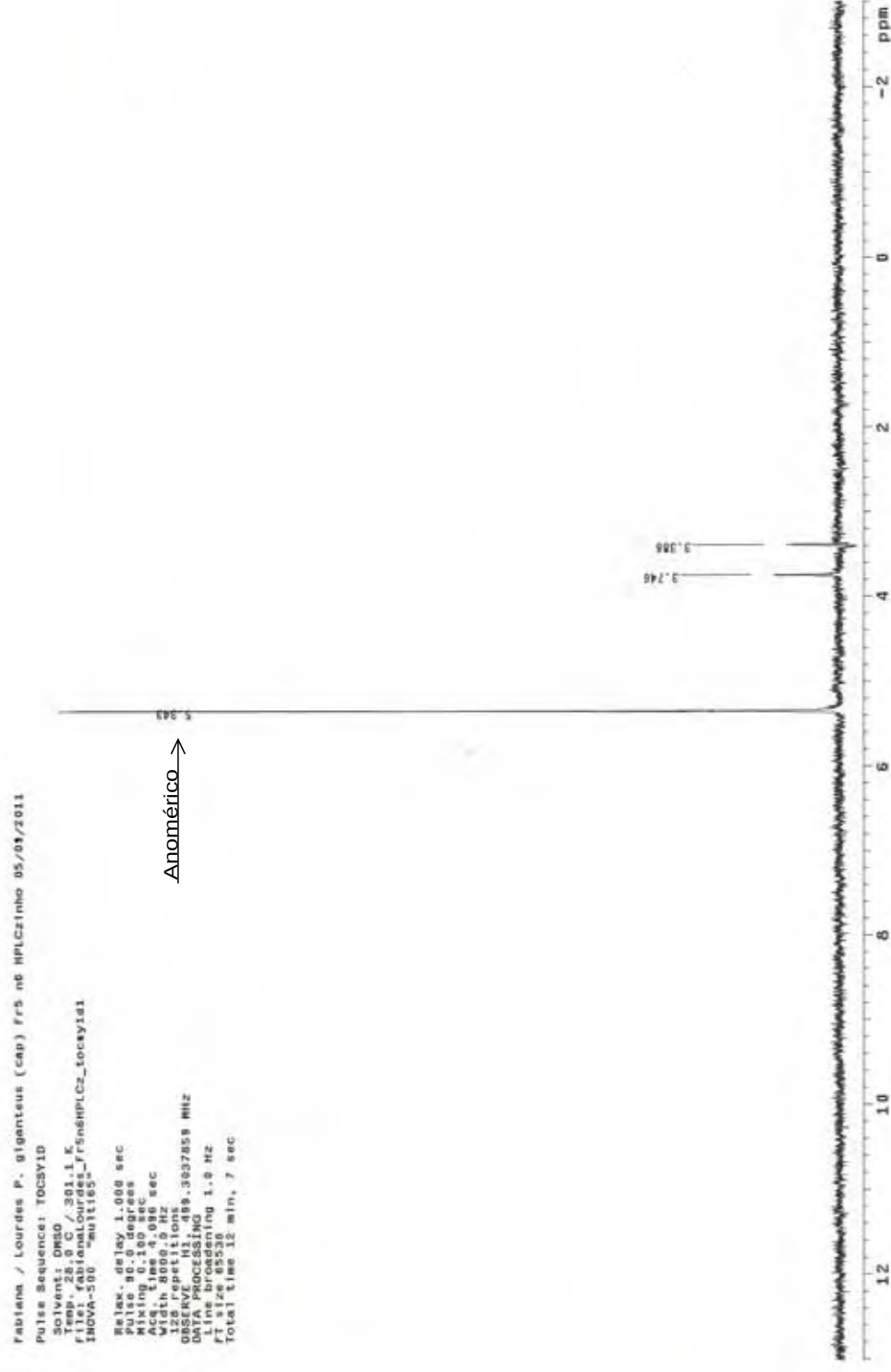


Figura 69 - Espectros de TOCSY-1D irradiado em δ 5,34 de **PGC 3** (11,7 T, DMSO- d_6 , TMS, δ).



Identificação Estrutural PGC 4 – m/z 507

Esta substância foi fracionada por sephadex LH-20 (Fração 10, 160 mg) e purificada por HPLC-UV-PDA (FR10.18, 3,7 mg) item 3.3.4.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 71) de **PGC 4** apresentou sinais de hidrogênios na região aromática, que comprovam que esta substância é uma flavonol derivado da quercetina. O sinal de deslocamento químico em δ 7,83 (1H, *d*, $J = 2,0$ Hz) foi atribuído ao H-2', o sinal em δ 7,50 (1 H, *dd*, $J = 2,0; 8,0$ Hz), foi atribuído ao H-6' e o sinal de deslocamento químico em δ 6,91 (1H, *d*, $J = 8,0$ Hz) que foi atribuído ao H-5' do anel B do flavonoide. O singlete em δ 6,53 (1H) foi atribuído ao H-8 do anel A. Observaram-se, ainda, dois singletos de grupos metoxílicos em δ 3,75 e 3,82 (3H cada) que, segundo correlações observadas no experimento *g*HMBC (Figura 73), apresentaram correlações à 3J com os carbonos δ 131,4 e 147,0 respectivamente. No espectro de ^1H observou-se, ainda, um duplete de hidrogênio anomérico com configuração em β ($J = 7,5$ Hz) e em δ 5,42, que segundo correlações à 3J no experimento *g*HMBC foi posicionado no carbono em δ 132,9, portanto, ligado na posição C-3 do flavonoide. O experimento *g*HMQC (Figura 72, Tabela 10), possibilitou atribuir todas as ligações diretas dos hidrogênios com os seus respectivos ^{13}C , enquanto que o experimento *g*COSY (Figura 74), possibilitou verificar a sequência de hidrogênios do açúcar. O espectro de ESI-MS desta substância apresentou o íon da molécula desprotonada em m/z 507 e está discutida no item 6, Tabela 3, Figuras 17 e 32. Portanto, diante dos dados apresentados esta molécula, foi identificada como 6-3'-dimetoxiquercetina-3-O- β -D-glicopiranosídeo (Figura 70).

Figura 70 – Estrutura de **PGC 4**.

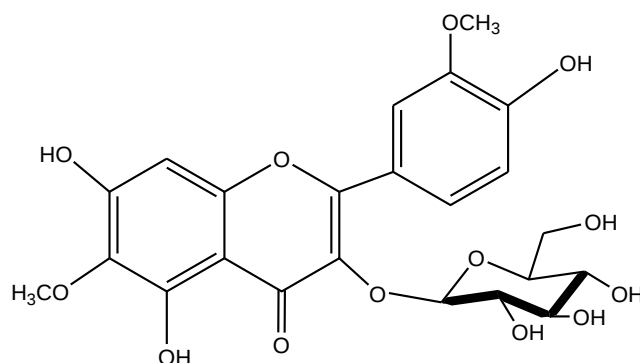


Tabela 10 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C de **PGC 4** (DMSO- d_6 , 11,7 T).

Posição	^1H (J em Hz)	^{13}C
2	-	156,4
3	-	132,9
4	-	**
5	-	152,0
6	-	131,4
7	-	157,0
8	6,54(s)	93,9
9	-	152,2
10	-	104,7
1'	-	122,0
2'	7,83 dd (2,0)	123,0
3'	-	147,0
4'	-	149,0
	-	
5'	6,91 d (8,0)	114,0
6'	7,50 dd (8,0, 2,0)	119,0
glicose		
1"	5,43 d (7,5)	
2"	3,37 dd (9,0, 7,5)	73,4
3"	3,48 dd (9,0; 9,0)	76,8
4"	3,27 dd (9,0; 9,0)	69,8
5"	3,29 m	75,6
6a"	4,24 dd (6,0; 10,0)	62,8
6b"	4,02 dd (5,0; 12,0)	
OH-5	12,8 sL	-
OCH3-6	3,70 s	60,0
OCH3-3'	3,82	56,7

Figura 71 – Espectro de RMN de ^1H de **PGC 4** (em DMSO-d_6 , 11,7 T).

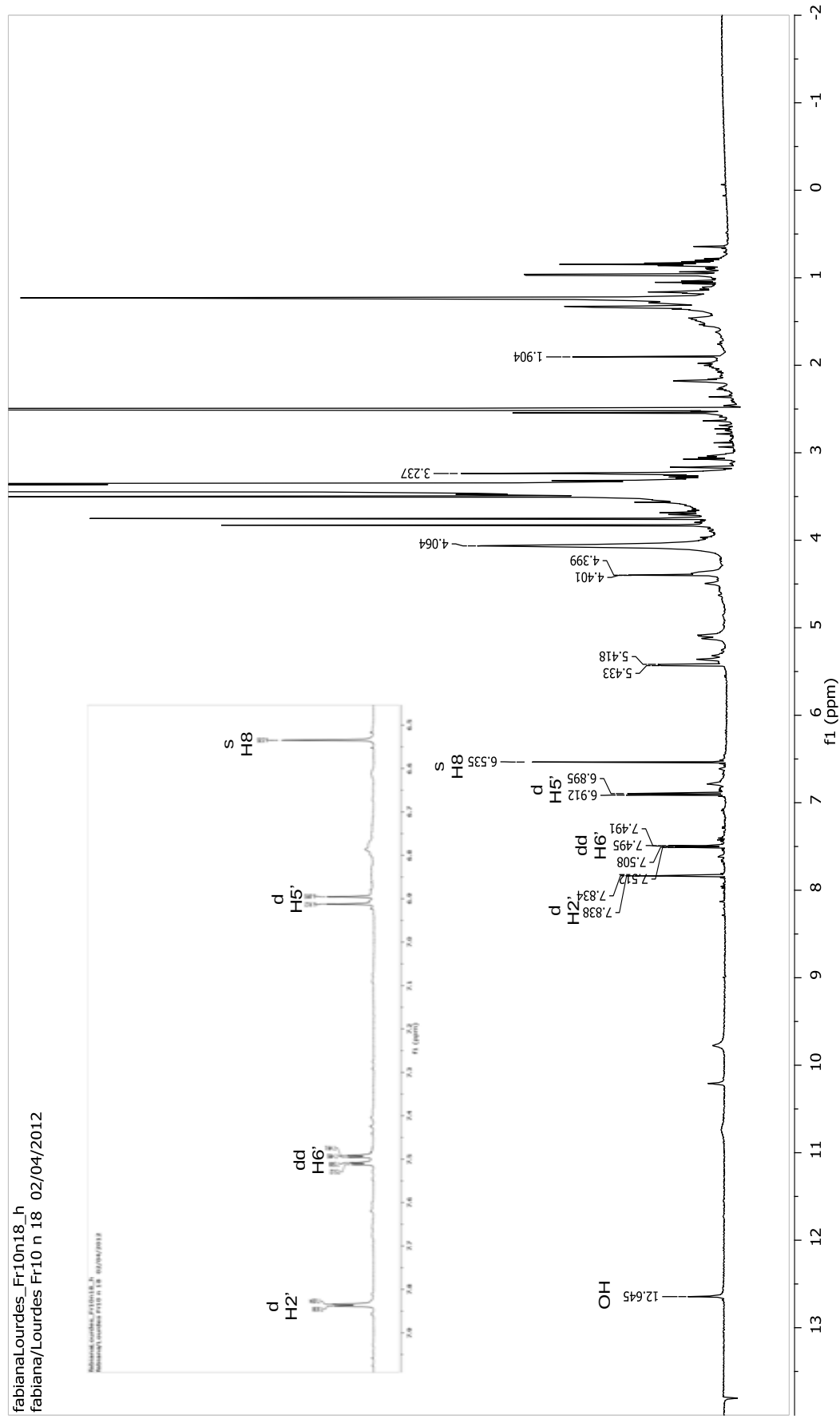


Figura 72 - Espectro de gHMQC de **PGC 4**, (11,7 T, DMSO-d₆, TMS, δ).

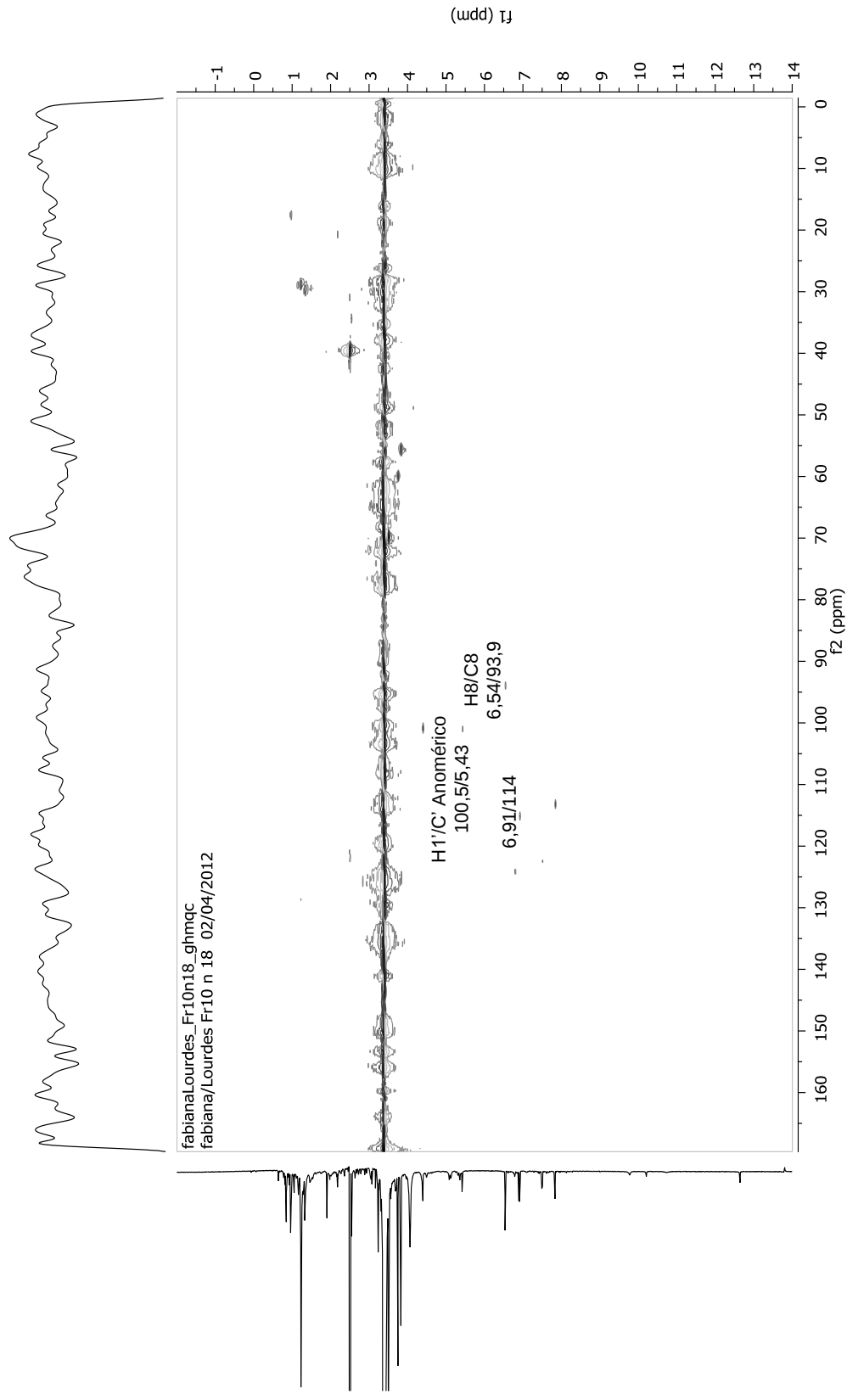


Figura 73 - Espectro de gHMBC de **PGC 4** (11,7 T, DMSO-_d₆, TMS, δ).

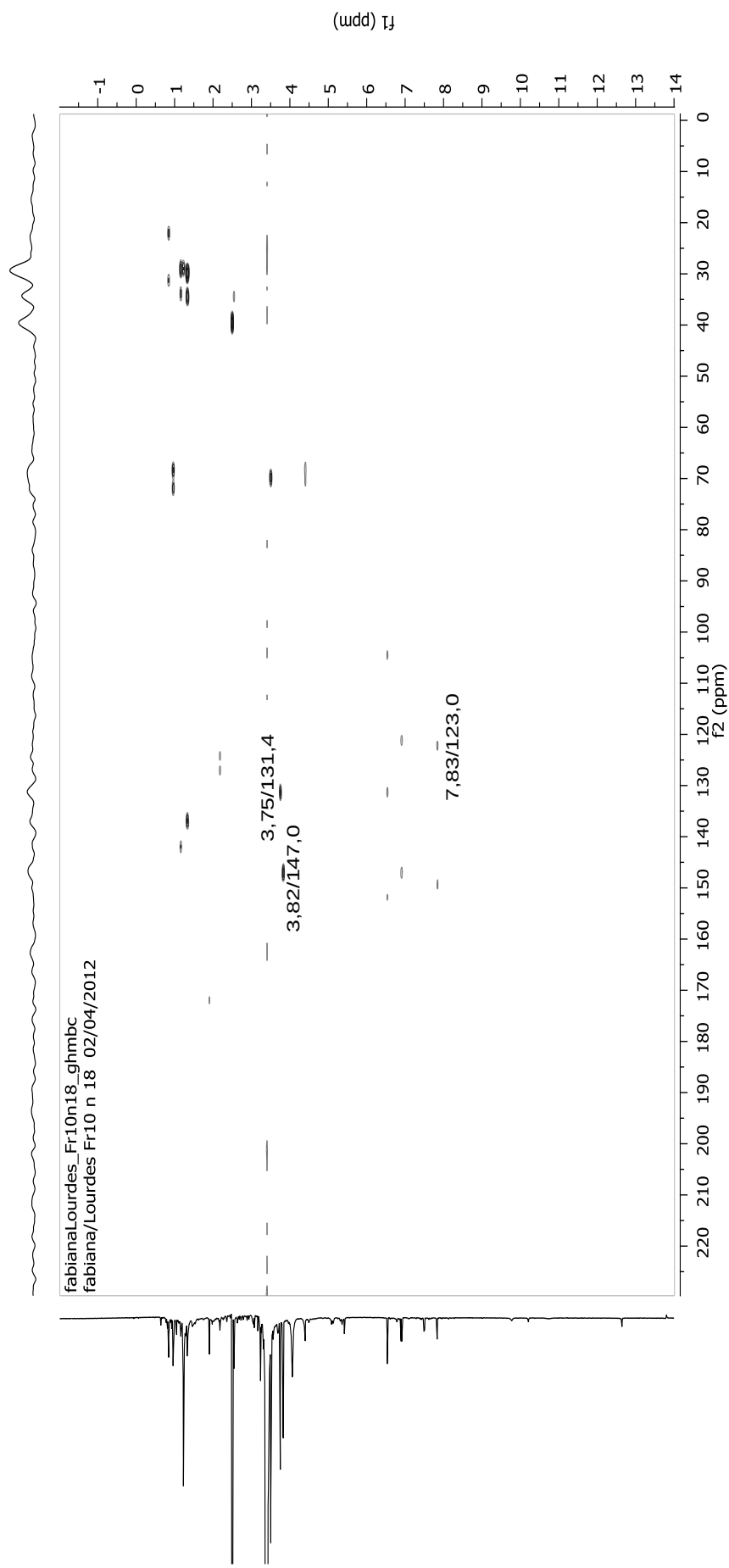
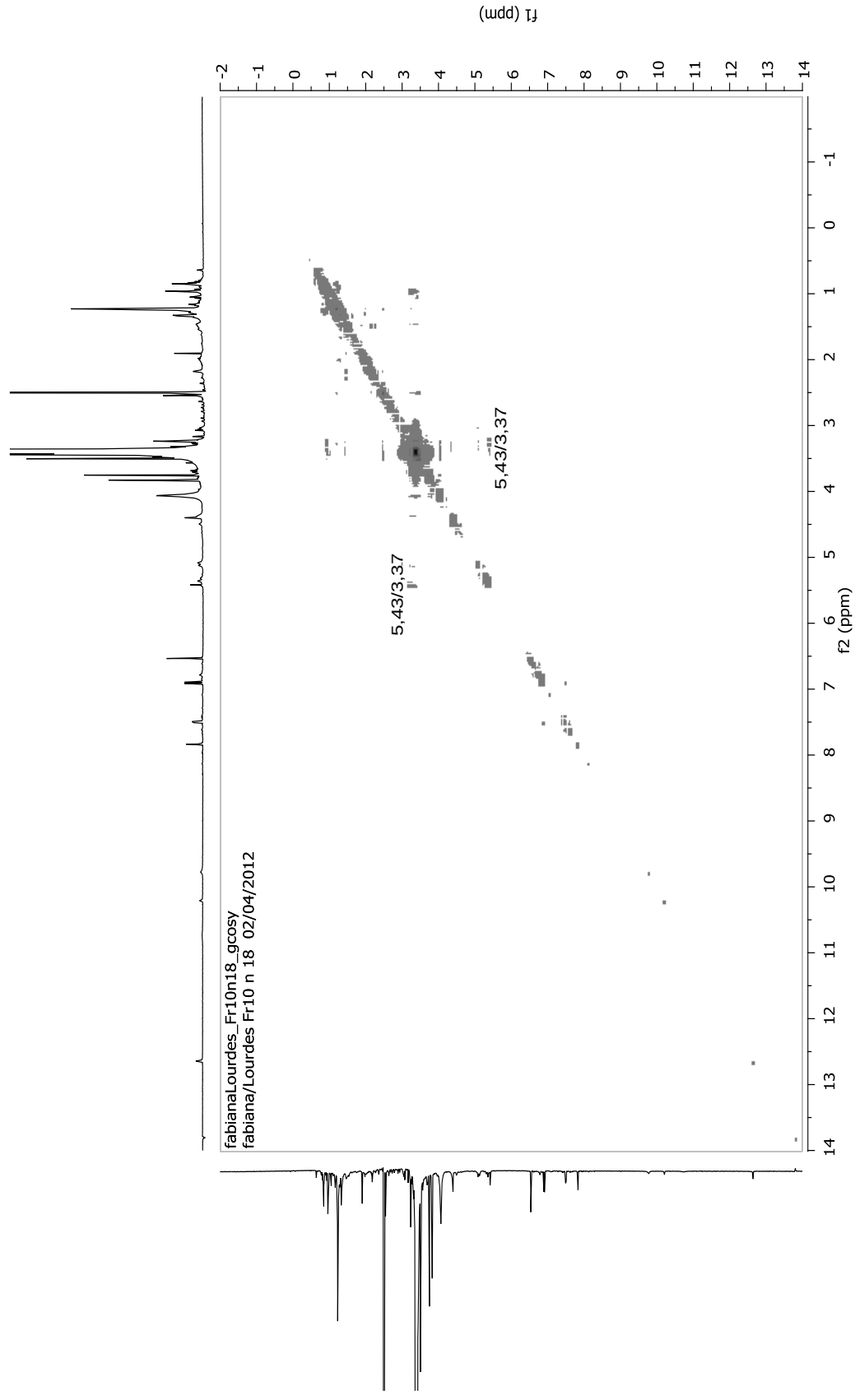


Figura 74 - Espectro de gCOSY de **PGC 4** (11,7 T, DMSO-d₆, TMS, δ).



6.3. Avaliação da Atividade Antiradicalar

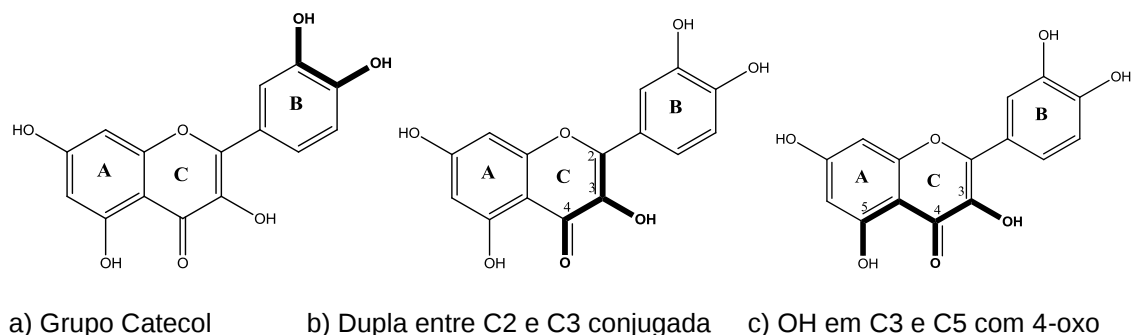
Os resultados da atividade antiradicalar dos extratos metanólicos e frações acetato de etila de capítulos e escapos de *P. chiquitensis*, obtidos com o ensaio antiradicalar por DPPH e utilizando-se os padrões quercetina e ácido gálico estão reunidos na Figura 77.

O DPPH apresenta coloração violeta, tendo absorção em 517 nm e, quando reduzido, torna-se amarelo. Esta redução ocorre quando existem substâncias capazes de doar hidrogênios radicalares ao DPPH dando origem a outro radical estável, a qual está associada à propriedade antiradicalar (HOSTETTMANN *et al.*, 2003).

As plantas produzem uma variedade de substâncias antioxidantes, dentre as quais se destacam os compostos fenólicos. A atividade antioxidante de compostos fenólicos, em especial os flavonoides, deve-se, principalmente, as suas propriedades redutoras e estrutura química (Figura 75). Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (SOUSA *et al.*, 2007).

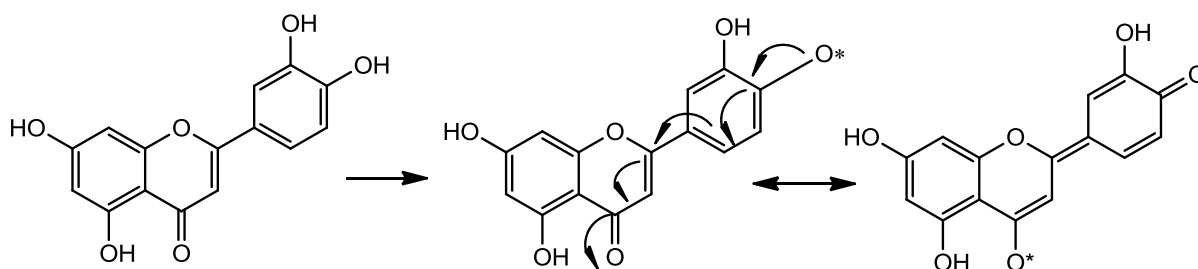
Com relação a sua estrutura química, as principais características para captura de radicais livres são a presença de um grupo catecol (Figura 75 “a”) no anel B que possui melhor propriedade de doar elétrons para estabilizar espécies radicalares, uma dupla ligação entre as posições 2 e 3 conjugada com o grupo 4-oxo (Figura 75 “b”) que é responsável pela deslocalização de elétrons e a presença de hidroxilas nos carbonos 3 e 5 juntamente com o grupo 4-oxo (Figura 75 “c”) conferindo potencial máximo na captura de radicais livres (EDENHARDER *et al.*, 1997). Estas 3 características estruturais são apresentadas pela molécula da quercetina.

Figura 75: Principais características para a captura de radicais livres.



Os intermediários formados pela ação dos antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias (Figura 76) (SOUSA *et al.*, 2007).

Figura 76: Anel do flavonóide entra em ressonância para a estabilização do radical livre. (Adaptado de JOVANOVIĆ *et al.* 1994; HALLIWELL, *et al.* 1995).



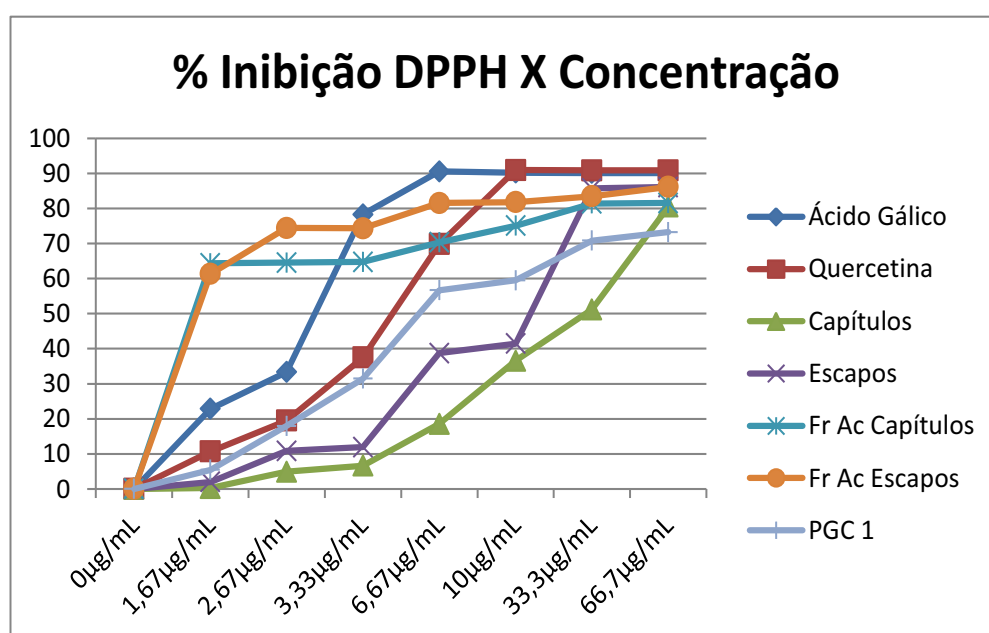
Deste modo, os estudos realizados utilizando o teste de DPPH revelaram que a atividade antiradicalar das frações acetato de etila ($IC_{50} = 1,82 \pm 0,0374 \mu\text{g mL}^{-1}$) dos escapos e dos capítulos ($2,05 \pm 0,0133 \mu\text{g mL}^{-1}$) foram bastante significativas quando comparadas com os padrões de ácido gálico ($IC_{50} = 4,37 \pm 0,0377 \mu\text{g mL}^{-1}$) e quercetina ($IC_{50} = 5,12 \pm 0,0079 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Algumas espécies de Eriocaulaceae, estudadas anteriormente também apresentaram atividade antiradicalar, utilizando-se este mesmo ensaio (SILVA, 2008). Esta atividade foi explicada devido à presença dos flavonoides derivados da quercetina existentes nos extratos. Quanto à atividade antiradicalar dos extratos metanólicos, apresentadas na Figura 77, observa-se $IC_{50} = 32,07 \pm 0,0063 \mu\text{g mL}^{-1}$, para os capítulos e $IC_{50} = 40,30 \pm 0,0389 \mu\text{g mL}^{-1}$ para os escapos. Portanto, o valor

de IC_{50} é muito mais significativo do que o estudo das espécies anteriores (SILVA, 2008).

Quando os resultados das frações acetato de etila e dos extratos metanólicos de *P. chiquitensis* são comparados, observamos também que a melhor atividade apresentada continua sendo o da fração acetato de etila. Estes resultados podem ser explicados devido a menor polaridade do solvente extrator, ficando assim as agliconas dos flavonoides concentradas nesta fração. Estudos anteriores comprovam que as agliconas dos flavonoides possuem melhor atividade antiradicalar do que seus glicosídeos (HAVSTEEN, 2002).

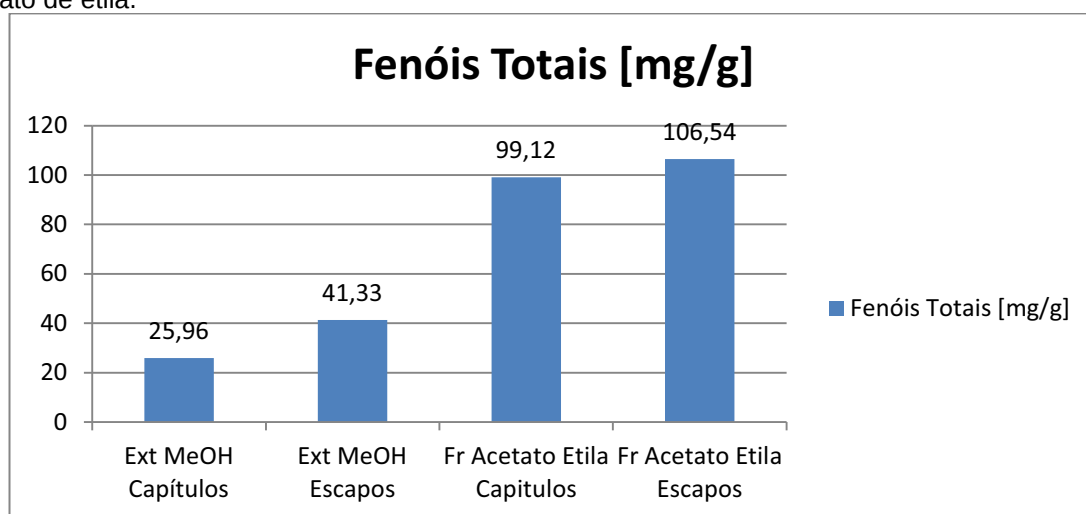
Figura 77 - Porcentagem de inibição de DPPH dos extratos metanólicos, frações acetato de etila de capítulos e escapos e da substância PGC 1 de *P. chiquitensis* e dos padrões quercetina e ácido gálico.



6.4. Determinação de Fenóis Totais

A determinação de fenóis totais foi realizada a partir do método de *Folin-Ciocalteu*. Para o mesmo, foi elaborada uma curva de calibração, utilizando como padrão o ácido gálico. A partir da curva, foi determinado o teor de fenóis, que é dado em miligramas de fenóis totais por grama de extrato (Figura 78).

Figura 78 - Teor de Fenóis Totais expressos em mg/g de extrato metanólico ou g de fração acetato de etila.

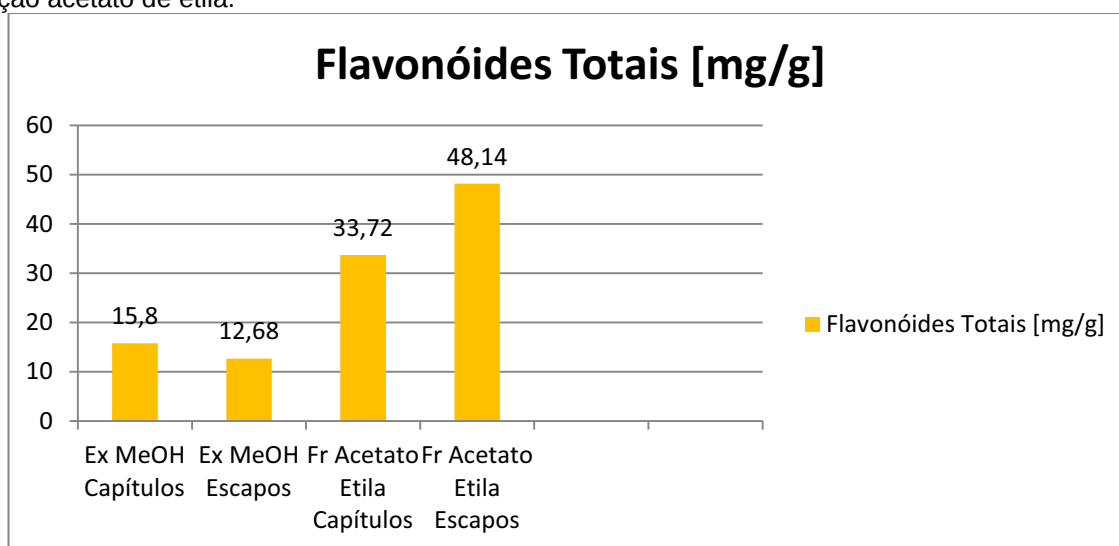


A maior concentração de fenóis totais foi observada na fração acetato de etila de escapos (106,54 miligramas de fenóis totais por grama de fração), seguido de respectivamente: 99,12 mg/g/fração para fração acetato de etila de capítulos; 41,33 mg/g/extrato para o extrato metanólico de escapos e nos capítulos, com 25,96 mg/g/extrato (o menor teor observado). O efeito antiradicalar dos extratos metanólicos de escapos deve-se deste modo a um maior conteúdo de fenóis totais em relação à capítulos, já que o segundo possui maior conteúdo de flavonoides totais.

6.5. Determinação do Teor de Flavonoides Totais

A quantificação de flavonoides totais foi determinado a partir do método colorimétrico no qual ocorre a complexação dos flavonoides com alumínio (Figura 79).

Figura 79 - Teor de Flavonoides Totais expressos em mg/g de extrato metanólico ou mg/g de fração acetato de etila.



O maior teor de flavonoides totais foi apresentado pela fração acetato de etila de escapos, na qual foram determinadas 48,14 miligramas de flavonoides por grama de fração. Em seguida, os maiores teores apresentados foram, respectivamente: fração acetato de etila de capítulos, com 33,72 mg/g/fração; extrato metanólico de capítulos, com 15,8 mg/g/extrato; e a menor quantidade de flavonoides totais foi encontrada no extrato metanólico de escapos, com 12,68 mg/g/extrato.

A partir destes dados podemos confirmar que a atividade antioxidante atribuída aos capítulos deve-se à concentração de flavonoides, que é maior no extrato metanólico de capítulos que em escapos. Já a alta atividade antioxidante obtida em escapos deve-se ao maior conteúdo de fenóis totais encontrados nestes extratos, em relação à capítulos. A atividade antiradicalar de substâncias como o ácido gálico e seus derivados possuem muitas vezes maior atividade que em

relação aos flavonoides em geral, isso pode ser observado através de comparação de valores de EC₅₀ destas substâncias.

6.6. Avaliação da Atividade Mutagênica (Teste de Ames)

Grande parte da composição química de plantas medicinais ainda é desconhecida pela ciência. O Brasil possui uma grande variedade de espécies endêmicas e a maioria destas, não possuem seus marcadores fitoquímicos determinados, o que constitui um grande potencial farmacológico a ser explorado (SANTOS, 2009).

Algumas destas plantas com propriedades medicinais podem conter substâncias com elevado potencial tóxico. Deste modo, é necessário o estudo da composição química, bem como do seu potencial mutagênico, uma vez que vem sendo utilizadas como remédio sem qualquer conhecimento dos seus malefícios à longo prazo, o que podem gerar danos à saúde de quem faz uso dos mesmos (VIEIRA, 2009; FÃO, 2012).

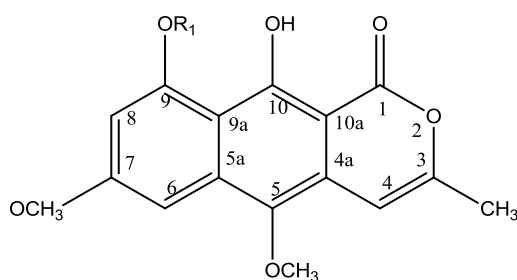
Portanto, torna-se imprescindível o teste de mutagenicidade, realizado atualmente por diversas técnicas, entre elas, o Teste de Ames por tratar-se de uma das técnicas mais aceitas pelos órgãos regulamentadores para avaliar a atividade mutagênica. Trata-se um teste *in vitro* de “screening” capaz de identificar substâncias que causam mutações gênicas através do uso de cepas de *Salmonella typhimurium* geneticamente modificadas (ANVISA, 2009).

Estudos químicos e biológicos anteriormente realizados pelo nosso grupo de pesquisa, já identificaram várias moléculas com potencial biológico, principalmente mutagênico (VARANDA, *et al.*, 1997; DEVIENNE, *et al.*, 2005; KITAGAWA, *et al.*, 2007; SILVA, 2008). Portanto, com a diversidade de moléculas bioativas existentes em capítulos e escapos de *P. chiquitensis*, é importante observar o potencial mutagênico destes extratos. O teste não foi realizado com frações enriquecidas, pois é muito difícil obter massa destas frações de modo suficiente para realização do teste completo e significativo, com e sem metabolização. Por outro lado, estudos realizados por Varanda *et al.* (1997 e 2004) e Oliveira (2010) são de grande valia

para determinar a relação entre a estrutura química e as atividades apresentadas como mutagênica, para concluir os resultados obtidos neste trabalho.

No estudo realizado por Varanda *et al.* (2004) avaliaram-se as atividades mutagênicas de derivados de naftopiranonas e destes, a paepalantina-9-O- β -D-glucopiranosídeo apresentou atividade mutagênica para a linhagem TA97a em presença de metabolização e a paepalantina-9-O- β -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-alopiranosídeo apresentou mutagenidade positiva para a linhagem TA97a com e sem presença de metabolização e indícios de mutagenicidade para a linhagem TA102. De acordo com este estudo, foi verificado que a capacidade dos grupos nas posições 1, 9 e 10 da naftopiranona em formarem ligações de hidrogênio com o nitrogênio das bases do DNA, e o fato da naftopiranona ter um átomo de hidrogênio como substituinte do radical R₁, o que deixaria a hidroxila livre, são responsáveis pela atividade mutagênica e explica a mutagenicidade deste tipo de composto.

Figura 80. Estrutura básica das naftopiranonas.



No trabalho de Oliveira (2010), a autora realizou ensaios com extratos, frações e substâncias puras de *Eriocaulon ligulatum*, *Leiothrix flavescens* e *L. spiralis*, e substâncias (naftopiranonas) de *Paepalanthus vellozioides*, *P. bromelioides* e *P. planifolius*. Com as naftopiranonas isoladas de espécies de *Paepalanthus* e de *Eriocaulon* foram realizados testes de mutagenicidade e estrogenicidade.

Com relação aos resultados de mutagenicidade, ainda no trabalho de Oliveira (2010), foram testadas 4 substâncias diferentes derivadas de naftopiranonas: eriocaulina, paepalantina, dímero 8-8' da paepalantina e a planifolina. Destas substâncias testadas, apresentaram mutagenicidade positiva para a linhagem TA97a

a eriocaulina, paepalantina e a planifolina, o que nos auxilia explicar os resultados mutagênicos positivos para a mesma linhagem neste trabalho.

O dímero 8-8' da paepalantina não foi considerado mutagênico devido à conformação do dímero que desfavorece o aparecimento de mutagenicidade pelo fato das hidroxilas estarem muito próximas de grupos metoxila e isto pode estar causando um impedimento estérico (VARANDA, *et al.*, 2004 e OLIVEIRA, 2010). Pode estar ocorrendo ainda uma espécie de ressonância entre os radicais desta molécula, devido a sua proximidade explicando também a alta atividade antioxidante desta molécula (DEVIENCE *et al.*, 2007).

Ainda de acordo com o trabalho de Oliveira (2010) ao avaliar a mutagenicidade de extratos, observou que os extratos metanólicos de *Eriocaulon ligulatum* foram considerados mutagênicos, isso foi observado pelo fato de apresentar mutagenicidade positiva para as linhagens TA97a com e sem presença de metabolização e TA102 com presença de metabolização, estes resultados positivos corroboram com os resultados obtidos neste trabalho, já que *E. ligulatum* possui flavonas, flavonols e naftopiranonas como componentes majoritários, semelhante a *P. chiquitensis* que possui como substâncias majoritárias naftopiranonas, flavonols e em menor quantidade flavonas. Já os extratos de *Leiothrix flavescens* e *L. spiralis* não foram considerados mutagênicos, devido a sua composição química que possui como componentes majoritários flavonas e xantonas.

Porém, diferentemente de *E. ligulatum* os extratos metanólicos de *P. chiquitensis* não apresentaram mutagenicidade positiva para a linhagem TA102, mas apenas para a linhagem TA97a. Isto pode ser explicado, pois as maiores das substâncias identificadas neste estudo apresentaram a presença de uma metoxila no anel B dos flavonoides, o que parece diminuir drasticamente a atividade mutagênica das substâncias (CZECZOT *et al.*, 1990; OLIVEIRA, 2010).

Os resultados realizados com Teste de Ames com os extratos metanólicos de capítulos e escapos de *P. chiquitensis* estão resumidos na Tabela 11, à seguir.

Tabela 11 - Atividade mutagênica expressa pelo número médio de revertentes/placa e razão de mutagenicidade (RM) do extrato metanólico de capítulos e escapes de *P. chiquitensis* em linhagens TA98, TA97, TA100 e TA102 de *S. typhimurium* em ausência (-S9) e em presença de metabolização (+S9).

Tratamento mg/placa	Número de revertentes/placa de linhagens <i>S. typhimurium</i> (M ± DP) e (RM)							
	TA98		TA97a		TA100		TA102	
Ext. MeOH Capítulos	-S9 ^b	+S9 ^d	-S9 ^b	+S9 ^d	-S9 ^a	+S9 ^d	-S9 ^c	+S9 ^e
0.0	24±1	31±2	133±17	161±24	185±11	123±9	382±30	248±3
0.625	--	--	--	--	--	--	245±24 (0.6)	388±71 (1.5)
1.25	--	--	--	--	--	--	277±21 (0.7)	332±64 (1.3)
1.875	34±9 (1.8)	32±1 (1.5)	753±127** (5.6)	1410±172** (8.7)	334±21 (1.65)	193±12 (1.6)	--	--
2.5	--	--	--	--	--	--	359±53 (0.9)	350±7 (1.4)
3.75	35±8 (1.1)	29±5 (1.3)	419±108*(3.1)	1358±76** (17.9)	187±12 (0.9)	148±7 (1.2)	421±133 (1.1)	341±104(1.37)
7.5	57±11 (1.8)	33±4 (1.5)	698±259*(5.2)	1493±62** (24.0)	151±24 (0.74)	172±11 (1.4)	--	--
11.25	47±8 (1.4)	39±2 (1.8)	231±68 (1.7)	1348±127** (10.5)	118±13 (0.58)	156±12 (1.3)	--	--
Controle +	1944±120	2877±749	1197±57	3605±34	2033±236	1700±311	1836±117	671±25
Ext. MeOH Escapos	-S9 ^b	+S9 ^d	-S9 ^b	+S9 ^d	-S9 ^a	+S9 ^d	-S9 ^c	+S9 ^e
0.0	24±2	31±3	134±2	235±10	185±11	105±11	382±30	248±3
0.625	--	--	--	--	--	--	468±10 (1.2)	370±26 (1.48)
1.25	--	--	--	--	--	--	427±33 (1.1)	320±25 (1.28)
1.875	47±2 (1.5)	32±2 (1.5)	384±65 (2.3)	837±77 (2.6)	382±21 (1.6)	180±6.1 (1.7)	--	--
2.5	--	--	--	--	--	--	492±138 (1.28)	377±13 (1.5)
3.75	41±1 (1.2)	34±6 (1.6)	235±132 (1.4)	909±180 (2.9)	187±12 (0.9)	196±10 (1.9)	493±21 (1.28)	321±61 (1.28)
7.5	61±4 (1.9)	37±4 (1.7)	172±46 (1.0)	708±73 (2.2)	151±24 (0.7)	194±7 (1.9)	--	--
11.25	41±6 (1.3)	41±2 (1.9)	30±19 (0.2)	580±89 (1.8)	21±2 (0.1)	192±28 (1.8)	--	--
Controle +	1944±120	2877±749	1465±57	2010±536	2033±236	3221±117	1836±117	671±25

* $p < 0.05$ (ANOVA); ** $p < 0.01$, M ± DP = média e desvio padrão. Ext. MeOH : Extrato metanólico; 0 = Controle negativo (DMSO – 75 µL/placa). Controle + : Controle positivo: ^a Azida sódica (2,5µg /placa); ^b NPD (4-nitro-o-fenilenediamina – 10 µg/placa); ^c Mitomicina (0,5 µg /placa); ^d 2-Antramina (1,25 µg /placa); ^e Aminofluoreno (10 µg /placa). * $P < 0.05$ (ANOVA). Os valores em parenteses referem-se ao RM = Razão de mutagenicidade.

De acordo com as tabelas 11 e 12, em ausência de metabolização (-S9), observa-se que para a linhagem TA97a, o extrato metanólico dos capítulos de *P. chiquitensis* (Ex-MeOH) apresentou ausência de mutagenicidade apenas para a concentração de 11,25 mg/placa. Para as demais concentrações testadas (1,875; 3,75 e 7,5 mg/placa), a atividade mutagênica foi evidente, pois o RM (razão de mutagenicidade) foi maior que 2 (para ter atividade mutagênica, é necessário que o RM seja maior que 2) para estas concentrações e houve um aumento significativo na relação dose–resposta. Para as outras linhagens (TA100, TA98 e TA102), o extrato metanólico de capítulos apresentou ausência de mutagenicidade. Nos ensaios em presença de metabolização (+S9), o extrato metanólico dos capítulos de *P. chiquitensis* apresentou mutagenicidade positiva somente para a linhagem TA97a em todas as concentrações testadas. Para as linhagens TA100, TA98 e TA102 a mutagenicidade foi considerada negativa.

O extrato metanólico dos escapos de *P. chiquitensis* apresentou mutagenicidade positiva apenas para a concentração 1,875 mg/placa para a linhagem TA97a sem presença de metabolização. As demais linhagens (TA100, TA98 e TA102) deste extrato, apresentou ausência de mutagenicidade. Nos ensaios em presença de metabolização (+S9), apenas a concentração a 11,25 mg/placa não foi considerado mutagênico para a linhagem TA97a, provavelmente por esta concentração ser tóxica para a TA97a, as demais concentrações testadas para esta linhagem apresentaram mutagenicidade positiva. Para as demais linhagens, TA100, TA98 e TA102, o extrato metanólico de escapos não foi considerado mutagênico.

De acordo com os resultados obtidos no Teste de Ames com os extratos metanólicos de capítulos e escapos de *P. chiquitensis* o responsável pela atividade mutagênica, principalmente após metabolização na linhagem TA97a, é a mutação do tipo *frameshit*, que altera o quadro de leitura do DNA devido as trocas dos pares de bases (G:C).

No estudo químico realizado com espécies de *P. chiquitensis*, verificou-se a predominância de naftopiranonas e derivados da quercetina nos capítulos, enquanto que nos escapos observou-se que as substâncias marjoritárias são os derivados da quercetina e do kaempferol, que de acordo com Oliveira (2010) e que são os responsáveis pela atividade apresentada.

As naftopiranonas tem um átomo de hidrogênio ao lado de R1, formando uma hidroxila livre, responsável pela atividade mutagênica encontrada na posição 9 (VARANDA, *et al.*, 2004). Estudos de mutagenicidade realizados com naftopiranonas, por Oliveira (2010), levaram à conclusão de que os resultados de mutagenicidade positiva para as linhagens TA97a, assim como aqueles obtidos neste estudo para os extratos metanólicos de capítulos, deve-se às suas hidroxilas das naftopiranonas presentes posições 1, 9 e 10, que estariam livres para fazer ligações de hidrogênio com as bases do DNA.

O fato dos extratos de capítulos possuírem uma potencia mutagênica maior em relação aos escapos deve-se ao fato de que estes possuem maior quantidade de naftopiranonas em relação aos escapos (CARDOSO *et al.*, 2012) e deste modo pode-se constatar que a mutagenicidade é dose-dependente. Pois os extratos de capítulos apresentaram uma concentração maior de naftopiranonas (455 µg/100 mg de extrato) enquanto escapos possuíam 431 µg/100 mg de extrato. Convertendo estes valores para a dose inicial capaz de induzir mutação (tabela 12:1,875 mg de extrato, tanto para capítulos, quanto para escapos) temos que a concentração de 8,08 µg naftopiranonas foi capaz de induzir mutação a uma razão de mutagenicidade de 2.3 para os extratos metanólicos de escapos. Já nos extratos metanólicos de capítulos, a mínima concentração testada de 8,53 µg de naftopiranonas foi capaz de induzir a mutagenicidade a 5.6, ou seja, quase o dobro de mutações em relação ao testado em escapos.

Interessante ressaltar, que ao aumentar a concentração de 8.08 para 8.53 µg (aumento de 0.45 µg de naftopiranonas) houve um expressivo aumento na relação dose-resposta. Ao realizar experimentos em presença de metabolização, observa-se que ocorreu um significativo aumento de RM de 5.6 (sem metabolização) para 8.7 (com metabolização).

Um aumento após a metabolização que foi mais expressivo foi na concentração de 7,5 mg de extrato de capítulos, no qual observou-se um aumento de RM de 5.2 para 24.0 após ser metabolizado. Trata-se de um aumento muito expressivo que provavelmente não poderia ser atribuído apenas à perda da unidade glicosídica.

No entanto, há a necessidade de aprimorar técnicas para extrair o conteúdo metabolizado da fração microssomal, (já que esta possui muitos interferentes, o que inviabiliza a detecção do composto formado após metabolização) e analisar qual o produto formado após metabolização, produto este que deve ser muito tóxico, já que altera de modo muito expressivo o RM.

Tabela 12. Teor de quercetina e naftopiranonas em µg para cada 1,875 mg* [µg/1,875 mg] de extrato metanólico de capítulos e escapos.

Amostras	Capítulos	Escapos
<i>Quercetina</i>	6,65 µg	7,33 µg
<i>Naftopiranonas</i>	8,53 µg	8,08 µg

Tais valores foram baseados no trabalho de quantificação de quercetina e naftopiranonas em extrato metanólico de capítulos e escapos de *Paepalanthus chiquitensis* realizados por Cardoso *et al.*, (2012). Os valores de quantificação deste trabalho estão dispostos na **Tabela 2**.

*1,875 mg: refere-se à concentração mínima capaz de induzir ao aumento no número de colônias revertentes, na linhagem TA97a (única linhagem que detectamos mutagenicidade dos extratos testados).

Em estudo realizado por Oliveira (2010) a autora sugere que ao ocorrer metabolização de uma naftopiranona, estando ela na forma de um dímero, ela liberaria seus monômeros, e isto provocaria um aumento no número de hidroxilas livres capazes de se ligarem com as bases do DNA, e o mesmo fato poderia ocorrer para naftopiranonas glicosiladas, detectada como maioria no estudo químico realizado neste trabalho. Este fato poderia explicar a intensa atividade mutagênica encontrada nos extratos de capítulos após a metabolização na linhagem TA97a, o que indica que estes extratos são capazes de induzir uma mutação do tipo *frameshift*.

Dewick (1997) descreve um mecanismo capaz de explicar a atividade mutagênica detectada através da linhagem TA97a nos extratos de *P. chiquitensis*. O mesmo verificou que anéis furano e piranos de uma cumarina (psoraleno) intercalavam com o DNA. Neste mecanismo ocorre uma reação de cicloadição, via o anel pirano do psoraleno. Tal reação de intercalação impede a replicação do DNA e diminui a taxa de divisão celular. As naftopiranonas possuem um anel pirano e as suas interações com as bases do DNA podem ser explicadas através deste

mecanismo dos psoralenos, explicando deste modo as mutações observadas através do teste de Ames.

A atividade mutagênica destes extratos também é atribuída à quercetina, porém, a concentração não mostrou influência direta como observado nas naftopiranonas, pois, mesmo os escapos possuindo uma maior concentração destas substâncias (7,33µg de quercetina a cada 1,875 mg de extrato metanólico, correspondente à concentração mínima testada capaz de aumentar o número de colônias revertentes, tendo para esta concentração, RM = 2.3), não houve um aumento significativo da relação de mutagenicidade destes extratos em relação aos extratos de capítulos (RM = 5.6, na mesma concentração e 6,65 µg de quercetina a cada 1,875 mg de extrato metanólico de capítulos).

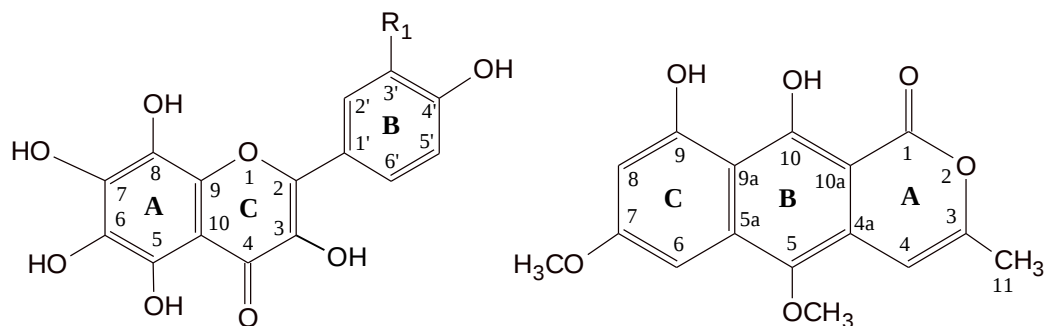
Assim, o extrato metanólico de capítulos, tendo uma menor concentração de quercetina, e maior concentração de naftopiranonas, foi capaz de induzir a 2.4 vezes mais mutações em relação a escapos. Deste modo podemos afirmar que as naftopiranonas podem induzir a um maior aumento de mutações apenas com um pequeno aumento de dose, já a quercetina, necessitaria de uma dose maior para induzir o mesmo número de mutações.

Após metabolização, ocorre um ligeiro aumento de RM (o aumento mais expressivo de escapos ocorreu na concentração de 3,75 mg/extrato onde o RM passa de 1.4, sem metabolização, e 2.9 após metabolizada) para os extratos de escapos, mas estes não são tão significativos quando comparados ao evento ocorrido após metabolização com os extratos de capítulos de *P. chiquitensis*.

Deste modo, as naftopiranonas não são as únicas responsáveis pela causa de mutagenicidade nos extratos metanólicos de capítulos e escapos. Há outras substâncias responsáveis também pela mutagenicidade positiva, que é atribuída também aos flavonoides derivados da quercetina, pois, segundo Rietjens *et al.* (2005) e Resende (2011), esta atividade mutagênica nos flavonoides é devido à uma hidroxila livre na posição 3, uma dupla ligação entre as posições 2 e 3, e um grupo ceto na posição 4, permitindo que a hidroxila livre na posição 3 tautomerise a molécula a uma molécula 3-ceto.

Os flavonoides e as naftopiranonas (Figura 81) identificados neste trabalho no extrato metanólico de *P. chiquitensis* possuem todas estas características, corroborando com os dados existentes na literatura.

Figura 81 - Estruturas de flavonoides e naftopiranona.



$R_1 = H$ = Kaempferol

$R_1 = OH$ = Quercetina

Naftopiranona

7. CONCLUSÕES

A partir do perfil químico por HPLC-UV-PDA, se pôde verificar que existe significativa diferença nos perfis químicos dos extratos metanólicos de capítulos e escapos. Enquanto nos capítulos observa-se uma maior quantidade de naftopiranonas nos escapos existe uma maior quantidade de flavonoides.

O estudo por HPLC-ESI-IT-MSⁿ confirmou o perfil dos extratos metanólicos de capítulos e escapos de *P. chiquitensis*, onde foram identificados dezenove flavonoides e seis naftopiranonas.

O fracionamento por sephadex LH-20 do extrato metanólico de capítulos de *P. chiquitensis* e posterior fracionamento por HPLC-IR, forneceu uma mistura de flavonoides, que foram identificados por UV, espectrometria de massas e RMN mono e bi-dimensionais, sendo que dois destes flavonoides são considerados inéditos na literatura que são 6-3'-dimetoxiquercetina-3-O- β -D-6''(p-cumaroil)-glicopiranosídeo e 4'-metoxiapigenina-7-O-(3''-galoil)- α -D-arabinopiranosil-(2''' $\rightarrow$ 1''')-apiofuranosil-(3'''' $\rightarrow$ 1''''')- α -D-arabinopiranosídeo.

Quanto à atividade antioxidante dos extratos de *Paepalanthus chiquitensis*, a fração acetato de etila de escapos (1,82 $\mu\text{g mL}^{-1}$) apresentou uma melhor atividade antiradicalar em relação aos capítulos (2,05 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Tal atividade pode ser explicada devido a maior concentração de compostos fenólicos existente nos escapos em relação aos capítulos. Tal afirmação pôde ser confirmada a partir dos resultados obtidos em ensaios de determinação de fenóis e flavonoides totais em frações acetato de etila de capítulos e escapos, no qual se obteve um maior teor, tanto de compostos fenólicos quanto de flavonóides totais, em escapos do que em capítulos.

Nos ensaios de mutagenicidade observa-se que tanto o extrato metanólico de capítulos quanto de escapos de *P. chiquitensis* apresentam mutagenicidade positiva (1,875 mg/extrato) para a linhagem TA97a de *Salmonella typhimurium*.

A presença das naftopiranonas em maior quantidade nos capítulos de *P. chiquitensis* também corrobora com as discussões taxonômicas realizadas até o momento, destacando que estas podem ser utilizadas como marcadores taxonômicos do gênero *Paepalanthus* (CARDOSO *et al.*, 2012).

Portanto, este trabalho contribui de maneira significativa para o conhecimento do perfil químico de extratos de *P.chiquitensis*, possibilitando correlacionar e corroborar com os dados já existentes na literatura. A presença dos flavonóis em *Paepalanthus* já é pré-estabelecida em várias discussões taxonômicas realizadas em espécies de *Paepalanthus*, porém, com a seção *Diphyomene*, estes resultados são considerados inéditos.

REFERÊNCIAS

- AKERELE, O. WHO guidelines for assessment of herbal medicine. *Fitoterapia*, v. 63, p. 99-104, 1992.
- 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*. *J. Nat. Prod.*, v. 75, p. 547-556, 2012.
- AMARAL, F. P. Compostos fenólicos de *Paepalanthus geniculatus* (Eriocaulaceae). 128f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, Araraquara, 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.; RAPINI, A.; QUEIROZ, L. P.; CONCEIÇÃO, A. S.; ALMEIDA, P. R. M.; VAN DEN BERG, C. A comprehensive phylogenetic analysis of Eriocaulaceae: evidence from nuclear (ITS) and plastid (psbA-trnH and trnL-F) DNA sequences. *Taxon*, v. 59, p. 379-388, 2010.
- ANDRADE, M. J. G.; GIULIETTI, A. M.; HARLEY, R. M.; VAN DEN BERG, C. *Blastocaulon* (Eriocaulaceae), a synonym of *Paepalanthus*: Morphological and molecular evidence. *Taxon*, v. 60, n. 1, p. 178-184, 2011.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Protocolo OECD 471 (1997). Orientações da SBMCTA. Brasília, 2009.
- AQUINO, R.; DE FEO, V.; DE SIMONE, F.; DETOMASI, N. PIZZA, C. Flora officinale dell'America Latina. Litotipografia Gutenberg. Lancusi: Salerno, 1996, p. 502
- ARAÚJO, M. G. F. Caracterização do potencial biológico de *Leiothrix spiralis* Ruhland e *Syngonanthus nitens* (Bong.) Ruhland (ERIOCAULACEAE). 146f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2011.
- ARAÚJO, M. G. F.; HILARIO, F.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C.; BRUNETTI, I. L.; SOTOMAYOR, C. E.; BAUAB, T. M.. Correlation among antioxidant, antimicrobial, hemolytic, and antiproliferative properties of *Leiothrix spiralis* leaves extract. *Intern. J. of Mol. Scienc.* v. 13, p. 9260-9277, 2012.
- ARDREY, R. E. *Liquid chromatography-mass spectrometry: an introduction*. San Francisco: John Wiley & Sons, 2003. 289 p.
- BANDONI, A. L.; CZEPAK, M. P. *Os recursos vegetais aromáticos no Brasil*. Vitoria: Edufes, 2008, 624p.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de novos fármacos. *Quim. Nova*, v. 32, nº 3, p. 679-688, 2009.

- BERNSTEIN, L.; KALDOR, J.; MCCANN, J.; PIKE, M.C. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the *Salmonella* test. *Mutat. Res.*, 97, 267–281, 1982.
- BOSQUEIRO, A. L. D. *Estudo Fitoquímico e Implicação Taxonômica em Paepalanthus Mart. (Eriocaulaceae)*. 92f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, Araraquara, 2000.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C.; Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci. Technol.* v. 28, 25-30, 1995.
- CAPASSO, R.; IZZO, A. A.; PINTO, L.; BIFULCO, T.; VITO BELLO, C.; MASCOLO, N. Phytotherapy and quality of herbal medicines. *Fitoterapia*, v. 71, S58-S65. 2000.
- CARDOSO, C. A. L.; ZANUTTO, F. V.; VARANDA, E. A.; SANO, P. T.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C. Quantification of Flavonoids, Naphthopyranones and Xanthones in Eriocaulaceae Species by LC-PDA. *Am. J. Analyt. Chem.*, v. 03, p. 138-146, 2012.
- 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. 1/2, p. 89, 2008.
- COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 12, p. 564 – 582, 1999.
- CUYCKENS, F.; CLAEYS, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *J. Mass Spectrom.*, v. 39, p. 1-5, 2004.
- DEVIENNE, K. F.; CÁLGARO-HELENA, A. F.; DORTA, D. J.; PRADO, I. M.; RADDI, M. S.; VILEGAS, W.; UYEMURA, S. A.; SANTOS, A. C.; CURTI, C. Antioxidant activity of isocoumarins isolated from *Paepalanthus bromelioides* on mitochondria. *Phytochemistry*, v.68, n. 7, p. 1075-1080, 2007.
- DEVIENNE, K. F.; RADDI, M. S. G.; COELHO, R. G.; VILEGAS, W. Structure-antimicrobial activity of some natural isocoumarins and their analogues *Phytomedicine*, v. 12, n. 5, p. 378-381, 2005.
- DEWICK, P. M. *Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach*. Inglaterra: Ed. Wiley. 1997. 465p.
- 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 Med.*, 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). *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 18, p. 437-439, 2007.

EDENHARDER, R.; RAUSCHER, R.; PLATT, K. L. The inhibition by flavonoids of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline metabolic activation to a mutagen: a structure–activity relationship study. *Mutat Res*, v. 379, p. 21-32, 1997.

FÃO, F.; ZAN, R. A.; BRONDANI, F. M. M.; RAMOS, L. J.; MENEGUETTI, D. U. O. Análise do potencial mutagênico da seiva da casca de *Croton lechleri* (Müll. Arg), no estado de Rondônia, Amazônia Ocidental. *SaBios: Rev. Saúde Biol.*, v.7, n.1, p.91-98, jan./abr., 2012.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

FARMACOPÉIA Brasileira. 5. ed. Brasília: Fundação Oswaldo Cruz, 2010.

FERREIRA, R. S.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. Integração das Técnicas de Triagem Virtual e Triagem Biológica Automatizada em Alta Escala: Oportunidades e Desafios em P&D de Fármacos. *Quim. Nova*, v. 34, n. 10, p. 1770-1778, 2011.

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

GHASEMZADEH, A. *et al.* 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.; WANDERLEY, M. G. L.; LONGHI-WAGNER, H. M.; PIRANI, J. R.; PARRA, L. R. Estudos em sempre-vivas: taxonomia com ênfase nas espécies de Minas Gerais, Brasil. *Acta Bot. Bras.*, v. 10, p. 329-377, 1996.

GIULIETTI, A. M.; SCATENA, V. L.; SANO, P. T.; PARRA, L. R.; QUEIROZ, L. P.; HARLEY, R. M.; MENEZES, N. L.; YSEPPON, A. M. B.; SALATINO, A.; SALATINO, M. L.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C.; RICCI, C. V.; BONFIM, M. C. P.; MIRANDA, E. B. Multidisciplinary studies on neotropical Eriocaulaceae, *Monocots: systematics and evolutions*. Collingwood: CSIRO Publishing, 2000, p. 580-588.

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.

- HALLIWELL, B.; MURCIA, M. A.; CHIRICO, S.; ARUOMA, O. I. Free radicals and antioxidants in food and *in vivo*: what they do and how they work. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, v.35, p.7-20, 1995.
- HARBORNE, J. B. *The Flavonoids*: advances in research since 1986. London: Chapman and Hall, 1986. 676 p.
- HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. & Therap.*, v. 96, p. 67– 202, 2002.
- HILL, R. A. Naturally occurring isocoumarins. *Progr. Chem. Organ. Nat. Prod.*, v. 49, p. 1-78, 1986.
- HO, J. C.; CHEN, C. M. Flavonoids from the aquatic plant *Eriocaulon buergerianum*. *Phytochemistry*, v. 61, p. 405–408, 2002.
- HOSTETTMANN, K.; QUEIROS, F. E.; VIEIRA, C. P. *Princípios ativos de plantas superiores*. São Carlos: Ed. UFSCar, 2003, p. 54.
- INTERTECHNE. Inventário hidroelétrico dos Rios Jequitinhonha e Araçuí: estudos preliminares. *Est. Ambientais*, v. 1, 2009, p. 5-12, apêndice D.
- JOVANOVIC, S. V.; STEENKEN, S.; TOSIC, M.; MARJANOVIC, B.; SIMIC, M.G. Flavonoids as antioxidants. *J. Am. Chem. Soc.* v. 116, p. 4846-4851, 1994.
- JURD, L.; GEISSMAN, TA. Absorption spectra of metal complexes of flavonoid compounds. *J. Org. Chem.*, v. 21, p. 1395-1401, 1956.
- KÄHKÖNEN, M.P. *et al.* Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.*, v. 47, p.3954-3962, 1999.
- KITAGAWA, R. R.; RADDI, M. S. G.; KHALIL, N. M.; VILEGAS, W.; FONSECA, L. M. Effect of the isocoumarin paepalantine on the luminal and lucigenin amplified chemiluminescence of rat neutrophils. *Biol. Pharm. Bull.*, v. 26, p. 905-908, 2003.
- LENORE, S.; CLESCERI, A.; GREENBERG, E.; ANDREW, D. E.; *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater*, 21th ed., American Public Health Association: Washington D.C, 2005.
- MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. *The systematic identification of flavonoids*. New York: Springer-Verlag, 1970.
- MABRY, T. J.; ULUBELEN, A. Chemistry and utilization of phenylpropanoids including flavonoids, coumarins, and lignans. *J. Agric. Food Chem.*, v. 28, p. 188-196, 1980.
- MACHADO, B. F. M. T.; FERNANDES JÚNIOR, A. Óleos Essenciais: Aspectos gerais e usos em terapias naturais. *Cad. Acad.*, Tubarão, v. 3, n. 2, p. 105-127, 2011.

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

MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.*, v. 113, n. 3/4, p. 173-215, 1983.

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

MONTEIRO, W. R.; MAZZONI, S. C. Aspectos morfológicos em ápice de inflorescências de Eriocaulaceae. *Bol. Bot. Universidade de São Paulo*, v. 4, p. 23-29, 1976.

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

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

MUNOS, B.; Lessons from 60 years of pharmaceutical innovation. *Nat. Rev. Drug. Discov.*, v. 8, p. 959 – 968, 2009.

OLIVEIRA, A. P. S. *Mutagenicidade e estrogenicidade de plantas da família Eriocaulaceae e relação estrutura-atividade de algumas substâncias isoladas*. 203f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2010.

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. *Ind. Crops Prod.*, v. 33, n. 2, p. 488-496, 2011.

PAGOTTO, T. C. S.; SOUZA, P. R. *Biodiversidade do complexo Aporé-Sucuriú: subsídios à conservação e ao manejo do Cerrado: área prioritária 316-Jauru*. Campo Grande: Ed. UFMS, 2006. 308 p.

PARK, E. J.; KIM, Y.; KIM, J. Acylated Flavonol Glycosides from the Flower of *Inula britannica*. *J. Nat. Prod.*, v. 63, p. 34-36, 2000.

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*. *J. Nat. Prod.*, v. 66, p. 1384-1387, 2003.

PEIXOTO SOBRINHO, T. J. S. et al. Otimização de Metodologia Analítica para o Doseamento de Flavonoides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. *Quím. Nova*, São Paulo, v. 33, n. 2, 2010.

PRISTA, L.N. *Tecnologia farmacêutica*. 5. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1995. v. 1-2.

RAHMAN, S. Z.; SINGHAL, K. C. Problems in pharmacovigilance of medicinal products of herbal origin and means to minimize them. *Uppsalla Reports* 17. January Supplement. 2002.

RESENDE, F. A. *Estudo do potencial antimutagênico, mutagênico, estrogênico e antibacteriano de flavonoides*. 158f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2011.

RIETJENS, I. M. C. M.; BOERSMA, M. G.; VAN DER WOUDE, H.; JEURISSEN, S. M. F.; SCHUTTE, M. E.; ALINK, G. M. Flavonoids and alkenylbenzenes: mechanisms of mutagenic action and carcinogenic risk. *Mutat Res*, v. 574, p. 124 - 138, 2005.

RODRIGUES, C. M. *Caracterização quali e quantitativa de metabólitos secundários em extratos vegetais*. 197 f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, Araraquara, 2007.

RUHLAND, W. Eriocaulaceae. In: ENGLER, A. (Ed.). *Das Pflanzenreich. IV 30 (Heft 13). Regni vegetabilis conspectus IV*. Leipzig: W. Engelmann, v. 4, n. 3, p. 1-249, 1903.

SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F.; GIULIETI, A. M. Contents of soluble phenolic compounds of capitula of Eriocaulaceae. *Quím. Nova*, v. 13, p. 289–292, 1990.

SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F.; SANTOS D. Y. A. C. Distribution and evolution of secondary metabolites in Eriocaulaceae, *Lythraceae* and *Velloziaceae* from “Campos Rupestres”. *Genet. Mol. Biol.*, v. 23, p. 931-940, 2000.

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.

SANTOS, F.S. *As plantas Brasileiras, os jesuítas e os indígenas do Brasil: história e ciência na triaga brasílica (séc. XVII-XVIII)*. São Paulo: Casa do Novo Autor, 2009.

SANTOS, L. C. *Estudo químico de plantas de Eriocaulaceae*. 198 f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, Araraquara, 2001.

SANTOS, L. C.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; TORO, R.; SANO, P. T.; VILEGAS, W. 6-Methoxyquercetin-3-O-(6"-E-feruloyl)- β -D-glucopyranoside from *Paepalanthus polyanthus* (Eriocaulaceae). *Biochem. System. Ecol.*, v. 30, p. 451-456, 2002.

SANTOS, L. C.; PIACENTE, S.; MONTORO, P.; PIZZA, C.; VILEGAS, W. Atividade antioxidante de xantonas isoladas de espécies de *Leiothix* (Eriocaulaceae). *Rev. Bras. Farmacogn.*, v. 13, n. 2, p. 67-74, 2003.

SANTOS, L. C.; VILEGAS, W.; COLOMBO, L.; PLAZARES, M. C. P.; CARLOS, Z. I. *In vitro* citotoxicity activity of planifolin isolated from *Paepalanthus planifolius* (Eriocaulaceae) on murine mammary and lung adenocarcinoma celular. In: *SIMPÓSIO DE IMUNOLOGIA* –

IMUNOLOGIA DOS TUMORES, 7., n. 9, 2005, Botucatu. *Anais...São Paulo: Anual Reviews of Biomedical Sciences*, 2005. v. 7.

SANTOS, L. C.; SILVA, M. A.; RODRIGUES, C. M.; CARBONE, V.; BASSARELLO, C.; MARI, A.; PIACENTE, S.; PIZZA, C. Characterization of Flavonoid and Naphthopyranone Derivatives from *Eriocaulon ligulatum* using Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Nat. Prod. Commun.*(Online), v. 4, p. 1651-1656, 2009.

SATO, C. S. *Parque Nacional da Serra do Cipó, MG: percepção ambiental e estabelecimento de áreas para educação*. 2007. 171 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Área Botânica) Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

SCATENA, V. L.; MORAES, A. R. S. Anatomia de raízes, folhas e escapos de *Paepalanthus* subgênero *Platycaulon* (Eriocaulaceae) da Serra do Cipó - MG. *Arq. Biol. Tecnol.*, v. 39, p. 1021-1035, 1996.

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

SILVA, I. G.; SILVA, H. H. G. S.; GUIMARÃES, V. P.; LIMA, C. G.; PEREIRA, A. L.; RODRIGUES FILHO, E.; ROCHA, C. Prospecção da atividade inseticida de plantas do cerrado, visando ao combate do *Aedes aegypti*. *Inf. Epidemiol. SUS*, v. 10, p. 51-52, 2001.

SILVA, M. A.; OLIVEIRA, A. P. S.; SANNOMIYA, M.; SANO, P. T.; VARANDA, E. A.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C. Flavonoids and naphytopiranone from *Eriocaulon ligulatum* and their mutagenic activity. *Chem. Pharm. Bull.*, v. 55, p. 1635-1639, 2007.

SILVA, M. A. Estudo químico e biológico de plantas da família Eriocaulaceae. 156f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, Araraquara, 2008.

SIMÕES, C. M. O.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P.; IRGANG, B.R.; STEHMANN, J. R. *Plantas da Medicina Popular do Rio Grande do Sul*. 5ª Edição, Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS, 1998. 174 p.

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

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JÚNIOR, G. M.; AYRES, M. C. C; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Total phenolics and antioxidant activity of five medicinal plants. *Quím. Nova*, v. 30, p. 351-355, 2007.

SPRINGFIELD, E. P.; EAGLES, P. K. F.; SCOTT, G. Quality assessment of South African herbal medicines by means of HPLCfingerprinting. *J. Ethnopharmacol.* v.101, p. 75-83, 2005.

- TANNUS, J. L. S. *Estudo da vegetação dos campos úmidos de cerrado: aspectos florísticos e ecológicos*. 2007. 138 f. Dissertação (Doutorado em Ciências Biológicas). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2007.
- TAVARAES, D. C.; VARANDA, E. A.; ANDRADE, F. D. P.; VILEGAS, W. Evaluation of the genotoxic potential of the isocoumarin paepalantine *in vivo* and *in vitro* mammalian systems. *J. Ethnopharmacol.*, v. 68, p. 115-120, 1999.
- TROVÓ, M.; SANO, P. T. Taxonomic survey of *Paepalanthus* section *Diphyomene* (Eriocaulaceae). *Phytotaxa*, v.14, p. 49-55, 2010.
- TROVÓ, M.; STÜZEL, T.; SCATENA, V. L.; SANO, P. T. Morphology and anatomy of inflorescence and inflorescence axis in *Paepalanthus* sect. *Diphyomene* Ruhland (Eriocaulaceae, Poales) and its taxonomic implications. *Flora*, v. 205, p. 242-250, 2010.
- TROVÓ, M. L. O. *Sistemática de Paepalanthoideae (Eriocaulaceae): Filogenia, morfologia e taxonomia de Diphyomene (Ruhland) Trovó*. 2010. 245 f. Tese (Doutorado em Ciências – Área: Botânica) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- VARANDA, E. A.; DEVIENNE, K. F.; RADDI, M. S. G.; FURUYA, E. M.; VILEGAS W. Mutagenicity of paepalantine dimer and glycoside derivatives from *Paepalanthus bromelioides*. *Toxicol. In Vitro*, v. 18, n. 1, p. 109-114, 2004.
- VARANDA, E. A.; RADDI, M. S. G.; DIAS, F. L. P.; ARAUJO, M. C. S.; GIBRAN, S. C. A.; TAKAHASHI, C. S.; VILEGAS, W. Evaluation of the genotoxic potential of the isocoumarin paepalantine *in vivo* and *in vitro* mammalian systems. *Teratogen Carcinogen Mutag*, v. 17, n. 2, p. 85-95, 1997.
- VEIGA-JUNIOR, V. F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. *Rev Bras Farmacogn.* v. 18, p. 308-313, 2008.
- VIEIRA, A.; GUIMARÃES, M.A.; DAVID, G.Q.; KARSBURG, I.V.; CAMPOS, A.R. Efeito genotóxico da infusão de capítulos florais de camomila. *Rev. Tróp. Ciênc. Agrár. Biol.*, v. 3, n. 1, 2009.
- VILEGAS, W.; ROQUE, N. F.; SALATINO, A.; GIESBRECHT, A. M.; DAVINO, S. Isocoumarin from *Paepalanthus bromelioides*. *Phytochemistry*, v. 29, p. 2299-2301, 1990.
- VILEGAS, W.; SANTOS, L. C.; ALECIO, A. C.; PIZZA, C.; PIACENTE, S.; PAUW, E.; SANO, P. T. Naphthopyranone glycosides from *Paepalanthus bromelioides*. *Phytochemistry*, v. 49, p. 207-210, 1998.
- VILEGAS, W.; DOKKEDAL, A. L.; RASTRELLI, L.; PIACENTE, S.; PIZZA, C. New naphthopyranone glycosides from *Paepalanthus vellozoides* and *P. latipes*. *J. Nat. Prod.*, v. 62, n. 5, p. 746-49, 1999.

WAGNER, H. M.; BLADT, S. *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*. Berlin: Springer - Germany, 1995, 350 p.

Article

Characterization of Flavonoids and Naphthopyranones in Methanol Extracts of *Paepalanthus chiquitensis* Herzog by HPLC-ESI-IT-MSⁿ and Their Mutagenic Activity

Fabiana Volpe Zanutto ^{1,2}, Paula Karina Boldrin ², Eliana Aparecida Varanda ², Samara Fernandes de Souza ¹, Paulo Takeo Sano ³, Wagner Vilegas ^{1,4} and Lourdes Campaner dos Santos ^{1,*}

¹ Department of Organic Chemistry, Institute of Chemistry, UNESP — Sao Paulo State University, Araraquara CEP 14800-900, Sao Paulo, Brazil

² Department of Biological Sciences, Faculty of Pharmaceutical Sciences of Araraquara, UNESP — Sao Paulo State University, Araraquara CEP 14801-902, Sao Paulo, Brazil

³ Institute of Biosciences, Sao Paulo University, Sao Paulo CEP 05508-900, Sao Paulo, Brazil

⁴ Experimental Campus of Sao Vicente, UNESP — Sao Paulo State University, Sao Vicente CEP 11350-000, Sao Paulo, Brazil

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: loursant@gmail.com; Tel.: +55-16-3301-9657; Fax: +55-16-3301-9500.

Received: 28 November 2012; in revised form: 11 December 2012 / Accepted: 18 December 2012
/ Published: 27 December 2012

Abstract: A HPLC-ESI-IT-MSⁿ method, based on high-performance liquid chromatography coupled to electrospray negative ionization multistage ion trap mass spectrometry, was developed for rapid identification of 24 flavonoid and naphthopyranone compounds. The methanol extracts of the capitulae and scapes of *P. chiquitensis* exhibited mutagenic activity in the *Salmonella*/microsome assay, against strain TA97a.

Keywords: *Paepalanthus*; naphthopyranones; flavonoids; mutagenicity

1. Introduction

Eriocaulaceae is a pantropical, predominantly herbaceous monocotyledonous family, comprising around 1,200 species in 10 genera [1]. They are common and diagnostic components of the herbaceous rocky outcrop vegetation of Brazil called “campos rupestres”, which flourishes at elevations exceeding

900 m above sea level. *Paepalanthus* is the largest genus in this family, with approximately 500 species, more than 400 occurring only in Brazil [2].

Taxonomic studies to delimit the genus, whose definition remains controversial, and the biological investigation of molecules isolated from Eriocaulaceae are of great importance, especially because several molecules possess antioxidant [3,4], cytotoxic and mutagenic activities [5–7] and some extracts of the assayed plants show antiulcerogenic activity [8].

Flavonoids have frequently been used in chemotaxonomy, because they are widespread, their patterns tend to be specific, they are relatively stable and their biosynthesis/accumulation is largely independent of environmental influence [9]. In our laboratories, glycosylated acyl flavonoids and quercetin derivatives with one sugar unit have been isolated from *Paepalanthus* genus [2,10–13].

Naphthopyranones are a class of natural metabolites, described until now only in the capitulae of the *Paepalanthus* genus, displaying anti-inflammatory [14] and cytotoxic activities [15]. Naphthopyranone derivatives are found in all the *Paepalanthus* species belonging to the subgenus *Platycaulon* [2,7,10,11,16]. However, there are no chemical and biological data for *Paepalanthus chiquitensis* Herzog (formally cited as *Paepalanthus giganteus* Sano), section *Diphyomene* [17].

Plants are valuable sources of potential chemotherapeutic drugs and are used to treat many ailments, but some medicinal plants and their compounds can be dangerous to human health [18–20]. The *Salmonella* mutagenicity test (Ames test) detects if any sample provokes specific mutations of the genetically modified DNA of selected *S. typhimurium* strains and is used worldwide as an initial screening of the mutagenic potential of new chemicals for hazard identification and for the registration or acceptance of new chemicals by regulatory agencies and an important component for making the bacterial mutagenicity test useful was the inclusion of an exogenous mammalian metabolic activation system, because bacteria are unable to metabolize chemicals via cytochromes P450, as in mammals and other vertebrates. Many carcinogens remain inactive until they are enzymatically transformed to an electrophilic species that is capable of covalently binding to DNA, leading to mutation [21].

In the present paper, methanol extracts of the capitulae and scapes of *P. chiquitensis* was prepared and analyzed by HPLC-ESI-ITMSⁿ and assayed by the Ames test in the *S. typhimurium* tester strains TA98 and TA97a (to detect frameshift mutations), TA100 (detects base-pair-substitution mutations) and TA102 (normally used to detect mutagens that cause oxidative damage and base-pair-substitution mutations) in presence and absence of metabolic activation system and the results compared with those from other *Paepalanthus* species.

2. Results and Discussion

In this study, methanol extracts of the capitulae and scapes of *P. chiquitensis* were prepared and analyzed by HPLC-ESI-ITMSⁿ. Several experiments were performed to establish suitable HPLC conditions. The best results were obtained with a Phenomenex Synergi Hydro RP-80 C₁₈ column eluted with a water/methanol gradient acidified with acetic acid, as described in the experimental section. The total ion current chromatograms of the two extracts generated by negative ion HPLC-ESI-IT-MSⁿ analysis are shown in Figures 1 and 2. The UV spectra were also recorded, since they provide useful data for the identification of different compounds exhibiting particular UV

The HPLC-ESI-MSⁿ analyses of compounds present in the methanol extracts of capitulae and scapes of *P. chiquitensis* led to the detection of flavonol and flavanonol derivatives and the presence of naphthopyranone derivatives (Tables 1 and 2 and Figures 1 and 2).

Figure 1. Total ion current chromatogram of the methanol extract of capitulae of *P.*

chiquitensis (HPLC-ESI-IT-MSⁿ negative ion mode). For conditions, see experimental part.

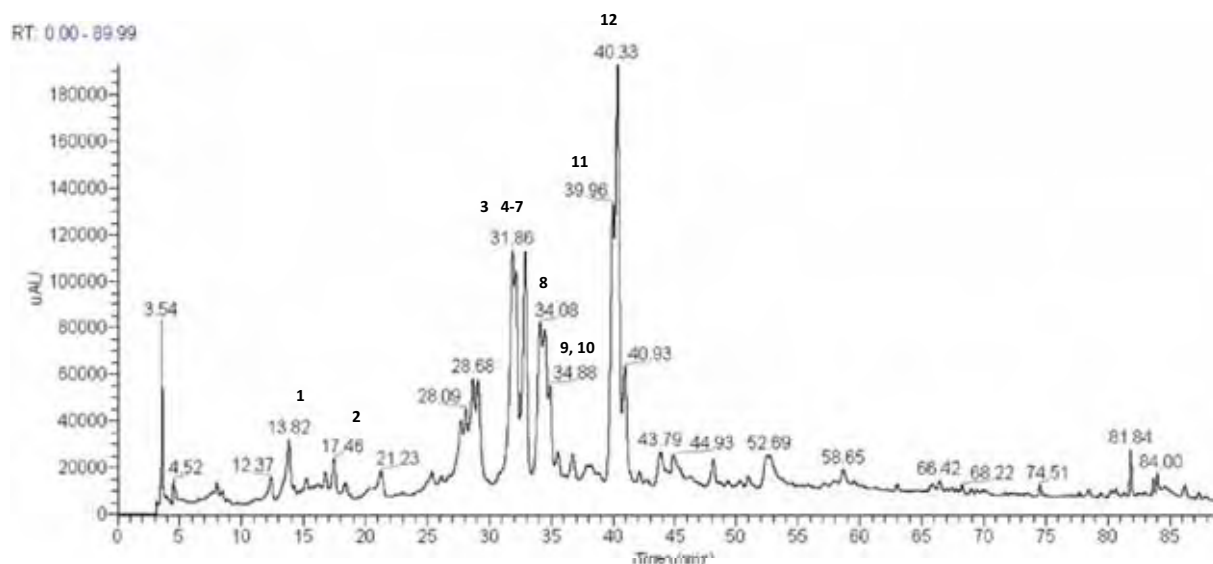


Figure 2. Total ion current chromatogram of the methanol extract of scapes of *P. chiquitensis* (HPLC-ESI-IT-MSⁿ negative ion mode). For conditions, see experimental part.

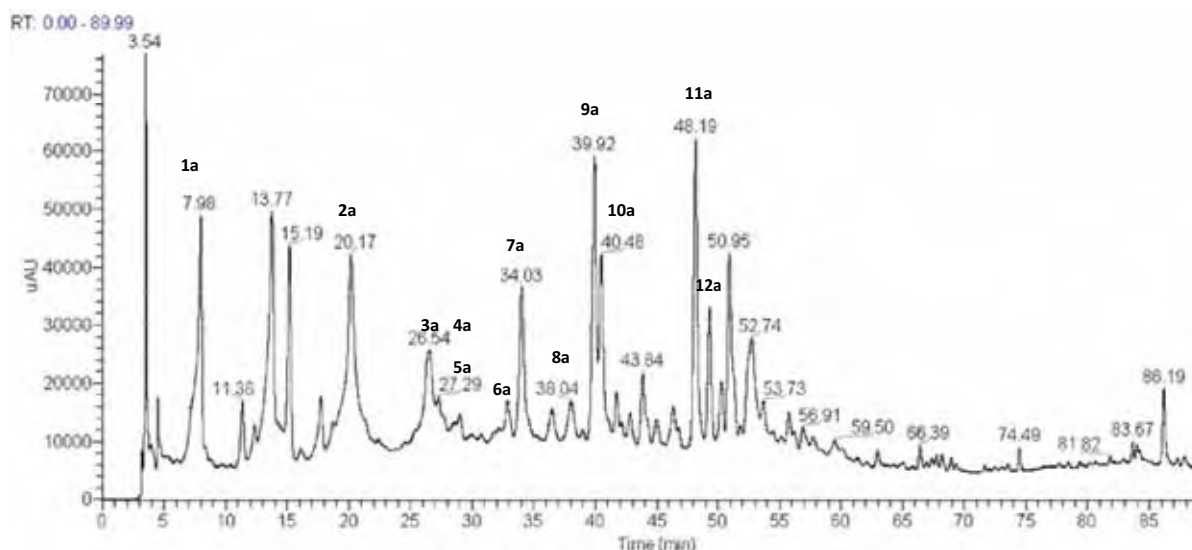


Table 1. ESI-MS and ESI-MSⁿ product ions of compounds occurring in the methanol extracts of capitulae from *P. chiquitensis*.

Substance	Peak	T _R	UV spectra λ _{max} (nm)	[M-H] [−]	Major MS ² and MS ³ fragments
6-Methoxyquercetin-7-O-β-D-glucopyranosyl-(6→1)-O-β-D-glucopyranoside 6,3'-Dimethoxyquercetin-7-O-β-D-glucopyranosyl-(6→1)-O-β-D-glucopyranoside	1 2	13.82 17.46	235, 345 235, 345	655 669	640,493, 331, 316 507, 345, 330, 302, 287
7-Methoxyquercetin-O-hexose	3	31.86	268, 342	477	315, 301, 273
6-Hydroxy-7,3,4-trimethoxyflavanonol-di-O-hexose	4	32.14	259, 349	685	623, 315
6-Methoxykaempferol-3-O-β-D-6-(p-coumaroyl)glucopyranoside	5	32.14	270, 315	623	608, 477, 300
6-Hydroxy-7-4-dimethoxyquercetin-3-O-hexose	6	32.31	257, 350	507	477, 315
6,3-Dimethoxyquercetin-3-O-β-D-6-(p-coumaroyl)glucopyranoside	7	32.88	262, 358	653	345, 330, 287
5-10-Dihydroxy-7-methoxy-3-methyl-1H-naphthol[2,3c]pyran-1-one-9-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→6)-O-β-D-glucopyranoside	8	34.08	271, 280sh, 383	595	449, 287
10-Hydroxy-5,7-dimethoxy-3-methyl-1H-naphthol[2,3c]pyran-1-one-9-O-β-D-allopyranosyl-(1→6)-O-β-D-glucopyranoside	9 10 11	34.48 34.88 39.96	273, 283sh, 362 252 281sh, 362 272,280sh381	625 625 433	593, 463, 301 609, 447, 285 271, 256
Quercetin-3-O-di-hexose 10-Hydroxy-7-methoxy-3-methyl-1H-naphthol[2,3c]pyran-1-one-9-O-β-D-glucopyranoside 10-Hydroxy-5-7-dimethoxy-3-methyl-1H-naphthol[2,3c]pyran-1-one-9-O-β-D-glucopyranoside	12	40.33	273,284sh, 384	463	301, 286, 272, 256

Table 2. ESI-MS and ESI-MSⁿ product ions of compounds occurring in the methanol extracts of scapes from *P. chiquitensis*.

Substance	Peak	T _R	UV spectra λ _{max} (nm)	[M-H] [−]	Major MS ² and MS ³ fragments
6-Hydroxyquercetin-3-O-di-hexose 6-	1a	7.98	260,295sh, 340	641	479, 317
Hydroxyquercetin-3-O-hexose dimer 6-	2a	20.17	260,274sh, 348	958	479, 463
Metoxykaempferol-3-O-hexose-O-pentose	3a	26.54	267, 337	577	431, 299
4-Methoxyapigenin-7-O-(3-galloyl)-α-D-	4a	26.94	267,337	831	803, 635, 623, 605, 315, 269
arabinopyranosyl-(2→1)-apiofuranosyl-(3→1)-α-D-					
arabinopyranoside					
6-Methoxyquercetin-7-O-glucoside	5a	27.29	253sh, 345	493	331, 316
6,3-Dimethoxyquercetin-3-O-β-D-6-(p-coumaroyl)-	6a	32.89	262sh,358	653	345, 330, 287
glucopyranoside					
5-10-Dihydroxy-7-methoxy-3-methyl-1H-	7a	34.03	268,279sh,349	595	449, 287
naphtho[2,3c]pyran-1-one-9-O-α-L-rhamnopyranosyl-					
(1→6)-O-β-D-glucopyranoside					
Flavanonol-di-O-hexose	8a	38.04	242,279sh,325	627	465, 303
10-hydroxy-7-methoxy-3-methyl-1H-	9a	39.92	270,279sh, 387	433	271, 256
naphtho[2,3c]pyran-1-one-9- O-β-D-glucopyranoside					
6-Hydroxy-7-methoxyquercetin-3-O-pentose	10a	40.48	250,283sh, 326	463	433, 331
6-Hydroxy-7,3,4-trimethoxyflavanonol	11a	48.19	242,261sh, 324	361	346, 331, 316
6-Hydroxy-7,4-dimethoxyquercetin-3-O-hexose	12a	49.31	250,283sh, 326	507	345, 286

The full negative ESI-MS spectrum of compound **4a** showed an $[M-H]^-$ ion at m/z 831. ESIMS² spectrum highlighted the presence of the aglycone ion at m/z 269, due to simultaneous loss of three sugar units and a galloyl unit.

The ¹H-NMR spectrum of compound **4a** exhibited signals for the aromatic protons at δ 7.96 (2H, *d*, J = 8.0 Hz, H2'/6'), 6.95 (2H, *d*, J = 8.0 Hz, H3/5), 6.79 (*s*, H-8), which revealed the substitution patterns in the B ring, while those at δ 6.42 (1H, *d*, J = 2.0 Hz) and 6.85 (1H, *d*, J = 2.0 Hz) corresponded to H-6 and H-8, respectively in the A ring. There was also a signal for hydrogen at δ 6.79 (2H, *s*). This signal showed correlations in the *g*HMBC contour map with carbons at δ 112.5, 147.0, 121.2, 149.6 and 165.0, confirming the presence of a galloyl unit. The location of a methoxy group was also confirmed by the *g*HMBC experiment, since the signal at δ 3.74 (3H, *s*) correlated with the carbon at δ 161.0 (C4). Analysis of the ¹H-NMR spectrum in the region of the sugars showed signals of anomeric protons at δ 5.11 (1H, *d*, J = 8.0 Hz), 5.34 (1H, *d*, J = 1.0 Hz) and 5.16 (1H, *d*, J = 7.0 Hz). Analysis of the signals in the TOCSY experiment suggests two possible arabinose units with α configuration. The chemical shift (deshielded) on the anomeric carbon at δ 108.0 suggested that one of the units of sugars could be apiose.

In the TOCSY experiment, we confirmed the spin systems of each sugar unit, because the signal radiated at δ 5.11 showed consistency with the transfer of signals at δ 3.82, 3.70, 3.64 and 3.38. Irradiation of the hydrogen in the signal at δ 5.34 showed correlation with the signals of protons at δ 3.74 and 3.38 and, finally, irradiation of the hydrogen signal at δ 5.16 correlated with the signals of protons at δ 3.50, 3.46, 3.38 and 3.20.

The sequence of the hydrogens in each system was confirmed in the COSY experiment. The correlations of the *g*HSQC experiment enabled the respective carbons to be assigned (Table 3). The deshielded C-7 (δ 164, 0) suggests that the carbon is replaced. In the *g*HMBC spectrum, correlations were observed between arabinose anomeric hydrogen at δ 5.11 and the carbon of the galloyl C-3" (δ 149.6). This experiment also showed that the hydroxyl at C2 (δ 72.8) of arabinose was replaced. This inference was made by observing the correlation of the apiose hydrogen signal at δ 5.34 with carbon C2 (δ 72.8) of the arabinose. The experiment shows *g*HMBC correlation of anomeric hydrogen δ 5.16 of the arabinose with the carbon of apiose at δ 79.0. Consequently, **4a** was determined to be the new 4-methoxyapigenin-7-*O*-(3-galloyl)- α -D-arabinopyranosyl-(2 $\rightarrow$ 1)-apiofuranosyl-(3 $\rightarrow$ 1)- α -D-arabinopyranoside (Figure 3, Table 3).

Table 3. ¹³C and ¹H-NMR Data (J in Hz) for the compounds **4a**, **7** and **6a** (500 MHz, δ ppm, in DMSO-*d*₆).

Position	4a	δ_C	7 and 6a	δ_C
	δ_H (J in Hz)		δ_H (J in Hz)	
2		164.1	-	156.4
3	6.85 <i>s</i>	103.9	-	132.6
4	-	180.0	-	177.0
5	-	161.8	-	152.5
6	6.42 <i>d</i> (2.0)	99.0	-	131.6

Table 3. Cont.

Position	4a	δ_C	7 and 6a	δ_C
	δ_H (Jin Hz)		δ_H (Jin Hz)	
7		162.6	-	157.4
8	6.85 <i>d</i> (2.0)	95.0	6.49 <i>s</i>	94.6
9	-	157.0	-	152.2
10	-	105.0	-	104.8
1	-	121.0	-	121.1
2	7.96 <i>d</i> (8.0)	129.3	7.55 <i>dd</i> (8.5, 2.0)	116.4
3	6.95 <i>d</i> (8.0)	116.5	6.85 <i>d</i> (9.0)	147.0
4	-	161.0	-	149.0
5	6.95 <i>d</i> (8.0)	116.5	6.76 <i>d</i> (8.5)	115.2
6	7.96 <i>d</i> (8.0)	129.3	7.51 <i>dd</i> (8.5, 2.0)	121.6
OCH ₃ -4	3.74 <i>s</i>	56.0	-	-
OCH ₃ -3	-	-	3.82	56.7
OCH ₃ -6	-	-	3.70	60.0
	galloyl		glucose	-
1		121.2	5.43 <i>d</i> (7.5)	100.8
2	6.79 <i>s</i>	112.0	3.37 <i>dd</i> (9.0; 7.5)	73.4
3	-	149.6	3.48 <i>dd</i> (9.0; 9.0)	76.8
4	-	139.0	3.27 <i>dd</i> (9.0; 9.0)	69.8
5	-	-	3.29 <i>m</i>	75.6
6	6.79 <i>s</i>	-	4.24 <i>dd</i> (6.0; 10.0)	62.8
			4.02 <i>dd</i> (5.0; 12.0)	
α	-	147.0	-	-
β	-	112.5	-	-
(C=O)	-	165.0	-	165.3
	arabinopyranosyl		coumaroyl	
1	5.11 <i>d</i> (8.0)	98.0	-	125.0
2	3.82 <i>dd</i> (5.5; 8.5)	72.8	7.36 <i>d</i> (8.5)	130.0
3	3.70 <i>dd</i> (3.5, 7.5)	76.7	6.78 <i>d</i> (8.5)	116.2
4	3.64 <i>m</i>	74.6	-	159.4
5	3.38 <i>dd</i> (11.5)	60.5	6.78 <i>d</i> (8.5)	116.2
	3.60 <i>d</i> (11.5)			
6'	-	-	7.36 <i>d</i> (8.5)	130.0
α	-	-	6.14 <i>d</i> (16.0)	114.5
β	-	-	7.31 <i>d</i> (16.0)	144.4
	apiofuranosyl			
1	5.34 <i>d</i> (1.0)	108.0	-	--
2	3.74 <i>d</i> (3.0)	76.7	-	-
3	-	79.0	-	-
4	3.64 <i>d</i> (5.5)	70.4	-	-
5	3.32 <i>dd</i>	64.9	-	-
	arabinopyranoside			-
1	5.16 <i>d</i> (7.0)	97.0	-	-
2	3.46 <i>dd</i> (5.5, 7.5)	72.8	-	-
3	3.50 <i>dd</i> (3.5; 7.5)	69.4	-	-
4	3.20 <i>m</i>	71.6	-	-
5	3.38 <i>d</i> (11.5)	62.5	-	-
	3.62 <i>d</i> (11.5)			

Figure 3. Cont.

Peak	TR	R1	R2	R3	R4	R5	R6
Scapes							
5 a	27.29	OH	OCH ₃	O-glc	OH	OH	
6 a	32.89	<i>p</i> -coum-O-glc	OCH ₃	OH	OCH ₃	OH	
7 a	34.03	OH	O-glc-glc	OH			
8 a	38.04	O-hex-hex	OH	OH	OH	OH	H
9 a	39.92	H	O-glc	OH			
10 a	40.48	O-xil	OH	OCH ₃	OH	OH	
11 a	48.19	OH	OH	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H
12 a	49.31	O-hex	OH	OCH ₃	OH	OCH ₃	

* alo: allose; api: apiose; ara:arabinose; coum: coumaroyl; gal: galloyl; glc: glucose; hex: hexose; rha: rhamnose; xyl: xylose.

The compounds **8**, **9**, **11**, **12** from the capitulae and **7a** and **9a** from the scapes of *P. chiquitensis* are in a class of substances, common in *Paepalanthus*, known as naphthopyranones. These were detected in greater quantities in the capitulae at the retention times: 34.08, 34.48, 39.96 and 40.33 min and in the scapes at 34.03 and 39.92 min.

These compounds were identified by comparing the peaks of their UV spectra with those of the available references in the literature. The naphthopyranones have characteristic bands at 270–273 and 280–284 nm [10,11,13,22,23].

The substances **11** and **9a** ($\lambda_{\max}$ = 272, 280, 381 nm) show a molecular ion at m/z 433, suggesting a paepalantine derivative $[M-H]^-$ [18]. The second-generation ion product spectrum of precursor ion at m/z 433 shows the loss of a hexose at m/z 271 $[M-H-162]^-$. The MS³ showed a peak at m/z 256 that refers to the loss of one hexose and a methyl group $[M-H-162-15]^-$. The information in the UV spectrum and the characteristic fragmentation of naphthopyranones lead us to suggest that this substance is 10-hydroxy-7-methoxy-3-methyl-1-H-naphtho[2,3c]pyran-1-one-9-O- β -D-glucopyranoside [22–24].

The substances **8** and **7a** ($\lambda_{\max}$ = 270, 279, 346 nm) show the molecular ion at m/z 595 $[M-H]^-$. The second-generation ion product of this ion at m/z 449 suggests the loss of rhamnose $[M-H-146]^-$ and the fragment ion at m/z 287 suggests the loss of two hexoses $[M-H-146-162]^-$. On the basis of these fragmentation patterns in the MS/MS and UV experiments, we suggest the presence of 5-10-dihydroxy-7-methoxy-3-methyl-1H-naphtho[2,3c]pyran-1-one-9-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1→6)-O- β -D-glucopyranoside [22,23].

The other paepalantine derivative common in *Paepalanthus* species is paepalantine-9-O- β -D-allopyranosyl-(1→6)-O- β -D-glucopyranoside, (**9**) [23,24]. This substance was identified at the retention time of 34.48 min, with a UV spectrum characteristic of paepalantine (273, 283, 362nm). The deprotonated molecular ion was identified at m/z 625 $[M-H]^-$. The MSⁿ spectrum shows characteristic fragmentation at m/z 593 $[M-H-31]^-$, 463 $[M-H-162]^-$ and 301 $[M-H-(2 \times 162)]^-$, respectively, suggesting the loss of two hexoses and a methoxy group. This substance was detected only in the capitulae of *P. chiquitensis*.

Finally, in the capitulae ($T_R = 40.33$ min), we detected another paepalantine derivative (**12**) with UV spectrum ($\lambda_{max} = 273, 284, 384$ nm). The ESI-MS spectrum showed the deprotonated molecule at m/z 463 $[M-H]^-$. The MSⁿ spectrum showed the characteristic fragmentation sequence at m/z 301 $[M-H-162]^-$, 286 $[M-H-15-162]^-$, 272 $[M-H-162-(2 \times 15)]^-$ and 256 $[M-H-162-(3 \times 15)]^-$. These data suggested that this molecule is 10-hydroxy-5-7-dimethoxy-3-methyl-1H-naphtho[2,3c]pyran-1-one-9-*O*- β -D-glucopyranoside, a naphthopyranone previously isolated from *P. bromeliodes*, *P. hilairei* and *P. ramosus* [10,22,23,25].

Compounds **4** of the capitulae and **8a**, **11a** of the scapes, with retention times 32.14 and 38.04 and 48.19 min, produce UV spectra characteristic of flavanone [9,25]. The ESI-MS of the compound **4** shows the deprotonated molecular ion at m/z 685, suggesting that it is a flavanone with the molecular formula $C_{30}H_{38}O_{18}$. The ion at m/z 623 refers to the loss of two methoxyl groups and the fragment ion at m/z 315 refers to the loss of two methoxyl groups and two hexoses.

The ions produced from the scape extract showed fragments characteristic of the diglycoside flavanone in **8a** at m/z 627 $[M-H]^-$. This is evidence of the loss of hexose at m/z 465 $[M-H-162]^-$ and two hexoses at m/z 303 $[M-H-(2 \times 162)]^-$.

Finally, at m/z 361 in **11a**, we suggest the 6-hydroxylated flavanone with three methoxyl groups. These flavanones are not common in the Eriocaulaceae, but there is a report of the isolation, in methanolic extract of the leaves of *Paepalanthus argenteus* var. *argenteus* (Bongard) Hensold, of a flavanone characterized as xeractinol. This dihydroflavone served as a taxonomic marker of *Paepalanthus* subg. *xeractis* [26]. Since such flavanones have been identified in *P. chiquitensis*, we suggest that this class of compounds can be of use in the chemotaxonomy of *Paepalanthus*.

Compound **2a**, with retention time 20.17 min in scape extract, shows a deprotonated molecule at m/z 958 suggesting that it is a flavonoid dimer. The MS/MS spectrum shows a fragment at m/z 479, indicating the fragmentation of a part of the dimer $[M-H-C_{21}H_{19}O_{12}]^-$, and another at m/z 463, indicating another part of the dimer $[M-H-C_{21}H_{19}O_{13}]^-$. This suggests that this molecule has the structure of a 6-hydroxyquercetin derivative, with a hexose on each part of the dimer. The connection between the two parts of the dimer could not be established by ESI-MS, requiring isolation and structural elucidation by NMR.

A kaempferol derivative **3a** containing a pentose was also detected at retention time 26.54 (in the scapes). The evidence for this is as follows: the deprotonated molecule was identified at m/z 577. The MS/MS spectrum showed the loss of rhamnose at 146 Da and MS³ showed the loss of a hexose and a pentose at m/z 299 $[M-H-146-132]^-$.

The signal at m/z 669 (**2**) also suggests a quercetin derivative [24]. The sequence of fragmentation in the MSⁿ spectra showed a hydroxydimethoxyquercetin with two hexoses. Specifically, the fragmentation pattern exhibited by compound **2** was coherent with the 6-3-dimethoxyquercetin core supporting two hexosyl moieties, while the MS/MS experiment on compound **2** showed a product ion at m/z 345, due to the simultaneous elimination of two sugar units $[M-H-162-162]^-$, and an ion at m/z 330, due to the loss of a methyl group from the 6-methoxyquercetin core. NMR data of the isolated compound **2** confirmed that it was 6-3-dimethoxyquercetin-3-*O*- β -D-glucopyranosyl-(6 $\rightarrow$ 1)-*O*- β -D-glucopyranoside [27].

A methoxyquercetin derivative was detected at the retention time (tR) 13.82 min in the capitulae extract. The ESI-MS spectrum showed the molecular ion (**1**) at m/z 655, the MS^2 spectrum had a peak at m/z 493 $[M-H-162]^-$ and MS^3 had a peak at m/z 331 $[M-H-162-162]^-$ showing the consecutive loss of two hexoses [24].

The ion with retention time 7.98 min (**1a**, scapes), showed a product ion at m/z 641. The MS^2 spectrum shows a fragment ion at m/z 479 $[M-162-H]^-$, due to the flavonol aglycone, originating by the loss of a hexose unit from the precursor ion, and an at ion a m/z 317, due to the consecutive loss of two hexoses from the 6-hydroxyquercetin core $[M-162-162-H]^-$.

A methoxyquercetin derivative was detected at the retention time of 27.29 (**5a**) min in the total ion current (TIC) profile of the scapes. The relative mass spectrum exhibited a peak at m/z 493 and the MS^2 spectrum exhibited a fragment at m/z 331, due to the flavonoid aglycone, formed by the loss of a hexose unit from the precursor ion. We suggest that **5a** is the 6-methoxyquercetin-7-O-glucoside [28].

Another methoxyquercetin derivative was detected only at the retention time 31.86 min (**3**) in the extract of capitulae. The full negative ESI-MS spectrum showed an ion at m/z 477 $[M-H]^-$ (Table 1). The MS^2 spectrum showed a peak at m/z 315 $[M-H-162]^-$, suggesting the loss of a hexose.

The flavonoid acyl glycosides are common in *Paepalanthus* species. These compounds were detected in *P. Chiquitensis* at retention times 32.14 and 32.88 min, in methanolic extracts from capitulae and scapes respectively (**5**, **7** and **6a**).

The ESI-MS spectrum showed the ion of compounds **7** and **6a** at m/z 653 $[M-H]^-$. The ESI- MS^2 spectrum of this ion showed a representative ion at m/z 345, attributed to the loss of two hexoses $[M-146-162-H]^-$, and the ion at m/z 330 showed the loss of the methyl group $[M-H-146-162-15]^-$. The MS^2 of the ion precursor at m/z 653 afforded an ion product at m/z 287, attributed to the loss of the other methyl group and CO $[M-H-146-162-(2 \times 15)-28]^-$.

The 1H -NMR spectrum of compound **7** and **6a** showed the proton signals that clearly indicated an OH group in a singlet at δ 12.71, due to hydrogen bonding to the C4 carbonyl. A doublet at δ 7.55 ($J = 2.0$ Hz), a double doublet at δ 7.51 ($J = 8.5$ Hz; 2.0 Hz) and a doublet at δ 6.76 ($J = 8.5$ Hz) are related to the B-ring of the aglycone moiety. The singlet at δ 6.47 was assigned to H8 of the A ring. These data, along with those derived from HSQC and HMBC experiments, allowed the aglycone moiety of **7** and **6a** to be identified as 6-methoxyquercetin. Two other doublets at δ 6.78 ($J = 8.0$ Hz) and δ 7.36 ($J = 8.0$ Hz) were attributed to H3/H5 and H2/H6 of the *p*-coumaroyl moiety, respectively. The two doublets ($J = 16.0$ Hz) at δ 6.15 and 7.33 were assigned to Ha and Hb of the *p*-coumaroyl moiety with *trans* stereochemistry, respectively. The signal at δ 5.43 ($J = 7.5$ Hz) was assigned to a D-glucose in the β -configuration. The singlets at δ 3.69 and 3.82 (3H each) indicated the presence of the two methoxy groups. The assignments of each signal, based on 2-D 1H - 1H COSY, ^{13}C - 1H COSY and gHMBC spectra, are shown in Table 3.

The signal at δ 63.1 (CH2) shows that the *p*-coumaroyl linkage was at C-6 of the glucose unit. The deshielding of C2, compared to patuletin (in which C2 is observed at δ 147.1), indicated that position 3 should be substituted by the *p*-coumaroyl glucose moiety [29]. This evidence was confirmed by HSQC, HMBC, and COSY correlations. The downfield shifts of H-6a-6b and C-6 of the glucose unit (δ H 4.31 and 4.26; δ C 62.8) suggested that the *p*-coumaroyl moiety was located at C-6glc. HMBC correlation between the two proton signals at δ 4.31 and 4.26 and the carboxylic carbon at δ 166.2 confirmed this assumption.

Thus, compounds **7** and **6a** are the new 6,3-dimethoxyquercetin-3-*O*- β -D-6-(*p*-coumaroyl) glucopyranoside.

Another acyl glycoside identified was 6-methoxykaempferol-3-*O*- β -D-6-(*E-p*-coumaroyl)-glucopyranoside (**5**) [23,30]. The deprotonated molecule was detected at m/z 623. The MS² spectrum shows the loss of *p*-coumaroyl at m/z 477 [M-H-146][−]. MS³ shows the fragment ion at m/z 300 that was attributed to the loss of *p*-coumaroyl and the one hexose and one methyl group [M-H-146-162-15][−] and finally at m/z 300, we detected the aglycone [M-H][−] which proved to be a derivative of kaempferol.

It can be seen therefore that most of the compounds in the methanolic extracts of capitulae and scapes of *P. chiquitensis* were basically flavonoids (quercetin derivatives) and naphthopyranones (paepalantine derivatives), illustrated in Figure 3. The contents of quercetin and paepalantine derivatives were determined in $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ of capitulae extract (335 ± 2.4 and 455 ± 3.3) and scapes (391 ± 1.1 and 431 ± 1.4) respectively [31].

Table 4 shows the mean number of revertants/plate (M), the standard deviation (SD) and the mutagenic index (MI) after treatments with the methanolic extracts of capitulae and scapes from *P. chiquitensis*, observed in *S. typhimurium* strains TA98, TA100, TA97a and TA102, in the presence(+S9) and absence (−S9) of metabolic activation.

The *Salmonella* strains used in the test have different mutations in various genes in the histidine operon; each of these mutations is designed to be responsive to mutagens that act via different mechanisms [21]. A series of doses were used, from 0.6 to 11 mg/plate, and mutagenic activity was observed only with TA97a, both in the presence and absence of metabolic activation. These results reveal that the MeOH extracts from the capitulate and scapes of *P. chiquitensis* contains compounds that cause frameshift mutations by acting directly and indirectly on the DNA. Results were negative with strains TA100, TA98 and TA102, with or without S9.

Other studies on the methanolic extract of capitulae of Eriocaulaceae species have been carried out [5–7,32]. In these studies, the mutagenic activity was induced by naphthopyranones present in these parts. Mutagenicity studies carried out with naphthopyranones and flavonoids [7], led to the conclusion that the mutagenicity observed in strain TA97a for the methanol extracts of capitulae and scapes, was due to the naphthopyranone and quercetin derivatives present. The values of MI were higher for capitulae than for scapes and more naphthopyranone than quercetin derivatives were detected in the extract of capitulae. The naphthopyranone has hydroxyls at positions 1, 9 and 10, which are free to make hydrogen bonds with the DNA bases. In flavonoids, this mutagenic activity is due to a free hydroxyl at position 3, a double bond between positions 2 and 3, and a keto group at position 4, allowing the free hydroxyl in position 3 to tautomerise the molecule to a 3-keto molecule [20,33].

Table 4. Mutagenic activity expressed as the mean and standard deviation of the number of revertants/plate and the mutagenic index (MI), in bacterial strains TA98, TA97a, TA100 and TA102 treated with methanolic extract of capitulae and scapes of *P. chiquitensis* at various doses, with (+S9) or without (−S9) metabolic activation.

Treatments		Nuber of revertants/plate in <i>S. typhimurium</i> strains(M ± DP) and (RM)							
mg/plate	TA98	TA97a				TA100		TA102	
Ext. MeOH	-S9 ^b	+S9 ^d	-S9 ^b	+S9 ^d	-S9 ^a	+S9 ^d	-S9 ^c	+S9 ^e	
Capitulae									
0.0	24±1	31±2	133±17	161±24	185±11	123±9	382±30	248±3	
0.625	--	--	--	--	--	--	245±24 (0.6)	388±71 (1.5)	
1.25	--	--	--	--	--	--	277±21 (0.7)	332±64 (1.3)	
1.875	34±9 (1.8)	32±1 (1.5)	753±127** (5.6)	1410±172** (8.7)	334±21 (1.65)	193±12 (1.6)	--	--	
2.5	--	--	--	--	--	--	359±53 (0.9)	350±7 (1.4)	
3.75	35±8 (1.1)	29±5 (1.3)	419±108*(3.1)	1358±76** (17.9)	187±12 (0.9)	148±7 (1.2)	421±133 (1.1)	341±104(1.37)	
7.5	57±11 (1.8)	33±4 (1.5)	698±259*(5.2)	1493±62** (24.0)	151±24 (0.74)	172±11 (1.4)	--	--	
11.25	47±8 (1.4)	39±2 (1.8)	231±68 (1.7)	1348±127** (10.5)	118±13 (0.58)	156±12 (1.3)	--	--	
Control +	1944±120	2877±749	1197±57	3605±34	2033±236	1700±311	1836±117	671±25	
Ext. MeOH	-S9 ^b	+S9 ^d	-S9 ^b	+S9 ^d	-S9 ^a	+S9 ^d	-S9 ^c	+S9 ^e	
Scapes									
0.0	24±2	31±3	134±2	235±10	185±11	105±11	382±30	248±3	
0.625	--	--	--	--	--	--	468±10 (1.2)	370±26 (1.48)	
1.25	--	--	--	--	--	--	427±33 (1.1)	320±25 (1.28)	
1.875	47±2 (1.5)	32±2 (1.5)	384±65 (2.3)	837±77 (2.6)	382±21 (1.6)	180±6.1 (1.7)	--	--	
2.5	--	--	--	--	--	--	492±138 (1.28)	377±13 (1.5)	
3.75	41±1 (1.2)	34±6 (1.6)	235±132 (1.4)	909±180 (2.9)	187±12 (0.9)	196±10 (1.9)	493±21 (1.28)	321±61 (1.28)	
7.5	61±4 (1.9)	37±4 (1.7)	172±46 (1.0)	708±73 (2.2)	151±24 (0.7)	194±7 (1.9)	--	--	
11.25	41±6 (1.3)	41±2 (1.9)	30±19 (0.2)	580±89 (1.8)	21±2 (0.1)	192±28 (1.8)	--	--	
Control +	1944±120	2877±749	1465±57	2010±536	2033±236	3221±117	1836±117	671±25	

* $p < 0.05$ (ANOVA); ** $p < 0.01$, M ± SD = mean and standard deviation. MeOH Ext.: methanolic extract; 0 = Negative control: DMSO – 75 µL/plate. Control +; Positive control: ^a Sodium azide (2.5µg /plate); ^b NPD (4-nitro-O-phenylenediamine – 10µg/plate); ^c Mitomycin (0.5µg /plate); ^d 2-Anthramine (1.25µg /plate); ^e 2-Aminofluorene (10µg /plate). Values inbrackets (MI) ≥ 2 indicate mutagenicity.

3. Experimental

3.1. Chemicals

HPLC-grade methanol was purchased from JT Baker (Baker Mallinckrodt, Phillipsburg, NJ, USA). HPLC-grade water was prepared with a Millipore (Bedford, MA, USA) Milli-Q purification system.

3.2. Plant Material

Capitulae and scapes of *P. chiquitensis* were collected in March 2010, in Serra do Cipó, Minas Gerais State, Brazil, geographical coordinates of 18°18'00.39"S, 43°41'06.46"W and authenticated by Professor Dr. Paulo Takeo Sano of the São Paulo University (USP), SP. A voucher specimen (3736 SPF) was deposited at the Herbarium of the IB-USP.

3.3. Extraction

Dried and powdered capitulae (256 g) and scapes (176.7 g) of *P. chiquitensis* were separately extracted by maceration at room temperature with methanol. The solutions were evaporated to dryness under vacuum to give 13.2 g of crude methanol extract of capitulae (7.4%), and 15.7g of crude methanol extract of scapes (6.1%).

3.4. Sample Preparation

The methanol extracts of capitulae and scapes of *P. chiquitensis* were processed as reported in Santos *et al.* [13]. The crude extract (1 g) was dissolved in methanol (10 mL) and the mixture was centrifuged for 5 min at 3,200 rpm. The supernatant was filtered through a nylon membrane disk 22, 25 mm diameter, 0.22 µm pore size (Flow Supply, Cotia, SP, Brazil).

3.5. Isolation of Compounds and Characterization

The dried methanolic extract of capitulae (3.0 g) was dissolved in 15 mL MeOH and centrifuged for 10 min at 3500 rpm, twice. The combined supernatants were fractionated on a Sephadex LH-20 column (56 cm × 3 cm), using MeOH (1.5 L) as mobile phase, affording 302 fractions (7 mL) each.

The Sephadex fraction 24 (10 mg) afforded the pure compound 5 (10 mg, from the capitulae). Fractions 47–54 (161 mg) were separated by semi-preparative HPLC IR, on a Phenomenex Synergi Hydro RP 80 column (40 × 250 × 10.00 mm i.d., 4 µm), with injected volume 40 µL, at a flow rate 2.0 mL·min⁻¹. The mobile phase consisted of 95% water (eluent A) and 5% methanol (eluent B), containing 0.1% acetic acid, in isocratic mode and afforded the compound **4a** (4 mg).

NMR analyses and 2D experiments of the compounds were run on a Varian® INOVA 500 operating at 500 MHz for ¹H and 125 MHz for ¹³C (11.7 T), using TMS as internal standard.

3.6. Standard Solutions

Standard substances were obtained from a collection in our laboratory (8, 9, 11, 12, 7a and 9a for naphthopyranones and 1, 2 and 5 for flavonoids) isolated previously from Eriocaulaceae species and used as external standards. Analysis of these compounds by HPLC revealed a purity of 98.5% in the standards. These standards and the compounds isolated from the methanolic extract of the capitulae from *P. chiquitensis* were utilized as external standards in tests to identify the compounds in the methanolic extract of the scapes from *P. chiquitensis*.

3.7. HPLC-ESI-IT-MSⁿ Analyses

The methanol extracts of *P. chiquitensis* (capitulae and scapes) were analyzed separately by in-line HPLC-ESI-IT-MSⁿ, using a SURVEYOR MS micro system coupled in-line to an LCQ Fleet ion-trap mass spectrometer (Thermo Scientific). HPLC separation was conducted on a Phenomenex Luna RP 18 column (250 × 4.6 mm i.d. 5 micron) using a gradient mobile phase with a flow rate of 0.8 mL·min⁻¹ of water (A) and methanol (B) plus 0.1% acetic acid. Initial conditions were 5% (B) increasing to reach 100% (B) and hold at 100% (B) at 80 min and held at 100% (B) for 10 min.

The column effluent was split into two by means of an in-line T junction which sent it both to ESI-MSⁿ and UV-DAD; 80% was sent to the UV-DAD detector and 20% was analyzed by ESI-MSⁿ in negative ion mode with a Fleet LCQ Plus ion-trap instrument from Thermo Scientific. The capillary voltage was set at -20 kV, the spray voltage at -5 kV and the tube lens offset at 100 V, sheath gas (nitrogen) flow rate at 80 (arbitrary units) and auxiliary gas flow rate at 5 (arbitrary units). Data were acquired in MS1 and MSn scanning modes. The capillary temperature was 275 °C. Xcalibur 2.1 software (Thermo Scientific) was used for data analysis.

3.8. ESI-MSⁿ Analysis

Each isolated compound was subjected to negative ESI-MS⁻¹ analysis under the same conditions as those used for HPLC-ESI-IT-MSⁿ analysis. Each compound was dissolved in methanol and infused in the ESI source by a syringe pump (flow rate 5mL/min). Nitrogen was used both as drying gas, at a flow rate of 60 (arbitrary units) and as nebulizing gas. Ion spray voltage was 5 kV and the tube lens offset was -55 V. The nebulizer temperature was set at 275 °C, and a potential of -4 V was used on the capillary. Negative ion mass spectra were recorded in the range *m/z* 150–2,000. The first event was a full-scan mass spectrum to acquire data on ions in the *m/z* range. The second event was an MS/MS experiment in which data-dependent scanning was carried out on deprotonated molecules of the compounds, at collision energy of 20% and activation time of 30 ms.

3.9. Salmonella Mutagenicity Assay (Ames Test)

Chemicals: Dimethylsulfoxide (DMSO), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate sodium salt (NADP), D-glucose-6-phosphate disodium salt, L-histidine monohydrate, and D-biotin were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

Standard Mutagens: Sodium azide, 2-anthramine, mitomycin and 4-nitro-*O*-phenylenediamine (NPD) were also obtained from Sigma. Oxoid Nutrient Broth N° 2 (Oxoid, UK) and Difco Bacto Agar

(Difco, Oxoid, Basingstoke, HAM, UK) were used for the preparation of bacterial growth media. All other reagents used to prepare buffers and media were from Merck (Whitehouse Station, NJ, USA) and Sigma.

3.10. Experimental Procedure

Test substances were first incubated for 20–30 min with the *S. typhimurium* strains TA100, TA98, TA97a and TA102, with or without metabolic activation by the addition of S9 mix [34]. *S. typhimurium* strains were kindly provided by Dr. B. Ames, University of California, Berkeley, CA, USA. The samples tested were the methanolic extracts of capitulae and scapes at four different doses in the range 0.60–11.25 mg/plate, dissolved in DMSO. The concentrations used were based on the bacterial toxicity established, in a preliminary test. The upper limit of the dose range tested for mutagenicity was either the highest non-toxic dose or the lowest toxic dose determined in the preliminary test. Toxicity was apparent either as a reduction in the number of His⁺ revertants in the Ames test or as an alteration in the auxotrophic background lawn. The various doses tested were added to 500 µL of buffer (pH 7.4) and 100 µL of bacterial culture and then incubated at 37 °C for 20–30 min. Next, 2 mL of top agar was added to the mixture and the whole poured on to a plate containing minimal agar. The plates were incubated at 37 °C for 48 h and the His⁺ revertant colonies were counted manually. The influence of metabolic activation was tested by adding 500 µL of S9 mixture (4%) to the bacterial culture in place of the buffer. The S9-mix was freshly prepared before each test with an Aroclor-1254-induced rat liver fraction purchased (lyophilized) from Moltox (Molecular Toxicology Inc., Boone, NC, USA). All experiments were analyzed in triplicate. The standard mutagens used as positive controls in experiments without S9-mix were 4-nitro-*O*-phenylenediamine (10 µg/plate) for TA98 and TA97a, sodium azide (1.25 µg/plate) for TA100 and mitomycin (0.5 µg/plate) for TA102. In tests with metabolic activation, 2-anthramine (0.125 µg/plate) was used for TA98, TA100 and TA97a and 2-aminofluorene (10 µg /plate) for TA102. DMSO (75 µL/plate) served as the negative (solvent) control. The statistical analysis was performed with the Salanal computer program, adopting the Bernstein model [35]. The mutagenic index (MI) was also calculated for each dose, as the average number of revertants per plate divided by the average number of revertants per plate of the negative (solvent) control. A sample was considered mutagenic when $MI \geq 2$ for at least one of the tested doses and the response was dose dependent [5,20,21].

4. Conclusions

This paper described a sensitive, specific and simple method for characterization of major constituents of *P. chiquitensis* extracts. Eighteen flavonoids of the types flavanone and flavonol and six naphthopyranones were identified or tentatively characterized in one LC-MSⁿ run. Results obtained by this method could significantly decrease the time required for the identification of some known flavonoids present in *P. chiquitensis* extracts; furthermore, isolation and purification of authentic reference were unnecessary. This methodology also provides chemical support for the chromatographic *fingerprint* technology and could facilitate the taxonomic study of the genus *Paepalanthus*. It is also suggested that the concentration of flavonoids and naphthopyranones found in the capitulae and scapes of *P. chiquitensis* can explain the mutagenic activity towards strain TA97a.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the financial support of the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) Program which provided the fellowship to the project to L.C.S. We also thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for grants to W.V.; E.A.V. and L.C.S. and for a fellowship to F.V.Z.

References

- 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* **2012**, *60*, 50–56.
- Dokkedal, A.L.; Santos, L.C.; Sano, P.T.; Vilegas, W. Chemistry in Eriocaulaceae. *Z. Naturforsch. C.* **2008**, *63*, 169–175.
- Santos, L.C.; Piacente, S.; Montoro, P.; Pizza, C.; Vilegas, W. Atividade antioxidante de xantonas isoladas de espécies de *Leiothix* (Eriocaulaceae). *Rev. Bras. Farmacogn.* **2003**, *13*, 67–74.
- Devienne, K.F.; Calgaro-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* **2007**, *68*, 1075–1080.
- Varanda, E.A.; Devienne, K.F.; Raddi, M.S.G.; Furuya, E.M.; Vilegas, W. Mutagenicity of paepalantine dimer and glycoside derivatives from *Paepalanthus bromelioides*. *Toxicol. In Vitro* **2004**, *18*, 109–114.
- Varanda, E.A.; Raddi, M.S.G.; Dias, F.L.P.; Araujo, M.C.S.; Gibran, S.C.A.; Takahashi, C.S.; Vilegas, W. Mutagenic and cytotoxic activity of an isocoumarin (paepalantine) isolated from *Paepalanthus vellozioides*. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* **1997**, *17*, 85–95.
- Silva, M.A.; Oliveira, A.P.S.; Sannomiya, M.; Sano, P.T.; Varanda, E.A.; Vilegas, W.; Santos, L.C. Flavonoids and naphthopyranone from *Eriocaulon ligulatum* and their mutagenic activity. *Chem. Pharm. Bull.* **2007**, *55*, 1635–1639.
- Coelho, R.G.; Batista, L.M.; Santos, L.C.; Brito, A.R.M.S.; Vilegas, W. Phytochemical study and antiulcerogenic activity of *Syngonanthus basiculatus* (Eriocaulaceae). *Rev. Bras. Cienc. Farm.* **2006**, *42*, 413–417.
- Markham, K.R. *Techniques of Flavonoid Identification*; Academic Press: London, UK, 1982; p. 113.
- Vilegas, W.; Santos, L.C.; Alecio, A.C.; Pizza, C.; Piacente, S.; Pauw, E.; Sano, P.T. Naphthopyranone glycosides from *Paepalanthus bromelioides*. *Phytochemistry* **1998**, *49*, 207–210.
- Vilegas, W.; Nehme, C.J.; Dokkedal, A.L.; Piacente, S.; Rastrelli, L.; Pizza, C. Quercetagenin 7-methyl ether glycosides from *Paepalanthus vellozioides* and *Paepalanthus latipes*. *Phytochemistry* **1999**, *51*, 403–409.
- Andrade, F.D.P.; Rastrelli, L.; Pizza, C.; Sano, P.T.; Vilegas, W. Flavonol glycosides and a naphthopyranone glycoside from *Paepalanthus macropodus* (Eriocaulaceae). *Biochem. Syst. Ecol.* **2002**, *30*, 275–277.
- Santos, L.C.; Sannomiya, M.; Piacente, S.; Pizza, C.; Sano, P.T.; Vilegas, W. Chemical profile of the polar extract of *Paepalanthus microphyllus* (Guill.) Kunth (Eriocaulaceae). *Rev. Bras. Cienc. Farm.* **2004**, *40*, 433–436.

14. 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 Med.* **2004**, *70*, 315–320.
15. Devienne, K.F.; Raddi, M.S.G.; Varanda, E.A.; Vilegas, W. *In vitro* cytotoxic of some natural and semi-synthetic isocoumarins from *Paepalanthus bromelioides*. *Z. Naturforsch.* **2002**, *57*, 85–88.
16. Piacente, S.; Santos, L.C.; Mahmood, N.; Zampelli, A.; Pizza, C.; Vilegas, W. Naphthopyranone glycosides from *Paepalanthus microphyllus*. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 680–682.
17. Trovó, M.; Sano, P.T. Taxonomic survey of *Paepalanthus* section *Diphyomene* (Eriocaulaceae). *Phytotaxa* **2010**, *14*, 49–55.
18. Jin, J.; Liu, B.; Zhang, H.; Tian, X.; Cai, Y.; Gao, P. Mutagenicity of Chinese traditional medicine Semen *Armeniacae amarum* by two modified Ames tests. *BMC Complement. Altern. Med.* **2009**, *15*, 43–50.
19. Gulluce, M.; Agar, G.; Baris, O.; Karadayi, M.; Orhan, F.; Sahin, F. Mutagenic and antimutagenic effects of hexane extract of some *Astragalus* species grown in the eastern Anatolia region of Turkey. *Phytother. Res.* **2010**, *24*, 1014–1018.
20. Resende, F.A.; Vilegas, W.; Santos, L.C.; Varanda, E.A. Mutagenicity of flavonoids assayed by bacterial reverse mutation (Ames) test. *Molecules* **2012**, *17*, 5255–5268.
21. Mortelmans, K.; Zeiger, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutat. Res.* **2000**, *455*, 29–60.
22. Santos, L.C.; Piacente, S.; Pizza, C.; Albert, K.; Dachtler, M.; Vilegas, W. Planifolin, a New Naphthopyranone Dimer and Flavonoids from *Paepalanthus planifolius*. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 122–124.
23. Amaral, F.P.; Napolitano, A.; Masullo, M.; Santos, L.C.; Pizza, C.; Vilegas, W.; Piacente, S. HPLC-ESIMSⁿ Profiling, Isolation, Structural Elucidation, and Evaluation of the Antioxidant Potential of Phenolics from *Paepalanthus geniculatus*. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 547–556.
24. Santos, L.C.; Silva, M.A.; Rodrigues, C.M.; Carbone, V.; Napolitano, A.; Bassarello, C.; Mari, A.; Piacente, S.; Pizza, C.; Vilegas, W. Characterization of Flavonoid and Naphthopyranone Derivatives from *Eriocaulon ligulatum* using Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Nat. Prod. Commun.* **2009**, *4*, 1651–1656.
25. Mabry, T.J.; Markham, K.R.; Thomas, M.B. *The Systematic Identification of Flavonoids*; Springer-Verlag: New York, NY, USA, 1970.
26. Dokkedal, A.L.; Lavarda, F.; Santos, L.C.; Vilegas, W. Xeractinol—A new flavanonol C-glucoside from *Paepalanthus argenteus* var. *argenteus* (Bongard) Hensold (Eriocaulaceae). *J. Braz. Chem. Soc.* **2007**, *18*, 437–439.
27. Santos, L.C.; Piacente, S.; Pizza, C.; Toro, R.; Sano, P.T.; Vilegas, W. 6-Methoxyquercetin-3-O-(6E-feruloyl)-β-D-glucopyranoside from *Paepalanthus polyanthus* (Eriocaulaceae). *Biochem. Syst. Ecol.* **2002**, *30*, 451–456.
28. Park, E.J.; Kim, Y.; Kim, J. Acylated Flavonol Glycosides from the Flower of *Inula britannica*. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 34–36.
29. Agrawal, P.K. *Carbon¹³H-NMR of Flavonoids*; Elsevier: New York, NY, USA, 1989.

30. Andrade, F.D.P.; Santos, L.C.; Dokkedal, A.L.; Vilegas, W. Acyl glucosylated flavonols from *Paepalanthus* species. *Phytochemistry* **1999**, *51*, 411–415.
31. Cardoso, C.A.L.; Zanutto, F.V.; Varanda, E.A.; Sano, P.T.; Vilegas, W.; Santos, L.C. Quantification of Flavonoids, Naphthopyranones and Xanthones in Eriocaulaceae Species by LC-PDA. *Am. J. Analyt. Chem.* **2012**, *3*, 138–146.
32. Tavares, D.C.; Varanda, E.A.; Andrade, F.D.P.; Vilegas, W.; Takahashi, C.S. Evaluation of the genotoxic potential of the isocoumarin paepalantine *in vivo* and *in vitro* mammalian systems. *J. Ethnopharmacol.* **1999**, *68*, 115–120.
33. Rietjens, I.M.C.M.; Boersma, M.G.; van der Woude, H.; Jeurissen, S.M.F.; Schutte, M.E.; Alink, G.M. Flavonoids and alkenylbenzenes: Mechanisms of mutagenic action and carcinogenic risk. *Mutat. Res.* **2005**, *574*, 124–138.
34. Maron, D.M.; Ames, B.N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.* **1983**, *113*, 173–215.
35. Bernstein, L.; Kaldor, J.; Mccann, J.; Pike, M.C. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the *Salmonella* test. *Mutat. Res.* **1982**, *97*, 267–281.

Sample Availability: Samples of the compounds are available from the authors.

© 2013 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>)

Quantification of Flavonoids, Naphthopyranones and Xanthenes in Eriocaulaceae Species by LC-PDA

Claudia Andrea Lima Cardoso¹, Fabiana Volpe Zanutto², Eliana Aparecida Varanda²,
Paulo Takeo Sano³, Wagner Vilegas^{4,5}, Lourdes Campaner dos Santos^{5*}

¹UEMS, Course of Chemistry, State University of Mato Grosso do Sul, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil

²Department of Biological Sciences, Faculty of Pharmaceutical Sciences,

UNESP-Universidade Estadual Paulista, Araraquara, Sao Paulo, Brazil

³Institute of Biosciences, Department of Botany, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

⁴Campus Experimental do Litoral Paulista, UNESP-Universidade Estadual Paulista,

Sao Vicente, Sao Paulo, Brazil

⁵Institute of Chemistry, Department of Organic Chemistry,

UNESP-Universidade Estadual Paulista, Araraquara, Sao Paulo, Brazil

Email: *loursant@iq.unesp.br

Received November 19, 2011; accepted December 21, 2011; accepted January 5, 2012

ABSTRACT

The linearity, stability, accuracy and inter-day precisions of the assay method were evaluated in methanolic aerial-part extracts of *Paepalanthus giganteus* and *Syngonanthus nitens* from the Eriocaulaceae family. Their small capitulae hinder morphological analysis, and thus complicate taxonomic studies of these species, which present anti-ulcer, antimutagenic and antioxidant activities. Taxonomic studies of these plants revealed that the *Paepalanthus* genus presents flavonols and naphthopyranones while the *Syngonanthus* genus has flavone and xanthone as majority compounds. The prepared samples were analyzed quantitatively by High Performance Liquid Chromatography with PDA detection for the presence of quercetin, luteolin, 3,6-dimethoxy-1,5,7-tri-hydroxyxanthone and paepalantine. The substances were recovered from these samples at rates from 98.01% to 99.99%. The coefficient of variation in the quantitative analysis of the sample compounds was under 5%. The linearity of the method was determined by linear regression. The analysis of the samples spiked with known amounts of analyte demonstrated that the response was proportional to the concentrations of the samples with respective determination coefficients of $r^2 = 0.9999$ (luteolin and 3,6-dimethoxy-1,5,7-tri-hydroxyxanthone) and $r^2 = 0.9998$ (quercetin and paepalantine) for the linear range of the analytical calibration curves of the samples. The detection limits were $0.07 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for quercetin and luteolin, $0.06 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for 3,6-dimethoxy-1,5,7-tri-hydroxyxanthone and $0.10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for paepalantine. The quantification limits were $0.23 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for quercetin and luteolin, $0.20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for 3,6-dimethoxy-1,5,7-tri-hydroxyxanthone and $0.33 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for paepalantine by LC. The method was considered sensitive for quantification of the quercetin, luteolin, 3,6-dimethoxy-1,5,7-tri-hydroxyxanthone and paepalantine in plant samples.

Keywords: LC-PDA; Naphthopyranone; Flavonoid; Xanthone

1. Introduction

Eriocaulaceae is an unusual monocotyledonous plant family that shares with the Asteraceae the presence of a capitula in the inflorescence, a fact that accounts for the phrase “the Compositae of the monocotyledons”, which has been employed to emphasize this morphological convergence [1,2].

Our interest in naphthopyranones and xanthenes has now led us to investigate the methanolic extract from the capitula and scape of two species, *Paepalanthus giganteus* and *Syngonanthus nitens*.

Syngonanthus nitens (Bong.) Ruhland is a grass-like species of Eriocaulaceae [3], a pantropical, predominantly herbaceous monocotyledonous family that comprises around 1100 species in 11 genera [1,2]. The plants are clonal, and fertile rosettes can annually produce from 1 to 10 scapes (flower stalks or stems), with each scape bearing a capitulum flower [4]. The flower stems of *S. nitens* are bright and assume a beautiful golden color when dried, acquiring a phenomenal aesthetic similarity to spun gold, hence their common name “capim dourado” (golden grass). This grass-like species occurs throughout the Brazilian Cerrado, in areas of intermediate humidity within the humid grasslands [4].

*Corresponding author.

The chemical studies performed by Pacifico [5] identified significant differences between capitulae and the scapes of *S. nitens*. Xanthenes and flavones were identified in the capitulae, while the scapes presented mostly flavones. This study also served to establish taxonomic relationships between the genera *Leiothrix* and *Syngonanthus*.

Paepalanthus giganteus Sano is a species belonging to the family Eriocaulaceae, genus *Paepalanthus*. It constitutes the largest genus in the family, comprising about 450 species [6]. This genus has as its main feature great morphological variability [7], which hampers morphological classification.

The present work includes the first known chemical investigation of the species *P. giganteus*. The LC-PDA profile of the methanolic extract showed UV spectra typical of flavonols and naphthopyranones (Table 1, Figures 1(a) and 1(b)).

Given the difficulty of obtaining sufficient mass of polar extracts for the purification of compounds due to the smallness of the capitulae in the species Eriocaulaceae, new methodologies must be sought to simplify its chemical study. Therefore, the present study aims to evaluate the sensitivity, linearity, accuracy and inter-day precision of flavonoids, xanthenes and naphthopyranones in methanolic extracts of capitulae and scapes from *S. nitens* and *P. giganteus*, two member species of Eriocaulaceae.

2. Materials and Methods

2.1. Reagents

Spectroscopy grade acetonitrile and methanol were purchased from Merck (Darmstadt, a collection in our laboratory). Stock mixtures of these standards were constituted from individual solutions, dissolved in methanol and then used as external standards. Standards of quercetin and luteolin were purchased from Sigma Aldrich. Standards of the 3,6-dimethoxy-1,5,7-tri-hydroxyxanthone and paepalantine were obtained from a collection purified by chromatography in our laboratory and revealed a purity of 98.5%. These stock mixtures were used as external standards.

2.2. Plant Material

Capitulae and scapes of *S. nitens* and *P. giganteus* were collected, respectively, in December 2009 in Jalapão city, Tocantins state, and February, 2010 at Serra do Cipó, Minas Gerais state, Brazil, and authenticated by Professor Dr. Paulo Takeo Sano of the São Paulo University (USP), São Paulo state, Brazil. Voucher specimens of *S. nitens* (SPF 189975) and *P. giganteus* (3736 SPF) were deposited at the Herbarium of the IB-USP.

2.3. Extraction

Dried and powdered capitulae (416 g) of *S. nitens* and

Table 1. Compounds identified in methanolic extracts from *S. nitens* and *P. giganteus*.

Specie name	1	2	3	4
<i>S. nitens</i> (c)	x		x	
<i>S. nitens</i> (e)	x			
<i>P. giganteus</i> (c)		x		x
<i>P. giganteus</i> (e)		x		x

X: presence; c: capitulae; e: scape; Luteolin (1); Quercetin (2); 3,6-dimethoxy-1,5,7-trihydroxyxanthone (3); Paepalantine (4)

(256 g) of *P. giganteus* and scapes (176.7 g) of *P. giganteus* and (410 g) of *S. nitens* were separately and successively extracted for one week, at room temperature, with methanol. The crude methanolic extracts were obtained after filtration and evaporated to dryness in a vacuum at a temperature no greater than 40°C; the respective masses and recuperation rates obtained from *S. nitens* were: 11.8 g from capitulae (2.87%), and 16.0 g from scapes (3.90%) while those from *P. giganteus* were: 15.0 g from capitulae (5.86%), and 6.81 g from scapes (3.85%).

2.4. Clean Up of Extracts

In the *clean-up* step of the methanolic extracts, a small mass (1 mg) of sample for each 10 mg of the C-18 reversed-phase was applied to the SPE cartridges. In C-18, the cartridge had been previously activated with methanol (4 mL) and then environed with water (5 mL). The material to be applied in support of SPE had been previously dissolved in approximately 0.5 mL of methanol with the aid of ultrasound and 2 mL of H₂O was added into the solution. The elution in C-18 followed the general order (methanol/water, 5:95 v/v, methanol/water, 1:1 v/v, and methanol); however, adjustments were made during the optimizations. All the fractions were injected into the LC-PDA and the fractions with the highest number of peaks are represented in Figures 1(a) and 1(b).

2.5. Preparation of Standards for Analysis by LC-PDA

The samples of standards (quercetin, luteolin, 3,6-dimethoxy-1,5,7-trihydroxyxanthone and paepalantine (0.1 g)) were dissolved in 3 mL of methanol, separately, filtered through a 0.45 µm Millex filter and the resulting solutions were diluted separately in methanol in a volumetric flask (5 mL each) for analysis by LC-PDA.

2.6. Fingerprint of the Methanolic Extract of the Capitulae and Scapes from *P. giganteus* by LC-PDA

The chromatographic profiles of methanolic extracts of the capitulae and scapes from *P. giganteus* were obtained in a LC-(Jasco ®) equipped with a photodiode array detector (PDA), utilizing a C-18 reversed-phase column.

Phenomenex ® Luna (2) (250 × 4.6 mm id, 5 mm). The mobile phase composition was: water acidified with 0.1 % TFA, pH 2.5 (eluent A) and methanol with 0.1 % TFA,

pH 5.5 (eluent B). The gradient program was as follows: 5% - 100% B (55 min) and flow rate 1.0 mL·min⁻¹ monitored at $\lambda = 200 - 400$ nm.

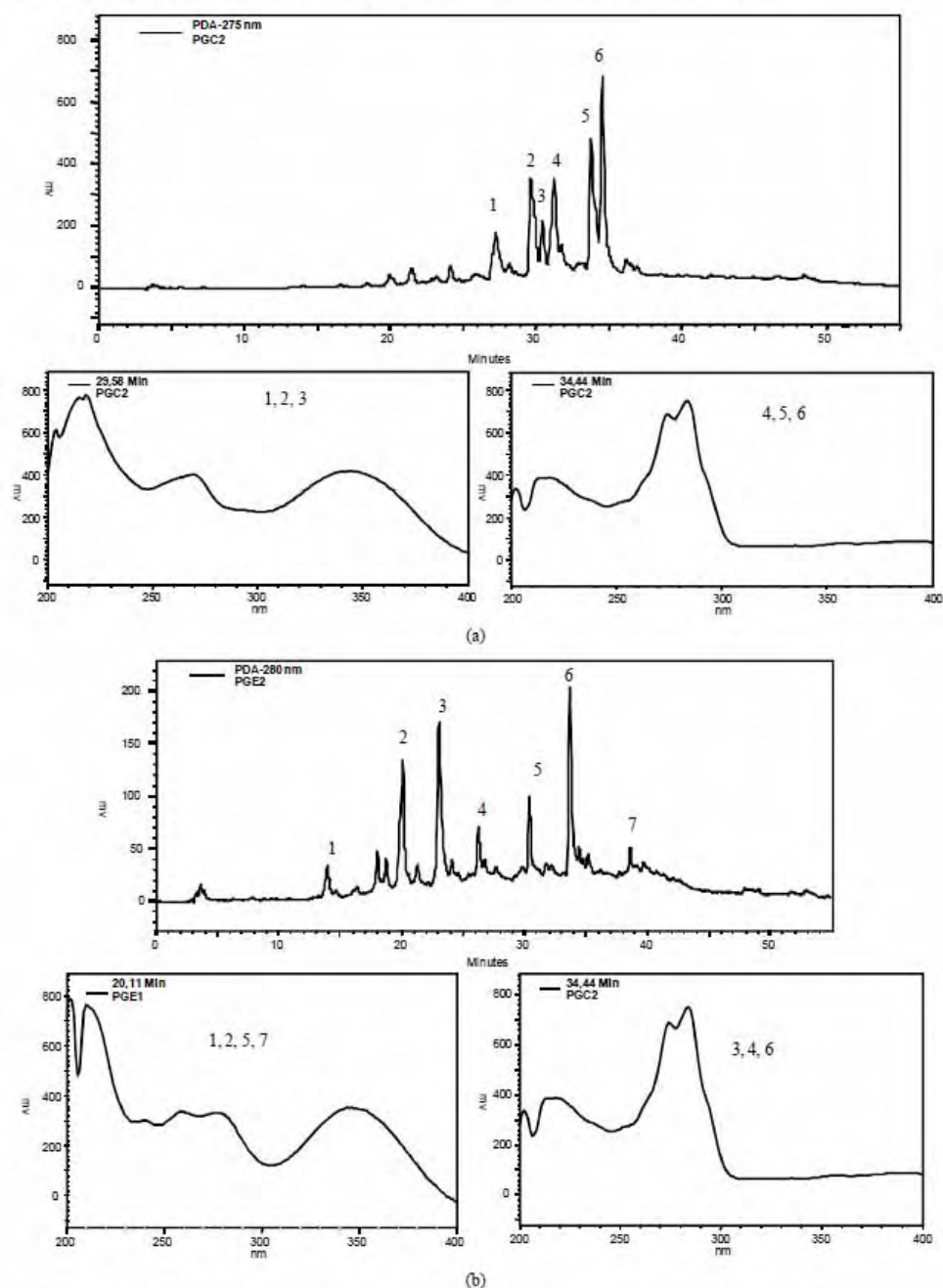


Figure 1. (a) Fingerprint by LC-PDA of the methanolic extract from *P. giganteus* capitulae. For chromatographic conditions, see the experimental section; (b) Fingerprint by LC-PDA of the methanolic extract from *P. giganteus* scapes. For chromatographic conditions, see the experimental section.

2.7. Preparation of Methanolic Extracts for Quantification by LC-PDA

Samples of capitulae from *P. giganteus* (1 g) and *S. nitens* (1 g) and scapes *S. nitens* (1 g) and *P. giganteus* (1 g) were separately extracted with 8 mL of methanol for 60 min in ultrasound, filtered with a 0.45 μm Millex filter after which the solutions were diluted with methanol in a volumetric flask (10 mL) for LC analysis. The validation procedure was performed according to the International Conference on Harmonization Guidelines (Validation of Analytical Procedures, Text on Validation of Analytical Procedures Q2A and Q2B) [8].

2.8. LC-PDA Analysis of Standards and Methanolic Extracts of Capitulae and Scapes from *S. nitens* and *P. giganteus*

The methanolic extracts obtained from the samples were analyzed on an analytical LC (Varian 210) system with a ternary solvent delivery system equipped with an autosampler, a photodiode array detector (PDA) and the software Star WS (Workstation), which was used to measure the peak areas of the chromatogram. The LC column was a C-18 (25 cm $\times$ 4.6 mm; particle size, 5 μm) (Luna, Phenomenex, Torrance, CA, USA), with a small pre-column (2.5 cm $\times$ 3 mm) containing the same packing, used to protect the analytical column. The flow rate of 1.0 mL/min and injected volume of 10 μL were used for each analysis. All chromatographic analyses were performed at 22°C. Elution was carried out using the following solvent-gradient program for standards (quercetin and paepalantine) and capitulae and scapes from *S. nitens*: water:acetonitrile (85:15, v/v) taking 40 minutes to reach 45% water and 55% acetonitrile, then returning in exactly 5 minutes to the initial conditions (Figures 2(a) and (b)). For the standards (luteolin and 3,6-dimethoxy-1,5,7-trihydroxyxanthone) and capitulae and scapes from *P. giganteus*: water: acetonitrile (80:20, v/v) taking 60 minutes to reach 100% acetonitrile, returning after 5 minutes to the initial conditions (Figures 3(a) and (b)).

2.9. Method Validation

2.9.1. Determination of the Detection and Quantification Limits

The detection limits were determined by injecting ($n = 5$) solutions of quercetin, luteolin, 3,6-dimethoxy-1,5,7-trihydroxyxanthone and paepalantine of known concentration (10 μL each) and then decreasing the concentrations of the samples until detection of a peak with a signal/noise ratio of 3. The corresponding concentration was considered the minimal detectable concentration. The quantification limits were determined by performing the same methodology and thus, the quantification limit was defined as the chromatographic peak having a signal/

noise ratio of 10.

2.9.2. Extraction Recovery

The extraction efficiency (recovery) was determined by analyzing aliquots of each sample spiked with the standards corresponding to low, medium and high concentrations. The spiked samples were submitted to the same procedure as described in Section 2.7.

2.9.3. Linearity

The content estimation of the quercetin (0.20 - 40.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), luteolin (0.23 - 40.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), paepalantine (0.20 - 40.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and 3,6-dimethoxy-1,5,7-trihydroxyxanthone (0.20 - 40.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) in the samples was performed by external calibration. The compounds in the study were dissolved separately in spectroscopy grade methanol in order to obtain stock solutions, which were appropriately diluted for each of the substances. Aliquots of 10 μL dilutions for each standard were analyzed via LC with each determination being carried out five times. For each standard, the corresponding chromatogram was obtained and a graph was constructed from the mean of the chromatogram areas plotted against the concentration of each substance. A linear least-square regression of the peak areas as a function of the concentrations was performed to determine the correlation coefficients. The equation parameters (slope and intercept) of each standard curve were used to obtain the concentration values for the samples. Specimens with an analytic concentration exceeding the analytical curve were re-assayed upon appropriate dilution of the samples.

2.9.4. Accuracy and Precision

The accuracy of the assayed method was evaluated by performing replicate analyses against an analytical calibration curve and calculating the mean percentage differences between the theoretical values and the measured values. The accuracy values in the inter-day variation studies using LC at low, medium and high concentrations of quercetin, luteolin, paepalantine and 3,6-dimethoxy-1,5,7-trihydroxyxanthone were evaluated in extracts A-D. Method precision, expressed as the percentage of the coefficient of variation (CV) of the replicate measurements, was tested for inter-day repeatability via LC. The inter-day variability of the method was determined from three different analyses ($n = 5$) of each sample with an addition of known amounts of analyte at low, medium and high concentrations.

2.9.5. Stability Study

The stability of the working standard solutions was tested at 22°C (working temperature), 4°C and -20°C (storage temperatures). The stability of quercetin, luteolin, paepalantine and 3,6-dimethoxy-1,5,7-trihydroxyxanthone in the

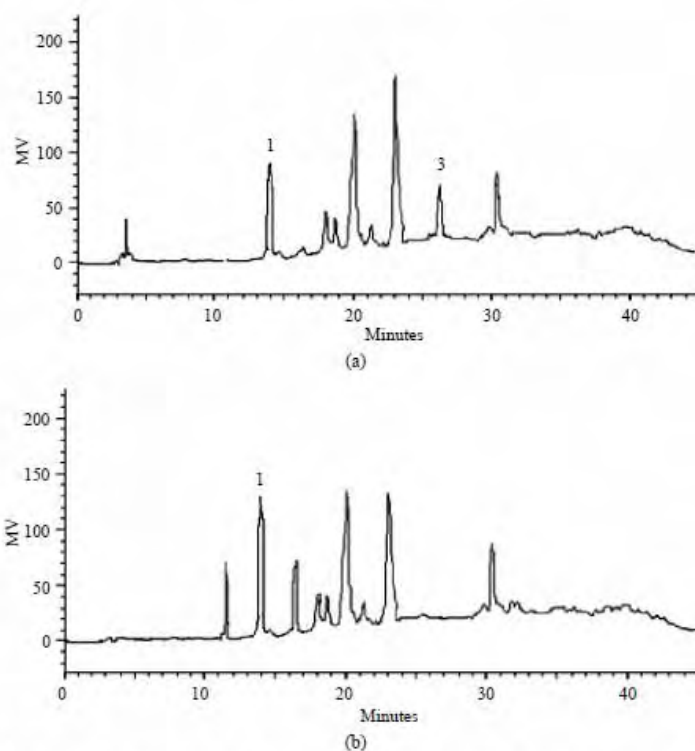


Figure 2. (a). LC-PDA of methanolic extract from *S. nitens* capitulae. For chromatographic conditions, see the experimental section; (b) LC-PDA of methanolic extract from *S. nitens* scapes. For chromatographic conditions, see the experimental section.

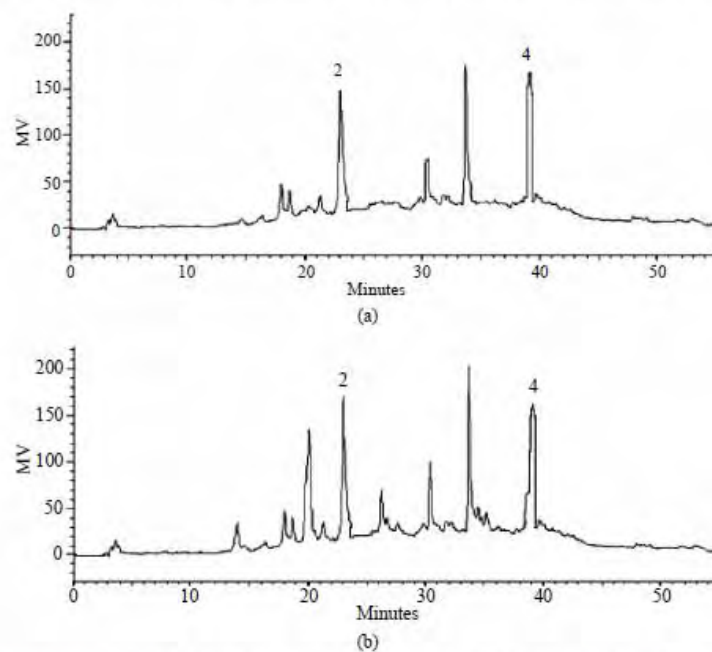


Figure 3. (a) LC-PDA of methanolic extract from *P. giganteus* capitulae. For chromatographic conditions, see the experimental section. (b) LC-PDA of methanolic extract from *P. giganteus* scapes. For chromatographic conditions, see the experimental section.

samples was evaluated during all the storage steps (i.e., at room temperature, at 4°C and at -20°C). Spiked samples were analyzed against the analytical calibration curves immediately after preparation (reference values) and after storage. Stability was defined as being less than 2% loss of the initial drug concentration in the stated time.

3. Results and Discussion

Earlier studies by our group have demonstrated promising antiulcer activity of *S. nitens*. Studies of capitulae and scapes of *S. nitens* [5] showed a high content of polar substances. The authors used the technique of high-speed counter-current chromatography (HSCCC) for the study, thus yielding impure fractions in which some flavonoids and xanthenes were identified. The complexity of the extracts comprised the phytochemical study of this material using traditional techniques of isolation, time and solvent consumption. The many other chromatographic techniques used to isolate the substances included gel permeation (GPC) using Sephadex LH-20 which was not efficient in the separation of secondary metabolites. Factors such as the strong adsorption of substances and the necessity of using large amounts of solvents for the elution of metabolites with subsequent steps for the regeneration of support led us to establish a new research strategy.

To assess *P. giganteus*, we are starting from its phytochemical studies; however, the paucity of material collected has also resulted in a lower amount of extract, which sometimes hinders the purification of substances for further identification. Thus, we opted to develop a methodology based on analysis by LC-PDA in an attempt to enable direct identification of major secondary metabolites using co-injection of authentic standards and/or substances previously isolated and characterized in species of the genus.

3.1. Identification of the Compounds with LC-PDA

Identification of the compounds with the aid of PDA detector scanning in the spectral range of 200 - 600 nm revealed two classes of compounds in the methanolic extracts of capitulae and scapes of *P. giganteus* (Figures 1(a) and (b)). Flavonols and naphthopyranones were easily

identified based on their absorption spectra in the UV region. Flavonols exhibited bands around 260 nm and 346 nm [9]. The naphthopyranones showed maximum intensity of absorption bands in the region of 273 nm and a weak band at 325 nm [10], (Figures 1(a) and (b)).

Some of the secondary metabolites found in methanol extracts of capitulae and scapes from *S. nitens* (Figures 2(a) and (b)) and *P. giganteus* (Figures 3(a) and (b)) could be identified unambiguously by performing co-injection experiments in which aliquots of the extracts and standards were mixed and diluted to a known volume, and analyzed through LC by more than one elution method (gradient and/or isocratic). Thus, the peaks of the chromatograms in Figures 2(a), 2(b), 3(a), 3(b) with retention times t_r (13.47; 24.22; 27.79 and 39.04 min) were identified as luteolin, quercetin, 3,6-dimethoxy-1,5,7-trihydroxyxanthone and paepalantine, respectively (Tables 1 and 2, Figure 4). The relative standard deviation for the retention times of replicated injections ($n = 5$) were less than 5%, thereby demonstrating good repeatability.

3.2. Method Validation

3.2.1. Linearity

Calibration curves were determined by linear regression using LC (Table 3). The linearity for compounds 1-4 was assessed at 5 concentration ranges, respectively, for quercetin (0.20 - 40.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), luteolin (0.23 - 40.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), paepalantine (0.20 - 40.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and 3,6-dimethoxy-1,5,7-trihydroxyxanthone (0.20 - 40.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (Table 3). The average standard errors for the peak areas of replicated injections ($n = 5$) were less than 1%, thus showing good repeatability of the calibration curve. The respective coefficients of determination were $r^2 = 0.9998$ for quercetin and paepalantine and $r^2 = 0.9999$ for luteolin and 3,6-dimethoxy-1,5,7-trihydroxyxanthone.

Table 2. Retention times of the standard samples.

Retention times (minutes)	$t_r \pm \text{SD}$	RSD%
Luteolin (1)	13.47 $\pm$ 0.62	4.60
Quercetin (2)	24.22 $\pm$ 0.51	2.11
3,6-dimethoxy-1,5,7-trihydroxyxanthone (3)	27.79 $\pm$ 0.97	3.49
Paepalantine (4)	39.04 $\pm$ 0.51	1.31

t_r : retention time; SD: standard deviations; RSD: Relative standard deviation

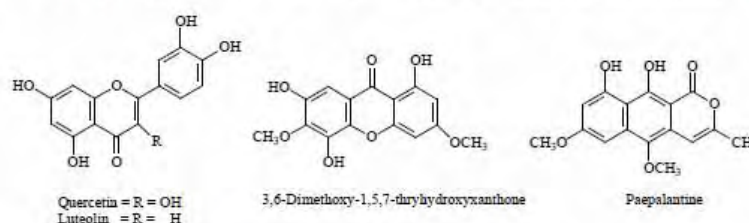


Figure 4. Structure of compounds identified.

Table 3. Regression data of the analytical calibration curves for quantitative determination of the substances by LC.

Parameters	1	2	3	4
LR $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	0.23 - 40.00	0.23 - 40.00	0.20 - 40.00	0.33 - 40.00
B	6.2675×10^6	16.4581×10^6	6.0897×10^6	5.9975×10^6
RSDS	4.67	3.78	4.98	4.99
A	0.0732×10^6	-2.0901×10^6	0.0539×10^6	0.0830×10^6
RSDI	4.78	3.92	4.59	4.34
r^2	0.9999	0.9998	0.9999	0.9998
LOD	0.07	0.07	0.06	0.10
LOQ	0.23	0.23	0.20	0.33
N	15	15	15	15

LR: linear range; b: slope; a: intercept; RSDS: Relative standard deviation of the slope; RSDI: Relative standard deviation of the intercept; r^2 : determination coefficient; n: number of samples. Linear regression, formula: $y = a + bx$, where y = ratio of peak areas; x = concentration ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); a = intercept and b = slope. Luteolin (1); Quercetin (2); 3,6-dimethoxy-1,5,7-trihydroxyxanthone (3); Paepalantine (4).

The analytical procedure was verified from the linearity of the assayed method as expressed by the correlation coefficient obtained, which was evaluated by analyzing each sample (extracts A-D) spiked with a known amount of the analyte at low, medium and high concentrations, which showed that the response was proportional to the concentrations of the samples; the respective coefficients of determination were $r^2 = 0.9994$ for quercetin and paepalantine and $r^2 = 0.9996$ for luteolin and 3,6-dimethoxy-1,5,7-trihydroxyxanthone.

3.2.2. Detection Limit

The detection limits were $0.07 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for quercetin and luteolin, $0.06 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for 3,6-dimethoxy-1,5,7-trihydroxyxanthone and $0.10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for paepalantine (Table 3) based on the signal-to-noise ratio (S/N) for 3.

3.2.3. Quantification Limit

The quantitation limit was defined as the lowest concentration level that provided a peak area with a signal-to-noise ratio higher than 10, a precision (% CV) within $\pm 5\%$ and accuracy (% recovery) between 98% and 100%. The quantification limits by LC were $0.23 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for quercetin and luteolin and $0.20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for 3,6-dimethoxy-1,5,7-tri- and hydroxyxanthones $0.33 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for paepalantine. The results suggest that substances in plants at these concentrations can be estimated accurately.

3.2.4. Extraction Recovery

The efficiency of each analytical procedure was evaluated by calculating the recovery values.

Recovery (98.01% - 99.99%) results show that the procedure utilized to extract the substances of interest was efficient with relative standard deviation lower than $\pm 5\%$ (Table 4), thus ensuring good recovery of these substances in plants.

Table 4. Recovery of the (1) and (3) in methanolic extracts of *S. nitens* and (2) and (4) in methanolic extracts of *P. giganteus* (n = 5).

(1) (%) (Mean $\pm$ SD)		
Conc. add ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	A	B
1	98.31 ± 1.26	99.80 ± 0.91
20	98.99 ± 0.75	99.99 ± 0.87
40	99.73 ± 0.97	99.93 ± 0.97
(2) (%) (Mean $\pm$ SD)		
Conc. add ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	C	D
1	98.67 ± 1.15	98.99 ± 0.81
20	98.89 ± 0.67	98.94 ± 1.01
40	99.69 ± 0.89	99.31 ± 0.90
(3) (%) (Mean $\pm$ SD)		
Conc. add ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	A	B
1		99.39 ± 1.02
20		99.96 ± 0.70
40		99.91 ± 0.53
(4) (%) (Mean $\pm$ SD)		
Conc. add ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	C	D
1	98.37 ± 0.63	98.66 ± 0.92
20	98.03 ± 0.51	98.76 ± 0.91
40	98.01 ± 0.49	99.02 ± 0.86

Conc: concentration; SD: standard deviation. A: methanolic extract of *S. nitens* scapes; B: methanolic extract of *S. nitens* capitulae; C: methanolic extract of *P. giganteus* capitulae; D: methanolic extract of *P. giganteus* scapes.

3.2.5. Stability

The identification of quercetin, luteolin, paepalantine and 3,6-dimethoxy-1,5,7-trihydroxyxanthone and the samples (methanolic extracts of capitulae and scapes of the species studied) was performed by comparing their retention times with authentic standards through adding standard solutions to the samples analyzed by LC and by comparing its UV-Vis spectrum [9,10]. There were no alterations detected in the working solutions prepared (quercetin, luteolin, 3,6-dimethoxy-1,5,7-trihydroxyxanthone and paepalantine) after 24 hours at 22°C , two months at 4°C and four months of storage at -20°C . Therefore, this validated method for the determination of the flavonoids, xanthones and naphthopyranones can be considered adequate to indicate the stability of the solutions.

3.2.6. Accuracy and Precision

As to the precision of the assay, inter-day coefficients of variation were lower than $\pm 5\%$. The international acceptance criteria (CV for precision better than 15% and recovery values) were met [11]. The inter-day variability of the method tested was determined at low, medium and high concentrations. The results are presented in Table 5. These data indicate that the method was reproducible on three different days.

3.3. Contents in *S. nitens* and *P. giganteus*

The contents of substances were described in Table 6.

Table 5. Inter-day accuracy and precision of the LC method for determining the substances (1 - 4) in samples (n = 5 for each sample).

1				2			
C add. µg·mL ⁻¹	C found. µg·mL ⁻¹ (M ± SD)	Ac (%)	CV (%)	C found. µg·mL ⁻¹ (M ± SD)	Ac (%)	CV (%)	
1	1.03 ± 0.05	3.00	4.85	1.01 ± 0.04	1.00	3.96	
20	19.51 ± 0.53	2.45	2.72	20.02 ± 0.47	0.10	2.35	
40	39.32 ± 0.91	1.70	2.31	39.51 ± 0.85	1.23	2.15	

3				4			
C add. µg·mL ⁻¹	C found. µg·mL ⁻¹ (M ± SD)	Ac (%)	CV (%)	C found. µg·mL ⁻¹ (M ± SD)	Ac (%)	CV (%)	
1	1.03 ± 0.04	3.00	4.85	1.01 ± 0.04	1.00	3.96	
20	19.51 ± 0.53	2.45	2.72	20.02 ± 0.47	0.10	2.35	
40	39.3 ± 0.91	1.70	2.31	39.51 ± 0.85	1.23	2.15	

C: concentration; CV: coefficient of variation; Ac: Accuracy; S.D.: standard deviations. Luteolin (1); Quercetin (2); 3,6-dimethoxy-1,5,7-trihydroxyxanthone (3); Paepalantine (4).

Table 6. Contents in µg/100 mg of extract A-D (mean ± SD) of the substances (1 - 4) employing the LC method.

Samples	1	2	3	4
A	458 ± 1.3	-	254 ± 1.7	-
B	350 ± 2.5	-	-	-
C	-	335 ± 2.4	-	455 ± 3.3
D	-	391 ± 1.1	-	431 ± 1.4

Conc: concentration; SD: standard deviation. A: methanolic extract of *S. nitens* scapes; B: methanolic extract of *S. nitens* capitulae; C: methanolic extract of *P. giganteus* capitulae; D: methanolic extract of *P. giganteus* scapes. Luteolin (1); Quercetin (2); 3,6-dimethoxy-1,5,7-trihydroxyxanthone (3); Paepalantine (4).

Quercetin and paepalantine were quantified in methanolic extracts of capitulae and scapes of *P. giganteus*. Luteolin is present in methanolic extract of both the capitulae and scapes from *S. nitens* while 3,6-dimethoxy-1,5,7-trihydroxyxanthone is present only in methanolic extract of the capitulae from *S. nitens*. The results from this method indicate that a variation coefficient of lower than 5% is adequate.

4. Conclusion

The implementation of the proposed work has demonstrated savings in time when compared to the classical phytochemical study. This factor avoids the performance of strenuous tasks that result in repeated substance isolation. The work also contributed to reducing the waste load generated by the use of organic solvents during the stages of preparation of extracts and chromatographic separation. This approach requires little organic solvent, which is easily discarded after the preparation steps. As an added benefit, small quantities of plant material are needed, which are indispensable in the study of Eriocaulaceae due to low mass preparation of the extracts pre-

sented. The recent literature does not report the presence of these substances in *P. giganteus* while for *S. nitens* the 3,6-dimethoxy-1,5,7-trihydroxyxanthone and luteolin have been identified by Pacifico [5]. On the other hand, flavonols and derivatives of paepalantine have been widely identified in the *Paepalanthus* genus [10,12]. Therefore, both species, when measured by LC-PDA, differ as to the existence of some flavonoids such as quercetin in extracts of *P. giganteus* and luteolin in *S. nitens*. Although the capitulae and scapes present similar profiles, the concentrations of these substances differ between the capitulae and scapes. Finally, we hope that our approach can contribute to the study of other plant species by providing a rapid and important strategy for the recognition of the chemical composition among Eriocaulaceae species. In addition, new parameters can be evaluated, especially when considering the occurrence of other classes of substances found in vegetable matrices, thus opening up new perspectives for future studies.

5. Acknowledgements

The authors thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), for funding and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), for grants to L. C. Santos.

REFERENCES

- [1] M. Giulietti, V. L. Scatena, P. T. Sano, L. R. Parra, L. P. Queiroz, R. M. Harley, N. L. Menezes, A. M. B. Yseppon, A. Salatino, M. L. Salatino, W. Vilegas, L. C. Santos, C. V. Ricci, M. C. P. Bonfim and E. B. Miranda, "Multi-Disciplinary Studies on Neotropical Eriocaulaceae," In: K. L. Wilson and D. A. Morrison, Eds., *Monocots: Systematics and Evolution*, Melbourne, CSIRO Publishing, Vol. 1, 2000, pp. 580-588.
- [2] P. T. Sano, "Actinocephalus (Körn.) Sano (Paepalanthus sect. Actinocephalus), a New Genus of Eriocaulaceae, and Other Taxonomic and Nomenclatural Changes Involving *Paepalanthus* Mart.," *Taxon*, Vol. 53, No. 1, 2004, pp. 99-107. doi:10.2307/4135493
- [3] A. M. Giulietti, M. G. L. Wanderley, H. M. Longhi-Wagner, J. R. Pirani and L. R. Parra, "Estudos em sempre-vivas: Taxonomia com Ênfase nas Espécies de Minas Gerais, Brasil," *Acta Botanica Brasílica*, Vol. 10, No. 2, 1996, pp. 329-377.
- [4] B. Schmidt, I. B. Figueiredo, F. Borghetti and A. Scariot, "Produção e Germinação de Sementes de 'capim dourado', *Syngonanthus nitens* (Bong.) Ruhland (Eriocaulaceae): Implicações Para o Manejo," *Acta Botanica Brasílica*, Vol. 22, No. 1, 2007, pp. 37-42. doi:10.1590/S0102-33062008000100005
- [5] M. Pacifico, A. Napoletano, F. Hilario, C. Pizza, S. Piacente, W. Vilegas and L. C. Santos, "Metabolite Fingerprinting of Capim Dourado (*Syngonanthus nitens*), a Basis of Brazilian Handcrafts," *Industrial Crops and Prod-*

- ucts, Vol. 33, No. 2, 2011, pp. 488-496.
[doi:10.1016/j.indcrop.2010.10.023](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.10.023)
- [6] T. Stützel, "Monocotyledons: Alismatanae and Commelinanae (except Gramineae). Flowering Plants: The Families and Genera of Vascular Plants," Springer-Verlag, K Kubitzki, Berlin, Vol. 4, 1998, pp. 197-207.
- [7] V. L. Scatena and A. R. S. Moraes, "Anatomia de Raízes, Folhas e Escapos de *Paepalanthus* Subgênero *Platycaulon* (Eriocaulaceae) da Serra do Cipó-MG," *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, Vol. 39, 1996, pp. 1021-1035.
- [8] W. Vilegas, C. A. L. Cardoso and A. E. Pires, "Química de Produtos Naturais, Novos Fármacos e a Moderna Farmacognosia," Univali: Itajai, SC, Brasil, 2009.
- [9] T. J. Mabry, K. R. Markham and M. B. Thomas, "The Systematic Identification of Flavonoids," Springer-Verlag, New York, 1970.
- [10] W. Vilegas, A. L. Dokkedal, L. Rastrelli, S. Piacente and C. Pizza, "New Naphthopyranone Glycoside from *Paepalanthus vellozioides* and *P. latipes*," *Journal of Natural Products*, Vol. 62, 1999, pp. 746-749.
[doi:10.1021/np980082t](https://doi.org/10.1021/np980082t)
- [11] V. P. Shah, K. K. Midha, S. Dighe, I. McGilvery, J. P. Skelly, A. Yakobi, T. Layloff, C. T. Viswanathan, C. E. Cook, R. D. McDowall, K. A. Pittman and S. Spector, "Analytical Methods Validation: Bioavailability, Bioequivalence, and Pharmacokinetic Studies," *Pharmaceutical Research*, Vol. 9, No. 4, 1992, pp. 588-592.
[doi:10.1023/A:1015829422034](https://doi.org/10.1023/A:1015829422034)
- [12] W. Vilegas, C. J. Nehme, A. L. Dokkedal, S. Piacente, L. Rastrelli and C. Pizza, "Quercetagenin 7-methyl Ether Glycosides from *Paepalanthus vellozioides* and *P. latipes*," *Phytochemistry*, Vol. 51, No. 3, 1999, pp. 403-409.
[doi:10.1016/S0031-9422\(99\)00009-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(99)00009-6)